

Université Bordeaux 1

Année 2006

Thèse N°3225

Thèse
pour obtenir le

Doctorat de l'université Bordeaux1

Mention : Sciences du vivant, Géosciences, Sciences de l'Environnement
Option: Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement

le **06 Octobre 2006**

par **Chloë VAN OOSTENDE**

***Analyse quantitative des réponses précoces à l'auxine
dans une suspension de cellules de Tabac***

Membres du jury :

Mme. **Hélène BARBIER-BRYGOO**
M. **Alain PUGIN**
Mme. **Catherine BERGOUNIOUX**
M. **Dominique ROLIN**
M. **Jean-Pierre RENAUDIN**

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Madame H el ene Barbier-Brygoo, Directeur de Recherche-CNRS et Directrice de l'ISV de Gif-sur-Yvette, Madame Catherine Bergounioux, Directeur de Recherche-CNRS à l'IBP de l'Université de Paris XI, Monsieur Alain Pugin, Professeur à l'Université de Dijon et Monsieur Dominique Rolin, Professeur à l'Université de Bordeaux2, je vous pris d'accepter mes plus respectueux remerciements pour l'honneur que vous me faites de consacrer une partie de votre temps pour juger ce travail.

Mesdames et Messieurs les lecteurs, ce travail est le fruit de l'action de l'auxine sur les cellules végétales, mais aussi sur ces quatre années passionnantes pendant lesquelles j'ai pu étudier cette hormone. Cela m'a permis aussi de rencontrer une foule de gens d'un professionnalisme remarquable et à la sympathie de tous les instants : je remercie chacun d'eux pour le rôle qu'il a joué dans cette aventure.

Imaginez ! Une cellule au milieu du parc de l'INRA de Villenave d'Ornon, l'UMR PBV.

  l'intérieur au moins 4 "MAPKines" indispensables à la communication intracellulaire et à la transduction de la Connaissance : le Professeur D. ROLIN, C. CHEVALIER, les Directeurs de la "cellule", C. ROTHAN, et le Professeur S. HAMDI. Merci pour leur dévouement et l'investissement qu'ils mettent dans le bon fonctionnement de cette UMR,

Et puis il y a LE facteur de Croissance Principal de ce travail, le Professeur Jean-Pierre Renaudin, que je ne remercierai jamais suffisamment de m'avoir confié ce projet, de m'avoir initié à la culture cellulaire, de ses précieuses réflexions et discussions (des études cellulaires aux analyses transcriptionnelles), de m'avoir épaulée à tout moment ainsi que pour la minutieuse correction de ce manuscrit.

Un profond remerciement à mon chef d'équipe, C. Chevalier, qui a également été l'un des piliers de ce projet par ces compétences moléculaires et les discussions que nous avons pu avoir au cours de la thèse, ainsi que pour la correction de ce manuscrit.

Il y a tellement "d'enzymes" dans cette cellule qui ont "catalysé" ce projet !

Fred Gévaudan et Michel Hernould, dont l'énorme sympathie est à la hauteur de leur analyse scientifique ! Disponibles à tout moment de l'année, avec toujours un petit jeu de mot, pour associer à la Recherche beaucoup de Bonne Humeur ! Merci messieurs pour votre patience et vos conseils !

J'adresse également mes plus vifs remerciements à Gilles Basset, pour son implication et sa réflexion sur la recherche de la fonction du nouveau gène de réponse primaire à l'auxine : C4M41-2.

Je tiens également à remercier Annick, Monique, Christelle, Mickaël pour leur aide crucial lors des expériences d'HPLC, et de RMN ; ainsi qu'aux deux "belles fleurs" au milieu des plants de tabacs et de tomates, : Aurélie et Patricia, sans qui nous ne pourrions pas mener nos expériences in planta, et nous ne "chercherions" pas grand-chose.

J'adresse mes vifs remerciements aux cytologistes qui ont fourni un travail merveilleux, dans des conditions peu favorables, afin que l'étude de l'ultrastructure des cellules BY-2 figure dans ce manuscrit : Monsieur Jean-Pierre Carde, Catherine C. (que je remercie pour les corrections très constructives qu'elle a apporté à ce manuscrit), Martine P., Valérie R. et Nathalie F.

Merci également à Jean-Pierre D. et Alain R. pour leur disponibilité et leur sourire à tous moments de la journée (Merci d'avoir répondu dans la seconde à chaque fois que j'en avais besoin).

J'adresse un grand merci aux secrétaires dont le professionnalisme et la bonne humeur ont toujours été de précieux réconforts :   Catherine Thioulouse, Florence Lartigaut (notre Flo !) et ma Christelle Albrespic.

Un clin d'œil aux doctorants qui sont partis : Laurent, Nadège, Fred, Romain, Rim, Gianni (pas tout à fait parti) et Chloé, qui ont fait de la vie au labo un véritable plaisir. A la relève ! A ceux qui rament encore à leur paillasse, je souhaite tout le courage et la chance qu'il leur est nécessaire pour mener à bien leur projet ! (Adrien, Fabien, Elodie'cheu, Thilia, Raph et Imène).

Une note particulière à la prochaine à soutenir : Anne ! Une amie de tous les instants, dans les crises, comme dans les fêtes (finies sur le tapis... hi !hi !), mais aussi une 'High Level Researcher !', qui mérite une carrière formidable ! Son intelligence, son sourire et son caractère basquais ont été essentiels pendant ces 4 années, je lui en suis grandement reconnaissante !

Tout comme Nathalie Frangne dont le soutien a été primordial à la finalisation de ce projet -un ENORME merci-

Je n'oublie pas Fabinou, notre bactériologiste international ! qui a toujours été présent et qui je l'espère le restera, alors « rendez-vous dans nos R... ! »

Et il y a tous les "ribosomes" qui créent la vie à l'intérieur de la cellule, en partageant leur joie et leur réflexions : Claudine T-M, Virginie L., Phillipe G., François B., Céline L., les Valérie's" (R. et M.), Armand M., Philippe R., Martine L., Yo et Virginie, Lindada S. (sage comme une image... en apparence ☺) et notre Véro danseuse de salsa ! Merci à tous !

Ensuite il y a eu mon exocytose ! La Cellule m'a envoyée en Belgique, pour continuer ma maturation ! Et quelle maturation ! Apprendre les cDNA-AFLPs en Flandre, quelle aventure !

Je tiens à ce titre à remercier chaleureusement le Professeur D. Inzé pour m'avoir reçu au sein de son laboratoire ainsi que tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ces 10 mois de "stage" intensifs : Alain Goossens., Valérie et Stijn, Freya, Marnik V., Stéphan R., Wilson A., Tom B., Steffen V..... sans leur professionnalisme et les petits moments partagés autour des containers de glaces (remplis de bière à la place des tubes !), les étiquettes obtenues seraient encore "untranscripted".

Et puis, il y a toujours des protéines qui favorisent la transcription ! A rebecca pour la "valse à trois temps qui est beaucoup plus charmante" pendant la polymérisation des gels d'acrylamide, ou à nos dîners au café de l'Autostradt pendant la migration de ces mêmes gels ! A la romantique Savina ! Qui par son dynamisme a créé et soudé notre petit groupe de fous, au centre duquel : Delphine ! Son nom ? Fleury ! Elle embaume l'air breton : l'écume salé et la douceur de la bruyère de la forêt de Brocéliande : avec ses "coups de gueules", ses éclats de rire, son esprit scientifique pragmatique et curieux, son courage et son amitié.

A ces soirées sur les bords de la Lys un verre de trappiste Westvleteren à la main !

Une petite pensée à mes amis que j'ai laissé dans ch'picardie, faire leur vie et qui lors de petites visites furtives m'ont permis de renouer de temps en temps avec mes racines : à Fred et Fanny, Romaric, Matthieu et Estelle, Marie, Jennifer, mais aussi à Soraya et à Alban. A Suha, ma « sœur » jordanienne qui m'a initiée à la biologie moléculaire à Amiens, pour qui je ressens la plus profonde amitié et que j'espère retrouvé un jour. Au luxembreton qui doit soutenir bientôt et dont les lettres manuscrites (pas mal pour un informaticien !!) m'ont redonné du baume au cœur les jours de mauvaises PCR ! Enfin, à Eric de Bergerac, le rayon de soleil de ces derniers mois.

Je serai éternellement reconnaissante à ma mère, pour sa présence et son aide indéfectibles à mes côtés et pour avoir supporté les longues heures au téléphone. Je souhaiterais enfin dédier ces 4 années à Mamé, à Mamoune et à mon père qui, je l'espère, sont fiers où ils sont, du travail accompli dans les règles de Conscience et de Morale qu'ils m'ont inculquées.

Abréviations

Unité

°C	degré Celcius
A	absorbance
b,pb,kb	paire de bases, kilo base
cpm	coup par minute
ppm	pulse per minute
kda	kilo Dalton
Pa	Pascal
xg	gravité
rpm	rotation per minute
M	moles par litre
MF	matière fraîche
Osmol	osmoles par litre
p/v	poids/volume
v/v	volume/volume
s,min,h,j	seconde, minute, heure, jour
U	unité enzymatique (micromoles de substrat transformé par min)

Divers

ADN:	acide désoxyribonucléique
ADNc:	ADN complémentaire
ATP, ADP,AMP:	Adénosine 5' tri-, di-, mono-phosphate
ARN:	acide ribonucléique
ARNm:	ARN messenger
ARNr:	ARN ribosomique
AFLP:	Amplified Fragment Length Polymorphism
BET:	Bromure d'éthidium
EDTA :	acide éthylène diamine tétraacétique
DEPc:	Diéthylpyrocarbonate
Dnase:	Nucléase
dNTP :	Désoxy-ribonucléotide triphosphate
DTT :	Dithiothréitol
HPLC:	Chromatographie Liquide à haute performance
IPTG :	Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside
NAD	nicotinamide-adénine-dinucléotide
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne
Rnase:	Ribonucléase
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
SDS:	Sodium dodécyl sulfate
SSC :	Salt Sodium Citrate
Tris :	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
X-Gal :	Acide-5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galacturonique

Inhibiteurs

CHX	Cycloheximide, inhibiteur de la synthèse protéique
NPA	acide 1-naphthylphthalamique (phytotropines)
TIBA	acide 2,3,5-triiodobenzoïque (phytotropines)
BFA	Bréfeldine A

Protéines associées à la voie de signalisation de l'auxine

AUX/LAX	famille de symport, responsable de l'entrée de l'auxine (dont AUX1 et LAX2)
AUX/IAA	famille de gènes primaires, inhibent l'action des ARFs, activité régulée par ubiquitination
ARF	Auxin Response Factor, facteur de transcription, sous l'action de l'auxine
ARF	ADP Ribosylation Factor, impliqués dans la délocalisation/relocalisation des PINs
SCF ^{TIR1}	complexe multiprotéique responsable de l'ubiquitinations des protéines
TIR1	Transport Inhibitor Resistant 1, protéine à F-box du complexe SCF ^{TIR1} , récepteur nucléaire à l'auxine
PIN	PIN-formed, famille de transporteurs d'efflux de l'auxine
MDR	MultiDrug Resistance protein, transporteur d'efflux de l'auxine, dont MRP, PGP
ABP1	Auxin Binding Protein, récepteur membranaire de l'auxine

SOMMAIRE

INTRODUCTION

L'AUXINE : UNE HORMONE PLEIOTROPE	8
1. METABOLISME	9
1.1. BIOSYNTHESE	9
1.1.1. Les voies dépendantes du Tryptophane	9
1.1.1.1. La voie passant par l'IPA	9
1.1.1.2. La voie passant par l'IAM	9
1.1.1.3. Les voies passant par IAox	9
1.1.2. La voie indépendante du tryptophane.....	10
1.2. MISE EN RESERVE-STOCKAGE	10
1.3. CATABOLISME	11
1.4. CONTROLE DE L'HOMÉOSTASIE DE L'AIA AU SEIN DE LA PLANTE.....	12
2. LE TRANSPORT DE L'AUXINE	13
2.1. LE TRANSPORT D'INFLUX	13
2.2. LE TRANSPORT D'EFFLUX	14
2.2.1. Les protéines PINs.....	14
2.2.2. Les transporteurs ABC	17
3. TRANSDUCTION DU SIGNAL AUXINIQUE	17
3.1. VOIE DE REGULATION NON TRANSCRIPTIONNELLE	18
3.1.1. Le récepteur : ABP1	18
3.1.2. La voie de transduction non transcriptionnelle.....	19
3.2. VOIE DE REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE	20
3.2.1. Les ARFs et les AUX/IAAs.....	20
3.2.2. Signalisation auxinique et dégradation protéique.....	21
3.2.3. Les différents niveaux de régulation du complexe SCF ^{TIR1}	23
3.2.3.1. La rubiquitination du complexe SCF ^{TIR1}	23
3.2.3.2. Autres mécanismes de régulation	24
4. LES GENES PRIMAIRES DE REPONSES A L'AUXINE	26
4.1. LES GENES PRECOCS DE REPONSE A L'AUXINE ET REPRIMÉS EN PRÉSENCE DE CYCLOHEXIMIDE	26
4.1.1. Le gène <i>arcA</i>	26
4.1.2. Les gènes <i>ARG1</i> et <i>ARG2</i>	27
4.2. LES GENES DONT L'INDUCTION PAR L'AUXINE EST INSENSIBLE AU CHX	27
4.2.1. Les gènes <i>GH3</i>	27
4.2.2. Les Glutathion-S-transférases (<i>GST</i>).....	28
4.2.3. Le gène <i>ZMK1</i>	29
4.2.4. Le gène <i>CRL1</i>	29
4.3. LES GENES DONT L'EXPRESSION EST INSENSIBLE AU CHX ET INDUITE PAR LE CHX SEUL	29
4.3.1. Les gènes <i>AUX/IAAs</i>	29
4.3.2. Les gènes <i>ARFs</i>	31
4.3.3. Les gènes <i>SAURs</i>	31
4.3.4. Les gènes <i>ACS</i>	32
4.3.5. Le gène <i>FQR1</i>	33
5. RÔLE DE L'AUXINE DANS LE CONTRÔLE DE LA DIVISION CELLULAIRE	34
5.1. LE CYCLE CELLULAIRE ET LES PRINCIPAUX RÉGULATEURS.....	34
5.2. RÉGULATION DU CYCLE CELLULAIRE PAR L'AUXINE	35

5.2.1. Régulation par l'auxine de l'expression des cyclines et des CDK	36
5.2.2. Les gènes <i>KRP</i>	36
5.2.3. Les gènes <i>E₂F</i>	36
5.2.5. Modulation par l'auxine de l'ubiquitination des cyclines	37
5.3. TRANSDUCTION DU SIGNAL AUXINIQUE REGULANT LA DIVISION CELLULAIRE	38
6. ROLE DE L'AUXINE DANS LE CONTROLE DE L'EXPANSION CELLULAIRE	38
6.1. INFLUENCE DE L'AUXINE SUR LE RELACHEMENT PARIETAL	39
6.1.2. Activation de protéines pariétales	40
6.1.3. Transduction du signal auxinique induisant l'expansion cellulaire.....	41
6.2. REGULATION DE LA TURGESCEANCE PAR L'AUXINE.....	42
OBJECTIF DU PROJET DE THESE	44

RESULTATS ET DISCUSSIONS

PARTIE 1 : REGULATION DES EFFETS PHYSIOLOGIQUES DE L'AUXINE SUR LES CELLULES DE TABAC BY-2

1. REPONSES A L'AUXINE AU COURS D'UN CYCLE DE CULTURE DES CELLULES DE TABAC BY-2	47
1.1. INFLUENCE DE LA PRESENCE ET DE LA NATURE DE L'AUXINE SUR L'EVOLUTION DE PLUSIEURS PARAMETRES CELLULAIRES AU COURS D'UN CYCLE DE CULTURE	47
1.2. INFLUENCE DE L'AUXINE SUR LES DIVISIONS CELLULAIRES.....	49
1.3. INFLUENCE DE L'AUXINE SUR LA TURGESCEANCE ET LE GRANDISSEMENT CELLULAIRE.....	50
2. REPONSES CELLULAIRES RAPIDES A L'AUXINE ET ETUDE DES EFFETS-DOSES	51
2.1. MISE EN EVIDENCE DE LA REGULATION RAPIDE DE L'ACTIVITE MITOTIQUE ET DE LA PRESSION DE TURGESCEANCE PAR L'AUXINE.....	51
2.2. ETUDE DE L'EFFET DE LA CONCENTRATION D'AUXINE SUR LES REPONSES RAPIDES A CETTE HORMONE	52
2.2.1. Etude du contrôle rapide de la division cellulaire et de la turgescence par 3 auxines exogène .	52
2.2.2. Etude de l'effet de l'AIA	54
3. VARIATIONS DU CONTENU CELLULAIRE EN FONCTION DE LA DOSE D'AUXINE ET DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE	55
3.1. MISE EN EVIDENCE DE NOMBREUX CHANGEMENTS METABOLIQUES ACCOMPAGNANT LES VARIATIONS DE TENEUR EN AUXINE APPLIQUEES AUX CELLULES BY-2	55
3.2. INFLUENCE DE LA DILUTION DU MILIEU EXTRACELLULAIRE ET DE LA TENEUR EN AUXINE SUR LES REPONSES CELLULAIRES.....	56
3.2.1. Description des réponses physiologiques	56
3.2.2. Effet sur les teneurs en composés organiques et inorganiques	58
3.3. INFLUENCE D'UNE CARENCE EN NITRATE SUR LES REPONSES CELLULAIRES.....	60
3.3.1. Description des réponses physiologiques	60
3.3.2. Effet sur les teneurs en composés organiques et inorganiques	61
3.3.3. Régulation de l'expression d'une Glutamine Synthétase cytosolique et d'un transporteur de nitrates de type NRT2	62
4. ETUDE DE L'ULTRASTRUCURE DES CELLULES BY-2	64
4.1. ANALYSE ULTRASTRUCTURALE DES CELLULES A L'ETAT STATIONNAIRE.....	65
4.2. ANALYSE ULTRASTRUCTURALE DES CELLULES EN PRESENCE D'AUXINE.....	65
4.3. ANALYSE ULTRASTRUCTURALE DES CELLULES EN CARENCE D'AUXINE.....	66

5. DISCUSSION	68
5.1. ACTION DE L'AUXINE SUR LA DIVISION CELLULAIRE	68
5.1.1. Intérêts des expériences menées sur une longue ou courte cinétique.....	68
5.1.2. Action du traitement auxinique sur la division cellulaire.....	68
5.1.3. Régulation de la division cellulaire en fonction de la concentration en auxine.....	69
5.1.3.1. Concentration efficace d'auxine intracellulaire ou extracellulaire ?.....	69
5.1.3.2. Action de la concentration d'auxine ajoutée dans le milieu.....	71
5.1.4. Influence de la nature de l'auxine sur l'entrée en division cellulaire	72
5.1.5. Influence du milieu de culture sur la division cellulaire	73
5.2. ACTION DE L'AUXINE SUR LE POTENTIEL DE TURGESCECE ET L'EXPANSION CELLULAIRE.....	74
5.2.1. Régulation du potentiel de turgescence par l'auxine	74
5.2.1.1. Effets de l'auxine sur le potentiel de turgescence au cours du temps.....	75
5.2.1.2. Action de la concentration d'AIA sur le potentiel de turgescence.....	75
5.2.1.3. Effets de la nature de l'auxine sur le potentiel de turgescence	76
5.2.1.4. Nature des changements moléculaires induits par l'auxine	76
5.2.2. Régulation de l'expansion cellulaire par l'auxine	79
5.2.2.1. Effet de la concentration d'auxine.....	80
5.2.2.2. Effet de la dilution du milieu de culture et de la carence en azote	81
5.3. RELATION ENTRE TURGESCECE-EXPANSION CELLULAIRE ET TURGESCECE-MITOSE.....	81
5.4. ETUDE DE L'ULTRASTRUCTURE DES CELLULES BY-2	85
5.5. VARIABILITES EXPERIMENTALES.....	88

PARTIE 2 : MODIFICATIONS DE L'EXPRESSION DE GENES ASSOCIEES AUX EFFETS CELLULAIRES DEPENDANTS DE LA DOSE D'AUXINE DANS LES CELLULES DE TABAC

1. ETUDE GLOBALE DU PROFIL TRANSCRIPTIONNEL DE LA REPONSE A L'AUXINE	91
1.1. OBTENTION D'ETIQUETTES DE GENES DIFFERENTIELLEMENT EXPRIMES SELON LA DUREE ET LA DOSE DU TRAITEMENT A L'AUXINE.	91
1.2. VALIDATION DU PROFIL D'EXPRESSION DE 13 DE CES GENES.....	93
1.2.1. Sélection de 13 étiquettes et élaboration des amorces	93
1.2.2. Analyse semi-quantitative de l'accumulation des ARN messagers des 15 gènes retenus	94
1.2.3. Identification de gènes primaires de réponse à l'auxine parmi les 13 gènes retenus	95
2. CARACTERISATION DE L'ETIQUETTE C4M41-2	97
2.1. ANALYSE CINETIQUE DE L'EXPRESSION DU GENE DE REPONSE PRIMAIRE C4M41 EN FONCTION DE LA TENEUR D'AUXINE.....	98
2.2. RECHERCHE DE LA SEQUENCE PLEINE LONGUEUR DU MESSAGEUR CORRESPONDANT A L'ETIQUETTE C4M4199	
2.2.1. Criblage d'une banque d'ADNc de cellules de tabac BY-2 et caractérisation d'un ADNc partiel.....	100
2.2.2. Amplification de l'extension en 5' de l'ADNc de l'étiquette C4M41	101
2.3. ANALYSE IN SILICO DE LA SEQUENCE DE C4M41	101
2.3.1. Recherche d'un cadre de lecture ouvert et de séquences protéiques homologues.	101
2.3.2. Recherche de séquences nucléotidiques homologues	102
2.4. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE C4M41 DANS LES PLANTES DE TABAC PAR HIS	103
2.5. PRESENCE DU GENE DANS LE GENOME DE N. TABACUM ET DE SES PARENTS	104
3. DISCUSSION	105
3.1. ETUDE GLOBALE DU PROFIL D'EXPRESSION DES GENES	105
3.1.1. Les avantages et les inconvénients de la technique de cDNA-AFLPs.....	105
3.2. RENDEMENT DE LA PRODUCTION D'ETIQUETTES INFORMATIVES ET SEQUENCES INCONNUES	106

3.3. FONCTION DES ETIQUETTES OBTENUES	107
4. ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES ISSUS DES CDNA-AFLPS.....	109
4.1. VALIDATION DES CDNA-AFLPS PAR RT-PCR.....	109
4.2. IDENTIFICATION DE NOUVEAUX GENES DE REPOSE PRIMAIRE A L'AUXINE	110
5. ANALYSE DE LA SEQUENCE DU GENE C4M41-2.....	111

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	115
---	------------

MATERIELS ET METHODES

1. MATERIEL BIOLOGIQUE :	121
2. PROCEDURES EXPERIMENTALES CELLULAIRES ET PHYSIOLOGIQUES	122
2.1. CONDITIONS EXPERIMENTALES LORS DES TRAITEMENTS A L'AUXINE	122
2.2. MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE	122
2.3. MESURE DE L'INDICE MITOTIQUE	122
2.4. MESURE DE LA SURFACE CELLULAIRE.....	122
2.5. MESURE DE LA PRESSION OSMOTIQUE.....	124
3. PROCEDURES EXPERIMENTALES DE PHYSIOLOGIE ET DE BIOCHIMIE	124
3.1. DOSAGE DES COMPOSES SOLUBLES	124
3.2. DOSAGE DES METABOLITES SOLUBLES PAR RMN ¹ H.....	124
3.3. DOSAGE DES METABOLITES SOLUBLES PAR HPLC.....	125
3.3.1. <i>Dosage des acides aminés par HPLC.....</i>	<i>125</i>
3.3.2. <i>Dosage des acides organiques.....</i>	<i>125</i>
3.3.3. <i>Dosages des sucres</i>	<i>126</i>
3.4. DOSAGE DES IONS MINERAUX.....	126
3.5. NORMALISATION DES DONNEES	126
4. PROCEDURES EXPERIMENTALES DE MICROSCOPIE	127
4.1. HYBRIDATION IN SITU	127
4.1.1. <i>Marquage à la digoxygénine des sondes ARN sens et antisens.....</i>	<i>127</i>
4.1.2. <i>Traitement du matériel : lames et lamelles.....</i>	<i>127</i>
4.1.3. <i>Fixation et traitement du matériel biologique.....</i>	<i>128</i>
4.1.4. <i>Déparaffinage et réhydratation des coupes.....</i>	<i>128</i>
4.1.5. <i>Préhybridation et hybridation.....</i>	<i>128</i>
4.1.6. <i>Lavages et détection immunologique.....</i>	<i>128</i>
4.2. ETUDE DE L'ULTRASTRUCTURE CELLULAIRE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	129
4.2.1. <i>Préparation des échantillons et cryoprotection.....</i>	<i>130</i>
4.2.2. <i>Cryofixation.....</i>	<i>130</i>
4.2.3. <i>Cryosubstitution.....</i>	<i>130</i>
4.2.4. <i>Imprégnation et inclusion.....</i>	<i>130</i>
4.2.5. <i>Confection des coupes et observations microscopiques</i>	<i>131</i>
5. PROCEDURES EXPERIMENTALES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	132
5.1. TECHNIQUE DE CDNA-AFLP	132
5.1.1. <i>Préparation des cellules et procédure expérimentale</i>	<i>132</i>
5.1.2. <i>Isolation des ARN totaux</i>	<i>133</i>

5.1.3. Synthèse de l'ADNc double brin.....	133
5.1.4. Préparation de la matrice pour les AFLP.....	134
5.1.5. Préamplification avec des amorces non-sélectives.....	136
5.1.6. Amplification sélective.....	137
5.1.7. Migration des produits amplifiés.....	138
5.1.8. Amplification et séquençage directe.....	138
5.1.9. Traitement bioinformatique des résultats.....	138
5.2. CRIBLAGE DE LA BANQUE 2H D'ADNC BY-2.....	139
5.3. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES PAR RT-PCR SEMI-QUANTITATIVE.....	140
5.3.1. Extraction et dosage des ARN totaux.....	140
5.3.2. Transcription inverse.....	141
5.3.3. Amplification par PCR.....	142
5.3.4. Electrophorèse des acides nucléiques en gel d'agarose.....	142
5.3.5. Analyse semi-quantitative.....	142
5.4. CLONAGE D'UN FRAGMENT D'ADN.....	143
5.4.1. Préparation de l'insert et ligation.....	143
5.4.2. Préparation des bactéries électro-compétentes.....	143
5.4.3. Transformation des bactéries par électroporation.....	143
5.4.4. Préparation d'ADN plasmidique.....	144
5.5. ANALYSES IN SILICO.....	144
5.6. NORTHERN BLOT.....	145
5.6.1. Préparation de la sonde.....	145
5.6.2. Préparation des échantillons d'ARNs.....	145
5.6.3. Transfert des ARN sur membrane de nylon.....	145
5.6.4. Hybridation et Révélation.....	146
5.6.4.1. Préhybridation :.....	146
5.6.4.2. Hybridation :.....	146
5.6.4.3. Lavage :.....	146
5.6.4.4. Révélation :.....	146
5.7. RACE.....	147
BIBLIOGRAPHIE.....	148

INTRODUCTION

Abréviations spécifiques de la métabolisation des auxines

Auxines actives

AIA acide-3-indole acétique

APA acide phénylacétique

IBA acide 3-indole butyrique

Auxines actives synthétiques

2,4-D acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

2,4,5-T acide 2,4-trichlorophénoxyacétique

ANA acide 1-naphtalèneacétique

Auxines inactives

2,3-D acide 2,3-dichlorophénoxyacétique

2,4,6-T acide 2,4,6-trichlorophenoxyacétique

2-ANA acide 2-naphtalène acétique

Voie de synthèse de l'AIA

IPA Acide 3-indole pyruvique

IAM indoleacétamide

IAOx Indole 3- acétaldoxime

TAM Tryptamine

IAN Indole-acetonitrile

L'auxine : une hormone pléiotrope

L'auxine est considérée comme la principale hormone retrouvée dans tous les clades végétaux : des algues aux plantes vasculaires (Cooke et al., 2002). Le rôle de cette hormone est très difficile à étudier à cause de son action pléiotropique. En effet, si l'on agit sur un gène, ou sur l'activité d'une protéine intervenant dans la voie de biosynthèse ou la voie de signalisation, c'est le phénotype de toute la plante qui est affectée. L'auxine est présente dans tous les tissus de la plante, et induit des réponses spécifiques qui apparaissent différentes (grandissement, division, différenciation cellulaire), mais qui à terme, promouvoient toujours la croissance et le développement des organes de la plante.

Dès le stade embryonnaire, le gradient d'auxine intra et inter-cellulaire, guide le plan de la première division du zygote et définit les différents territoires cellulaires qui donneront les futurs organes de la plante (Chen et al., 2001; Rober-Kleber et al., 2003; Weijers et al., 2006).

Au cours du développement de la plante, le principal lieu de synthèse de l'AIA est situé au niveau de l'apex caulinaire, où elle détermine la division de ces cellules. Son accumulation localisée détermine l'emplacement du primordium d'organe, définissant ainsi la formation et l'emplacement des organes latéraux.

L'auxine fait ensuite l'objet d'un transport polarisé de l'apex vers les racines induisant, lors de son cheminement, l'élongation des tiges et des racines jeunes. Cette réponse "grandissement cellulaire" est également constatée après un stimulus tropique (phototropisme ou gravitropisme). Les parties aériennes présentent un gravitropisme négatif et les racines un gravitropisme positif. Au niveau de la racine, en se concentrant sur l'une des faces de l'organe un gradient auxinique s'établit, qui inhibe l'élongation cellulaire sur la face où elle s'accumule, mais l'induit sur la face opposée permettant alors la courbure de la racine. Au niveau de la jeune tige, c'est l'inverse, l'auxine, en s'accumulant sur l'un des côtés, induit l'élongation de ces cellules (**Figure 23**) (Philippart et al., 1999). Ces différents effets permettent également d'illustrer le phénomène de sensibilité tissulaire spécifique face à cette hormone.

Au cours de son transport basipétal, l'auxine inhibe le développement des méristèmes latéraux en-dessous de l'apex. Une fois celui-ci décapité, de nouveaux bourgeons émergent et se développent à partir des méristèmes latéraux. Au niveau des racines le transport acropétal (vers l'apex racinaire), passant principalement par le cylindre central, induit l'initiation de la formation des racines latérales (secondaires).

L'auxine intervient aussi dans la différenciation cellulaire en stimulant la différenciation du procambium en cambium, du xylème (quand la concentration d'AIA est forte) et du phloème (quand la concentration d'AIA est faible).

Enfin l'auxine intervient dans la reproduction en agissant sur la formation des différents organes reproducteurs dans la fleur et dans le développement et la croissance des fruits, puis dans la maturation amenée par un changement de l'équilibre hormonal auxine-éthylène, en faveur de l'éthylène. Cette dernière réponse est également observée au niveau de la zone d'abscission à la base du pétiole, lors de la chute des feuilles et des fruits.

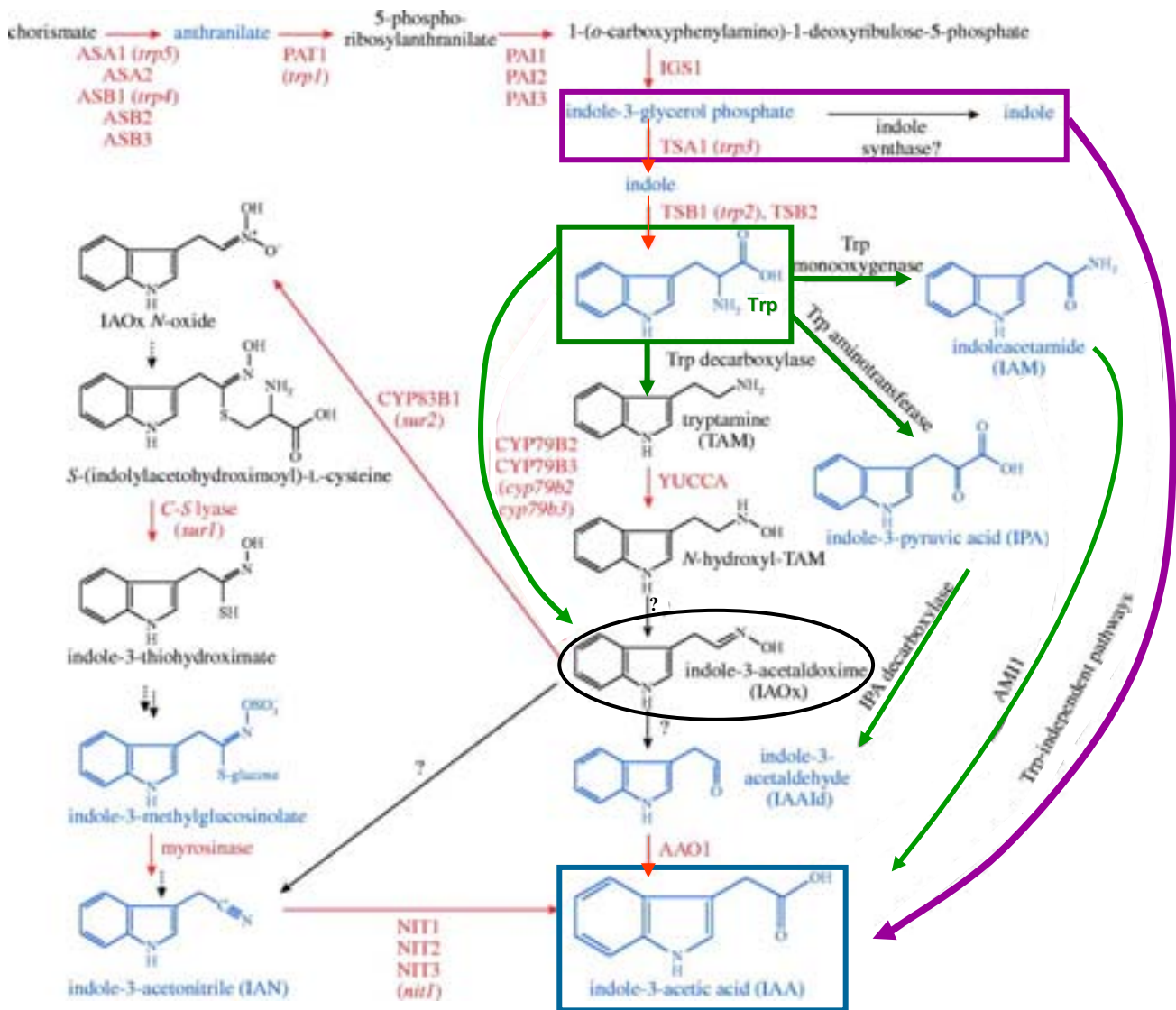


Figure 1 Voies de biosynthèse potentielles de l’AIA chez Arabidopsis.

Les composés détectés chez Arabidopsis sont en bleu, les enzymes pour lesquelles des gènes ont été identifiés sont en rouge et les mutants d’Arabidopsis sont en italique. Les conversions suggérées sans que le gène correspondant soit identifié sont indiquées par des points d’interrogation. On distingue les voies de biosynthèse de l’AIA dépendantes du tryptophane (flèches vertes) de la voie indépendante de cet acide aminé (flèche violette).

D’après Woodward et Bartel 2005

1. Métabolisme

1.1. Biosynthèse

1.1.1. Les voies dépendantes du Tryptophane

L'acide -3-indole acétique (AIA) est reconnu comme étant la principale auxine chez les plantes, bien qu'il existe plusieurs composés, d'origine naturelle ou synthétique, ayant des actions similaires. Il existe plusieurs voies de biosynthèse de l'AIA, dépendantes ou indépendantes du tryptophane, identifiées d'abord chez les microorganismes (*Enterobacter cloacae*, *Agrobacterium tumefaciens* ou *Pseudomonas synrigae*...) et en cours de caractérisation chez les plantes (Woodward and BARTEL, 2005). Comme le montre la **figure 1** il existe trois voies synthétisant l'AIA à partir du tryptophane (flèches vertes).

1.1.1.1. La voie passant par l'IPA

La voie passant par l'acide 3-indole pyruvique (IPA) est très importante chez les procaryotes et semble l'être chez *Arabidopsis* également (Cooney and Nonhebel, 1991). L'IPA a été détecté dans les plantules d'*Arabidopsis thaliana*, mais les enzymes intermédiaires, telles que la Trp amino transférase et l'IPA decarboxylase, n'ont pas encore été identifiées. Chez les mutants *superroot1* (*sur1*), produisant de l'AIA en excès, la dernière enzyme de la voie, l'indole-3-acétaldéhyde oxydase (AAO1) a une activité accrue (Seo et al., 1998). Or AAO1 est aussi la dernière enzyme de la voie de l'IAM (indoleacetamide). Ne pouvant distinguer les deux voies l'une de l'autre (la voie IPA de la voie IAM), on ne peut donc mettre en évidence cette première voie de biosynthèse chez les plantes.

1.1.1.2. La voie passant par l'IAM

Dans la seconde voie, la Trp monooxygénase transforme le tryptophane en IAM, qui est ensuite hydrolysé par une amidohydrolase (Ami1), dont l'activité n'a été démontrée qu'*in vitro* chez *Arabidopsis* (Pollmann et al., 2002).

1.1.1.3. Les voies passant par IAox

L'indole 3-acétaldéhyde (IAOx) est au croisement des deux voies de biosynthèse les mieux caractérisées chez les plantes depuis ces six dernières années (la voie passant par les CYP et la Trp décarboxylase) et des voies de synthèses de métabolites secondaires du type indole glucosinolates.

La caractérisation du mutant *yucca*, qui accumule de forte concentration d'AIA, suggère l'existence de la voie de la tryptamine (TAM) chez les plantes (Zhao et al., 2001). L'enzyme YUCCA pourrait constituer une enzyme limitante en terme de vitesse réactionnelle.

Les cytochromes P450 monooxygénases (CYP79B2 et CYP79B3) oxydent directement le Trp en IAOx. Leur surexpression entraîne une augmentation d'AIA, d'IAN et d'indole glucosinolate.

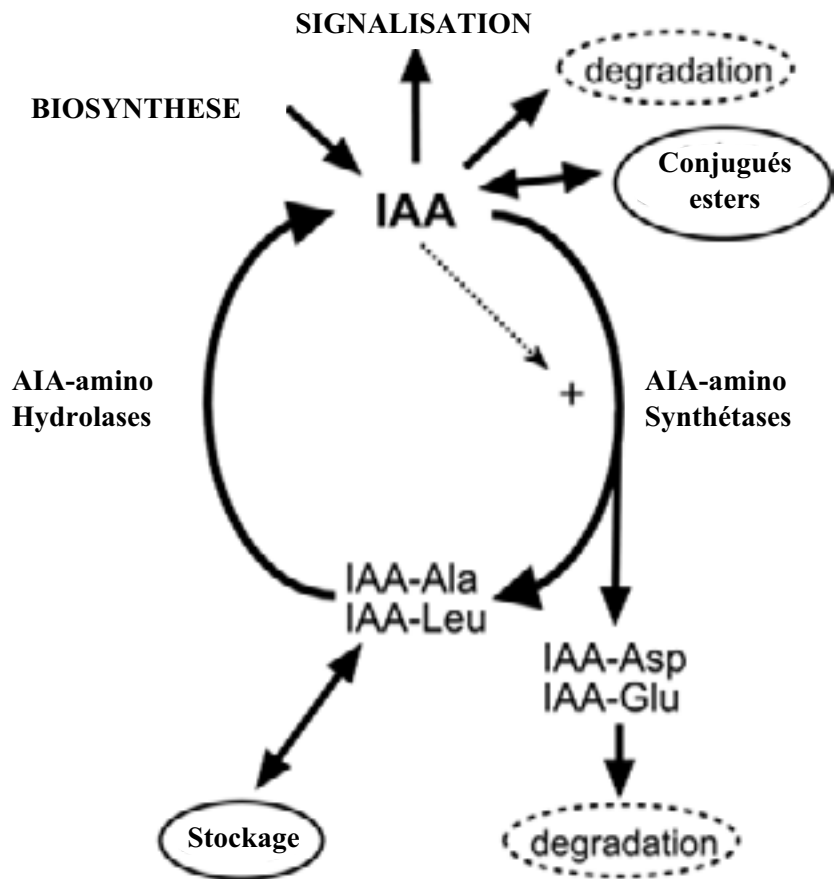


Figure 2. Rôle des activités Amino Synthétase et Hydrolase dans l'homéostasie de l'AIA

La flèche en pointillé indique l'activation transcriptionnelle de plusieurs gènes codant pour des AIA-amino synthétases.

Staswick et al., 2005

Une troisième cytochrome P450 monooxygénase (CYP83B1), transforme IAOx en IAOx-N-oxyde engageant la métabolisation d'IAOx vers la biosynthèse de l'indole-3-methylglucosinolate, à partir duquel peut être synthétisé l'IAN (indole-acetonitrile). Comme le montre la **figure 1**, l'IAN peut être ensuite converti en IAA (analyses *in vitro*) grâce aux nitrilases (NIT), au nombre de quatre chez *Arabidopsis thaliana*.

D'autre part, IAOx peut également être réduit et hydrolysé en IAAlc qui est ensuite oxydé en AIA par l'AAO1. IAOx, étant à l'origine de nombreuses voies alternatives, serait un intermédiaire très important dans la modulation de la biosynthèse de l'AIA dépendant du Trp.

Comme le montre l'étude des mutants *cyp83b1* et *sur1*, le blocage de la production de glucosinolates entraîne l'accumulation d'AIA et de ses conjugués. Cependant les indoles glucosinolates étant indétectables chez *sur1*, cela montre que les différentes voies de biosynthèse de l'AIA ne sont pas encore bien caractérisées.

1.1.2. La voie indépendante du tryptophane

Une autre voie indépendante du tryptophane a été mise en évidence grâce à l'étude des mutants *trp* de la voie de biosynthèse du Tryptophane (flèche rose). Cette voie utilise un précurseur indolique du tryptophane : l'indole-3-glycerol phosphate qui donnerait ensuite l'indole. Or l'indole synthase n'a pas été identifié chez les plantes. Seul l'indole a été détecté chez le maïs lors de la production de composés de défense (Frey et al., 2000). Cette dernière voie serait utilisée pendant la croissance normale de la plante, mais pourrait être détournée vers les voies dépendantes du Trp, lors d'une blessure ou de tout autre stress entraînant un fort besoin d'AIA.

1.2. Mise en réserve et stockage

Les plantes supérieures ont la capacité de stocker l'AIA sous la forme de conjugués d'AIA ou d'acide 3-indole butyrique (AIB) libre (**Figure 3**). Ces formes de stockage peuvent redonner de l'AIA libre après hydrolyse des conjugués ou par β -oxydation de l'AIB.

L'AIA peut être conjugué aux sucres, aux acides aminés et aux peptides. La formation de ces conjugués aurait un rôle dans le stockage, le transport, la compartimentation, la détoxification et la protection contre la dégradation oxydative (Woodward and BARTEL, 2005). Il a été déterminé qu'une plante adulte d'*Arabidopsis* contiendrait environs 90 % de l'AIA conjugué aux acides aminés, 9 % sous forme de conjugués au glucose, et 1 % resterait libre (Tam et al., 2000).

La formation de conjugués et leur hydrolyse semblent des points de contrôle très importants de l'homéostasie de l'auxine au sein de la plante (Staswick et al., 2005) (**Figure 2**). Chez *Arabidopsis thaliana* la perte de fonction des amino-acide aminohydrolases, responsables de l'hydrolyse des conjugués auxine - acide aminé, entraîne une résistance spécifique aux conjugués, qui se traduit par l'inhibition de l'élongation racinaire lors de leur rajout dans le milieu. Leur surexpression entraîne l'obtention de plantes naines avec peu de racines et un dé-étiolement. Ces enzymes requièrent *in vitro* la présence de cations divalents tels que le Mn^{2+} , le Ca^{2+} , ou le Cu^{2+} (LeClere et al., 2002), ce qui suggère que l'homéostasie des ions métalliques pourrait avoir un impact sur l'hydrolyse des conjugués. De plus ces enzymes ont été détectées

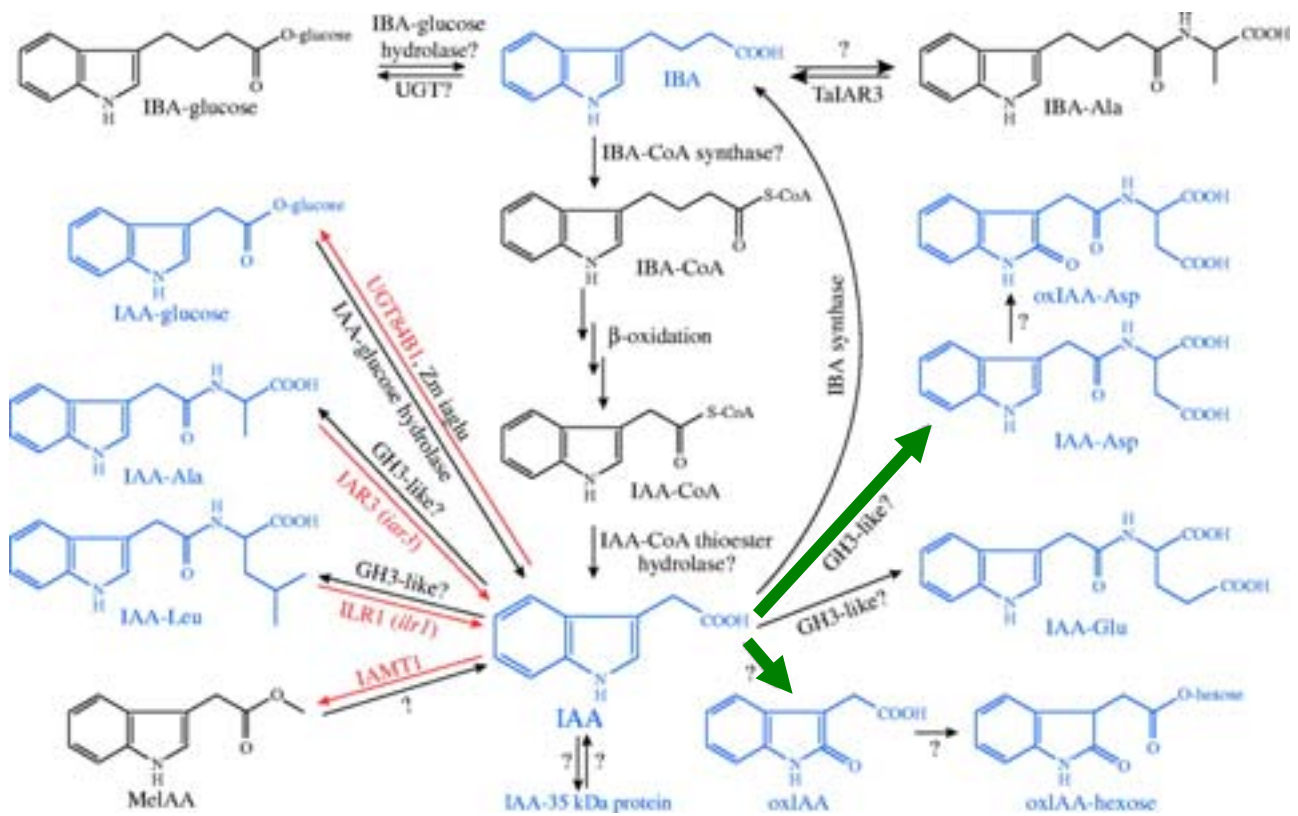


Figure 3. Voies potentielles de métabolisation de l'IAA.

Les composés détectés chez Arabidopsis sont en bleu, les enzymes pour lesquelles des gènes ont été clonés sont en rouge et les mutants d'Arabidopsis sont en italique. Les conversions suggérées sans que le gène correspondant soit identifié sont indiquées par des points d'interrogation.

Woodward et Bartel 2005

dans la lumière du Reticulum Endoplasmique (RE). La localisation également dans le RE d'ABP1, la principale protéine capable de fixer l'auxine (Henderson et al., 1997), renforce l'idée d'un rôle possible de ce compartiment dans l'action de l'auxine et dans la modulation de la principale voie de libération de l'AIA libre.

L'AIA peut être stockée sous forme d'AIB, grâce à une AIB synthase (**Figure 3**) activée par différents stress biotiques et abiotiques. La mise à disposition d'AIA libre peut être ensuite réalisée par β -oxydation de l'AIB dans les péroxysomes (Ludwig-Muller and Cohen, 2002).

Parmi les conjugués AIA-Acides aminés, on distingue ceux qui conservent une activité auxinique tels que l'AIA-Ala présent à l'apex et l'AIA-Leu qui s'accumule dans les racines. L'AIA-Asp et AIA-Glu (formes conjugués majoritaires dans les organes végétatifs) n'ont pas d'activité auxinique et seraient impliqués dans le catabolisme de l'AIA. En fonction de la concentration d'AIA exogène, un type de conjugaison sera favorisé par rapport à un autre, afin de diriger le devenir de l'AIA (Ljung et al., 2002).

L'AIA peut également se conjuguer au glucose par des liaisons esters sous l'action de glucosyltransférases. D'autres conjugués esters de haute énergie (1-O-(indole-3-acetyl)- β -D-glc (1-O-Glc) sont produits grâce à des UDPG-dependante glucosyltransférases et servent de substrat pour la synthèse d'autres conjugués esters et des AIA- β -1,4-glucanes de haut poids moléculaire (Jackson et al., 2002).

Chez *Arabidopsis thaliana* il existe un système d'oxydation de l'AIA en OxAIA qui peut ensuite se conjuguer aux hexoses (Ljung et al., 2002).

1.3. Catabolisme

En règle général, la métabolisation de l'AIA se fait soit par son oxydation (décarboxylative ou non) ou sa conjugaison, qui modifient le cycle indole ou la chaîne latérale, causant la perte de son activité biologique.

L'oxydation décarboxylative est catalysée par les peroxydases. Or les composés issus de la décarboxylation de l'AIA *in vitro* (indole-3-méthanol, indole-3-aldéhyde, acide 3-indolecarboxylique, par exemples), ne sont trouvés que très rarement dans les plantes. Il ne s'agit donc pas de la principale voie de catabolisme *in vivo* (Ljung et al., 2002).

La principale voie du catabolisme de l'AIA est **l'oxydation non décarboxylative**, par l'oxydation directe de l'AIA, ou de son conjugué AIA-Asp, en fonction de l'espèce végétale. Dans le péricarpe du fruit de tomate, l'AIA-Asp est le substrat de la 1^{ère} oxydation. La seconde oxydation forme un groupement OH sur le 3^{ème} carbone du cycle indole (formation de l'acide 2oxo-3-indole-acétique ou OxAIA-Asp), et le plus souvent des glycosylations supplémentaires forment du 3-o-glucoside d'OxAIA-Asp, et produisent des composés de haut poids moléculaire (Ostin et al., 1998).

En réponse à une concentration élevée d'AIA la conjugaison catabolique serait activée, alors que la conjugaison de stockage serait réprimée, mais ceci dépendant également de la disponibilité en acides aminés dans la cellule. La détection d'AIA-Asp et d'AIA-Glu à un faible niveau dans les plantules d'*Arabidopsis thaliana* montre que le catabolisme de l'AIA existe aussi pendant la croissance normale de la plante (Tam et al., 2000). Les enzymes qui conjuguent l'AIA aux acides aminés appartiennent à la famille

4 jours après
germination



8 jours après
germination



Figure 4. Modèle montrant comment différentes sources peuvent approvisionner les racines en auxine pendant le développement précoce des plantules.

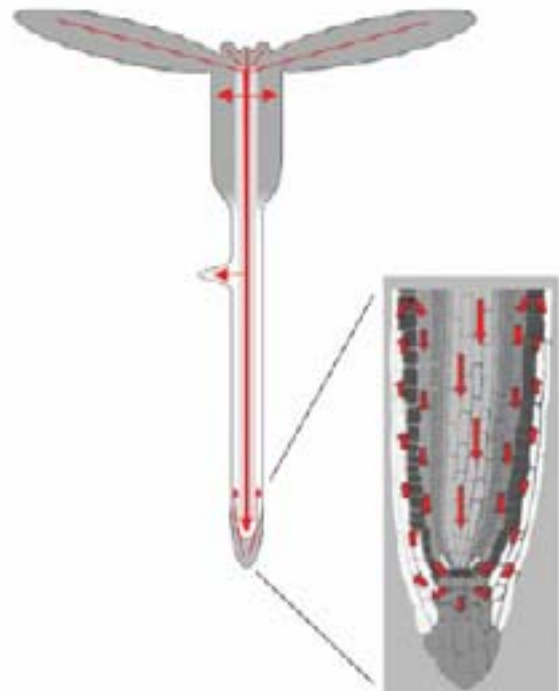
La source (en rouge) et le transport (jaune) de l'AIA synthétisé *de novo* dans le système racinaire d'Arabidopsis. A 4 jours l'auxine produite dans les parties aériennes de la plantule est transportée dans les racines par deux voies d'égale importance: le transport modulé par le phloème (A) et le transport polarisé (B). A 8 jours, le transport modulé par le phloème est relativement plus important. Dès le développement précoce des racines deux sources "internes" sont formées : l'une spécifiquement localisée à 0,5 mm de la pointe racinaire (C), et une autre présente dans tous les tissus au dessus avec une faible capacité de synthèse (D).

Dans les **stades tardifs** du développement toutes les racines latérales émergentes, gagnent la capacité de synthétiser l'AIA (E) et contribuent à la constitution d'une réserve d'auxine au niveau de la racine.

Ljung et al., 2005

Figure 5. Représentation schématique des principaux courants auxiniques dans les plantules et dans les méristèmes racinaires.

Les courants sont symbolisés par les flèches rouge
Benjamins, 2005



GH3, elle-même membre de la superfamille des AIA-amino-synthétases. Les gènes *GH3* sont exprimés très précocement en réponse à l'auxine et seront détaillés un peu plus loin.

L'AIA peut également être méthylée au niveau de sa chaîne carboxylique par des carboxyl méthyl transférases (Zubieta et al., 2003). Cette méthylation rendrait plus volatil l'AIA, mais on ne sait pas si ce changement active ou inhibe l'action de l'AIA.

1.4. Contrôle de l'homéostasie de l'AIA au sein de la plante

L'homéostasie de l'AIA reflète la régulation temporelle et spatiale de la distribution de l'AIA. Chaque tissu montre une sensibilité et une concentration en AIA spécifique (Ljung et al., 2002). La formation de conjugués et leur hydrolyse sont les plus importants contrôles de l'homéostasie de l'auxine.

Contrairement à ce qui a longtemps été admis, l'auxine n'est pas simplement synthétisée à l'apex de la plante et dans les jeunes graines. Dans ces dernières l'AIA est sous forme de conjugués AIA-esters (Ljung et al., 2001), sauf chez les légumineuses où elle est sous la forme AIA-acides aminés (Ljung et al., 2002). Chez *Arabidopsis thaliana* toutes les jeunes parties de la plante sont capables de synthétiser l'auxine (Ljung et al., 2001). En particulier, les jeunes feuilles ont la plus grande capacité à synthétiser l'AIA et en contiennent 250 pg/mg Matière Fraîche (MF). Le contenu en AIA diminue quand la feuille grandit jusqu'à atteindre sa taille finale. De plus, il existe en réponse à l'augmentation de la concentration en AIA intracellulaire, un rétro-contrôle négatif sur la biosynthèse de l'AIA, phénomène non visible ni chez les jeunes feuilles ni dans les cotylédons. Chez les mutants *sur1* et *sur2* produisant beaucoup plus d'AIA que les plantes sauvages, le pourcentage de feuilles en expansion est réduit (Boerjan et al., 1995). Ce qui suggère l'existence d'un mécanisme de contrôle de la teneur en AIA de façon tissu spécifique. L'expansion des feuilles semble donc dépendante d'un contrôle rigoureux de l'homéostasie de l'AIA.

Récemment Karin Ljung et ses collaborateurs ont mené une étude plus précise du contenu d'AIA dans les racines d'*Arabidopsis* (Ljung et al., 2005). Les zones de fortes divisions cellulaires, telles que la zone méristématique de la racine principale et la pointe des racines latérales émergentes, sont des sources importantes d'auxine. Ces auteurs proposent un modèle où la régulation spatio-temporelle des différentes sources d'auxine module la formation des racines (**Figure 4**). Ainsi, 4 jours après la germination, l'auxine est produite à l'apex et est transportée vers les racines par voie passive et active (voir paragraphe 3). Après 8 jours, le transport se fait surtout par le phloème et l'auxine produite à l'apex racinaire va suivre un transport basipétal qui va intervenir dans la formation des racines latérales et l'élongation de la racine principale. Les racines latérales gagnent ensuite la capacité à produire elles-mêmes de l'auxine et à le transporter vers la racine principale (Ljung et al., 2005). Lors de la croissance de l'hypocotyle de lupin, plusieurs sources d'AIA ont été mises en évidence ainsi que l'importance du transport latérale de l'auxine, de la stèle jusqu'au cortex et à l'épiderme, dans l'élongation de cette jeune tige (Lopez et al., 2004). L'homéostasie de l'auxine au sein de la plante est notamment régulée par sa biosynthèse localisée à différents endroits de la plante, mais aussi par son transport des tissus sources vers les tissus cibles. Ce transport est polarisé et spécifique à l'auxine, comparé aux autres hormones végétales. Il intervient dans la polarité cellulaire notamment au cours de l'embryogénèse, de la disposition des organes latéraux, de l'activité méristématique ou encore dans la réponse tropique.

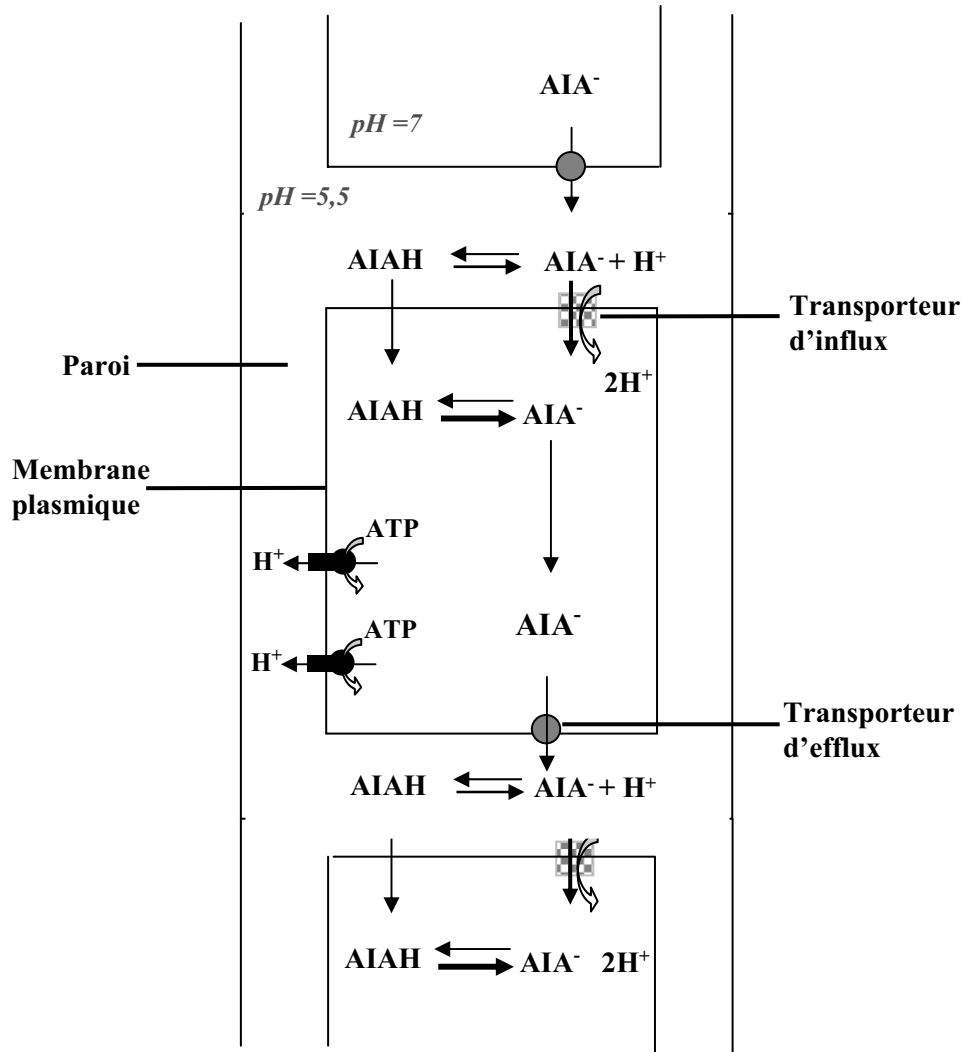


Figure 6. Transport polarisé de l'auxine, proposé par Rubery, Sheldrake et Raven.
Inspiré de Benjamins, 2005

2. Le Transport de l'auxine

Vers la fin du 19^{ème} siècle Charles et Francis Darwin notent pour la première fois qu'un signal est transmis de l'apex jusqu'à la base des coléoptiles d'avoine. En 1928, Went et Cholodny découvrent que ce signal est une molécule biochimique et identifient alors l'acide-3-indole-acétique (AIA).

Le transport polarisé résulte d'une distribution asymétrique de ces transporteurs sur les différentes faces de la cellule, dirigeant le flux d'auxine dans un seul sens. Deux types de transport sont mis en évidence : Un transport passif et un transport actif. **Le transport passif**, passe par le phloème, acheminant l'auxine des tissus sources vers les tissus puits. **Le transport actif** permet le transport de l'auxine de cellule en cellule et implique des mécanismes complexes de régulation. Au niveau racinaire (**figure 5**), ce transport est à la fois acropétal, passant par les cellules du parenchyme xylémien, et basipétal, allant de la pointe des racines vers l'apex caulinaire en passant au travers de la coiffe racinaire puis de l'épiderme et du cortex, dans la zone d'élongation de la racine.

Le transport actif de l'auxine se déroule en deux étapes comme le montre la **figure 6** : l'influx d'auxine dans la cellule suivi de son efflux. La régulation de l'un et l'autre permet de réguler le contenu en auxine intracellulaire et ainsi d'induire des réponses spécifiques à ce contenu.

2.1. Le transport d'influx

Le système de transport polarisé de l'auxine a été décrit pour la première fois en 1974 par Rubery, Sheldrake et Raaven (Rubery and Sheldrake, 1974; Raven, 1975) (**Figure 6**).

Les auxines sont des acides faibles (pK_a AIA=4,75), au pH pariétal (autour de 5,5) l'AIA sera donc majoritairement sous sa forme ionisée. La forme AIA^- est incapable de passer par diffusion, son transport est donc assuré par un système de symport AIA^-/H^+ , tandis que la fraction d'auxine sous forme protonée $AIA-H^+$ (lipophile) peut rentrer par diffusion dans la cellule, ce qui permet l'accessibilité de l'AIA dans tous les compartiments cellulaires. Arrivé dans le cytoplasme, le pH plus élevé augmente encore la concentration d'auxine sous sa forme ionisée, la piégeant ainsi dans la cellule, et l'obligeant à sortir par des transporteurs d'efflux.

Les protéines intervenant dans ce système de symport sont les protéines AUX/LAX, sous-famille multigénique parmi les acides aminés perméases (AAP) (Bennett MJ et al., 1996), contenant 6 membres chez *Arabidopsis* et 5 chez *Medicago*. Parmi elles, AUX1 et LAX2 fournissent de nombreuses informations sur les modalités d'influx d'AIA au niveau cellulaire et tissulaire. Lors d'un criblage de mutants résistants à de fortes concentrations de 2,4-D, d'AIA et de ces conjugués aminés (germination sur un milieu contenant ces molécules), le mutant *aux1* a été identifié (Bennett MJ et al., 1996). Ce mutant présente un gravitropisme racinaire défectueux et une diminution du nombre de racines latérales, par la perturbation du transport de l'auxine à partir des tissus sources, tels que les jeunes feuilles, vers les organes puits comme les tissus racinaires et les plantules en cours de développement (Marchant et al., 2002). Le fait que le phénotype sauvage soit restauré uniquement par l'application d'ANA (ni par l'AIA, ni par le 2,4-D)

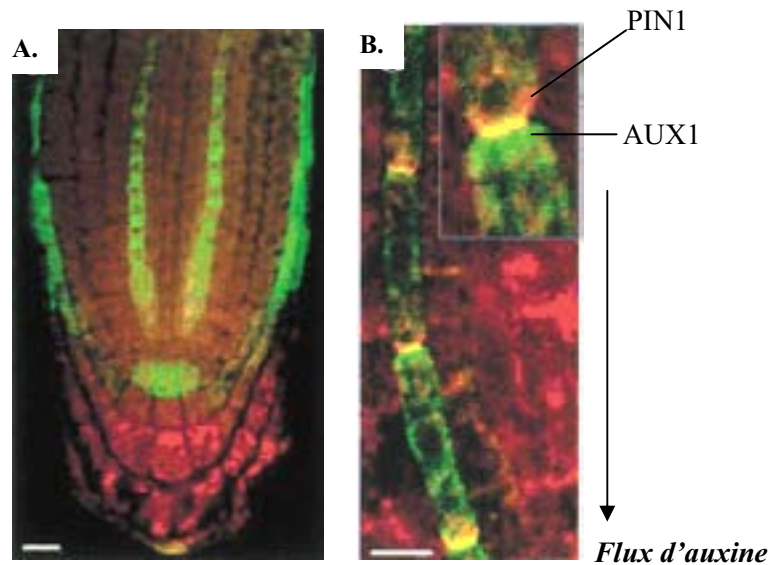


Figure 7 Localisation d'AUX1 et PIN1 dans la racine d'*arabidopsis thaliana*

A-Observation par microscopie confocale de la localisation d'AUX1 de l'apex racinaire, par immunomarquage.
B-Double marquage des protéines PIN1 (en rouge) et AUX1 (en vert) dans une file cellulaire de protophloème de racine. *Swarup et al. 2001*

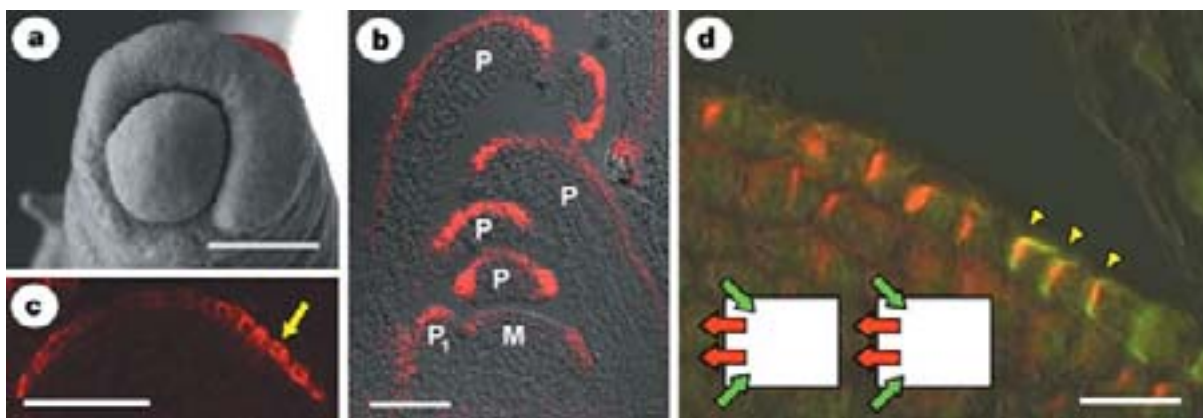


Figure 8 Localisation d'AUX1 dans l'apex caulinaire

a, Chez le double mutant *pin1;aux1* l'application de petites gouttes d'auxine (rouge) induisent la formation de primordia floraux sur presque tout le tour de l'apex. **b**, Expression de HA-AUX1 (rouge) dans un méristème végétatif de 6 jours. Le signal est le plus fort dans l'épiderme de la face abaxiale de P1 et des feuilles plus âgées (P). **c**, A 6 semaines, AUX1 (rouge) était exprimé dans la couche cellulaire L1 du méristème avec la plus forte expression à la périphérie. AUX1 est localisé dans le plasmalemme et présente une polarité cellulaire (flèche). **d**, Double marquage de la section médiane de plantes âgées de 4 semaines avec des anticorps anti-HA-AUX1 (vert) et de anti-PIN1(rouge). Leur localisation se superpose partiellement (flèches jaune). Les flux nets d'auxine déduits de la localisation et du niveau relatif d'AUX1 et de PIN1. M, meristème; P, primordia. Barre d'échelle, 50 μ m (**a-c**); 10 μ m (**d**).

Reinhardt et al., 2003

(Marchant et al., 1999), montre que cette auxine lipophile (l'ANA) ne passerait pas par ce système de symport d'influx mais par diffusion au travers de la membrane plasmique.

L'immunolocalisation d'AUX1, dans la racine, a montré une localisation cellulaire asymétrique suggérant l'implication de cette protéine dans le transport acropétal de l'auxine dans les cellules du protophloème (**Figure 7**) (Swarup et al., 2001). La protéine AUX1 faciliterait le chargement de l'AIA dans le système vasculaire au niveau des tissus sources (jeunes feuilles), et également son accumulation au niveau de l'apex racinaire et des primordia des racines latérales lors de son cheminement dans le protophloème favorisant l'émergence des racines latérales (Bhalerao et al., 2002; Marchant et al., 2002; Swarup et al., 2004; Ljung et al., 2005). La localisation d'AUX1 met en évidence un transport basipétal dans les cellules épidermiques et son intervention dans l'élongation racinaire induite par l'auxine. (**Figure 7B**) (Swarup et al., 2001; Swarup et al., 2004).

Le transporteur d'influx AUX1 joue également un rôle dans la formation des organes latéraux aériens (Stieger et al., 2002; Reinhardt, 2005), bien que chez le mutant *aux1*, aucune perturbation de la formation des feuilles ne soit visible, suggérant une redondance fonctionnelle avec les autres membres AUX/LAX, chez *Arabidopsis*. Son implication a alors été démontrée chez le double mutant *aux1/pin1*, où l'application d'AIA induit la formation d'un primordium sur une zone plus étendue (**Figure 8a**) que le même traitement chez le simple mutant *pin1*. L'activité d'AUX1 contribue donc aussi à la délimitation des organes (phyllotaxie). La localisation par immunofluorescence d'AUX1 a été détectée sur la face abaxiale de l'épiderme des primordia foliaires et la couche L1 du méristème (**Figures 8b et 8c**). Pendant le développement végétatif précoce, la localisation d'AUX1 coïncide souvent à celle du transport d'efflux PIN1, qui lui se trouve sur le côté distal de ces cellules épidermiques (**Figure 8d**).

Au niveau racinaire ou caulinaire, l'influx modulé par les protéines AUX/LAXs, dirigerait le flux d'auxine, en limitant la diffusion aux cellules voisines et maintiendrait ainsi des concentrations d'auxine intracellulaires optimales et une distribution spécifique au sein des tissus.

2.2. Le transport d'efflux

2.2.1. Les protéines PINs

Etant donné que la majorité de l'AIA intracellulaire est sous forme ionisée, son efflux fait donc appel à un transport actif. Il semble que plusieurs types de transporteurs interviennent : les protéines de la famille multigénique PIN et les protéines MultiDrug Resistance like (MDR), ainsi que les protéines qui leurs sont associées.

Les protéines PINs sont des protéines centrales dans l'établissement et le maintien de la distribution de l'auxine hautement spécifique au niveau des tissus de la plante.

Il existe chez *Arabidopsis* 8 gènes, notés de PIN1 à PIN8, qui codent pour des protéines entre 351 AA à 647 AA, avec de nombreux domaines transmembranaires (nombre variable en fonction de la protéine, il y peut y avoir jusqu'à 11 domaines, comme pour *AtPIN1*) concentrés principalement en N-terminal et C-terminal (Chen et al., 1998; Paponov et al., 2005). Une haute hétérogénéité est présente dans la région centrale hydrophile, qui peut correspondre à des variations fonctionnelles. D'ailleurs, souvent les

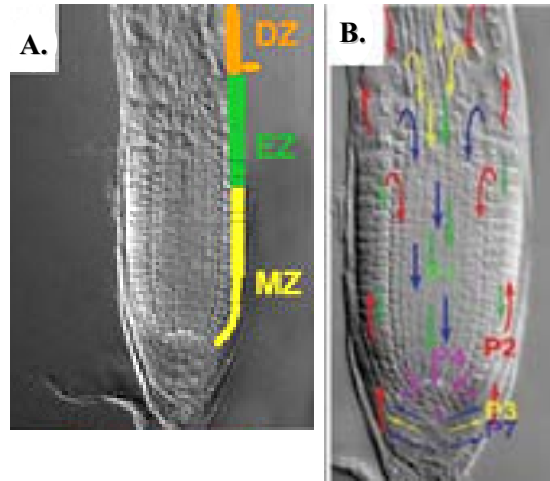


Figure 9. Localisation des protéines PIN dans la racine d'Arabidopsis.

A. Identification des zones méristématiques (MZ, nombreuse divisions cellulaires), de la zone d'élongation (EZ) et de la zone de différenciation cellulaire (DZ). **B.** Les courants auxiniques sont identifiés par la localisation de PIN1 **en vert** (intervenant dans le transport acropétal de l'auxine), PIN2 **en rouge** (corrélé à l'action de l'auxine dans la zone d'élongation), PIN3 **en jaune** (redirigerait l'auxine sous le stimulus gravitropique), PIN4 **en violet** et PIN7 **en bleu** (intervenant surtout dans l'accumulation d'auxine dans la zone de forte activité méristématique)

Blilou, 2005



Figure 10. Apex de la tige d'inflorescence du mutant *Atpin1*
(*Okada et al. 1991*)

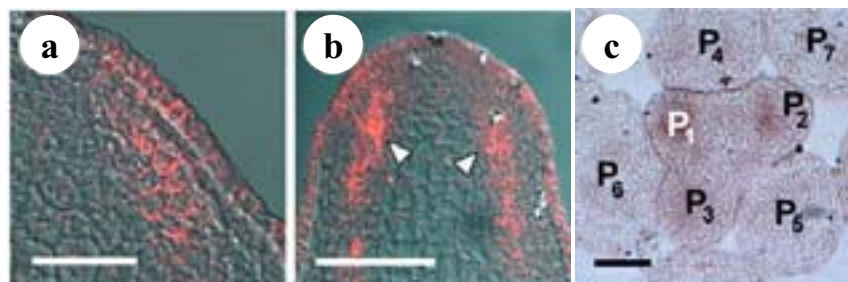


Figure 11. Localisation du transporteur PIN1 au niveau de l'apex caulinaire d'Arabidopsis

a, Section longitudinale montrant la localisation polarisée de PIN1 dans la couche cellulaire L1. **b,** Section longitudinale au travers de l'apex du mutant *pid*, montrant le signal de PIN1 sur les côtés. **c,** Section transversale de l'apex de l'inflorescence d'Arabidopsis du sauvage montrant l'accumulation des ARNm de *PIN1* suivant le profil phyllotaxique. Barre d'échelle, 25 µm (a); 50 µm (b-c).

Reinhard et al., 2003

autres membres PINs sont régulés transcriptionnellement et post-traductionnellement pour compenser la perte d'une protéine mutée (Sieberer et al., 2000).

Il est démontré que les PINs sont reliées au transport polarisé d'efflux de l'auxine. Mais il n'a pas été clairement démontré si, ils agissaient comme transporteurs directs de l'auxine ou comme régulateurs du transport polarisé de l'auxine en s'associant à des protéines telles que les MDR.

La distribution différentielle de l'auxine est associée à de nombreux processus d'adaptation tels que les tropismes, le fonctionnement des méristèmes et l'organogenèse, ainsi que l'embryogenèse. L'étude moléculaire des mutants *pin* chez *Arabidopsis* met en évidence l'implication de ces protéines dans tous ces processus.

Dans les années 30, Went et Cholodny forment l'hypothèse que la croissance différentielle des deux cotés d'une racine courbée est corrélée à l'inégale distribution de l'auxine au sein de l'organe. En 2003, des enregistrements de la concentration d'auxine basée sur la détection de DR5 (promoteur synthétique sensible à l'auxine) couplée à la GFP (Ottenschlager et al., 2003) montrent un niveau important d'auxine au niveau de la columelle de l'apex racinaire. Après une stimulation gravitropique un flux asymétrique est visible, à partir des cellules de la columelle vers celles de la coiffe racinaire latérale puis au travers de la zone d'élongation. En parallèle l'analyse des mutants *pin1*, *pin2*, *pin3* et *pin4* conjuguée à la localisation de ces transporteurs dans des tissus spécifiques a mis en évidence leur rôle autant dans le transport acropétal que basipétal (Friml et al., 2002) (**Figure 9**).

Le mutant *pin1*, caractérisé par une tige d'inflorescence, sans feuille, ni ramification, est le premier à avoir été décrit chez *Arabidopsis* (**Figure 10**) (Okada et al., 1991). Ce mutant a été utilisé pour établir un modèle de la régulation de la teneur et de la synthèse d'auxine au niveau du méristème apical. Ce modèle intègre à la fois la régulation de son transport, le maintien d'un gradient de concentration intracellulaire et la définition de la région de formation des nouveaux organes (phyllotaxie) (Reinhardt, 2005). Il est à noter que seul l'application exogène d'AIA et d'ANA sur le méristème du mutant *pin* peut induire la formation *de novo* d'un profil phyllotaxique. PIN1 ne fait pas que répondre au signal phyllotaxique qu'est l'auxine, mais contribue à créer et maintenir le profil phyllotaxique. L'auxine est transportée acropétalement au travers du méristème avec création d'un gradient auxinique croissant de la périphérie vers le centre. L'auxine ne rejoint les zones organogènes qu'à une certaine distance des primordia existants. L'accumulation de l'AIA dans cette nouvelle zone crée un deuxième gradient auxinique privant le reste du méristème d'auxine (**Figure 11 et Figure 81**) (Reinhardt, 2005). L'auxine induit alors l'expression de *PIN1* et définit les nouvelles cellules organogènes. Ce système nécessite une régulation très dynamique de PIN1, par des mécanismes de phosphorylation par la Ser/Thr kinase PINOID (PID), et de délocalisation/relocalisation. Il a été démontré que l'adressage intracellulaire des PINs était modulé par les ARF (ADP Ribosylation Factor) qui forment des complexes avec des ARF-GEF (G-protein Exchange Factor) et modulent la localisation des protéines PINs, en régulant l'activité d'autres protéines (Xu and Scheres, 2005). Par exemple, la protéine GNOM, une BFA sensitive nucleotide exchange factor (ARF-GEF) est nécessaire au trafic vésiculaire et la localisation de PIN1 (Bonifacino and Jackson, 2003; Geldner et al., 2003).

Récemment M. Heisler a présenté par imagerie confocale à fluorescence, la régulation spatiotemporelle de PIN1 et d'autres protéines intervenant dans l'organogenèse (CUC, STM, LFY). (Heisler et al., 2005). C'est par la combinaison de ces approches expérimentales avec les réalisations de modèle *in*

silico tels que ceux de Kramer (Kramer, 2004) que les mécanismes de la phyllotaxie sont identifiés (Reinhardt, 2005).

L'auxine intervient également dans la formation de l'axe apico-basal qui a lieu lors des étapes précoces de l'embryogénèse et dont la première manifestation est la première division asymétrique du zygote, définissant une cellule basale qui exporte l'auxine et une cellule apicale qui y répond. Ce gradient d'auxine qui provoque la spécification des structures apicales de l'embryon, est maintenu par la localisation de PIN7 à la surface apicale de la cellule basale. Ensuite la localisation de PIN7 s'inverse au stade 32 cellules, et régule en accord avec PIN1 et PIN 4 le transport de l'auxine vers le pôle racinaire (Friml, 2003). L'auxine possède donc la capacité de spécifier le devenir apical et immédiatement après de spécifier le devenir basal selon un modèle complexe où, des facteurs supplémentaires de spécification du devenir de certaines cellules s'accumulent. Par exemple le facteur de transcription PLETHORA (PLT) est induit par l'auxine, c'est un AP2 domaine, lui-même sous le contrôle de facteurs de transcription ARFs (Aida et al., 2004). PLT est nécessaire à la transcription des gènes PINs pour stabiliser un pic d'auxine à l'apex racinaire (Blilou et al., 2005).

Les phyto tropines, telles que le NPA ou le TIBA, ont initialement été découvertes comme des inhibiteurs affectant le tropisme. Il a ensuite été découvert qu'elles étaient des inhibiteurs du transport d'efflux de l'auxine. L'application de tels composés affecte le phénotype de toute la plante d'une façon similaire aux mutants du transport de l'auxine, par exemple, l'utilisation du NPA provoque le même phénotype apical que le mutant *pin1*. Les phyto tropines sont donc désormais utilisées pour étudier le transport de l'auxine chez différents mutants impliqués dans la réponse à cette hormone. En outre il a récemment été découvert qu'elles perturberaient le transport d'efflux d'auxine en inhibant la délocalisation/relocalisation des protéines membranaires *PIN*. Ce phénomène est caractérisé par la délocalisation des protéines membranaires qui par phénomène d'endocytose se retrouvent dans des organelles endocytiques qui cheminent dans le cytoplasme grâce aux filaments d'actine du cytosquelette. Ces endosomes peuvent ensuite être redirigés vers un autre endroit de la membrane plasmique. Cette étape est aussi inhibée par le bréfeldine A, qui agit sur la voie de sécrétion originaires du golgi (Petrasek et al., 2002).

La polarisation des PINs est rapidement modulée en réponse aux signaux extérieurs et développementaux. Ce processus n'est possible que si leur délocalisation/relocalisation est discontinuée entre les endosomes et la membrane plasmique. Le contrôle dynamique de cette délocalisation/relocalisation permet d'affecter la spécificité et la sensibilité du système d'efflux (Paponov et al., 2005) ; (Friml et al., 2004).

La perturbation de la localisation de certains PINs dans les mutants de délétions d'autres PINs et leur évolution proche indiquent donc que non seulement les PINs définissent la polarité de la cellule mais qu'ils répondent aussi à cette polarité. La famille PIN est donc un important marqueur de l'établissement et de la régulation de la polarité chez les plantes.

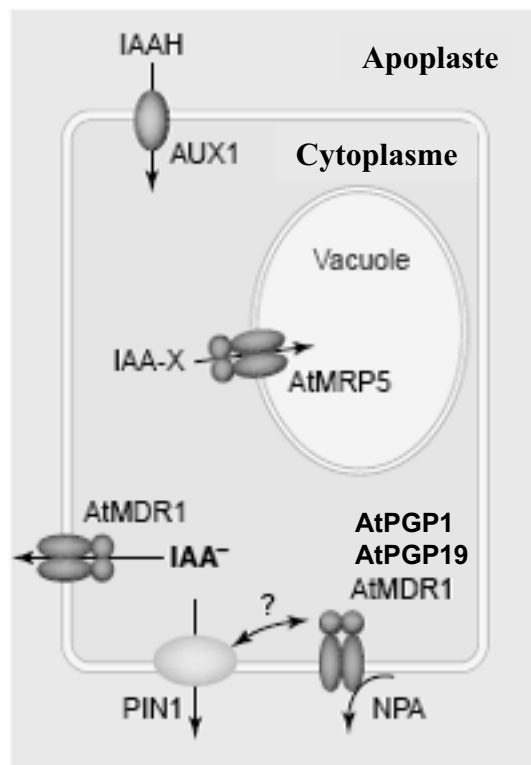


Figure 12. Implications possibles des protéines ABC dans le transport de l'auxine.

IAA-x: formes conjugués de l'AIA.

Luschnig, 2002

2.2.2. Les transporteurs ABC

Des modèles mathématiques (Kramer, 2004) prédisent que la localisation des PIN ne serait le seul responsable de l'efflux de l'auxine, que dans le cas de grande cellules différenciées. Pour les petites cellules méristématiques où la concentration en auxine est importante, un deuxième système de transport autre que PIN semble nécessaire (**Figure 12**). En accord avec cette hypothèse, l'annotation du génome d'Arabidopsis a fait ressortir 22 gènes codant pour des p-glycoprotéines (PGP), sous famille des **transporteurs ABC de type MDR** (multidrug Resistance-like) (Noh et al., 2001), qui fonctionnent avec des substrats hydrophobes dont le déplacement est dépendant de l'ATP (Blakeslee et al., 2005). Les mutants *Atpgp1* et *Atpgp19* (Geldner et al., 2003; Geisler et al., 2005) présentent un phénotype nain et un transport polarisé de l'auxine réduit. Ces phénotypes sont retrouvés chez les mutants *brachytic* de maïs, et *dwarf3* de sorghum. Chez Arabidopsis, AtMDR1 et AtPGP1 semblent être nécessaires à la détoxification générale de la cellule et permettrait d'éviter une concentration d'auxine critique pour la cellule (**Figure 12**) (Luschnig, 2002). PGP19 interviendrait dans la stabilisation de l'efflux d'auxine en stabilisant les complexes PIN1 au niveau de la membrane plasmique (Blakeslee et al., 2005). Ces protéines pourraient intervenir à d'autres niveaux de régulation de la concentration intracellulaire de l'auxine. Par exemple AtMRP5 serait impliquée dans le stockage des conjugués d'AIA-acides aminés en favorisant leur entrée dans la vacuole (**Figure 12**) (Luschnig, 2002), et AtPGP4 faciliterait l'influx d'auxine en parallèle d'AUX1 (Geisler and Murphy, 2006). Un autre mutant *pxa1* (MDR-like protein) fait moins de racines latérales que le sauvage. La protéine PXA1 est localisée dans la membrane des péroxysomes et nécessaire à la β -oxydation de l'AIB (Zolman et al., 2001).

Le transport d'efflux de l'auxine est un système qui fait intervenir différents protagonistes, dont le nombre ne cesse de croître depuis quelques années. Trois modèles d'action des transporteurs d'auxine sont proposés par Geisler et Murphy. Le premier considère que les transporteurs PINs et MDRs seraient localisés dans différentes cellules. Le deuxième modèle propose que les deux transporteurs d'efflux soient localisés dans les mêmes cellules mais fonctionnent de façon indépendante. Enfin dans le troisième modèle les protéines PINs et MDRs seraient associées en un complexe et fonctionneraient de manière synergique (Geisler and Murphy, 2006).

3. Transduction du signal auxinique

L'action très pléiotrope de l'auxine complique beaucoup l'identification des différentes étapes de sa voie de signalisation et de son mode d'action. Ce n'est que depuis ces 15 dernières années, avec la multiplication des outils de génétique inverse, que les études de la voie de transduction du signal auxinique et de la régulation transcriptionnelle des gènes de réponse à l'auxine ont pu être initiées. Deux voies de signalisation distinctes ont récemment été mises en évidence (Dharmasiri et al., 2003; Jones et al., 2004; Paciorek and Friml, 2006) : l'une serait une **voie de régulation non transcriptionnelle** et l'autre serait **nucléaire** et régulerait l'expression des gènes.

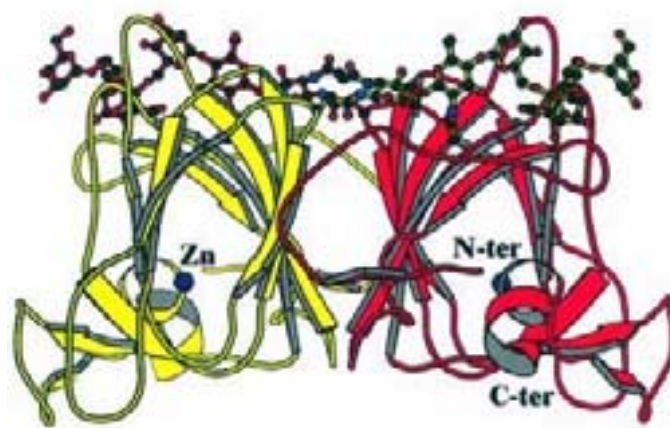


Figure 13. Structure globale de la protéine ABP1 de maïs.

A partir de l'analyse cristallographique de haute résolution (1,9 Å) il a été possible d'obtenir cette représentation schématique du repliement global du dimère d'ABP1 dont les brins β sont représentés par des flèches, les hélices α , par des hélices, et les atomes de zinc par des sphères bleues (1 au centre de chaque sous-unité). Les 2 sous-unités composant le dimère sont symétriques selon un axe de rotation d'ordre 2 vertical, les résidus interagissant avec le sucre sont aussi représentés.

3.1. Voie de régulation non transcriptionnelle

3.1.1. Le récepteur : ABP1

De nombreuses protéines se liant à l'auxine (Auxin binding proteins, ABPs) ont été identifiées par marquage de l'hormone et purification par affinité. Parmi ces ABPs, Hertel en 1972 détecte une activité de liaison à l'auxine à partir de préparations de membranes de coléoptiles étiolés. Cette protéine fut purifiée par Löbler en 1985 et identifiée comme ABP1, dont l'activité a bien été associée à des réponses à cette hormone (Löbler and Klambt, 1985), ce qui la fait considérer comme un récepteur à l'auxine (Brown and Jones, 1994) (Napier et al., 2002). Deux ADNc d'ABP1 de tabac ont été clonés par Leblanc et ses collaborateurs (Leblanc et al., 1999) et les gènes correspondants par S. Watanabe et S. Shimomura (Watanabe and Shimomura, 1998). La protéine, déduite de la séquence nucléotidique, est hydrophile et contient deux sites de N-glycosylation, un peptide signal en N-terminal, et en C-terminal un peptide KDEL forme un motif putatif de rétention dans le Réticulum Endoplasmique (RE) (Leblanc et al., 1999; David et al., 2001). Cette séquence et les différents motifs qui la constituent ont notamment la particularité d'être très conservés parmi les espèces (maïs, arabidopsis, tabac...).

Plusieurs expériences, de purification d'ABP1 à partir de membranes et d'immunolocalisation ont montré que chez le tabac et le maïs la protéine se retrouve majoritairement dans la lumière du RE mais également au niveau du plasmalemme (Oliver et al., 1995; Leblanc et al., 1999; David et al., 2001). L'auxine ne serait capable d'interagir qu'avec ABP1 localisé sur la membrane plasmique, le pH trop acide du RE empêchant la liaison auxine-ABP1 (Tian et al., 1995).

La protéine ABP1 appartient à la super-famille des cupines, qui comprend un corps en tonneau- β , formé par deux feuillet- β anti-parallèles, qui se lie à un ion zinc (**Figure 13**) (Woo et al., 2002). Quand l'auxine est présente dans le milieu, son groupement carboxylique se lie au zinc et oriente ainsi l'auxine à l'intérieur de la poche hydrophobe contenant les résidues Trp, caractéristiques du site de liaison de toutes les ABPs (Napier et al., 2002). Contrairement à ce qui avait été avancé par les auteurs précédemment (Leblanc et al., 1999; David et al., 2001; Warwicker, 2001) il n'y a pas de changement conformationnel entre la forme non liée et liée à l'auxine, ce qui ajoute de la complexité à la compréhension de son mode d'action comme récepteur.

La régulation de l'accumulation des messagers d'ABP1 est corrélée avec l'élongation des organes floraux et la germination des graines de tabac (Leblanc et al., 1997). La surexpression d'ABP1 augmente la capacité de l'auxine à influencer l'expansion cellulaire dans les feuilles de tabac. Le phénotype des feuilles de tabac transgénique est comparable au sauvage, mais les cellules sont moins nombreuses et plus grandes (Jones et al., 1998).

ABP1 ne semble pas intervenir dans le contrôle de la division cellulaire, ni dans la régulation des gènes de réponse primaire à l'auxine. L'absence d'ABP1 conduit à la létalité des embryons d'*Arabidopsis*, après 7 jours de développement normal (jusqu'au stade globulaire) (Chen et al., 2001). Ces embryons ne peuvent pas passer au stade de bilatéralisation, qui se traduit par une élongation des cellules du dernier tiers de l'embryon puis de leurs divisions anticlinales (**Figure 14**). Chez le mutant il n'y a pas d'élongation et

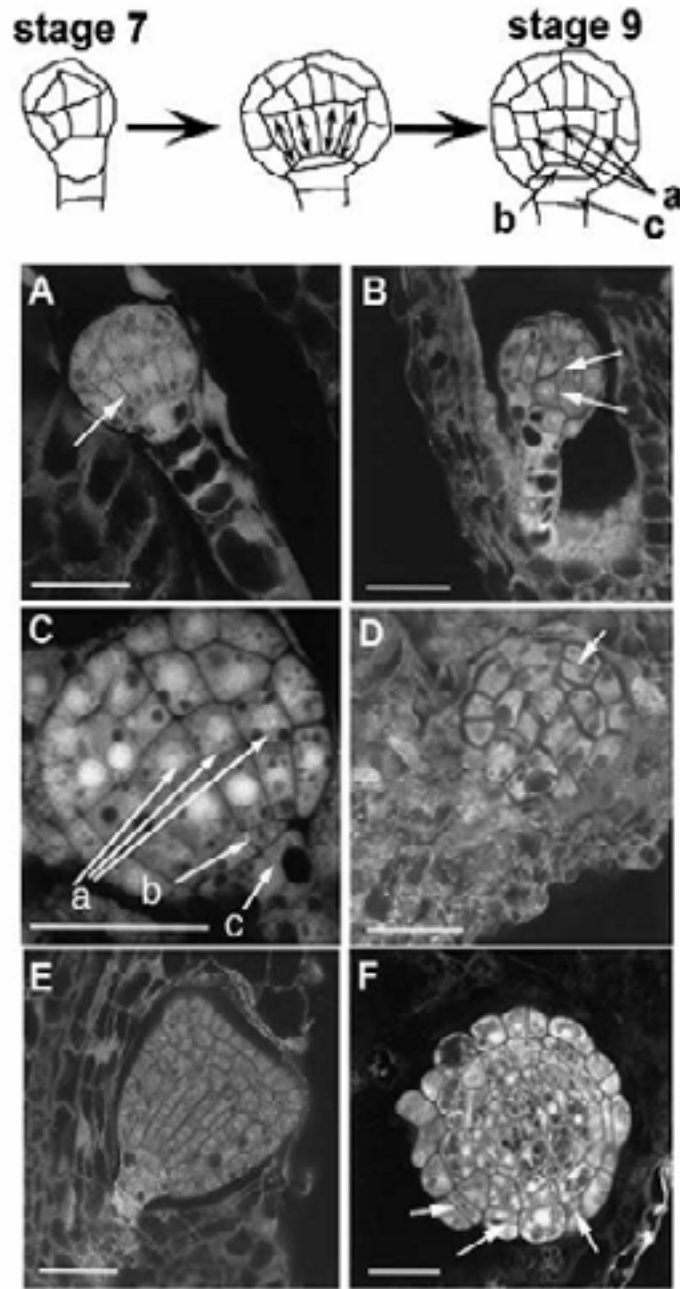


Figure 14. Développement des embryons d'*Arabidopsis thaliana* sous exprimant ABP1

En haut, schéma de la progression normale du développement embryonnaire du stade 7 (dermatogène) jusqu'au stade globulaire. Les cellules du premier tiers du bas grandissent axialement (indiqué par les doubles flèches), ensuite elles se divisent anticlinalement (flèche a). **A-** embryon sauvage au stade de développement globulaire précoce (stade7). La flèche indique les cellules qui grandissent. **B-** Embryon du mutant *abp1* au même stade que pour A-. La flèche indique la mauvaise orientation des nouvelles parois. **C-** Embryon sauvage au stade globulaire (stade 9). Les flèches correspondent aux mêmes structures que sur le schéma du dessus. **D-** Embryon *abp1* au stade globulaire. Les flèches indiquent les plans de divisions périclines de la couche cellulaire externe. **E-** Embryon au stade cordiforme précoce. **F-** Section transversale médiane d' embryon *abp1* arrêté au stade globulaire. Les flèches indiquent les plans de divisions périclines de la couche cellulaire externe.

Chen et al., 2001

les divisions sont périclinales. Des perturbations semblables sont observées dans les embryons où le transport polarisé de l'auxine est affecté.

La plupart des résultats tendent à montrer l'implication d'ABP1 dans l'expansion cellulaire induite par l'auxine. Le consensus est cependant à nuancer depuis la caractérisation moléculaire d'ABP1 chez le tournesol où l'expression est plus importante dans les organes présentant une forte activité mitotique (Thomas et al., 2003). Ces résultats couplés à des analyses d'hybridation *in situ* suggèrent qu'ABP1 est très finement régulé spatialement au sein d'un tissu et que son expression serait corrélée à une haute sensibilité des tissus vis-à-vis de l'auxine (Thomas et al., 2003).

3.1.2. La voie de transduction non transcriptionnelle

L'auxine module l'expansion cellulaire tout d'abord en activant une pompe H^+ -ATPase, qui va sécréter des ions H^+ dans la paroi. L'acidification pariétale qui en résulte va activer des enzymes et des protéines de la paroi, sensibles au pH acide, les expansines par exemple. On observe alors un relâchement pariétal et une croissance cellulaire (paragraphe 6). De plus, l'hyperpolarisation membranaire stimule l'influx de potassium, ce qui entretient la turgescence cellulaire comme de la croissance.

L'expansion cellulaire est également obtenue en utilisant des anticorps dirigés contre la boîte de liaison d'ABP1 à l'auxine. Par contre des anticorps dirigés contre la partie C-terminale d'ABP1 inhibent la réponse à l'auxine (Steffens et al., 2001).

Des expériences d'électrophysiologie ont montré qu'ABP1 est impliquée dans l'activation de l'hyperpolarisation de la membrane plasmique induite par l'auxine en moins d'1 min dans les protoplastes de mésophylle de tabac. Ceci reflète la modulation d'un transport d'ions membranaires (Leblanc et al., 1999). L'analyse des réponses physiologiques des cellules de garde des plantes de tabac surexprimant ABP1 montre une augmentation du courant potassique induit par l'auxine (Baully et al., 2000). L'hyperpolarisation membranaire est également induite par un peptide synthétique correspondant à la zone C-terminale, où l'importance du motif "**WDE**" dans la réponse à l'auxine est démontrée (Leblanc et al., 1999). La régulation de la présence d'ABP1 au niveau de la membrane plasmique semble plus liée au contrôle de l'expression du gène qu'à l'adressage de la protéine (Leblanc et al., 1999).

Bien que le signal auxinique induisant le gonflement des protoplastes (Steffens et al., 2001) soit perçu par ABP1 il n'est pas prouvé qu'il module directement les H^+ -ATPases de la membrane plasmique. Tandis qu'ABP57, agirait directement sur l'activité H^+ -ATPase (Kim et al., 2001), mais elle ne semble pas avoir un rôle de récepteur à l'auxine.

En parallèle un autre mécanisme impliqué dans la transduction du signal est présenté par Scherer et ses collaborateurs. Ils décrivent une rapide activation d'une phospholipase A2 indépendante du calcium (PLA2) via l'activation d'une protéine G (Scherer, 2002). A travers l'action de PLA2, les acides gras s'accumuleraient et une protéine kinase pourrait être activée. Celle-ci pourrait alors stimuler l' H^+ -ATPase et les canaux K^+ . Cependant cette voie n'a pas été clairement mise en évidence et les différentes protéines impliquées n'ont pas été identifiées. D'autre part l'activité de protéines impliquées dans la transduction du



Figure 15. Schéma général des facteurs de transcription ARFs (A) et des AUX/IAAs (B).

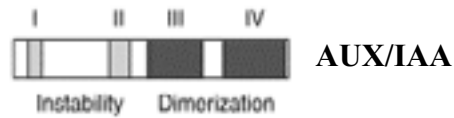
B

Domaine I: 9AA

Domaine II: 15AA

Domaine III: 40AA

Domaine IV: 45AA



Les protéines ARF et les AUX/IAA possèdent les domaines III et IV en communs, nécessaires à leur dimérisation
Reed 2001

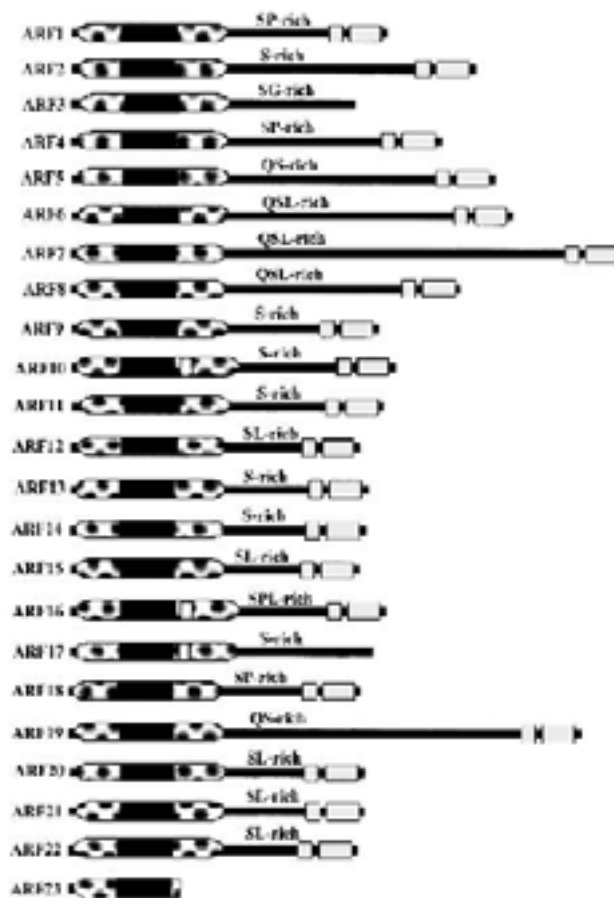


Figure 16. Diagramme schématique des protéines ARFs chez Arabidopsis.

Les tailles relatives des ARFs sont indiquées par les lignes noires.

Les domaines **DBD** sont indiqués par des ovales à l'extrémité N-terminale, et les domaines **B3** sont indiqués par les boîtes noires à l'intérieur des ovales. Les boîtes blanches dans le DBD des ARF10, 16, and 17 représentent l'insertion de résidus 32 to 36.

Les régions centrales **MR** sont caractérisées par leur enrichissement en acides aminés. Les deux boîtes situées en région C-terminale correspondent aux domaines III et IV, que possèdent également les protéines AUX/IAAs. Les protéines ARF3 et ARF17 ne possèdent pas ces domaines.

Guilfoyle et Hagen, 2001

signal a été caractérisée. Par exemple, l'activation d'une phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) par les radicaux libres d'oxygène produits sous l'action de l'auxine dans les racines de maïs (Joo et al., 2005).

3.2. Voie de régulation transcriptionnelle

L'implication des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) dans la transduction du signal auxinique fait l'objet de différentes controverses. En 1994 Mizoguchi et ses collaborateurs caractérisent deux ADNc qui correspondent à des MAPKs activées par l'auxine dans des cultures cellulaires de tabac (Mizoguchi et al., 1994). En 1998, Tena et Renaudin montrent, dans le même modèle, que cette activité kinase est en fait induite par l'acidité intracellulaire engendrée par la forte concentration d'auxine ajoutée (Tena and Renaudin, 1998) et que l'activité mitogène de l'auxine ne semble pas passer par l'activation de MAPK (Kovtun et al., 1998; Tena and Renaudin, 1998). De plus, Kovtun et ses collaborateurs montrant que l'action de l'auxine est inhibée par une cascade MAPK. En surexprimant NPK1 (une MAPKKK de tabac) dans des protoplastes de cellules de mésophylles, ils bloquent l'induction par l'auxine, du promoteur de la GH3 de soja. Ceci est confirmé par l'étude de l'orthologue de NPK1 chez *Arabidopsis* : ANP1. L'activation de cette protéine par l' H_2O_2 , suggère que le signal de stress oxydatif active les MAPKKK qui inhibent alors la signalisation auxinique (Kovtun et al., 2000). Ces résultats soulignent les interactions entre les réponses au stress oxydatif et à l'auxine qui passeraient par la régulation des espèces réactives à l'oxygène (ROS), et seraient à l'origine de différentes réponses de prolifération et de grandissement cellulaire (Pasternak et al., 2005).

Cependant, en 2000, Mockaitis et Howell mettent en évidence l'activation par l'auxine d'une activité MAPK dans les racines d'*Arabidopsis*, avec les mêmes caractéristiques que les ERK des mammifères (Extracellular Regulated Kinase, qui répondent principalement aux facteurs de croissances) (Mockaitis and Howell, 2000). Cette activité est diminuée chez le mutant *axr4* (*auxin resistant 4*), qui présente des perturbations au niveau du gravitropisme, de l'élongation racinaire, et de la formation des racines latérales. De plus l'utilisation d'inhibiteurs de MAPKK de mammifères, bloque l'expression de BA3::GUS (β -glucuronidase sous le contrôle du promoteur de IAA4/5).

L'ensemble de ces expériences suggère que l'implication des MAPK dans la signalisation auxinique dépend du tissu et de la réponse auxinique qui y est induite.

3.2.1. Les ARFs et les AUX/IAAs

Les protéines AUX/IAAs sont codées par des gènes de réponses primaires à l'auxine. Ces protéines ont un rôle majeur dans la régulation de la transcription des gènes en réponse à l'auxine. Elles sont constituées de 4 domaines conservés, dont les domaines III et IV qui leur permettent de former des dimères (**Figure 15**). La fonction principale des AUX/IAAs est de former des hétérodimères avec les Auxin Response Factor (ARFs) qui sont des facteurs de transcription. La formation de ces dimères a pour conséquence d'inhiber l'action des ARFs, qui peuvent être des activateurs ou des répresseurs de l'expression des gènes (**Figure 16**). Ils se lient à l'élément-cis de réponse à l'auxine, AUX/RE (**Auxin Responsive Element**), qui correspond à la séquence TGTCTC, située au niveau de la région promotrice

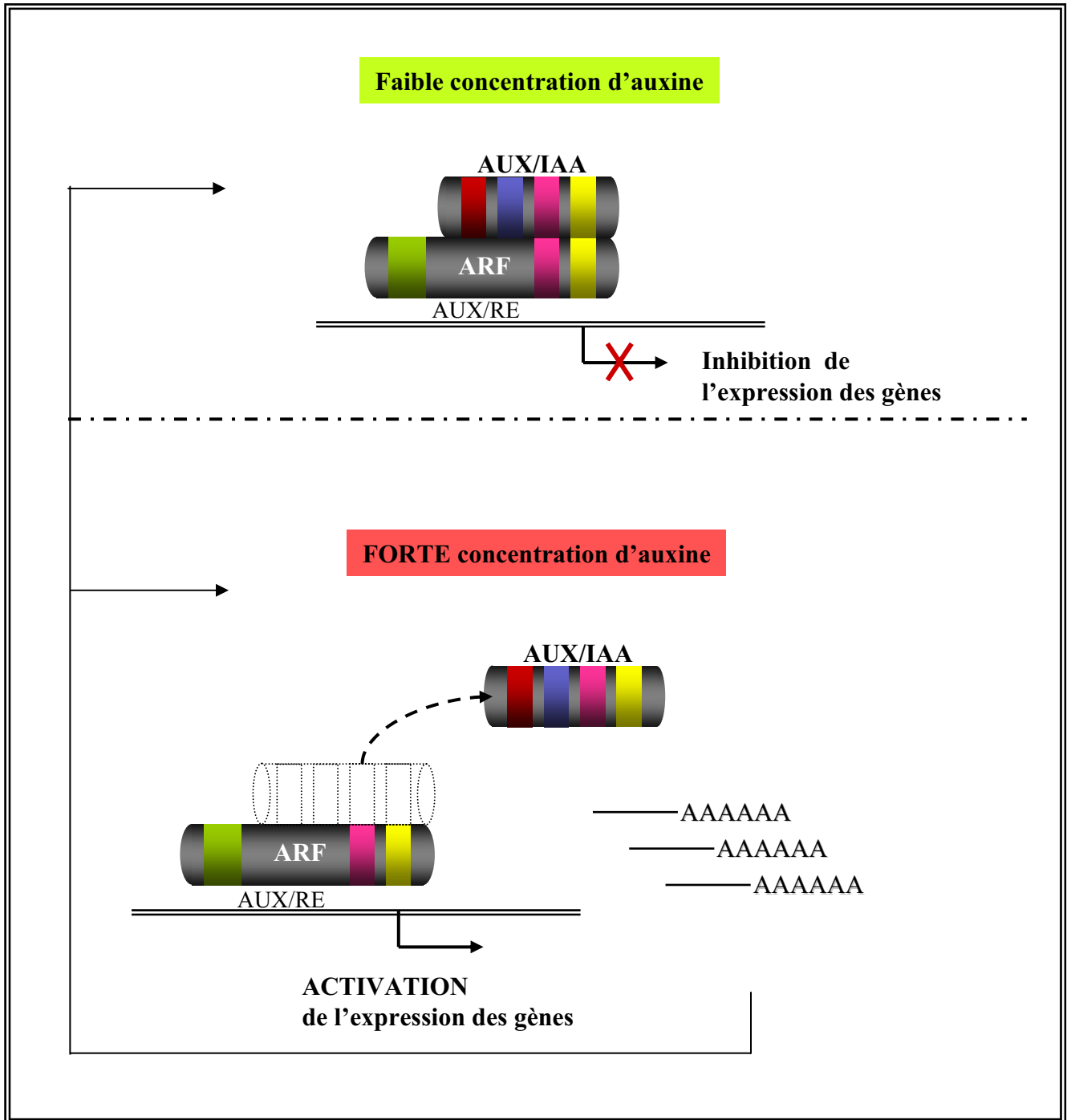


Figure 17. Contrôle de l'activité des facteurs de transcription ARFs par les AUX/IAAs, en fonction de la dose d'auxine

Les boîtes de couleur correspondent aux différents domaines des ARFs et des AUX/IAAs. Le domaine I (rouge), domaine II en bleu, domaine III en rose, domaine IV jaune et le domaine DBD en vert.

Inspiré de Berleth et al., 2004

La figure suivante montre le devenir des AUX/IAAs une fois détachés de ARF.

des gènes de réponse primaire à l'auxine. Ces éléments ont d'abord été caractérisés dans les régions promotrices des gènes *GH3* (gène de réponse primaire à l'auxine, paragraphe 4.2.1) dans les protoplastes de carotte (Ulmasov et al., 1995), puis découverts dans la majorité des gènes primaires répondant à l'auxine (Guilfoyle and Hagen, 2001). L'analyse fonctionnelle des ARFs, chez *Arabidopsis thaliana* montre qu'ils régulent des gènes primaires de réponse à l'auxine (*AUX/IAA*, *GH3*) ou liés au transport ou au métabolisme de cette hormone (*AUX1*, *PINoid*, *CYP79B2*...). Certaines ARFs régulent également l'expression de gènes reliés au signal éthylène, au métabolisme pariétal ou au développement (facteur de transcription AP2, LRP, Argos...) (Hu et al., 2003; Ullah et al., 2003; Okushima et al., 2005).

Les protéines ARFs contiennent 3 principales régions (Tiwari et al., 2003) (**Figure 15**). En N-terminal, il y a un domaine très conservé de liaison à l'ADN (domaine DBD), suffisant pour établir la liaison des ARF à l'ADN, de manière indépendante de l'auxine. A l'intérieur de ce domaine une région B3 très conservée est retrouvée dans de nombreux facteurs de transcription spécifiques du règne végétal (Guilfoyle and Hagen, 2001). La région centrale de ces protéines est très peu conservée et possède une fonction d'activation ou de répression (Tiwari et al., 2003). Cette région est riche en sérine et parfois certains ARFs contiennent des domaines supplémentaires enrichis en 1 ou 2 acides aminés supplémentaires (Guilfoyle and Hagen, 2001). Il a été montré que les ARFs activateurs de la transcription, tels que AtARF6-7-8 et 19, possèdent une région riche en glutamine (Ulmasov et al., 1995) et que les autres pourraient être des répresseurs de la transcription, comme AtARF1 et 2. La plupart des ARFs contiennent également une séquence conservée : **(R/K)LFGhxL** (h représente un résidu hydrophobe et x un résidu non conservé), qui est la seule responsable, de la fonction régulatrice des ARFs, et fonctionne indépendamment de l'auxine (Guilfoyle and Hagen, 2001).

Dans la plupart des cas, une région de dimérisation, située en C-terminal contient les domaines III et IV similaires aux domaines III et IV des AUX/IAAs (**Figure 15**). Cette région permet aux ARFs de former des homodimères ou des hétérodimères avec les AUX/IAAs. Cette dimérisation est régulée par la protéolyse des AUX/IAAs par le protéasome 26S, un complexe multiprotéique comprenant l'unité centrale 20S et deux unités régulatrices 19S. Seuls les AUX/IAAs qui auront été "marquées" par une chaîne de polyubiquitine seront dégradés. Cette ubiquitination est effectuée par le complexe Ubiquitine protein ligase, SCF^{TIR1} et dépend de la dose d'auxine. Ainsi des concentrations suffisantes d'auxine activent la dégradation des AUX/IAAs, lèvent l'inhibition sur les ARFs et activent la transcription des gènes (**Figure 17**).

Les mécanismes de régulation de la transcription des gènes de réponse à l'auxine ne sont pas encore connus en détails à cause du nombre important d'interactions possibles qui peuvent se produire entre les 22 membres ARF et les 29 membres AUX/IAAs (chez *Arabidopsis thaliana*).

3.2.2. Signalisation auxinique et dégradation protéique

Cette voie de signalisation fait intervenir le récepteur nucléaire de l'auxine TIR1, qui appartient au complexe SCF^{TIR1}. La liaison de l'auxine sur TIR1 favorise l'interaction de ce dernier avec les protéines AUX/IAAs, codées par des gènes primaires de réponse à l'auxine (**Figure 18**) (Zenser et al., 2001). Le complexe SCF^{TIR1} a pour fonction de cibler les protéines qui devront être dégradées par le 26S protéasome

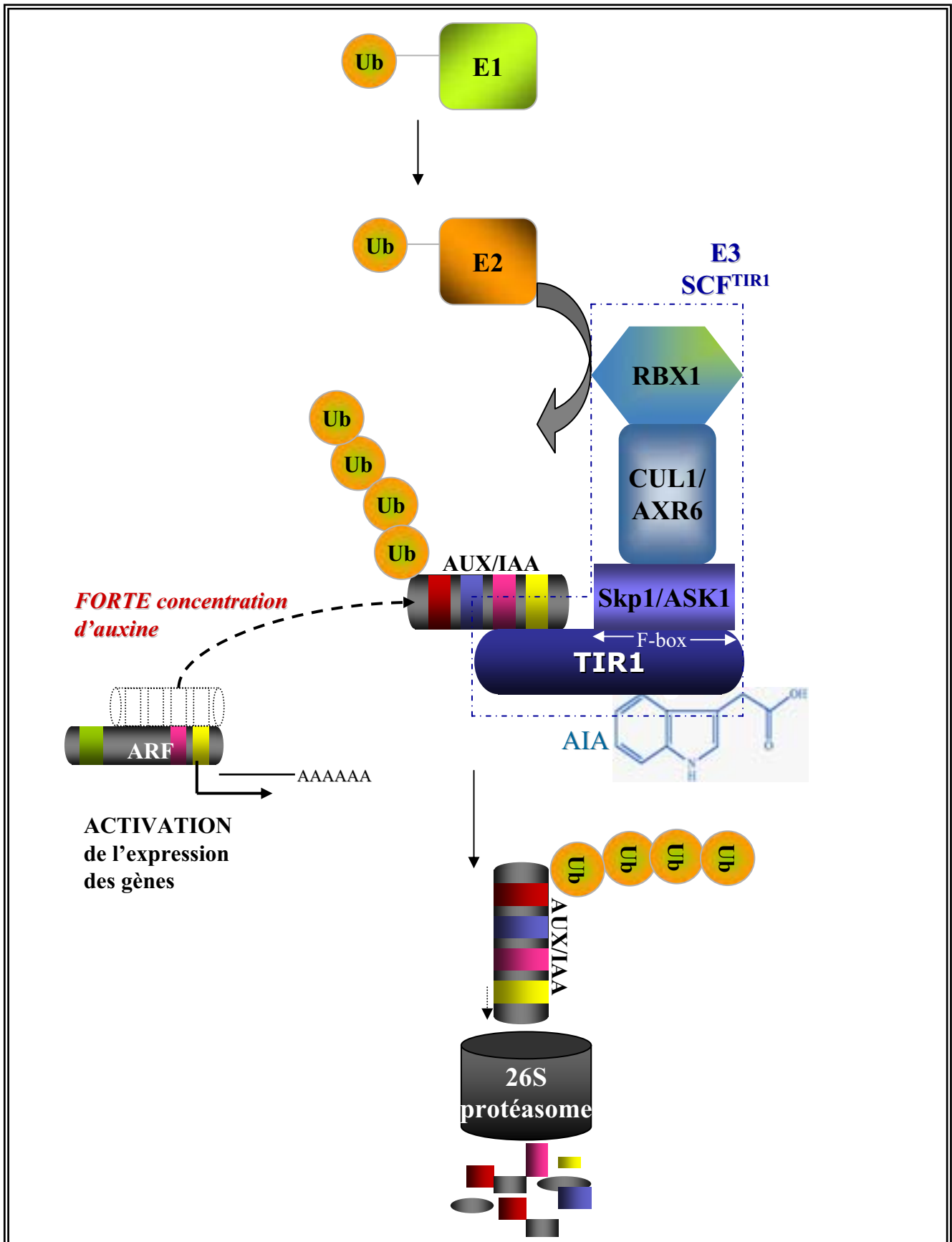


Figure 18. Régulation de l'activité des ARFs par l'ubiquitination et la protéolyse des AUX/IAAs

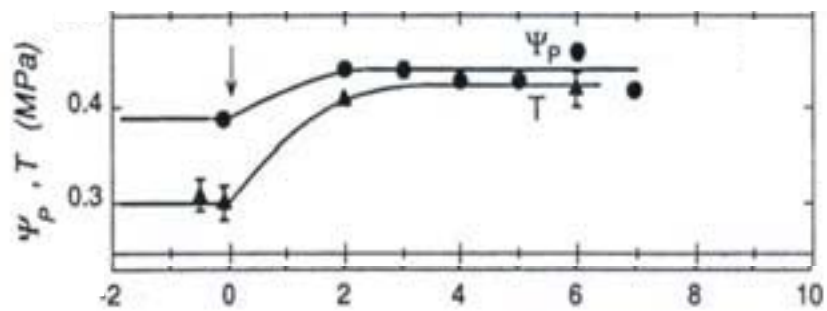
Pour être dégradées, les AUX/IAAs doivent d'abord être ubiquitinées par l'E3 ligase, appelée le complexe SCFTIR1. La fixation au complexe se fait par la protéine à F-Box, TIR1, cette liaison est dépendante de l'auxine, qui se lie à TIR1, son récepteur nucléaire. L'ubiquitine est activée par l'enzyme E1, puis l'enzyme de conjugaison E2 transmet l'ubiquitine au complexe E3 ligase, SCFTIR1, qui ajoute l'ubiquitine aux AUX/IAAs cibles. Ces protéines ubiquitinées, sont dirigées vers le protéasome 26S où elles sont dégradées. Inspiré de Berleth et al., 2004

dans le noyau, en leur ajoutant des ubiquitines (**Figure 18**). L'ubiquitination des protéines commence par l'activation d'une molécule d'ubiquitine par l'Enzyme E1 (Ubiquitin activating enzyme) qui forme une liaison thiol-ester entre le résidu Cys d'E1 et le résidu Gly en C-terminal d'une molécule d'ubiquitine (activation dépendante de l'ATP). Celle-ci est transférée à l'enzyme de conjugaison E2 (ubiquitin conjugating enzyme), également au niveau d'une Cys qui est très conservée parmi les protéines E2. Enfin, l'ubiquitine est attachée de manière covalente à la protéine cible grâce à ligase E3 (ubiquitine protein ligase). L'action de cette enzyme confère la spécificité de la cible, c'est la plus complexe et la plus diverse des 3 enzymes. Chez les plantes 4 types d'E3 ligases ont été identifiés : HECT (homology avec E6-AP carboxyl terminus) ; Ubr1p (Ubiquitin amino-end recognizing protein1) ; APC/C (anaphase promoting complexe/cyclosome) et SCF (**SKP1-Cullin/cdc53-Fbox**). L'auxine module la dégradation des AUX/IAAs via un complexe SCF composé de 4 sous-unités : CULLIN/Cdc53, Skp1/ASK1, RBX1/ROC/Hrt1 et TIR1, une protéine à F-box qui confère la spécificité au complexe SCF. La dégradation des protéines, contrôlée par leur ubiquitination, est un processus vital dans la régulation de la croissance et le développement des eucaryotes. Les complexes SCF couplés à différentes protéines F-box régulent ainsi le cycle cellulaire via la dégradation des cyclines (SCF^{Grr1}), ou le rythme circadien (ZTL), ou le développement floral (UFO), ou la réponse à l'acide jasmonique (SCF^{Coi1}) (Dharmasiri and Estelle, 2002).

Le complexe SCF^{TIR1}, contient comme son nom l'indique, la protéine TIR1 qui est constituée en C-terminal d'un domaine riche en Leucine (LEU rich repeats) et en N-terminal du domaine F-box, qui sert à la fixation à la protéine ASK1 (Gray et al., 1999). La protéine TIR1 a d'abord été identifiée, par clonage positionnel de la mutation *tir1* (*Transport Inhibitor Response 1*) conduisant à la résistance d'*Arabidopsis* à plusieurs phytotropines (Ruegger et al., 1997). Le gène *TIR1* code pour une protéine de 594 acides aminés et contient un domaine F-box en N-terminal et 16 Régions Riches en Leucine (LRR) (Ruegger et al., 1998).

Mis à part son rôle dans le contrôle de l'ubiquitination, il a récemment été découvert que TIR1 était aussi un récepteur à l'auxine. Ce sont des expériences d'immunoprécipitation avec des domaines caractéristiques des AUX/IAAs (gènes primaires de réponse à l'auxine et cibles du SCF^{TIR1}), qui ont permis de le mettre en évidence (Dharmasiri et al., 2005; Kepinski and Leyser, 2005). De plus, le fait que cette interaction soit dépendante de la dose d'auxine et qu'il ait été démontré que l'AIA se lie directement à TIR1 (Kepinski and Leyser, 2005) montre que TIR1 est un récepteur de l'AIA, bien que l'on ne sache pas encore comment l'auxine se lie à TIR1, ni comment elle module l'interaction de TIR1 avec les AUX/IAAs.

Le mutant *tir1* d'*Arabidopsis*, possède un phénotype peu altéré, avec une légère diminution de l'élongation de la racine et de l'hypocotyle et de la formation de racines latérales. Etant donné la quantité importante d'AIA retenu dans les essais de pull down d'AUX/IAAs à partir d'extrait du mutant *tir1*, il est suggéré que d'autres membres de la famille de TIR1 soient également des récepteurs à l'auxine (Dharmasiri et al., 2005). En effet, TIR1 appartient à une sous-famille contenant 7 membres chez *Arabidopsis*, dont 3 sont nommés AFB 1 à 3 pour "**A**uxin signalling **F-Box**" (Dharmasiri et al., 2005). Le pull down sur des extraits issus du quadruple mutant *tir1-afb1-2-3*, ne montre aucune détection d'AIA radiomarquée retenue. Ceci tend à prouver que l'auxine se lie à TIR1 mais aussi aux AFBs (Dharmasiri et al., 2005).



Temps après la décapitation de l'apex du coléoptile (h)

Figure 32. Évolution de la turgescence (Ψ_p) et du seuil de turgescence (T) en fonction de la durée de la carence auxinique (décapitation de l'apex du coléoptile)

Maruyama et Boyer 1994

Les protéines AUX/IAAs ont une demie-vie très courte : 10 à 80 min, augmentée après traitement avec un inhibiteur du protéasome, qui stabilise donc ces protéines et prouve leur relation avec le complexe SCF et le protéasome (Gray et al., 2001). L'interaction entre TIR1 et les AUX/IAAs est dépendante de la dose d'auxine (0,5 à 50 μ M d'AIA) et s'effectue dans les 5 premières minutes après l'ajout d'auxine (Kepinski and Leyser, 2005) (**Figure 19**). L'interaction est la plus forte en présence d'AIA, moins forte avec l'ANA et très faible avec du 2,4-D. La délétion de la F-BOX empêche l'interaction de TIR1 avec les AUX/IAAs, ce qui tend à démontrer que cette région intervient à la fois dans la liaison de TIR1 avec la sous-unité ASK1 du SCF et les AUX/IAAs.

L'analyse des mutants *aux/iaas* a révélé que le phénotype gain de fonction observé était dû à des mutations dans la séquence conservée GWPPV du domaine II de la protéine (Dharmasiri and Estelle, 2004), ceci ayant pour conséquence de favoriser la répression de la transcription des gènes et donc d'accroître l'insensibilité des plantes à l'auxine. Le domaine II permettrait au complexe SCF de se lier à la protéine cible (Ramos et al., 2001). Etant donné que l'interaction des protéines IAA3, IAA7 et IAA17 (mutants SHY3, AXR2 et AXR3 respectivement) avec SCF^{TIR1} a été prouvé ; il est fort possible que tous les AUX/IAAs interagissent avec ce complexe, mais cela n'a été que partiellement étudié.

3.2.3. Les différents niveaux de régulation du complexe SCF^{TIR1}

3.2.3.1. La rubiquitination du complexe SCF^{TIR1}

L'action du complexe SCF^{TIR1} est modulée par l'auxine mais également par la protéine RUB1 (related to ubiquitin1), qui ressemble à l'ubiquitine et qui modifie CUL1 (Dharmasiri and Estelle, 2004). Il existe 3 gènes codant pour la protéine RUB chez *Arabidopsis thaliana* (appelé NEDD8 chez l'humain et les levures). Les protéines RUB1 et RUB2 sont génétiquement et biochimiquement redondantes (Bostick et al., 2004). Elles sont nécessaires à l'établissement des premières divisions embryonnaires et à la régulation de différents processus développementaux (Bostick et al., 2004). RUB1 se lie de façon covalente au résidu Lys située en C-terminal de CUL1 (**Figure 20**). Comme pour l'ubiquitine, RUB nécessite une enzyme d'activation E1 et une enzyme de conjugaison E2. L'enzyme E1 serait apparemment un hétérodimère constitué de la protéine AXR1 (Auxin Resistant1) et ECR1 (E1 C-terminus-Related) (**Figure 20**). Chez *Arabidopsis* RUB E2 est appelé RCE (RUB-conjugating enzyme) et serait codé par deux gènes *RCE1* et *RCE2*. La fonction de RUB E3 serait remplie par RBX1 (une protéine à motif Ring-H2, appartenant au complexe SCF) qui permettrait la conjugaison de RUB1 sur CUL1 (Dharmasiri and Estelle, 2004). Le double mutant perte de fonction *axr1rce1* présente une forte diminution de la modification de CUL1 et entraîne une létalité des graines similaires aux mutants *monopteros* (*mp*) (perte de fonction) et *bodenlos* (*bdl*) (gain de fonction), dont les gènes codent respectivement pour *AtARF5* et *AtIAA12*.

La protéine RUB1 est enlevée de CUL1 par un autre complexe : le CSN (COP9 signalosome) qui possède une isopeptidase (**Figure 20**) (Schwechheimer et al., 2001). Des mutations dans le CSN provoquent une augmentation de CUL1-RUB, une stabilisation des AUX/IAAs et une diminution de l'expression des gènes AUX/IAAs induits primairement par l'auxine.

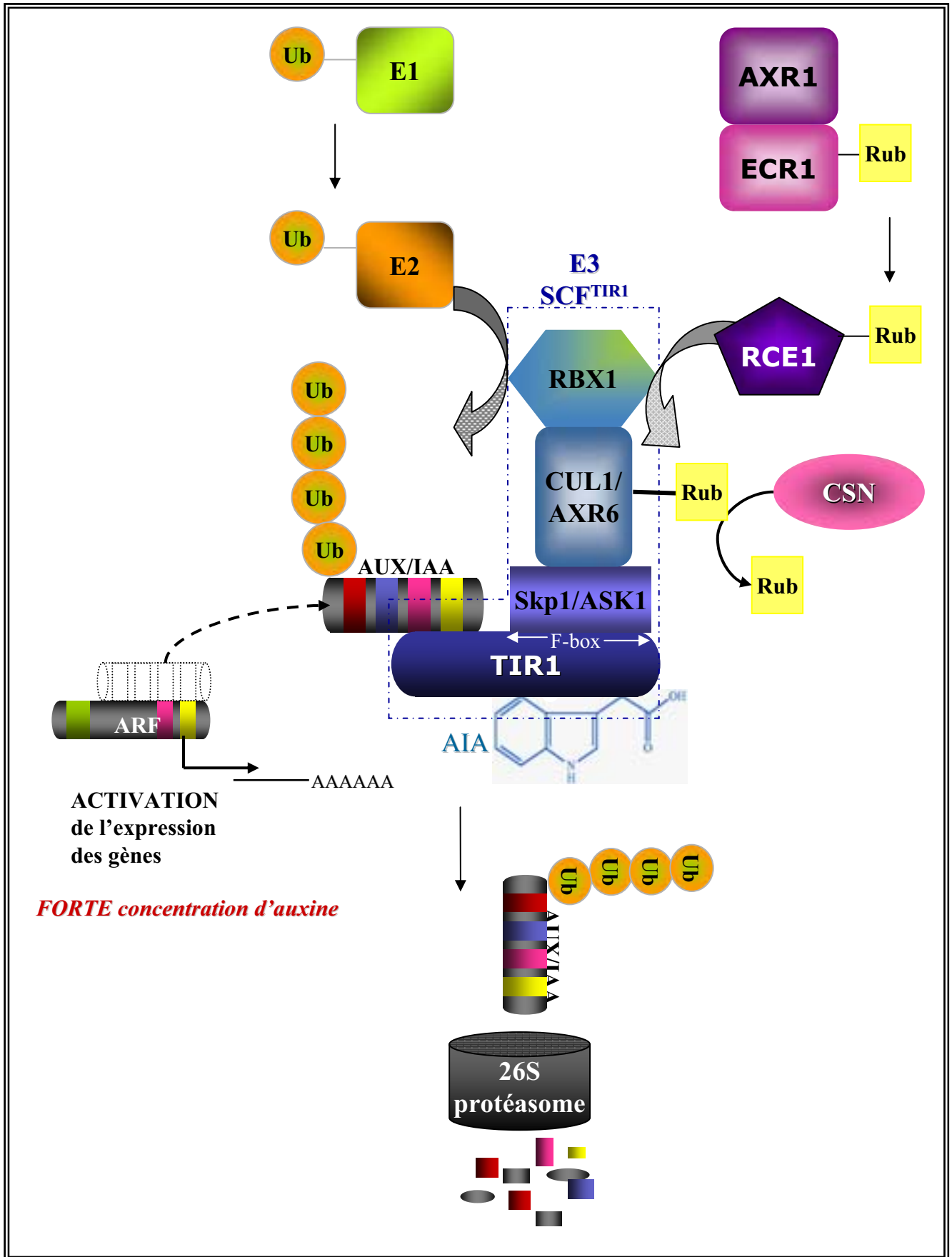


Figure 20. Régulation du complexe SCF^{TIR1} par la rubiquitination de la sous-unité CUL1
Le complexe AXR1-ECR1, joue le rôle de E1, et transfère Rub sur l'enzyme E2 RCE.
RBX1 possède l'activité E3 ligase.

Inspiré de Berleth et al., 2004

La régulation du complexe SCF^{TIR1} n'est pas encore bien caractérisée, car aucun gène codant pour l'un des composants de ce complexe n'est régulé transcriptionnellement par l'auxine, et des régulations post-transcriptionnelles n'ont pas encore été démontrées. Bien que certaines protéines à F-box soient connues pour s'auto-ubiquitinyler, aucune donnée sur la stabilité de TIR1 en absence d'auxine n'a été montrée (Dharmasiri and Estelle, 2004). La régulation de l'activité du complexe SCF pourrait être réalisée par la modification de la sous-unité CUL1, bien que l'impact de la conjugaison de RUB1 sur la réponse auxinique ne soit pas claire. *In vitro* la rubiquitination de CUL1 augmente l'activité du complexe SCF (Read et al., 2000). Le but de la conjugaison de RUB1 serait le recrutement de l'enzyme E2-Rub au complexe SCF et l'augmentation de l'affinité de CUL1 pour l'E2-Ub (Kawakami et al., 2001). La régulation de ce système, chez les animaux se fait par l'intervention d'une TATA-binding protein-interacting protein (CAND1) qui interagit avec la région N-ter et C-terminal de CUL1 non modifié. CAND1 est un régulateur négatif de l'assemblage du SCF car l'interaction CUL1 avec CAND1 est exclusive. La conjugaison de RUB favorise la dissociation de CAND1 et CUL1. Le génome d'*Arabidopsis* contient un gène homologue à CAND1 (une HEAT repeat protein). Le mutant *cand1* présente une incapacité à séquestrer CUL1 non modifiée (Cheng et al., 2004), ce qui se traduit par une insensibilité à l'auxine, et au sirtinol. Ce dernier est un inhibiteur des désacétylases dépendants du NAD et augmente la dégradation des AUX/IAAs, au niveau physiologique il mime l'effet de l'auxine (Zhao et al., 2003). Contrairement à *cand1*, le mutant *sir1*, résistant également au sirtinol, est hypersensible à l'auxine lors de tests d'élongation racinaire. SIR1 serait un régulateur négatif de la réponse à l'auxine. L'analyse de la séquence protéique de SIR1 montre un domaine similaire à AXR1 en N-terminal et un domaine rhodanèse en C-terminal (Zhao et al., 2003). La rhodanèse est une thiosulfate transférase impliquée dans la détoxification, mais certains motifs inactifs sont retrouvés chez les phosphatases, les MAPK, cdc25, par exemple, et interviendraient dans d'autres régulations.

3.2.3.2. Autres mécanismes de régulation

En parallèle de la régulation de l'activité du SCF, le ciblage des protéines à dégrader doit être également contrôlé. Plusieurs hypothèses sont formulées. Souvent la reconnaissance par le SCF nécessite la phosphorylation du substrat (**Figure 21**) (Dharmasiri and Estelle, 2004). L'intervention des MAPK ou des MAPKKK est très discutée dans la littérature (paragraphe 3.2) (Kovtun et al., 1998; Tena and Renaudin, 1998; Mockaitis and Howell, 2000) et la phosphatase IBR5, impliquée dans la signalisation auxinique et de l'ABA, qui pourrait réguler ces MAPK. Il a été montré que les AUX/IAAs étaient phosphorylées par le phytochrome A, une SER/THR kinase (Colon-Carmona et al., 2000), d'autant que les protéines AUX/IAAs contiennent une région riche en SER/THR dans leurs domaines I et II. La lumière modulerait donc l'activité des AUX/IAAs. La découverte de la SER/THR kinase PINOID, intervenant dans le transport de l'auxine et du photorécepteur NPH1, kinase régulée par la lumière et liée à cette kinase PINOID (Ren et al., 2004), montrent bien l'existence d'un ou des système(s) de régulation du signal auxinique basé sur la phosphorylation/déphosphorylation.

L'action d'une prolyl isomérase (PPI) semble agir directement sur la régulation des AUX/IAAs (**Figure 21**). La PPI est une hydroxy-isomérase, c'est à dire une enzyme qui catalyse l'isomérisation

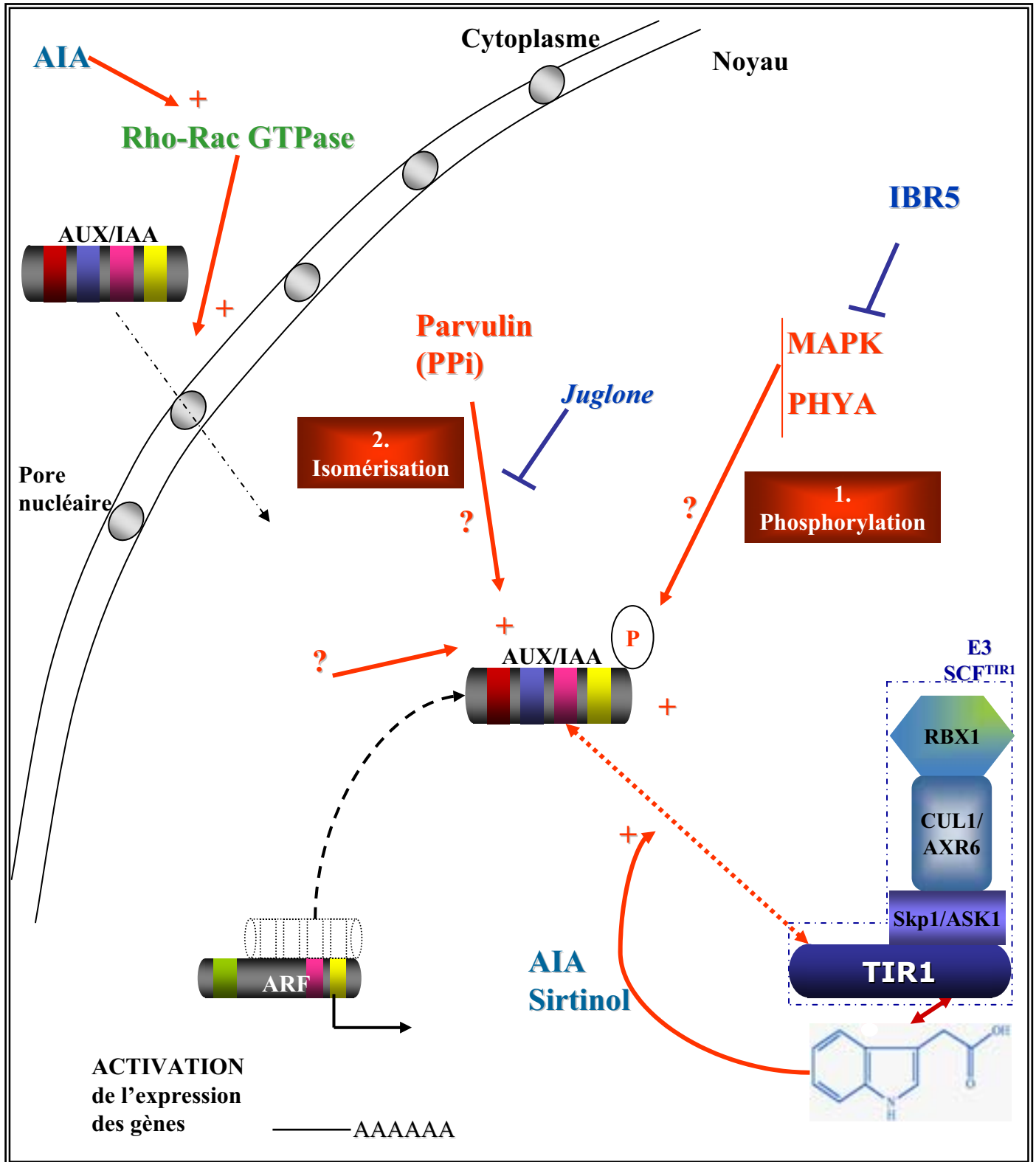


Figure 21. Régulation de l'ubiquitination des AUX/IAAs

Le recrutement des AUX/IAAs dans le noyau est favorisée par une Rho-RAC GTPase.

La reconnaissance des AUX/IAAs par le SCF^{TIR1}, nécessite leur "ciblage" par phosphorylation (par une MAPK, ou le phytochromeA, par exemple), leur isomérisation (par la parvuline, une prolyl isomérase) ou un autre mécanisme. Ces mécanismes sont activés par l'AIA et le sirtinol.

cis/trans de peptides. Il existe 3 groupes de PPI : les cyclophilines (inhibées par la cyclosporine), les FK506-binding proteins (inhibées par la FK506) et la parvuline (inhibée par la juglone). Seule la juglone diminue l'expression de BA3::GUS et l'interaction AUX/IAAs-TIR1 (Dharmasiri et al., 2003). Ceci tend à prouver l'action de la parvuline dans le ciblage des protéines AUX/IAAs, d'autant qu'elle possède un domaine rhodanese en C-terminal, comme SIR1 (Dharmasiri and Estelle, 2004).

L'auxine pourrait avoir aussi un contrôle sur l'activité du complexe SCF^{TIR1} via l'activation d'une protéine Rho-Rac GTPase qui favoriserait en retour l'expression des gènes de réponse à l'auxine (**Figure 21**) (Tao et al., 2002). Cette protéine serait un régulateur positif du système de dégradation des protéines (Ub/26S), vu que l'augmentation de son l'activité augmente la dégradation des AUX/IAAs en fonction de la concentration en auxine (Tao et al., 2002). De plus cette protéine, favoriserait le recrutement des AUX/IAAs dans le nucléoplasme, sous l'action de l'auxine.

De plus, des données restent encore à découvrir sur la régulation des AUX/IAAs et des ARFs, leur spécificité tissulaire, leur action coordonnée ou en synergie : comme les AUX/IAAs peuvent apparemment se lier eux aussi directement à l'ADN (Pabo and Sauer, 1992; Morgan et al., 1999), cette action serait-elle indépendante de celle des ARFs ?

Enfin, la régulation transcriptionnelle peut également s'exercer au travers des microARN (ARN non codant de 22 nucléotides de long). Une fois transcrits, ces microARNs s'hybrident sur une partie de la région 3' UTR des ARN messagers cibles, entraînant la répression de leur traduction ou leur dégradation (Reinhart et al., 2002), selon le degré de complémentarité entre le microARN et sa cible (Han et al., 2004). Les microARNs matures forment une structure en épingle à cheveux, très conservée au sein de cette famille (ZHANG et al., 2005). Ces petits ARNs, molécules clés du contrôle du développement de la plante, joueraient notamment un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de certains gènes, impliqués à différents niveaux de l'action de l'auxine. Par exemple, le microARN160 serait dirigé contre AtARF10, AtARF16 et AtARF17 (Mallory et al., 2005) et le microARN393 régule négativement la transcription de *TIR1* et des gènes *AFBs* en reconnaissant le motif F-box (Jones-Rhoades et al., 2006). Ce type de mécanisme ouvre de nouvelles perspectives sur la régulation transcriptionnelle de ces nouveaux récepteurs. La protéine NAC1 (voir paragraphe 5.2.5) est également régulée par la voie des microARNs, car miR164 cible différenciellement les facteurs de transcription possédant un domaine NAC (Mallory et al., 2005).

Ainsi sur la base de l'ensemble de ces données, un modèle de double voie de signalisation auxinique apparaît. Il y aurait un récepteur transmembranaire qui influencerait sur le transport ionique membranaire et l'expansion cellulaire (tel ABP1), et qui serait activé très rapidement par l'auxine apoplastique. En même temps il co-existerait un récepteur nucléaire qui modulerait la transcription des gènes en réponse à l'auxine intracellulaire (TIR1 et les AFBs) et qui induirait d'autres réponses plus lentes en induisant une amplification du signal et des effets de rétro-inhibition, telle que la régulation de l'expression de gènes de réponse à l'auxine activée par les facteurs de transcription de type ARFs (Auxin Response Factor), dont la dimérisation avec les AUX/IAA bloque leur activité.

Tableau 1. Tableau récapitulatif des gènes précoces de réponse à l'auxine en 1996.
Abel et Theologis, 1996

Gene	Plant Species	Response within ^a min	Sensitivity to CHX	Other Inducers ^b	Reference ^c
<i>Aux/IAA gene family</i>					
<i>Aux22</i>	<i>Glycine</i>	15	n.d. ^d	n.d.	Ainley et al. (1988)
<i>Aux28</i>	<i>Glycine</i>	30	n.d.	n.d.	Ainley et al. (1988)
<i>AtAux2-11 (IAA4)</i>	<i>Arabidopsis</i>	30	n.d.	n.d.	Conner et al. (1990)
<i>AtAux2-27 (IAA5)</i>	<i>Arabidopsis</i>	90	n.d.	n.d.	Conner et al. (1990)
<i>ARG3</i>	<i>Vigna</i>	20	n.d.	CHX	Yamamoto et al. (1992)
<i>ARG1</i>	<i>Vigna</i>	20	n.d.	CHX	Yamamoto (1994)
<i>GH1</i>	<i>Glycine</i>	15	Insensitive	-	Guilfoyle et al. (1993)
<i>PS-IAA4/5</i>	<i>Pisum</i>	5	Insensitive	CHX	Oeller et al. (1993)
<i>PS-IAA6</i>	<i>Pisum</i>	8	Insensitive	CHX	Oeller et al. (1993)
<i>IAA1-IAA6</i>	<i>Arabidopsis</i>	5-25	Insensitive	CHX	Abel et al. (1995b)
<i>IAA7, IAA8</i>	<i>Arabidopsis</i>	60-120	Sensitive	-	Abel et al. (1995b)
<i>IAA9-IAA14</i>	<i>Arabidopsis</i>	15-60	Insensitive	CHX	Abel et al. (1995b)
<i>SAUR gene family</i>					
<i>SAURs</i>	<i>Glycine</i>	3-5	Insensitive	CHX	McClure et al. (1989)
<i>ARG7</i>	<i>Vigna</i>	5	n.d.	CHX	Yamamoto (1994)
<i>SAUR-AC1</i>	<i>Arabidopsis</i>	n.d.	Insensitive	CHX	Gil et al. (1994)
<i>GH3 gene family</i>					
<i>GH3</i>	<i>Glycine</i>	5	Insensitive	-	Hagen et al. (1991)
<i>Genes encoding GST-like proteins^e</i>					
<i>GH24 (Gmhsp26-A)</i>	<i>Glycine</i>	15	Insensitive	CHX, Cd ²⁺	Hagen et al. (1988)
<i>parA</i>	<i>Nicotiana</i>	20	Insensitive	CHX, Cd ²⁺	Takahashi et al. (1995)
<i>parB</i>	<i>Nicotiana</i>	20	n.d.	n.d.	Takahashi and Nagata (1992a)
<i>parC</i>	<i>Nicotiana</i>	10	Insensitive	CHX	Takahashi and Nagata (1992b)
<i>pCNT103</i>	<i>Nicotiana</i>	15	Insensitive	CHX, SA	Van der Zaal et al. (1987)
<i>pCNT107 (parC)</i>	<i>Nicotiana</i>	15	Insensitive	ABA, SA	Van der Zaal et al. (1987)
<i>pCNT114 (parA)</i>	<i>Nicotiana</i>	30	Insensitive	Cu ²⁺ , SA	Van der Zaal et al. (1987)
<i>Genes encoding ACC synthase</i>					
<i>ACS4</i>	<i>Arabidopsis</i>	25	Insensitive	CHX	Abel et al. (1995a)
<i>CM-ACS2</i>	<i>Cucurbita</i>	20	n.d.	n.d.	Nakagawa et al. (1991)
<i>OS-ACS1</i>	<i>Oryza</i>	n.d.	Insensitive	CHX, anaerobiosis	Zarembinski and Theologis (1993)
<i>Miscellaneous genes</i>					
<i>ARG1</i>	<i>Vigna</i>	20	n.d.		Yamamoto et al. (1992)
<i>ARG2</i>	<i>Vigna</i>	20	n.d.	Heat shock	Yamamoto (1994)
<i>arCA</i>	<i>Nicotiana</i>	60	n.d.	n.d.	Ishida et al. (1993)

^a As detected by in vitro nuclear runoff transcription or by changes of steady-state mRNA levels. ^b A dash indicates that none of the agents tested other than active auxins are able to elicit a response. ^c The reference given does not necessarily coincide with the original publication. ^d n.d., Not determined. ^e For more genes encoding GST-like proteins, see Takahashi et al. (1995).

4. Les gènes primaires de réponses à l'auxine

On définit un gène de réponse primaire à un signal, par le fait que sa transcription est indépendante de la néo-synthèse de protéines, ce qui nécessite que les activateurs de sa transcription soient préexistants, mais inactifs lors de l'application du signal, et que la voie de transduction du signal passe par des régulations post-traductionnelles. Le promoteur de ces gènes est très souvent caractérisé par la présence de séquences TGTCT et GGTCCAT, responsables de l'induction de leur transcription par l'auxine (Li et al., 1994) et appelées AUX/REs (Auxin Response Element). La période séparant la perception du stimulus et l'activation du gène peut être de quelques minutes seulement. De par leur fonction de régulation, l'expression des gènes primaires est aussi souvent fortement régulée à plusieurs niveaux post-transcriptionnels pour faciliter la fin de réponse et un retour rapide dans le système inductible.

La principale manière de savoir si un gène est primaire ou pas, est de réaliser un traitement *in vivo* par le cycloheximide (CHX), qui est un inhibiteur de la synthèse protéique. L'expression des gènes de réponses primaires à l'auxine est insensible à l'application de CHX, certains ayant même la particularité d'être activés par le CHX seul et de présenter une superinduction lors d'un double traitement.

Dans les années 80-90, le criblage de gènes différentiellement exprimés dans différents modèles biologiques traités ou non avec de l'auxine a permis la découverte de nombreux gènes de réponse à l'auxine. Certains ont été définis comme primaires suite au traitement au CHX, d'autres n'ont pas été validés comme tels. Abel et Theologis, en 1996, résument l'état des connaissances à cette époque sur les gènes précoces à l'auxine (**Tableau 1**) (Abel and Theologis, 1996). Ces gènes ne sont, en général, pas activés seulement par l'auxine, mais aussi par des métaux lourds ou d'autres hormones telles que l'ABA ou l'acide salicylique ou par le cycloheximide seul. Depuis cette époque, plusieurs gènes précoces ont été découverts (Sawa et al., 2002) mais peu ont été caractérisés comme répondant principalement à l'auxine.

4.1. Les gènes précoces de réponse à l'auxine réprimés en présence de cycloheximide

4.1.1. Le gène *arcA*

L'expression de ce gène, isolé par Ishida et ses collaborateurs dans les années 90, dans les cellules de tabac BY-2, est induit dans la première heure suivant le traitement avec 0,9 μM de 2,4-D, de cellules BY-2 carencées en auxine pendant 3 jours (Ishida et al., 1993). L'induction a lieu également avec l'AIA et l'ANA, mais pas avec d'autres hormones (Ishida et al., 1996). Ce gène code pour une protéine contenant 7 répétitions WD-40 (répétition de 40 acides aminés de Trp-Asp) et correspond à la sous-unité β de protéines G hétérotrimériques. Cette protéine serait impliquée dans l'entrée en division des cellules. L'accumulation des transcrits de ce gène sous l'action de l'auxine, bien que rapide, est inhibée par un traitement préalable par le CHX (Ishida et al., 1996). La protéine ArcA serait un point d'ancrage pour la MAPKC et interagirait avec la sous-unité β d'un transporteur de K^+ (Sano et al., 2004). Cet exemple montre qu'un gène peut être induit rapidement par la voie de signalisation auxinique, sans être un gène primaire.

4.1.2. Les gènes ARG1 et ARG2

Dans les années 90 le groupe de Yamamoto caractérise des ARNm régulés par l'auxine dans les sections d'hypocotyles de *Vigna radiata* ; les **ARG** (pour **Auxin-Regulated-RNA**) (Yamamoto et al., 1992). La protéine ARG1 est homologue d'une Δ^{15} acide gras désaturase et ARG2 a 40 % d'identité avec une protéine LEA (Late Embryogenesis-Abundant) (Yamamoto, 1994). Ces gènes sont également fortement induits par le stress lié à la blessure, voire davantage que par l'AIA. Aucune donnée n'est fournie sur le caractère primaire de ces gènes, bien qu'ils soient induits par l'auxine en 20 min. La diversité fonctionnelle de ces gènes montre l'action pléiotrope de l'auxine, sans que l'on connaisse précisément le rôle qu'ils jouent dans l'élongation de l'hypocotyle.

4.2. Les gènes dont l'induction par l'auxine est insensible au CHX

4.2.1. Les gènes GH3

Le premier gène GH3 a d'abord été isolé à partir d'hypocotyles de soja, traités avec 50 μ M de 2,4-D pendant 2 h. Ce gène est exprimé dans le cortex, le protoxylème racinaire et de façon transitoire dans les fleurs et les gousses (Gee et al., 1991). L'application de 2,4-D entraîne une accumulation des transcrits de GH3 dans les régions vasculaires de tous les organes, ainsi que dans les feuilles. Les GH3 sont parmi les gènes les plus rapidement exprimés, entre 5 et 15 min après l'ajout d'auxine exogène (Hagen and Guilfoyle, 1985; Franco et al., 1990).

Actuellement, 19 gènes similaires à cette GH3 ont été découverts chez *Arabidopsis thaliana*. Ils sont composés de trois exons et codent pour une protéine de 70 kDa. La présence de plusieurs gènes serait liée à une spécificité tissulaire et /ou développementale, davantage qu'à des propriétés biochimiques différentes.

Récemment les gènes GH3 ont été définis comme appartenant à la superfamille des luciférases (ou adénylate-forming enzyme family) (Staswick et al., 2002). Ils sont divisés en trois groupes en fonction de leur similarité de séquence et de leur substrat. Les GH3 du groupe III ne semblent pas agir ni sur l'AIA, ni sur d'autres hormones (Staswick et al., 2002). Les enzymes du groupe I, comme JAR1, agirait en tant qu'acide jasmonique amino-synthétase (Staswick et al., 2005). Les GH3 découverts chez le tabac et la tomate appartiennent au groupe II et sont aussi des AIA-amino synthétases. L'adénylation de l'AIA permettrait d'initier sa conjugaison aux acides aminés, plus pour l'inactiver (synthèse de conjugués AIA-Asp et AIA-Glu) que pour former des conjugués de stockage (AIA-Ala et AIA-Leu). Les enzymes testées peuvent aussi adényler *in vitro*, l'ANA, le APA et l'AIB.

Les mutations insertionnelles dans les six *AtGH3* appartenant au groupe II entraînent une hypersensibilité des plantes à certains conjugués d'AIA, à l'AIA libre, mais pas au 2,4-D. Bien que le 2,4-D active l'expression des GH3, ces enzymes n'agissent pas sur sa métabolisation (Staswick et al., 2005).

L'auxine n'induit pas l'expression de tous les gènes GH3 du groupe II. Par exemple chez *Arabidopsis thaliana*, *GH3-17* est exprimé en absence d'auxine et n'est pas induit après traitement par l'ANA (Hagen and Guilfoyle, 2002).

De nombreuses études menées sur les mutants GH3 (mutants *dfi2* et *FIN219*), suggèrent l'implication de ces protéines dans la photomorphogenèse et la régulation du niveau d'auxine et appuient l'hypothèse d'une régulation de la voie de signalisation auxinique par les phytochromes (Hsieh et al., 2000; Tanaka et al., 2002; Tanaka et al., 2002; Takase et al., 2003).

Etant donné que la conjugaison est favorisée quand il y a un excès d'auxine, l'activation transcriptionnelle des AIA-amino synthétases favorise la formation de conjugués AIA-AA, qui sont inactifs ou dégradés. La régulation de l'expression de GH3 spécifiques est ainsi un rétro-contrôle sur l'homéostasie de l'AIA par l'auxine elle-même, dans les différents tissus, à des stades du développement donné et sous l'influence de divers stimuli.

4.2.2. Les Glutathion-S-transférases (GST)

A la fin des années 80, un certain nombre de gènes codant pour des GST ont été décrits comme répondant primairement à l'auxine. Les gènes *GH2/4*, ont ainsi été identifiés à partir de tissus en élongation chez le soja par le groupe de Guilfoyle. Bien que l'activation rapide de la transcription de ces gènes par l'auxine ne soit pas affectée par un traitement au CHX, ils ne sont pas spécifiques de la réponse auxinique. Le promoteur de ces gènes contient un élément ocs (pour octopine synthase) qui répond à certaines hormones dont l'auxine mais également à des forme d'auxines inactives. L'expression est également induite par d'autres hormones, des conditions de stress, des métaux lourds et des agents électrophiles (ou alkylant) (Ulmasov et al., 1994).

D'autres gènes codant pour des GSTs et induits par l'auxine ont été clonés à partir de protoplastes de cellules du mésophylle de tabac, et nommés gènes *par* (pour **p**rotoplast **a**uxin **r**egulated) et à partir de cultures cellulaires du cultivar White barley de tabac, et nommés *pCNT*. Dans ces deux modèles, les gènes sont exprimés entre 15 et 30 min après l'ajout d'auxine et l'accumulation de leurs messagers, sous l'effet de l'auxine, est insensible au CHX.

Dans les travaux de Takahashi et ses collaborateurs, l'expression de *parA* n'est induite que par le traitement au 2,4-D, plus faiblement par l'ANA et pas du tout par l'AIA (Takahashi et al., 1989). Sa localisation nucléaire a été démontrée par microscopie confocale dans les cellules BY-2 (Takahashi et al., 1995). Son induction, comme la plupart des GST n'est pas spécifique de l'auxine, mais dépend également du cadmium ; le promoteur de ce gène contenant un élément de réponse au cadmium dans sa séquence (Kusaba et al., 1996). Son expression n'est pas retrouvée dans les cellules BY-2 de tabac en cours de division.

Le gène *parB* est induit par le 2,4-D, mais également par l'AIA et l'ANA (Takahashi and Nagata, 1992). Son expression semble être spécifique de la réponse à l'auxine car il n'est pas activé par d'autres hormones, ni par d'autres stress, comme le choc thermique par exemple. L'analyse de sa séquence a révélé que son promoteur contenait deux éléments de réponses à l'auxine (AUX/REs). Dans les plants de tabac son expression est localisée à l'apex caulinaire et à la pointe des racines. (Takahashi et al., 1995). Bien que son expression soit inhibée en phase M, il interviendrait dans le contrôle de l'activité méristématique. Les GST et leur substrat, le glutathion, sont souvent reliés à la prolifération cellulaire et à la détoxification des xénobiotiques. Un troisième gène, *parC* a été cloné par les mêmes auteurs et présente les même caractéristiques que *parA* (Takahashi and Nagata, 1992).

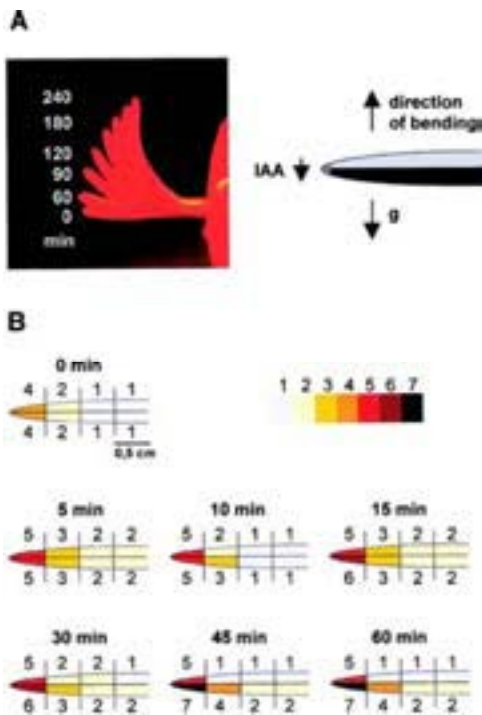


Figure 22. Courbure du coléoptile et redistribution de l'AIA en réponse au gravitropisme

(A. gauche) Cinétique de courbure du coléoptile (0-240 min) en réponse à une stimulation gravitropique de 90° gravistimulation. (A.droite) schéma de la gravistimulation du coléoptile. (B) Concentration d'AIA (pg AIA/mg matière fraîche) dans des segments de 0.5-cm de moitiées de coléoptiles stimulés pendant 0, 5, 10, 15, 30, 45, et 60 min. Le spectre d'AIA est décomposé en 7 gammes de concentrations reliées au code de couleur indiqué par: **1**, 10.8-13.9 ± 3.0; **2**, 14.1-17.9 ± 3.3; **3**, 19.9-23.5 ± 5.5; **4**, 16.9-31.2 ± 5.9; **5**, 34.6-42.5 ± 7.6; **6**, 48.7-49.4 ± 6.5; **7**, 51.1-58.8 ± 8.0 pg AIA/mg matière fraîche.

Phillipar et al. 1999

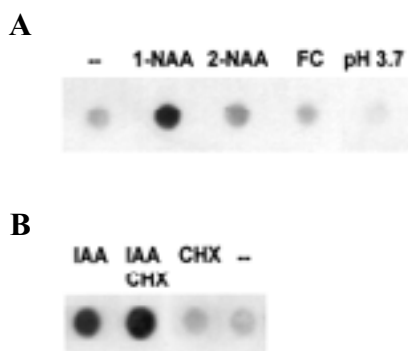


Figure 23. Caractérisation de l'accumulation des transcrits de ZMK1 en réponse à l'auxine.

A. L'induction de la transcription de *ZMK1* est induite spécifiquement par l'auxine active. Les coléoptiles et les tissus ont été traités pendant 1 h avec 5 µM 1-ANA, 5 µM 2-ANA, and 1 µM FC (fusiccocine) ou incubés dans un milieu à pH 3.7. B. L'induction de la transcription de *ZMK1* par l'auxine est indépendante du traitement au CHX. Coléoptiles traités pendant 1 h avec : 5 µM AIA, 5 µM AIA + 70 µM CHX, ou 70 µM CHX, contrôle tissu non traité(-).

Phillipar et al. 1999

En parallèle van der Zaal et ses collaborateurs ont isolé dans les cultures cellulaires de tabac 4 ADNc correspondant à des GST : *pCNT103-pCNT107- pCNT114 et pCNT115* (van der Zaal et al., 1987). Ces gènes sont activés transitoirement par un traitement au 2,4-D et par l'ANA mais pas par l'AIA. L'analyse des séquences a révélé que *pCNT114* correspond à *parA* et *pCNT107* à *parC* (Abel and Theologis, 1996). L'étude de *pCNT103* et *114*, a montré leur localisation nucléaire et la présence d'élément *as1* dans la séquence de leur promoteur (van der Zaal et al., 1996). Cet élément, présent dans le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, permettrait à l'auxine de moduler l'expression de ces gènes, bien que ce ne soit pas un élément de type AUX/REs. Pour induire ces gènes l'auxine n'agirait pas au travers des facteurs de transcription de type ARFs mais par TGA2, un facteur de transcription type bZIP (Niggeweg et al., 2000).

4.2.3. Le gène *ZMK1*

Le gène *ZMK1* codant pour un canal potassique chez le maïs a été associé à la croissance induite par l'auxine (**Figure 22**). L'expression de ce gène dans les tissus non vasculaires est activée spécifiquement par des auxines actives (**Figure 23**). Le suivi de l'accumulation des transcrits de *ZMK1* au cours de l'élongation du coléoptile, montre une corrélation entre le profil d'expression de *ZMK1*, régulée à la fois spatialement et temporellement, et l'accumulation d'auxine qui précèdent la courbure du coléoptile (Philippar et al., 1999). Un effet identique sur l'expression de ce transporteur est observé en réponse au phototropisme (Stiles et al., 2003).

4.2.4. Le gène *CRL1*

Le mutant ***Crown rootless 1*** (*Cr1*) a été caractérisé chez le riz (*Oriza sativa*). Ce mutant présente une diminution du nombre de racines latérales, une insensibilité à l'auxine pour former des racines latérales ainsi qu'un défaut de gravitropisme racinaire (Inukai et al., 2005). Les parties aériennes ne sont pas affectées par la mutation. Le clonage du gène a montré qu'il code pour une protéine de la famille des Asymmetric Leaves2 / Lateral Organ Boundaries (AS2/LOB). L'expression a été localisée dans les tissus parenchymateux adjacents au cylindre central, à l'origine de l'initiation des racines latérales et des racines du talle (Inukai et al., 2005). La séquence du promoteur de *CRL1* contient deux domaines d'éléments de réponse à l'auxine (AuxREs), dont l'un permet à OsARF1 de se fixer et d'activer la transcription de *Cr1* de façon primaire (Inukai et al., 2005).

4.3. Les gènes dont l'expression est insensible au CHX et induite par le CHX seul

4.3.1. Les gènes AUX/IAAs

Les gènes AUX/IAAs codent pour des protéines nucléaires à courte durée de vie, dont le rôle principal est de former des hétérodimères avec les facteurs de transcription ARFs, afin de réguler la transcription de gènes en réponse à l'auxine (Oeller and Theologis, 1995). Les ARNm de ces gènes s'accumulent davantage après le double traitement auxine+CHX, c'est ce que l'on appelle une super-

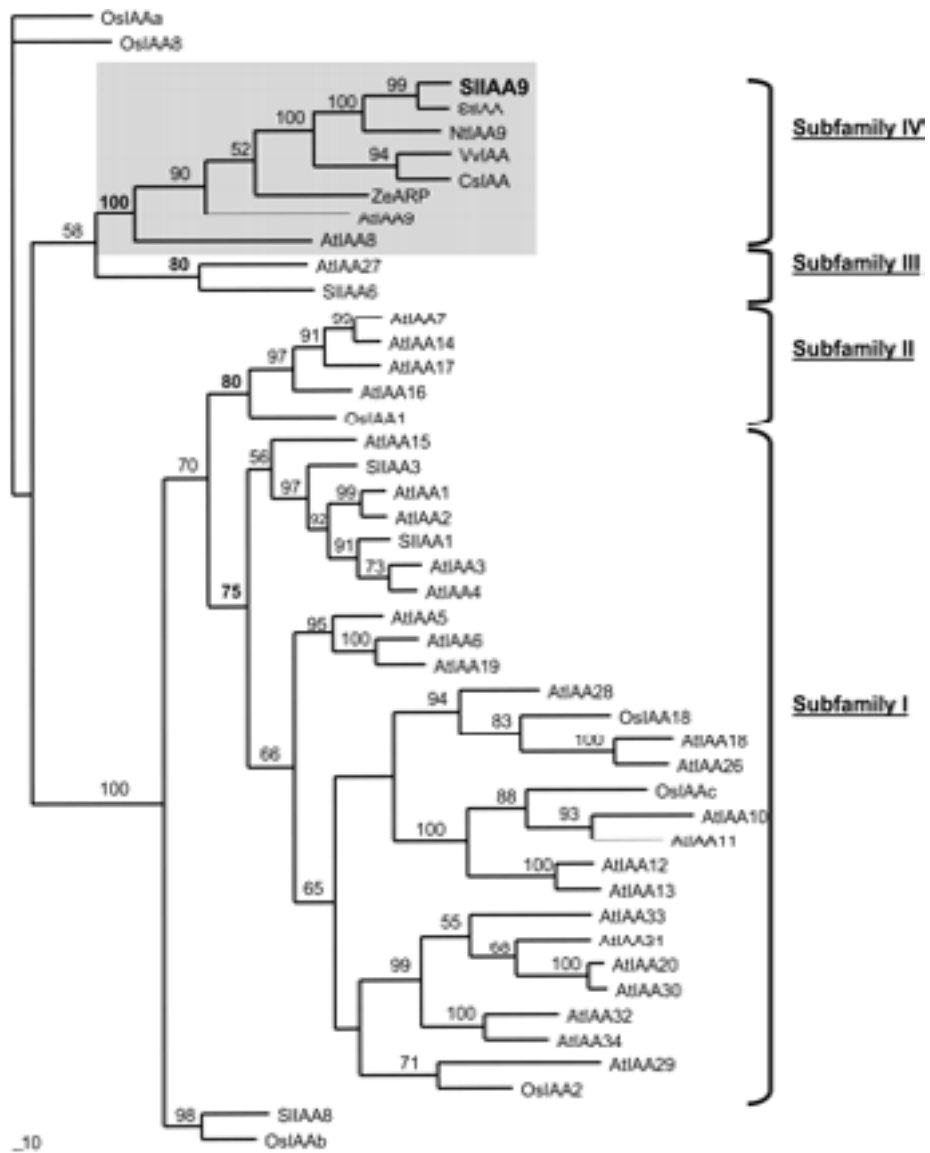


Figure 24. Arbre phylogénétique de la famille des AUX/IAAs
Wang et al. 2005

induction des gènes primaires. L'expression de la majorité de ces gènes est activée très rapidement par l'auxine (5 à 10 min) et n'est pas affectée par la présence de CHX, voir elle est induite par ce traitement (Koshiba et al., 1995). Les premiers gènes *aux/iaas* ont été mis en évidence chez le pois par l'équipe de Theologis en 1995. Ce phénomène est dû soit à l'activation de la transcription, soit à un processus de régulation post-transcriptionnel, et notamment, c'est l'hypothèse qui est favorisée, à une stabilisation des ARNm avec augmentation de leur durée de vie. Chez le pois, l'instabilité des ARNm de *PS-IAA4/5* et *PS-IAA6* serait due à la présence d'une séquence riche en AU en 3'-UTR, motif sur lequel s'accrochent des protéines en doigt de zinc qui déstabilisent les ARNm (Lai et al., 2002), mais cette hypothèse n'a pas été confirmée. Les gènes AUX/IAAs n'ont pas été trouvés chez les animaux, les champignons, et les bactéries. Ces gènes sont spécifiques des plantes, et ont déjà été caractérisés chez les dicotylédones (pois, soja, soja vert, arabette, tomate), les monocotylédones (maïs, et riz) et chez les gymnospermes (sapin).

La majorité des protéines AUX/IAAs contiennent quatre domaines très conservés (**Figure 15**), bien que un ou deux domaines manquent chez certaines de ces protéines. Les domaines sont notés I ; II ; III ; IV, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. Les domaines les plus importants semblent être I et IV, car ils sont systématiquement présents dans les séquences des AUX/IAAs (Reed, 2001). Le domaine I est le plus petit des domaines et le moins conservé. Il ne montre pas d'activité biochimique particulière (Reed, 2001). Le domaine II est très conservé et la plupart des mutants *aux/iaa* isolés présentent une mutation dans cette région, ce qui a pour conséquence d'augmenter la stabilité des protéines correspondantes (Ramos et al., 2001). C'est par ce domaine que ces protéines vont s'accrocher à la protéine à F-box du complexe SCF^{TIR1} (voir paragraphe signalisation), ce qui les entraîne vers la voie de la protéolyse. Les domaines III et IV modulent la dimérisation de ces protéines. En effet la régulation de l'expression des gènes par les AUX/IAAs nécessite la formation d'homodimères ou d'hétérodimères avec les facteurs de transcription ARFs (Kim et al., 1997). En particulier le domaine IV contient aussi un signal de localisation dans le noyau. Le recrutement nucléaire nécessiterait l'action d'une Rho-GTPase (voir paragraphe 3.2.3.2).

Les acides aminés divergents dans les domaines III et IV permettraient l'interaction avec d'autres protéines que les ARFs, et confèreraient la spécificité fonctionnelle des différents membres de cette famille, vis-à-vis de l'expression différentielle de gènes. En général, l'expression des AUX/IAAs est activée principalement par l'auxine, mais certains peuvent être des gènes secondaires, *Nt-iaa28* par exemple (Dargeviciute et al., 1998) et d'autres peuvent être réprimés par cette hormone (Rogg et al., 2001).

Chez *Arabidopsis thaliana* il existe 29 gènes qui constituent la famille multigénique des AUX/IAAs. L'analyse phylogénétique montre qu'il existe 4 sous-familles d'AUX/IAAs (Wang et al., 2005) (**Figure 24**). Les différents clades contiennent des AUX/IAAs qui semblent partager les mêmes propriétés fonctionnelles, et comparé à leur position génomique, il semble que les gènes d'une même sous-famille soient issus de nombreuses duplications génomiques (Liscum and Reed, 2002).

De nombreux mutants du développement se sont avérés en fait mutés dans un gène *Aux/iaa*. Il s'agit souvent de mutations gain-de-fonction, associées à une mutation dans le domaine II (**Tableau 2**). L'altération du gravitropisme racinaire et apical, de la formation de racines latérales, de la dominance apicale, de l'expansion foliaire ou de l'élongation de la tige, correspond à une diminution de la réponse auxinique causée par l'augmentation de la stabilité des AUX/IAAs. Cependant des mutations dans le

Tableau 2. Les gènes AUX/IAAs chez *Arabidopsis thaliana*

Phénotype gain de fonction des mutants *aux/iaa*, qui correspond souvent à une mutation dans le domaine II.

D'après Reed et al.2001

Gène Aux/IAA mutant	Mutation dans le domaine II	PHENOTYPE
AXR2/IAA7 <i>axr2-1</i>	VVGWPPVRN <i>S</i>	Hypocotyle court, pousse à l'obscurité, feuilles ondulées , pas de racines secondaires, agravitropisme des racines et des tiges
AXR3/IAA17 <i>axr3-1</i> <i>axr3-3</i>	VVGWPPVRS <i>L</i> <i>G</i>	Hypocotyle court, pousse à l'obscurité, feuilles recourbées, pas de racines secondaires, agravitropisme des racines
SHY2/IAA3 <i>shy2-1,2-2</i> <i>shy2-3</i> <i>shy2-6</i>	IVGWPPVRS <i>S</i> <i>E</i> <i>L</i>	Hypocotyle court, pousse à l'obscurité, feuilles recourbées
SLR1/IAA14 <i>slr1-1</i>	VVGWPPVRN <i>S</i>	Pas de racines latérales, peu de racines secondaires, agravitropisme des racines et de l'hypocotyle
IAA28 <i>iaa28-1</i>	VVGWPPVRS <i>L</i>	Peu de racines latérales, réduction de la dominance apicale
MSG2/IAA19 <i>msg2-1</i> <i>msg2-2</i> <i>msg2-3</i> <i>msg2-4</i>	VVGWPPVCS <i>S</i> <i>R</i> <i>L</i> <i>L</i>	gravitropisme et phototropisme de l'hypocotyle affecté, peu de racines latérales
IAA12 <i>bodenlos</i>	VVGWPPIGL <i>S</i>	Pas de racines embryonnaires, feuilles recourbées
IAA18 <i>iaa18-1</i>	VVGWPPVRS <i>E</i>	Hypocotyle long, cotylédons fusionnés, racine courte, feuilles recourbées
SHY1/IAA6 <i>shy1-1</i>	AVGWPPVCS <i>R</i>	Hypocotyle court, feuilles recourbées

domaine II peuvent aussi s'accompagner d'une hypersensibilité à l'auxine, comme chez le mutant *axr3-1* (AXR3=IAA17), selon que la protéine AUX/IAA régule positivement ou négativement l'expression des gènes de réponse à l'auxine. Les mutants perte de fonction des AUX/IAAs inhibent l'expression des gènes et ne montrent généralement pas de forts phénotypes, ce qui est attribué à la redondance fonctionnelle des membres de cette famille (Reed, 2001). Les analyses fonctionnelles réalisées sur 12 (/ 29) membres de la famille AUX/IAAs dans des plantules d'*Arabidopsis* (Overvoorde et al., 2005) se sont basées sur l'étude de mutants d'insertions. Ces mutants ne montrent pas de problèmes développementaux, les doubles et triples mutants non plus. Ceci prouve l'extrême redondance fonctionnelle des AUX/IAAs.

Mis à part le phénotype des mutants, la fonction moléculaire des AUX/IAAs est très peu connue. La caractérisation du mutant SHY/IAA3 par une approche "puces à ADN", montre que ce gène (Tian et al., 2002) inhibe l'expression de gènes activés ou inhibés par l'auxine ainsi que d'autres gènes indépendants de la voie auxinique, tels que des gènes de réponse à la lumière. D'ailleurs les protéines AUX/IAAs ont également été décrites comme médiateurs de la régulation des gènes en réponse à la lumière (Colon-Carmona et al., 2000; Reed, 2001).

4.3.2. Les gènes ARFs

Les facteurs de transcription ARFs sont connus pour ne pas être régulés principalement par l'auxine. Or les travaux de Waller en 2002, démontrent que le gène *OsARF1*, répond principalement à l'auxine chez le riz. Ceci est dû notamment à la présence d'un élément-*cis* de réponse à l'auxine (AUX/RE) dans la région promotrice d'*OsARF1*. L'accumulation des transcrits est détectée lors d'une stimulation gravitropique, sur la face basale du coléoptile, qui correspond à la zone d'élongation (Waller et al., 2002). L'application d'auxine exogène accroît l'expression d'*OsARF1* en 15 minutes et cette induction n'est pas affectée par un traitement au CHX. Au contraire, le double traitement auxine+CHX provoque une super-induction. La découverte d'une protéine ARF régulée principalement au niveau transcriptionnel montre une nouvelle voie de régulation des gènes induits par l'auxine et un possible rétro-contrôle d'*ARF1* sur lui-même, ou par d'autres ARFs.

4.3.3. Les gènes SAURs

Les SAURs (Small Auxin Up RNAs) forment un groupe de petits gènes induits par l'auxine et découverts dans les années 1985, à partir de sections d'hypocotyle de soja en élongation (McClure and Guilfoyle, 1987). Depuis, des gènes SAURs ont été clonés et caractérisés chez le pois, le tabac et l'arabette. Les séquences (500 pb à 900 bp) des gènes SAURs de soja ne contiennent pas d'introns et codent pour des polypeptides de 9 à 10 KDa (McClure et al., 1989). Le promoteur possède une région NDE de 30 bp qui contient deux séquences éléments AUX/REs (Li et al., 1994). Le séquençage du génome d'*Arabidopsis* a révélé 70 gènes SAURs et tous (sauf SAUR1) correspondent à ces critères moléculaires. Ces gènes sont regroupés au sein de même loci, sur les chromosomes 1, 3, 4 et 5, et une situation analogue est rencontrée chez le soja (McClure et al., 1989; Hagen and Guilfoyle, 2002). Pour le moment la réponse à l'auxine de tous les membres de cette famille n'est pas démontrée (Hagen and Guilfoyle, 2002).

Les études sur l'hypocotyle de soja révèlent une expression particulièrement forte des SAURs dans l'épiderme et les cellules corticales. L'induction par l'auxine a lieu dans ces mêmes tissus et est spécifique des auxines actives (McClure et al., 1989). L'accumulation des messagers est détectée entre 2 et 5 minutes après traitement des hypocotyles avec 50 μ M de 2,4-D et augmente jusqu'à 1 h après (McClure and Guilfoyle, 1987). Cette accumulation des ARNm des SAURs n'est pas inhibée par le traitement au CHX et la superinduction est maximale après 1 h de traitement AIA+CHX (McClure and Guilfoyle, 1987). Ceci tend à montrer une action du CHX sur la stabilisation des SAURs, par exemple via des protéines de courte durée de vie, qui réguleraient négativement l'expression des SAURs, comme proposé par l'équipe de Guilfoyle (Franco et al., 1990). L'instabilité des ARNs des SAURs serait due à la présence d'un élément DST conservé dans la région 3' UTR (McClure et al., 1989). Il peut également y avoir une régulation post-traductionnelle, la détection par anti-corps Anti-SAUR suggèrent que les protéines SAURs sont très peu stables, car peu abondantes dans l'hypocotyle de soja (Hagen and Guilfoyle, 2002). La fonction précise des SAURs reste encore inconnue. L'étude de Zm-SAUR1 et Zm-SAUR2 chez le maïs tend à proposer que ces protéines interviendraient dans la signalisation de l'auxine dépendant de la voie calcium/calmoduline. Yang et Poovaiah ont identifié Zm-SAUR1 comme une protéine se liant à la calmoduline de façon dépendante du calcium (Yang and Poovaiah, 2000), et l'analyse des séquences de SAUR d'Arabidopsis, de soja et de maïs, suggère que la majorité des SAURs possèdent une région de liaison à la calmoduline en position N-terminale.

4.3.4. Les gènes ACS

L'éthylène est également une phytohormone, qui intervient dans différents processus de croissance de la plante et de maturation des fruits (Bleecker and Kende, 2000). Sa production est régulée par divers stress et par l'auxine. Dans les années 90s, des gènes codant pour les ACS ont été décrits comme des gènes de réponse primaire à l'auxine dans différentes espèces. Les gènes ACS codent pour la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, enzyme clef de la voie de biosynthèse de l'éthylène. L'*At-ACS4* a particulièrement été étudié pour sa réponse rapide et dépendante de la dose d'auxine, non affecté par le traitement au CHX, voir induite par ce seul traitement (Abel et al., 1995). Chez le mutant *axr2* (*At-IAA7*), l'expression est presque complètement éteinte (Abel et al., 1995), ce qui tend à montrer la régulation de l'expression d'*ACS4* par l'AUX/IAA *At-IAA7*.

L'analyse des séquences génomiques d'Arabidopsis a révélé la présence de 12 gènes putatifs d'*At-ACS*. L'équipe d'A. Theologis a montré que dans les plantules étiolées, l'expression des *At-ACS* 2,4,5,6,8,11,10 et 12 est induite par l'auxine (Yamagami et al., 2003). Les gènes *ACS10* et *ACS12* codent pour des aminotransférases, mais pas pour une ACCsynthase, ce qui met en évidence l'implication de l'auxine dans un autre processus que la synthèse d'éthylène.

Par des fusions ACS::GUS, il a été observé que les gènes *ACS* 2,4,5,6,7,8,11 sont constitutivement exprimés dans les racines, et principalement dans le cylindre centrale de la racine (Tsuchisaka and Theologis, 2004). L'accumulation de ses transcrits est accrue en présence d'AIA, et altère également leur profil d'expression, en influençant leur localisation au sein des différents tissus racinaires (Tsuchisaka and Theologis, 2004).

Tableau 3. Candidats de gène précoces de réponse à l'auxine

Résultats de l'analyse des microarrays affymetrix réalisés sur plantules d'Ath traitées pendant 15 min avec 1 μ M AIA

Sawa et al. 2002

Class	Gene	Accession	Coded protein features	Ratio			New/reported
				Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	
1	IAA1	L15448	AUX/IAA family	25	14.4	8.9	Reported
	IAA2	AF027157	AUX/IAA family	4	3.7	4.8	Reported
	IAA3	U18406	AUX/IAA family	3.4	3.6	1.6	-
	IAA5	U18407	AUX/IAA family	24	24	32.6	Reported
	IAA6	U18408	AUX/IAA family	3.5	3.3	4.5	Reported
	IAA7	U18409	AUX/IAA family	-1.1	-1.2	-1.1	-
	IAA8	AC006340	AUX/IAA family	1.1	1.8	1.2	-
	IAA9	U18411	AUX/IAA family	1.1	1.3	1.4	-
	IAA10	U18412	AUX/IAA family	1.1	1.3	-1.0	-
	IAA11	U18413	AUX/IAA family	2.9	1.9	2.3	-
	IAA12	U18414	AUX/IAA family	1.0	1.4	1.5	-
	IAA13	U18415	AUX/IAA family	1.4	1.3	2.0	-
	IAA15	U18417	AUX/IAA family	1.7	1.5	-1.2	-
	IAA16	U49072	AUX/IAA family	-1.1	1.3	1.1	-
	IAA17	AF040632	AUX/IAA family	1.5	1.6	-1.0	-
	IAA18	U49074	AUX/IAA family	-1.2	-1.3	1.1	-
	IAA19	U49075	AUX/IAA family	6.2	5.5	2.5	New
	IAA20	U49076	AUX/IAA family	2.2	1.6	-1.4	-
	IAA26	AF089291	AUX/IAA family	1.0	1.4	1.1	-
	IAA28	AF149816	AUX/IAA family	1.1	-1.4	1.1	-
SAUR AC1	S70188	SAUR-AC1	8.3	6.8	6.5	Reported	
AUR1	AC006201/T27K22.12	SAUR-AC1 like	10.6	4.8	2.5	New	
AUR2	AL022373/T19K4.240	SAUR-AC1 like	10.2	8.0	2.8	New	
AUR3	AL035601/F6G17.40	GH3 like	17.3	18.2	8.8	New	
AUR4	AC002391/T20D16.20	GH3 like	13.7	17.5	5.2	New	
2	ADR1	AL035528/F18A5.290	LRR (leucine-rich repeat) motif	-2.8	-3.3	-2.4	New
	AUR5	AC004165/T27E13.22	Putative MAPKKK	8.4	9.9	5.3	New
	AUR6	AL030978/M4I22.90	Putative Ca binding protein	10.6	12.4	7.6	New
	AUR7	AL031032/F17I5.110	Putative protein phosphate 2C	2.9	2.6	2.0	New
3	XTR6	U43488	Xyloglucan endotransglycosylase related	4.4	6.6	4.9	New
	TCH4	AF051338	Xyloglucan endotransglycosylase related	3.5	4.5	5.0	Reported
4	AUR8	AL021961/F28A23.90	Extensin like	2.9	3.4	2.1	New
	AUR9	AL035601/F6G17.20	P450 like	5.1	2.5	3.2	New
5	AtACS-6	M92354	ACC synthase related	5.2	5.0	11.0	New
	HAT2	U09335	HD-Zip II subfamily	15.5	15.6	2.5	New
	STZ	X95573	Zn finger-like (C2-H2 type)	5.6	7.5	7.5	New
	AUR10	AF085279/T07M07.3	Zn finger-like (C3-H type)	4.7	3.6	4.8	New
	AUR11	AC004683/T19C21.4	Zn finger-like (WRKY type)	3.5	4.2	9.4	New
	AUR12	AC005896/F3G5.22	Zn finger-like (C2-H2 type)	3.3	3.1	6.4	New
	AtMYB50	Z95773	MYB like (R2R3)	2.8	2.3	2.0	New
	AtMYB77	Y14208	MYB like (R2R3)	2.0	2.1	2.3	New
	AUR13	AC002388/T13E15.15	AP2 like (EREBP homolog)	3.9	3.2	22.0	New
	AtERF6	AB013301	AP2 like	4.3	8.5	5.1	New
6	AUR14	AC006921/F2H17.17	No homology	2.9	2.6	2.4	New
	AUR15	AC007357/F3F19.27	41 a.a. peptide	5.7	5.5	2.1	New

Upregulated candidates are shown in red and downregulated candidates in blue.

When genes have names on database, we adopted their names. Otherwise, we designated ADR1 (auxin downregulated1) and 15 AUR (auxin upregulated) genes.

D'autres travaux montrent la régulation précoce par l'auxine de l'expression d'autres gènes intervenant dans la voie de biosynthèse d'éthylène (les ACC oxydases, par exemple (Kim et al., 2001 ; Woltering et al., 2005)), ce qui confirme l'action de l'auxine sur le contrôle précis de la production de l'éthylène (Gray, 2004).

4.3.5. Le gène *FQR1*

Récemment il a été cloné chez *Arabidopsis thaliana* un gène codant pour une flavine mononucléotide quinone réductase (*FQR1*) (Laskowski et al., 2002). Son expression est induite dès 10 min après l'ajout d'auxine et atteint son maximum (expression multipliée par 10) après 30 min de traitement (Laskowski et al., 2002). Comme pour d'autres gènes de réponse à l'auxine, le traitement au CHX n'affecte pas l'induction par l'AIA, il peut même activer seul l'expression de *FQR1*. Dans un système hétérologue bactérien, *FQR1* entraîne une activité quinone réductase accrue et catalyse le transfert d'électrons à partir de NADPH et NADH vers différents substrats (Laskowski et al., 2002). Les GST et les quinones réductases sont des enzymes impliquées dans la détoxification cellulaire et participe aussi à la défense des cellules contre le stress oxydatif induit par l'auxine (Chen et al., 1996; Vranova et al., 2002). Cependant la fonction *in planta* de ces gènes reste à découvrir. En outre, l'induction par l'auxine des gènes primaires précédent s'effectue par l'intermédiaire des éléments AUX/RE du promoteur. Or le promoteur de *FQR1* ne possède pas ces éléments de réponse, ce qui laisse supposer que son expression pourrait être induite par le stress oxydatif plutôt que directement par l'AIA (Laskowski et al., 2002).

Le groupe de Koshiba du RIKEN institute, a recherché des gènes précoces de réponse à l'auxine par analyse par microarrays Affymetrix d'extraits de plantules d'*Arabidopsis* traitées avec 1 μ M d'AIA pendant 15 min (Sawa et al., 2002). Ils en ont ressorti une trentaine de gènes activés ou inhibés par l'auxine qu'ils ont classé en 6 groupes fonctionnels (**Tableau 3**). Le premier groupe comprend les *aux/iaas*, les *SAURs* et les *GH3*, le deuxième est constitué de gènes de la transduction d'un signal, le troisième, de gènes liés à l'élongation cellulaire. Le quatrième regroupe des gènes impliqués dans la production ou la dégradation des hormones, le cinquième est constitué de facteurs de transcription et enfin le sixième groupe est constitué des gènes non identifiés pour le moment. Cette étude ne comprenant aucun traitement au CHX, ces gènes ne sont pour le moment pas décrits comme régulés primaires par l'auxine.

Parmi cette liste, les auteurs se sont focalisés sur un gène homéobox codant pour un facteur de transcription de type HD-Zip, nommé HAT2. L'expression de ce gène est activée 15 min après le traitement à l'auxine, de façon spécifique. Chez le mutant *tir1*, l'induction par l'auxine de l'expression d'HAT2 est grandement diminuée, ce qui porte à croire que l'interaction entre l'auxine et son récepteur intracellulaire est nécessaire à l'activation de ce gène. En 2005, Son et ses collaborateurs confirment l'intervention des gènes à homéodomains-leucine zipper dans l'action de l'auxine. Parmi les 8 gènes homéobox sélectionnés dans le génome d'*Arabidopsis*, l'expression d'*ATHB53* est induite par l'auxine et inhibée par les cytokinines (Son et al., 2004). De plus sa localisation au niveau du méristème racinaire (Son et al., 2004) tend à montrer l'implication de ce facteur de transcription dans la régulation du développement racinaire par ces deux hormones.

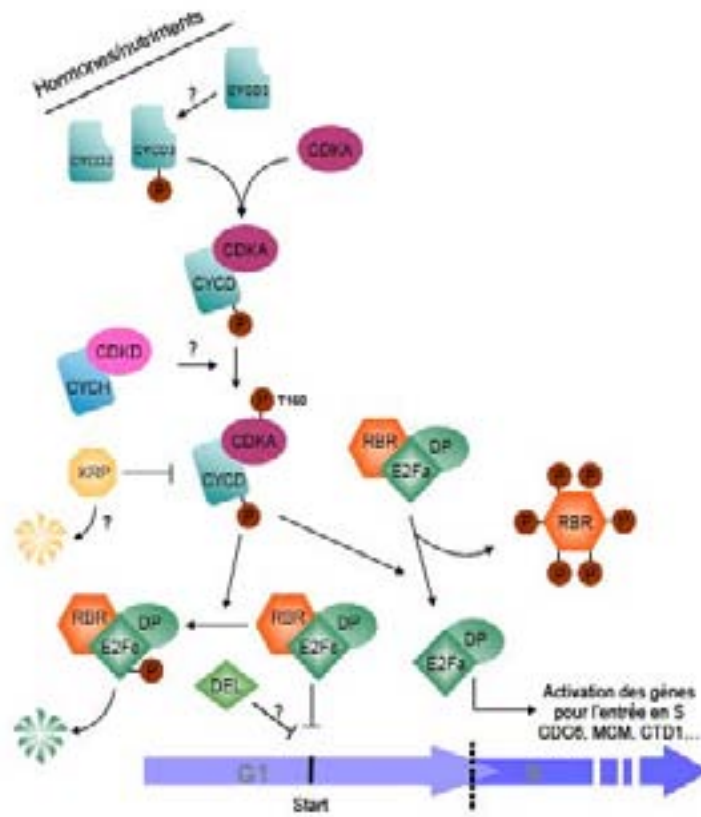


Figure 25. Schéma de la régulation de la transition G1/S chez les plantes

Les points d'interrogation représentent les voies qui ne sont pas totalement démontrées expérimentalement (adapté de De Veylder et al. 2003).

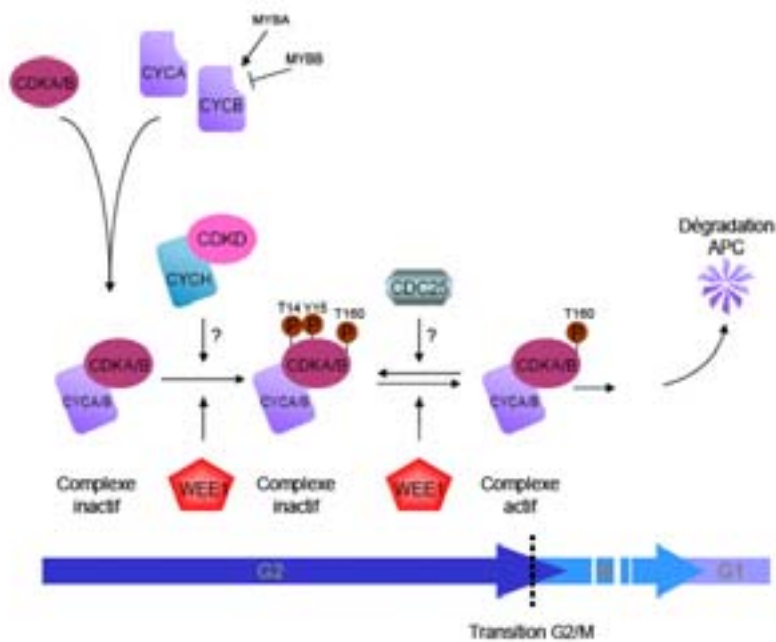


Figure 26. Schéma de la régulation de la transition G2/M chez les plantes

Les points d'interrogation représentent les voies qui ne sont pas totalement démontrées expérimentalement (adapté de De Veylder et al. 2003).

Les travaux de Sawa montrent que de nombreux gènes de réponses précoces à l'auxine, et potentiellement primaires, sont encore à caractériser (Sawa et al., 2002). La découverte de nouveaux gènes primaires permettrait de mieux connaître la voie de signalisation auxinique en amont de l'expression des gènes primaires, et d'autre part d'offrir également la possibilité de comprendre les réponses secondaires en aval, c'est-à-dire les cibles de l'action pléiotrope de l'auxine.

5. Rôle de l'auxine dans le contrôle de la division cellulaire

5.1. Le cycle cellulaire et les principaux régulateurs

Le cycle cellulaire correspond à l'intervalle de temps séparant l'apparition de deux cellules-fille issue de la division d'une cellule-mère. Le cycle cellulaire est découpé en 4 phases : une phase préparatoire (phase G1) à la réplication de l'ADN (phase S), une phase préparatoire (phase G2) à la phase M de mitose ou division cellulaire. Le cycle cellulaire est sous la dépendance de complexes régulateurs multiprotéiques dont l'activité enzymatique est elle-même finement contrôlée (Stals and Inze, 2001). La sous-unité catalytique de ce complexe est une Ser/Thr kinase Cycline dépendante (CDK) qui est associée à une sous-unité régulatrice : la cycline (CYC), pour former un complexe actif. Le contrôle de l'activité kinase du complexe CDK-CYC implique (i) la disponibilité de la sous-unité régulatrice cycline (transcription/traduction et dégradation protéolytique), (ii) la phosphorylation/déphosphorylation d'acides aminés particuliers du complexe, et (iii) la liaison de différents facteurs protéiques au complexe, en particulier des inhibiteurs spécifiques de CDK, encore appelés des KRP (Kip-Related-Protein) (Dewitte and Murray, 2003). L'activité kinase des complexes CDK-CYC permet de réguler le passage des transitions des différentes phases du cycle cellulaire.

La phase G1 correspond à une phase d'intégration des informations environnementales (conditions environnementales, disponibilité des nutriments, contrôle hormonal) et intracellulaires (mitose précédente accomplie) qui permet à la cellule de s'engager dans le cycle pour préparer une nouvelle mitose. Si toutes les conditions favorables sont réunies, la cellule s'engage dans le cycle cellulaire en étant capable de dépasser un point de restriction du cycle (ou point de contrôle « START ») où la cellule quitte le cycle pour entrer dans un état de quiescence, appelé phase G0. Une fois ce premier point de contrôle passé, la transition G1/S (**Figure 25**) fait intervenir différentes protéines : les protéines RBR (RetinoBlastoma-Related proteins ; suppresseurs de tumeurs chez les animaux), et les facteurs de transcription E2F-DPa (Elongation 2 Factor- Dimerisation Partner a). Les complexes CDK-CYC impliqués dans le contrôle de la transition G1/S associent à la CDKA les cyclines de type D (CYCD), et ont pour cible de phosphoryler RBR. RBR se lie aux facteurs E2F associés aux protéines DP et inhibe leur activité de transcription. L'hyperphosphorylation de RBR par CDKA-CYCD3, libère E2F/DPa sous sa forme active qui peut alors induire le passage en phase S (Veylder et al., 2003 ; Uemukai et al., 2005). De nombreuses cyclines de type D ont été identifiées chez les plantes, et il a été montré que l'expression des cyclines CYCD2 et CYCD3 d'*Arabidopsis* était contrôlée par des signaux de croissance externes (saccharose, hormones) (Riou-Khamlichi et al., 2000). D'autres facteurs sont également impliqués dans la transition G1/S, tels que

les KRPs, qui empêcheraient la phosphorylation de RBR en inactivant le complexe CDKA-CYCD3 (Schnittger et al., 2003).

La phase S correspond à la réplication de l'ADN parental : le niveau de ploïdie passe alors de 2C à 4C. Au cours de la phase G2, la cellule se prépare à passer en phase de mitose. La transition G2/M (**Figure 26**) fait intervenir les CDKs de type A et B qui s'associent aux cyclines de type A et B. Les CDKBs sont spécifiques des plantes, car aucun homologue n'a été trouvé chez les autres eucaryotes. Les complexes qu'ils forment, sont fortement régulés par des mécanismes post-traductionnels de phosphorylation/déphosphorylation.

Pendant la phase S et en début de phase G2, la CDKA est phosphorylée sur son résidu T160 par la CDK activatrice, CDKD. Cette phosphorylation est essentielle à l'activation complète de la CDKA (Veylder et al., 2003). Pendant la phase G2, les complexes CDKA-CYCA/B sont maintenus inactifs par l'intervention de la protéine kinase WEE1 qui phosphoryle les résidus T14 et Y15 de CDKA. Cette phosphorylation inhibitrice entraîne un changement de conformation du site catalytique dans le complexe, empêchant la fixation de l'ATP et du substrat, et inhibant ainsi l'activité de la kinase. Pour permettre l'entrée en phase de mitose, la déphosphorylation des résidus T14 et Y15 par la phosphatase CDC25 permet d'activer le complexe CDKA-CYCB. Durant la mitose, les complexes CDKA-CYCB s'associent au réseau de microtubules, et réguleront la réorganisation du cytosquelette en phosphorylant des protéines associées aux microtubules (Criqui et al., 2001). L'ensemble de ces mécanismes de régulation fait intervenir la dégradation protéolytique ubiquitine-dépendante via le protéasome à de nombreux niveaux. La kinase inhibitrice WEE1 est inactivée par phosphorylation puis dégradée rapidement par le protéasome en fin de G2. A la fin de la mitose les complexes CDKA/B-CYCA/B se dissocient et les cyclines seraient dégradées par le protéasome. Ce processus n'a été montré que pour CYCB1, qui est dégradée dès l'anaphase, dans les cellules BY-2 de tabac (Criqui et al., 2000). Le rôle des CDKBs spécifiques des plantes est encore largement méconnu. Il a été proposé qu'elles pourraient intervenir dans la mise en place du phragmoplaste, structure cellulaire spécifique de la mitose chez les plantes (Porceddu et al., 2001). Récemment, Verkest et al. (2005) ont montré que l'activité de la kinase CDKB1;1 contrôlait l'activité de la CDKA en régulant la quantité de l'inhibiteur KRP2 : CDKB1;1 phosphoryle KRP2 qui est alors dégradé par le protéasome. Ce mécanisme de régulation post-traductionnelle permet à la cellule de s'engager dans la mitose, et évite alors le passage vers l'endoréduplication associé à un état de différenciation.

5.2. Régulation du cycle cellulaire par l'auxine

L'action de l'auxine sur la formation des racines latérales et adventives offre un modèle d'étude idéale pour étudier l'entrée en division de ces cellules. La formation des racines latérales est divisée en deux phases : une phase d'activation des cellules du péricycle au pôle xylémien (**figure 27**) et une phase d'établissement du méristème qui produira les cellules nécessaires à la croissance de la racine (Himanen et al., 2002). Tandis que les cellules du péricycle partant du méristème racinaire restent en G1, celles près du protoxylème sont susceptibles de poursuivre le cycle, et 2 h après l'application d'auxine, des figures de mitoses sont observables à partir de cellules en phase G2 (Casimiro et al., 2003) (**figure 27**).

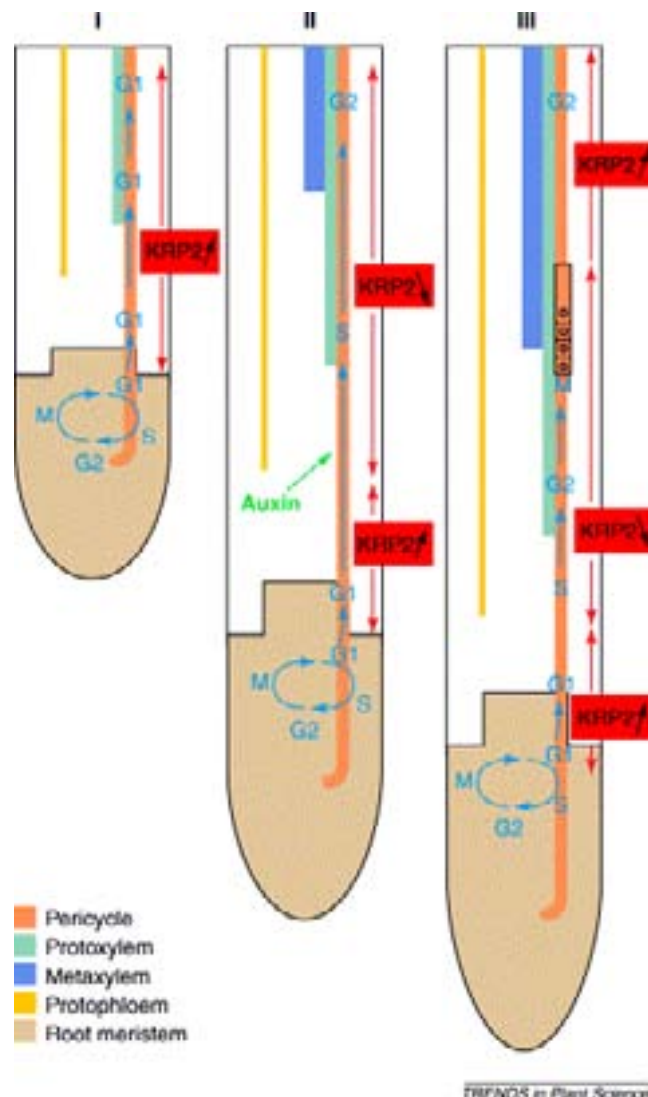


Figure 27. Relation spatiales entre la position longitudinale des cellules du péricycle au pôle protoxylémien le long de l'axe racinaire de la plantule d'Arabidopsis thaliana, leur phase dans le cycle cellulaire, et l'auxine.

Les trois phases de développement de la racine des plantules d'Arabidopsis (I, II et III) sont montrées ici.

Phase I: les cellules du péricycle restent en phase G1, l'expression de KRP2 est forte.

Phase II: certaines cellules du péricycle passent au travers de la transition G1/S. Ces cellules en G2 présentent une diminution de l'expression de KRP2 dans ces cellules, qui serait due à un flux important d'auxine qui gagnerait le péricycle.

Phase III: les cellules en G2 entre en mitose, et l'expression de KRP2 augmente dans les cellules qui ne se divisent pas, donc qui n'interviennent pas dans la formation des racines latérales.

Casimiro et al., 2003

5.2.1. Régulation par l'auxine de l'expression des cyclines et des CDK

L'initiation de la formation des racines latérales est inhibée par un transport déficient de l'auxine, provenant de l'apex caulinaire (via le protophloème), dans les premiers jours de croissance de la plantule d'*Arabidopsis* (Bhalerao et al., 2002; Casimiro et al., 2003). La localisation d'AUX1 (**Figure 7A**) n'est plus visible dans le protophloème au même niveau que les cellules du péricycle au pôle xylémien qui passent en transition G1/S et qui subiront la première division menant à la formation des racines latérales (**Figure 27**). La cycline CYCB1, marqueur de la transition G2/M, est d'ailleurs exprimée dans ces cellules du péricycle proches du protoxylème. Ces expériences montrent que l'auxine est un régulateur primaire de l'entrée dans le cycle cellulaire lors de l'initiation des racines latérales.

L'analyse transcriptionnelle systématique de gènes du cycle cellulaire régulés par l'auxine, les cytokinines ou le saccharose, a été réalisée sur des cultures cellulaires d'*Arabidopsis* (Richard et al., 2002). Cette analyse a montré qu'après 48 h de carence, l'ajout d'auxine (1 μ M d'ANA) induisait les cyclines CYCA2;1, CYCA2;2, CYCB2;1, CYCB2;2, CYCB1;1 et la CDKA;1 (Roudier et al., 2003). Ces travaux ont également montré que ces régulateurs du cycle possèdent un à plusieurs AUX/REs dans leur séquence promotrice (Richard et al., 2002), ce qui suggère une régulation transcriptionnelle par les facteurs de transcription ARFs.

Des analyses par cytométrie en flux ont révélé que l'auxine intervient en association avec les cytokinines, sur l'entrée et le contrôle de la transition G1/S dans les protoplastes de cellules de mésophylle de *Petunia* (Bergounioux et al., 1988). L'auxine et les cytokinines agissent également en synergie sur les cultures cellulaires d'*Arabidopsis* pour contrôler l'expression de la cycline de type D (CYCD2 et CYCD3), qui répond fortement à l'ajout d'auxine, et sur la CDKB1;1 (spécifique des plantes), qui n'est que faiblement induite par l'auxine seule, (Richard et al., 2002).

5.2.2. Les gènes KRP

Il semble qu'en absence d'auxine, les CDKs soient inhibées par certaines KRPs, mais la régulation de ces inhibiteurs de CDK n'est pas claire. Dans les cultures cellulaires, l'auxine semble induire l'expression de KRP1 et réprimer KRP2 (Richard et al., 2002). Lors de l'initiation des racines latérales d'*Arabidopsis*, KRP1 et KRP2 sont fortement exprimées dans les cellules du péricycle des racines (où le transport d'auxine a été inhibé par le NPA), et une diminution importante est observée après un ajout d'auxine (Vanneste et al., 2005). De plus, l'expression de KRP2 reste localisée dans les cellules du péricycle au pôle phloémien et la surexpression de KRP2, y compris aux pôles xylémiens, entraîne une forte diminution de la densité de racines latérales.

5.2.3. Les gènes E₂F

Dans les cultures cellulaires de BY-2, la surexpression d'E2Fb-DPa stimule la prolifération cellulaire et raccourcit la durée du cycle cellulaire. Ce complexe régule à la fois l'entrée en phase S et en phase M (en activant la cycline B1;1) (Magyar et al., 2005). Alors que la protéine E2Fa a besoin de l'auxine pour

induire la division, la surexpression seule d'E2Fb-DPa permet les différentes phases de division cellulaire, d'endoréplication et de grandissement cellulaire sans qu'il y ait présence d'hormones. Dans les lignées cellulaires accumulant de fortes concentrations d'E2Fa et d'E2Fb, la quantité et l'activité de CDKA;1 et de CDKB1;1 sont très importantes et constantes sur toute la période de croissance exponentielle de la culture. Ces auteurs concluent que l'auxine régulerait l'entrée en phases G1/S et G2/M en favorisant l'accumulation et la stabilité des protéines d'E2Fb : en carence hormonale, la quantité d'E2Fb diminue en 30 min, alors qu'elle ne diminue qu'au bout de 4 h en présence d'ANA (Magyar et al., 2005). L'expression de CYCB1;1 est directement activée par E2Fb. E2Fa, qui n'est pas exprimée en même temps, activerait la CYCB1;1 en favorisant l'expression d'E2Fb. Etant donné que la stabilité d'E2F est accrue quand l'expression de CSN5 est inhibée par RNAi, ces facteurs de transcription seraient soumis à la régulation par COP9 et la voie du signalosome (Magyar et al., 2005).

5.2.4. La télomérase

La télomérase a pour fonction d'allonger les télomères lors de la réplication de l'ADN en synthétisant des répétitions en tandem de 6 bases nucléiques (TTTAGGG chez la plupart des angiospermes (Ren et al., 2004)). L'activité de la télomérase est indétectable dans la majorité des organes différenciés (Ren et al., 2004), et elle est significative quand les cellules sont dans le cycle cellulaire, en début de phase S. Cette activation n'est pas directement couplée à la réplication de l'ADN mais à l'entrée en phase S (Tamura et al., 1999). Dans les cellules BY-2, il a été montré que la régulation de cette enzyme est liée à sa phosphorylation et déphosphorylation et que les auxines (2,4-D, AIA et ANA) stimulent son activité, de manière dose-dépendante (Tamura et al., 1999; Yang et al., 2002).

En 2004 une protéine à doigt de zinc appelée « Telomerase Activator 1 » (TAC1) a été identifiée chez des mutants d'*Arabidopsis thaliana* (Ren et al., 2004). Cette protéine induit la télomérase sans activer ni le cycle cellulaire, ni la dédifférenciation, ni affecter le niveau de ploïdie. Etant donné que les cals issus des mutants *tac1* (surexprimant TAC1) se forment rapidement sur du milieu sans auxine et que l'élongation racinaire induite par l'ajout d'auxine exogène est inhibée, la surexpression de TAC1 entraîne une hypersensibilité à l'auxine. Pour les auteurs, TAC1 interagirait avec les AUX/IAAs et déstabiliserait des complexes ARFs-AUX/IAAs, potentialisant alors certaines réponses auxiniques (Ren et al., 2004). Il serait possible que l'activité de la télomérase soit nécessaire pour fournir aux cellules de la plante assez d'ADN télomérique et ainsi garantir une capacité proliférative suffisante (Vanneste et al., 2005).

5.2.5. Modulation par l'auxine de l'ubiquitination des cyclines

Chez les animaux et les végétaux la protéolyse régule différents régulateurs du cycle cellulaire. La protéine NAC1 est un activateur de la transcription qui possède un domaine NAC de liaison à l'ADN en N-terminal et un domaine d'activation en C-terminal (Xie et al., 2000). Il a été observé que sa surexpression restaure la formation des racines latérales inhibée chez le mutant *tir1* (Xie et al., 2000). Le régulateur NAC1 agirait donc en aval de TIR1 et de SINAT5. Cette dernière est une protéine C3HC4 RING FINGER, possédant une activité ubiquitine-ligase (Xie et al., 2002). La protéine NAC1, au travers de son interaction

avec SINAT5, est régulée post-traductionnellement par la voie de la protéolyse ubiquitine-dépendante. L'auxine induit l'expression de SINAT5 de 30 min à 1 h après celle de NAC1, et la dégradation de NAC1 apparaît 8h après traitement auxinique. La protéine NAC1 régule l'expression d'au moins 2 gènes qui répondent à l'auxine : une protéine riche en lysine, la DBP (DNA binding protein), qui ressemble à une histone H1 (Alliotte et al., 1989), et AIR3 qui est impliquée dans l'affaiblissement des connexions intercellulaires facilitant alors l'émergence des racines latérales.

D'autre part, E2Fc inhibe l'entrée en phase S en étant un compétiteur négatif de la sous-unité DPa pour la formation du complexe E2Fa-Dpa qui permet l'entrée en phase S (**Figure 25**). L'abondance d'E2Fc est également sous le contrôle du complexe SCF. La phosphorylation d'E2Fc *in vitro* par CDKA;1-CYCA2;2 et CDKA;1-CYCD2;1 est essentielle pour son recrutement par la protéine F-box AtSKP2 et la modulation de son ubiquitination (del Pozo et al., 2002). L'induction de CDKA;1 et des cyclines par l'auxine favoriserait la protéolyse de cet inhibiteur et activerait l'entrée en G1/S.

Enfin, le gene *Hobbit* code pour la sous-unité CDC27 appartenant au complexe APC d'ubiquitination (Anaphase Promoting Complex) et son expression est restreinte aux cellules passant en G2/M. Chez le mutant *hobbit* l'accumulation d'AXR3 (*aux/iaa 17*), montre l'implication de l'APC (en plus du complexe SCF^{TIR1}) dans le ciblage des AUX/IAAs, en vue de leur protéolyse. Ceci suggère un autre lien entre le signal auxinique et les divisions cellulaires (Blilou et al., 2002).

5.3. Transduction du signal auxinique régulant la division cellulaire

On ne connaît pas encore la voie de transduction qui à partir d'un récepteur (ABP1 ? TIR1 ? autre ?) mène à la régulation par l'auxine du cycle cellulaire. Il a également été suggéré que les cellules ne répondraient à l'auxine que dans certaines phases du cycle cellulaire (Vanneste et al., 2005). Au vue de certains résultats il semble qu'une protéine G hétérotrimérique intervienne dans la cascade de signalisation (Ullah et al., 2001 ; Ullah et al., 2003). Ces protéines membranaires se liant au GTP, interagissent typiquement avec des récepteurs hormonaux. La sous-unité alpha (G α) se lie directement au récepteur et aux sous-unités G $\beta\gamma$, qui activent ou inhibent diverses enzymes. Chez *Arabidopsis*, la sous-unité G α (GPA), interviendrait comme régulateur positif du cycle cellulaire (Ullah et al., 2001) et la sous-unité G $\beta\gamma$ (AGB1) neutraliserait cette activité. Le mutant *agb1* présente une hypersensibilité à l'auxine et l'application de cette hormone inhibe son expression chez le sauvage. AGB1 jouerait donc un rôle dans l'atténuation du signal auxinique dans la division cellulaire, en amont des réponses transcriptionnelles à l'auxine (Ullah et al., 2003). L'analyse de l'expression des gènes chez le mutant *agb*, a révélé qu'environ une cinquantaine de gènes répondant à l'auxine étaient réprimés par AGB1 (Jones et al., 2004). La sous-unité G α serait sous le contrôle d'une protéine RGS (Regulator of G-protein Signalling protein), qui accélère sa désactivation (Chen et al., 2003), mais sa régulation par l'auxine n'a pas encore été démontrée.

6. Rôle de l'auxine dans le contrôle de l'expansion cellulaire

L'auxine contribue à la croissance de la plante en agissant particulièrement sur l'expansion cellulaire. Ce phénomène est notamment contrôlé par son transport et par des signaux environnementaux.

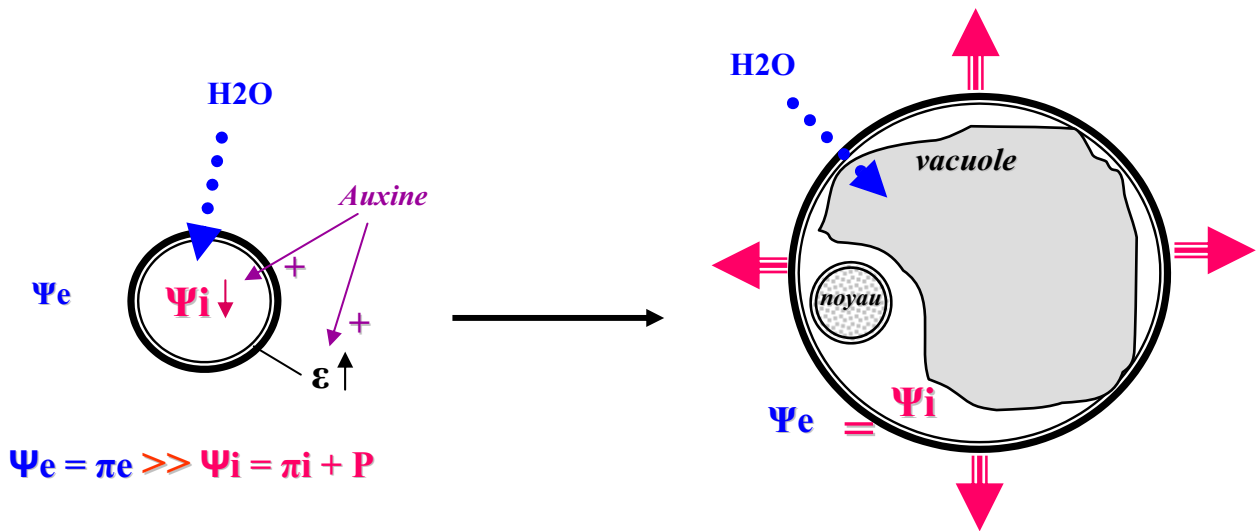


Figure 28. Régulation par l'auxine de l'expansion cellulaire

L'auxine intervient sur deux facteurs principaux : l'extensibilité pariétale (ϵ) et l'augmentation de la turgescence cellulaire (P) due à la baisse du potentiel osmotique intracellulaire (π_i) qui se traduit par une diminution du potentiel hydrique (Ψ_i), qui devient alors plus petit que le potentiel hydrique externe (Ψ_e). Ce différentiel crée un appel d'eau qui fait gonfler la cellule, qui grâce à l'augmentation de son extensibilité pariétale pour pouvoir grandir.

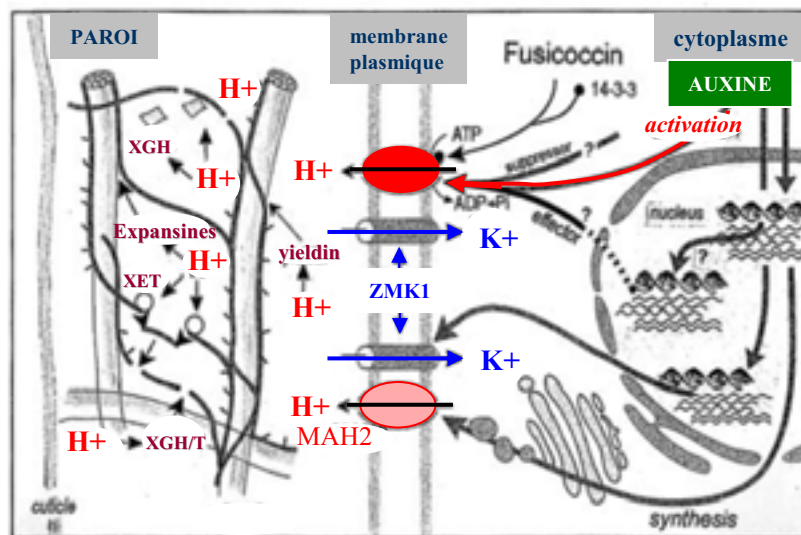


Figure 29. La théorie acide de la croissance cellulaire induite par l'auxine

L'auxine entraîne une hyperpolarisation membranaire qui active les H^+ -ATPases entraînant une sortie de protons. Cette sortie est compensée par une entrée d'ions potassium (via ZMK1, par exemple) qui participent au maintien du potentiel osmotique intracellulaire. L'acidification de l'apoplasme provoquée par la sortie de protons par les ATPases et d'autres canaux (tels que MAH2) active des enzymes qui participent au relâchement pariétal. L'auxine agit également au niveau transcriptionnel afin d'accroître la quantité de protéines qui interviennent dans ce processus.

D'après Hager 2003

Cette réponse à l'auxine est notamment observée dans les jeunes racines et les jeunes tiges, lors de la réponse à un stimulus tropique, où l'accumulation d'auxine sur l'un des côtés de l'organe crée un gradient entre les deux bords, à l'origine de la phénoménologie du tropisme. Au niveau cellulaire l'expansion peut être soit isodiamétrique soit polarisée.

L'expansion cellulaire chez les plantes nécessite une entrée d'eau consécutive à une baisse du potentiel hydrique interne par rapport au potentiel hydrique externe. La présence d'une paroi chez les cellules végétales ne présente qu'une élasticité limitée, elle exerce donc une contre-pression qui s'oppose au flux d'eau et qui correspond au potentiel de turgescence (**Figure 28**). En fonction des propriétés de la paroi, et de l'entrée d'eau, la turgescence pousse la cellule à grandir en parallèle du relâchement pariétale, c'est pour cela qu'elle est souvent appelée le "moteur" de l'expansion cellulaire.

Lorsque l'auxine favorise l'expansion cellulaire, elle agit à la fois sur le relâchement pariétal suivant ce qui a été appelé la "théorie acide" (**Figure 29**) et le maintien du potentiel de turgescence via le contrôle du potentiel osmotique intracellulaire (Hager et al., 1971). Une pompe à proton dépendante de l'ATP située au niveau de la membrane plasmique (PM H^+ -ATPase) est responsable de la sortie des ions H^+ vers le compartiment apoplastique (paroi). L'AIA augmente l'activité de cette enzyme, causant alors une diminution du pH apoplastique et une hyperpolarisation de la membrane. Le pH acide active des enzymes apoplastiques qui permettent la croissance cellulaire. L'hyperpolarisation active des canaux potassiques entrant ce qui permet de maintenir une pression de turgescence constante pendant l'expansion cellulaire.

6.1. Influence de l'auxine sur le relâchement pariétal

6.1.1. Hyperpolarisation membranaire et activité H^+ -ATPase

L'hyperpolarisation induite par l'auxine a été démontrée en 1988 par Ikoma et Okamoto sur des hypocotyles de soja vert (*Vigna*) (Ikoma and Okamoto, 1988). La perfusion d'AIA (entre 1 μ M et 1 mM) dans des segments d'hypocotyle entraîne une hyperpolarisation de la membrane qui est suivie d'une accélération de l'élongation du segment. Il a également été démontré que cette sortie d' H^+ ne peut se réaliser que si des cations sont disponibles pour pouvoir être échangés contre les H^+ (Mizuno and Katou, 1992).

La régulation des H^+ -ATPases par l'auxine se fait à un niveau post-traductionnel et transcriptionnel. Pour être activée, l' H^+ -ATPase doit être phosphorylée sur sa partie C-terminale (Hager, 2003). Il a été démontré que l'action de l'auxine n'était pas directe sur la H^+ -ATPase plasmique, mais qu'elle n'impliquait que la membrane plasmique (Santoni et al., 1993; Peltier and Rossignol, 1996).

L'auxine peut également favoriser la sortie d' H^+ en augmentant le nombre d' H^+ -ATPase à la membrane plasmique, ce qui nécessite un contrôle de l'expression des gènes codant pour ces protéines. Il a notamment été montré que l'AIA faisait rapidement augmenter la quantité l' H^+ -ATPase membranaire après une durée très courte d'incubation avec l'auxine (à partir de 10 min après l'ajout d'auxine) (Hager et al., 1991). De plus, chez le maïs, un gène codant pour une isoforme d' H^+ -ATPase membranaire, MHA2, a

été caractérisé comme répondant à l'auxine (**Figure 29**). L'expression de ce gène est induite d'un facteur 3 par l'auxine dans les tissus non vasculaires du coléoptile de maïs. Cette induction est corrélée à la sortie de proton induite par l'auxine dans ces mêmes tissus. Par contre l'auxine n'induit par l'expression de ce gène dans les tissus vasculaires (Frias et al., 1996). Ainsi la présence accrue des ATPases à la membrane, compense l'expansion cellulaire et maintient le potentiel membranaire l'influx de solutés (Hager, 2003). Ces mécanismes maintiennent donc une turgescence constante pour poursuivre le grandissement cellulaire.

La récente découverte de l'implication d'AVP1 (pompe à protons dépendante du pyrophosphate (V-PPase) et non de l'ATP) dans le transport de l'auxine et l'acidification pariétale ouvre de nouvelles voies de régulations qui permettent la connection entre le transport de l'auxine et la croissance cellulaire "acide" (Li et al., 2005). Les plantes d'*Arabidopsis* surexprimant AVP1, sont caractérisées par une augmentation des divisions cellulaires lors de la formation des organes et une augmentation du transport d'auxine à la pointe des racines. Une acidification pariétale accrue est également mesurée dans ces plantes. La sous-expression d'AVP1 entraîne une diminution du transport de l'auxine et des problèmes développementaux aux apex caulinaires et racinaires. Ces plantes présentent une diminution de l'activité H⁺-ATPase plasmique et une augmentation du pH pariétal. Des variations de l'expression d'AVP1 affectent la distribution et l'abondance de l'H⁺-ATPase plasmique ainsi que des protéines PIN responsables du transport d'efflux facilité de l'auxine. Cette V-PPase est retrouvée dans le réseau trans-golgien, et les corps vésiculaires, la vacuole et la membrane plasmique (Grebe, 2005). Le modèle présenté par les auteurs (**Figure 30**), propose qu'AVP1 régule le trafic vésiculaire à la fois des PINs et des H⁺-ATPases plasmiques, par une acidification des compartiments subcellulaires de la voie de sécrétion ou d'endocytose, qui interviennent notamment lors de la redistribution de ces protéines à la membrane plasmique (Grebe, 2005; Li et al., 2005).

L'inhibition de l'activité H⁺-ATPase peut être causée par un déficit d'ions K⁺. De même, une augmentation de la teneur en K⁺ apoplastique mime l'action de l'auxine sur l'élongation cellulaire (Tode and Luthen, 2001). Le gène ZMK1, codant pour un canal potassique rectifiant entrant, chez le maïs, met en évidence l'implication des cations K⁺ dans l'activité de l'H⁺-ATPase (Philippart et al., 1999).

6.1.2. Activation de protéines pariétales

Dans la théorie acide la sortie de protons qui acidifie le milieu apoplastique, agit comme un facteur de relâchement pariétal en activant des hydrolases apoplastiques qui vont hydrolyser des liaisons covalentes, réaliser des transglycosilations ou rompre des liaisons non-covalentes. Cinq principales familles d'enzymes agissent pendant le relâchement pariétal : les expansines, les xyloglucanes hydrolases (XGH) et les xyloglucanes endotransglycosylases (XET, qui appartiennent aux endo-xyloglucantransférases), les cellulases et enfin des yieldins (**Figure 29**).

Les expansines sont des protéines extracellulaires qui modifient les propriétés mécaniques de la paroi, permettant à la cellule de grandir suivant le potentiel de turgescence (Cosgrove, 1993). Ces protéines forment un complexe, qui n'est actif que dans un milieu acide (pH 3,5-4,5). Dans la paroi les microfibrilles de celluloses sont reliées les unes aux autres par des glycanes. Les expansines rompent ces liaisons, ce qui sous une forte pression de turgescence entraîne un déplacement des polymères pariétaux

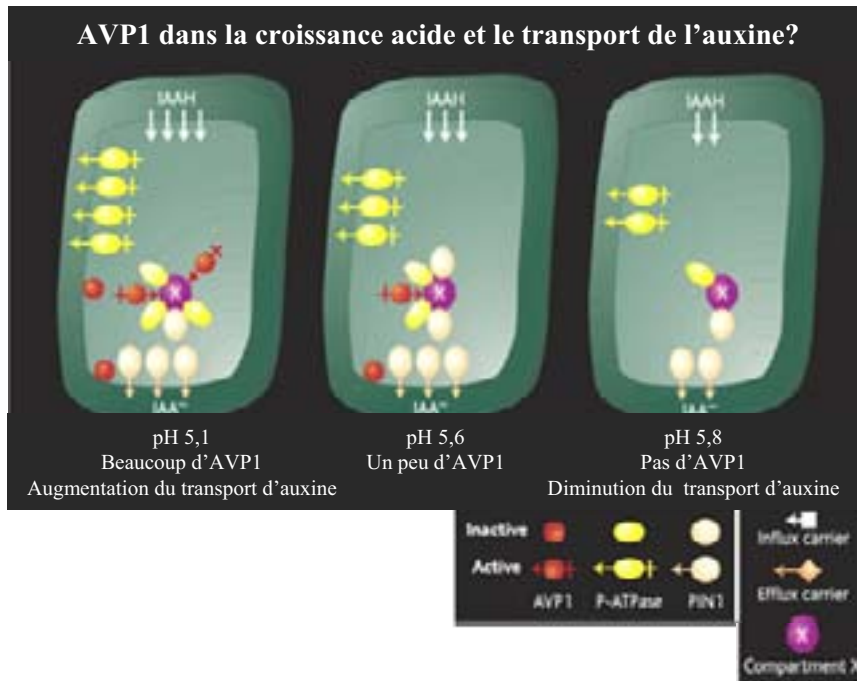


Figure 30. Contribution d'une pompe à protons intracellulaire dans le transport de l'auxine et l'acidification pariétale.

En accord avec la théorie de la croissance acide l'auxine (AIA) entraîne l'élongation cellulaire en stimulant l'acidification pariétale par la pompe à protons P-ATPase. La pompe à proton intracellulaire AVP1 régulerait la quantité de P-ATPase et de transporteur PIN1 au niveau de la membrane plasmique, en acidifiant un compartiment de "transport" intracellulaire inconnu (X) commun aux deux protéines. *D'après Grebe, 2005*

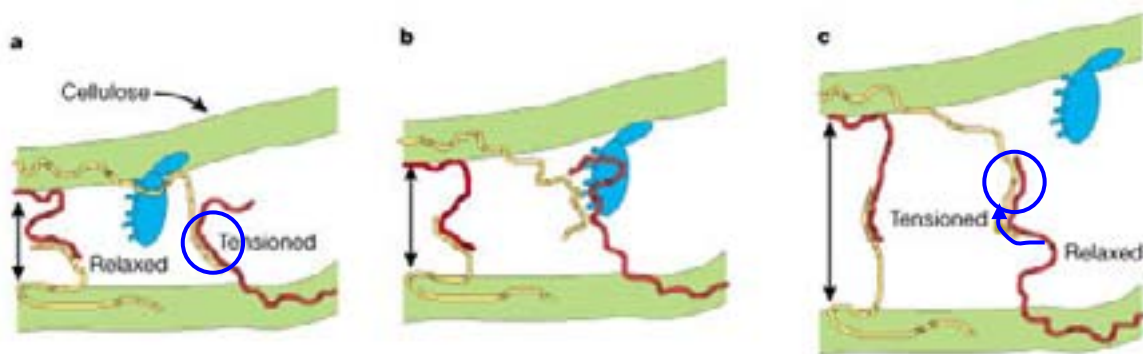


Figure 31. Modèle d'action des expansines sur le relâchement pariétale

Dans la paroi les microfibrilles de celluloses (vertes) sont reliées les uns aux autres par des glycanes (jaunes et rouges) (a). Les expansines (bleues) rompraient ces liaisons glycanes, ce qui, sous une forte pression de turgescence, entraîne un déplacement des polymères pariétaux (b et c) et un glissement de leur point d'adhésion (cercles et flèche bleus).

D'après Cosgrove et al., 2000

et un glissement de leur point d'adhésion (**Figure 31**) (Cosgrove, 2000). L'auxine en favorisant l'acidification pariétale régule positivement, à un niveau post-traductionnelle, l'activité des expansines. Il a également été démontré que la transcription de l'alpha expansine était activée par l'auxine dans les hypocotyles de conifères (Hutchison et al., 1999). Dans les cellules de tabac BY-2, dont la croissance est dépendante de l'auxine, le traitement par des expansines exogènes a pour résultat une forte augmentation de la croissance des cellules d'un facteur 3 (Link and Cosgrove, 1998).

Les xyloglucanes sont les principales hémicelluloses de la paroi et se lient fortement aux microfibrilles de cellulose. Sous l'action de l'auxine, les xyloglucanes s'ont dégradées partiellement par l'endo-1,4- β -glucanase (ou cellulase) (Matsumoto et al., 1997), les XGH et les XET. Lors de l'élongation du coléoptile d'orge, induite par l'auxine, l'endo-1,3:1,4- β -glucanase (E1) est activée et dégrade les xyloglucanes hemicellulosiques. Dans un premier temps, l'acidification pariétale induite par l'auxine activerait les cellulases déjà présente dans la paroi, puis l'auxine activerait l'expression de E1 pour favoriser la croissance cellulaire sur un plus long terme.

Enfin, les yieldines correspondent à un mélange de protéines de 30 à 32 kDa, qui se lient à la membrane plasmique et qui régulent le seuil de relâchement pariétal, qui correspond à la limite au-delà de laquelle l'extension est irréversible. Leurs séquences possèdent une homologie avec des endochitinases et des concanavalines B (Okamoto-Nakazato et al., 2000). Ces yieldines sont localisées dans le cortex et l'épiderme (cellules possédant une forte capacité d'élongation) (Okamoto-Nakazato et al., 2001).

6.1.3. Transduction du signal auxinique induisant l'expansion cellulaire

L'expression constitutive d'ABP1 chez le tabac, augmente l'expansion cellulaire dans les feuilles de tabac (Jones et al., 1998). La taille des feuilles de tabacs transgéniques est comparable au sauvage, mais les cellules sont moins nombreuses et plus grandes. Dans les cultures cellulaires de Tabac BY-2, la surexpression d'ABP1 entraîne une augmentation de la taille cellulaire (Chen et al., 2001). Ces observations mettent en évidence l'importance d'ABP1 dans la transduction du signal auxinique induisant l'expansion cellulaire. A partir de la réception du signal auxinique, la voie de transduction passerait par une augmentation d'efflux d' H^+ couplé à un influx de K^+ et une hyperpolarisation membranaire (NAPIER, 2004). Il a également été observé que le niveau d'ABP1 est élevé dans les grandes cellules où la teneur en AIA libre est faible. Réciproquement, dans les petites cellules, la concentration d'AIA libre est importante mais ABP1 est faiblement présent (Chen et al., 2001). Le facteur limitant de la teneur en protéine ABP1 dans les feuilles serait donc relié à une régulation transcriptionnelle par l'auxine (Chen et al., 2001). La transformation de cellules BY-2 avec une construction anti-sens d'ABP1 (cellules NAS1) entraîne une diminution de l'expansion cellulaire mais agit peu sur la division (Chen et al., 2001; Chen et al., 2001).

Un autre gène impliqué dans l'expansion cellulaire et dans le signal auxinique a été identifié chez la tomate. Le mutant *diageotropica* (*dgt*) présente une résistance à l'auxine (inhibition de la formation des racines latérales, réponse gravitropique réduite, nanisme, développement vasculaire retardé) et est affecté dans les étapes précoces de la formation des fruits, la maturation étant normale (Balbi and Lomax, 2003). La protéine DGT intervient dans la régulation des gènes de réponse à l'auxine et à l'éthylène. Le gène DGT code pour une cyclophiline (CYP1) qui a une activité peptidyl-prolyl isomerase (PPI) (Oh et al., 2006). La

mutation *dgt* affecte l'accumulation de la protéine CYP1, et non son expression. Il est intéressant de noter que ces enzymes interviennent dans l'isomérisation des AUX/IAAs pour cibler leur ubiquitination par le complexe SCF^{TIR1} (Balbi and Lomax, 2003). Le traitement à la cyclosporine A (inhibiteur de CYP1) inhibe l'initiation des racines adventives induite par l'auxine, appliquées au niveau des sections d'hypocotyle, et réduit l'expression des gènes primaires *LeIAA10* et *LeIAA11*, comme chez le mutant *dgt* (Oh et al., 2006), où en plus, les gènes *LeIAA2* et *LeIAA8* sont activés. Ceci montre une régulation spécifique par DGT de certains membres des AUX/IAAs en fonction des tissus (Balbi and Lomax, 2003).

Coenen et ses collaborateurs ont montré en 2002 que le mutant *dgt* avait une sécrétion d'H⁺ altérée et une extensibilité pariétale affectée (Coenen et al., 2002). Les auteurs concluent que la protéine DGT est nécessaire à la sécrétion d'H⁺ induite par l'auxine dans les hypocotyles de tomates mais pas dans l'inhibition de cette sécrétion dans les racines. Ceci met en évidence deux voies de signalisation de l'auxine, une dépendante de DGT et une autre qui lui est indépendante (Coenen et al., 2002). Le traitement par l'auxine augmente le volume des protoplastes, réponse mimée par l'utilisation d'anticorps dirigés contre une partie du domaine de liaison à l'auxine d'ABP1, qui n'est pas observé pour les protoplastes issus du mutant *dgt* (Christian et al., 2003), qui répondent pourtant à la stimulation des H⁺-ATPases par la fusicoccine. On peut donc supposer que DGT interfère avec la voie utilisant ABP1.

6.2. Régulation de la turgescence par l'auxine

Les études menées sur le grandissement cellulaire induit par l'auxine, privilégient souvent l'action de l'auxine sur le relâchement pariétal et le maintien de la turgescence, aux dépens de l'augmentation de la valeur absolue de cette turgescence. Mis à part l'étude des pompes H⁺-ATPases et canaux potassiques, peu d'articles évoquent les variations du potentiel osmotique intracellulaire induits par l'auxine. En 2001, lino et ses collaborateurs évoquent l'osmorégulation des protoplastes de *Phaseolus vulgaris* en réponse à l'auxine et à l'acide abscissique. Le traitement par 1 μM ou 10 μM d'AIA, entraîne un "gonflement" des protoplastes en 30 minutes (lino et al., 2001). Cette réponse est annulée soit lorsque le milieu a un pH neutre, ou qu'il est carencé en K⁺ ou en Cl⁻. Ce gonflement est donc dû à l'influx de K⁺ grâce aux canaux potassiques et aux ions Cl⁻ par les symports H⁺/Cl⁻, activés par l'auxine (lino et al., 2001). Des résultats similaires, 20 ans auparavant, avaient montré que seuls les coléoptiles d'avoine incubés dans du KCl pouvaient maintenir une croissance et une pression osmotique forte sous l'action de l'auxine, contrairement à ceux incubés dans un milieu dépourvu de solutés absorbables (Stevenson and Cleland, 1981).

Pour trouver des travaux traitant de l'effet de l'auxine sur le potentiel de turgescence, il faut remonter aux années 90 et aux expériences d'Okamoto, Nakahori et Maruyama (Okamoto et al., 1990; Nakahori et al., 1991; Maruyama and Boyer, 1994). Ce dernier a étudié en détails sur des plantules étioilées de soja, l'action de l'auxine sur la régulation du seuil de turgescence minimum pour entraîner l'élongation cellulaire. Plusieurs paramètres ont été étudiés : les potentiels hydriques, osmotiques et de turgescence.

Okamoto et Nakahori proposaient que la conductance hydrique, dans le tissu xylémien, n'était pas modulée par l'auxine, mais qu'une carence en auxine entraînait une augmentation du seuil de turgescence T (**Figure 32**), et donc d'une diminution de l'extensibilité de la paroi dans ces tissus (Okamoto et al., 1990; Nakahori et al., 1991). La différence entre la turgescence absolue des cellules et la turgescence seuil qu'il

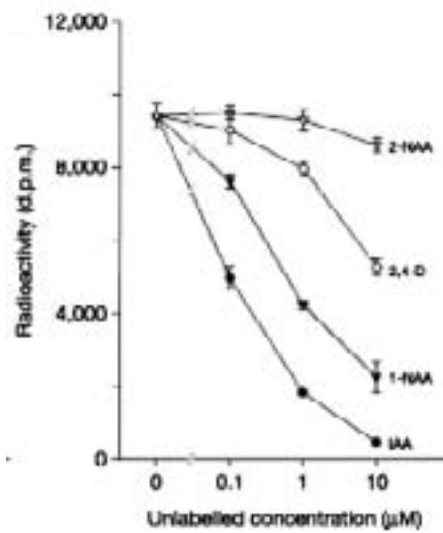


Figure 19. Expérience de pull-down avec GST-AXR2 (GST-IAA7) à partir d'extrait de TIR-MYC de plantule

En présence de $0,1\mu\text{M}$ [^3H]AIA et augmentation de la concentration d'AIA (cercles noirs), de 2,4-D (cercles blancs), d'1-ANA (triangles noirs) ou de 2-ANA (triangles blancs) non marqués.
Kepinski et Leyser, 2005

faut atteindre pour la croissance, ce que l'on appelle la turgescence active, est donc réduite dans ces tissus. En effet dans les plantules intactes de soja, le seuil de turgescence est de 3 bar, contrairement aux plantules dont l'apex a été excisé, entraînant une carence auxinique, et chez lesquelles le seuil est à 4,2 bar. La turgescence réelle dans ces plantes, est de 3,9 bar (avec auxine) et 4,4 bar (sans auxine) (Maruyama and Boyer, 1994). Donc la carence en auxine s'accompagne d'une augmentation de la turgescence réelle mais surtout d'une plus grande augmentation du seuil de turgescence, réduisant dans ces expériences la turgescence active (**Figure 32**).

Objectif du projet de thèse

Les hormones végétales sont les principaux messagers de la communication intercellulaire, permettant à l'ensemble de la plante de se développer et de répondre de façon spécifique et rapide aux variations de son environnement. L'auxine est l'une de ces hormones qui, en contrôlant l'expression génétique de certains gènes va moduler la coordination et l'enchaînement précis de la division, de l'expansion et de la différenciation cellulaire. Le contrôle très précis de l'action de l'auxine au sein de la plante, repose sur la régulation de sa concentration extra / intracellulaire (via la régulation de sa biosynthèse, de sa conjugaison, ou de son transport), et l'induction de réponses cellulaires et moléculaires rapides et dépendantes de sa concentration.

Sur la base de ces observations bien documentées (Chen et al., 2001; Chen et al., 2001; Campanoni and Nick, 2005) **le projet de thèse a pour objectif d'étudier pour un même système biologique un ensemble de réponses dépendantes de la dose d'auxine aux échelles cellulaires et moléculaires, afin de comprendre comment cette hormone induit autant d'effets pléiotropes.** Ce travail sera mené sur le modèle des suspensions de cellules de Tabac BY-2 (*Nicotiana tabacum* cv Bright Yellow 2) avec lequel l'analyse et l'intégration des différents phénotypes cellulaires sont plus aisées qu'à l'échelle d'un système complexe tel que la plante entière (Geelen and Inze, 2001).

La première partie du travail a été de caractériser et de décrire finement au cours du temps et en fonction de chaque concentration en hormone la division et/ou le grandissement cellulaire. En relation avec ce dernier paramètre nous avons aussi montré l'influence de l'auxine sur l'intensité de la turgescence cellulaire, paramètre bien plus aisément mesurable en culture cellulaire qu'*in planta*. Un aspect majeur de ce travail a été d'être focalisé sur les réponses précoces à l'auxine, en moins de 24 h et ce pour s'affranchir des perturbations métaboliques liées à des temps plus longs et susceptibles d'altérer l'interprétation des courbes effet-doses.

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ces différents comportements cellulaires, la deuxième partie du travail a consisté à réaliser, par cDNA-AFLP (cDNA-amplified fragments length polymorphism) la comparaison de l'expression des gènes des cellules BY-2 répondant aux différentes conditions décrites précédemment. Cette étude a été menée, grâce au soutien financier du programme européen Marie Curie, en collaboration avec le Laboratoire "Plant System Biology" à l'Université de Gand, a révélé une cinquantaine d'étiquettes de gènes différenciellement exprimés dans les 6 premières heures après l'ajout d'auxine. Parmi celles-ci l'expression de 11 gènes a été validée par RT-PCR semi-quantitative et deux nouveaux gènes régulés primaires par l'auxine ont été identifiés, dont l'un a été davantage caractérisé.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

PARTIE 1 :
Régulation des effets physiologiques de l'auxine
sur les cellules de Tabac BY-2

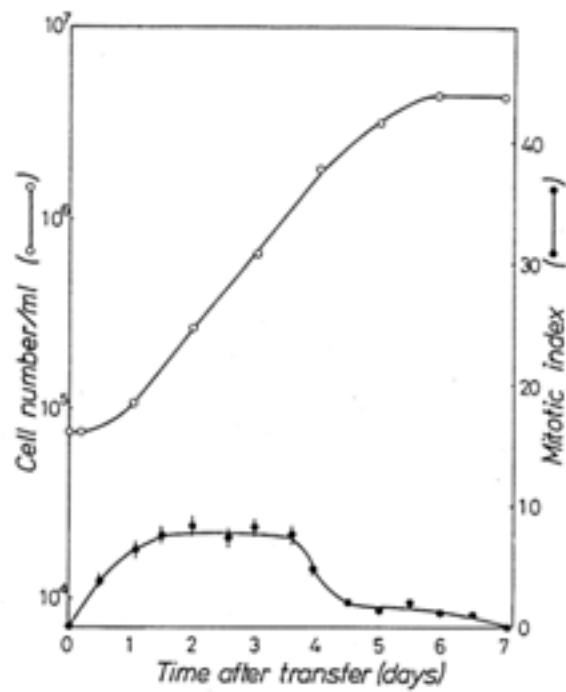


Figure 33. Courbe de croissance et indice mitotique des cellules BY-2 de tabac.
Nagata et al. 1992

1. Réponses à l'auxine au cours d'un cycle de culture des cellules de tabac BY-2

1.1. Influence de la présence et de la nature de l'auxine sur l'évolution de plusieurs paramètres cellulaires au cours d'un cycle de culture

Dans les années 70 le Tobacco Science Research Laboratory du Japon isole une culture cellulaire à partir de cals régénérés, issus de plantules de *Nicotiana tabacum* L. cv Bright-Yellow 2. Cette culture cellulaire s'est révélée la plus proliférative parmi les 40 variétés de *Nicotiana* testées. En 1992, Nagata T. et ses collaborateurs caractérisent cette culture cellulaire qui est devenue un système modèle de cellules végétales très utilisé au niveau international. Les avantages que présente la souche BY-2 sont bien documentés et ont été décrits à plusieurs reprises (Geelen and Inze, 2001; Nagata et al., 2004).

Les cellules de BY-2 sont repiquées tous les 7 jours. Comme toute culture cellulaire, la population croît suivant trois phases (**Figure 33**) : une courte phase de latence due au stress lors du repiquage, en réponse à une forte dilution des cellules dans un milieu non conditionné par elles-mêmes. Puis une phase de croissance exponentielle entre le premier et le 6^{ème} jour après le repiquage, durée pendant laquelle plusieurs cycles de division cellulaire sont réalisés. A la fin de cette phase, les phosphates, le sucre, l'azote et les hormones deviennent limitants, ce qui conduit les cellules dans la phase stationnaire de croissance. Dans les conditions de culture mises au point par Nagata en 1992, le nombre de cellules BY-2 par unité de volume augmente entre 80 et 100 fois en 7 jours (**Figure 33**).

Les mesures réalisées avec la souche présente au laboratoire nous montrent des résultats similaires (**Figure 34**). Au moment du repiquage, 1,2 mL d'une culture âgée de 7 jours sont repiqués dans 100 mL de milieu MS complété en nitrates, vitamines et 2,4-D (Nagata et al., 1992) ce qui correspond à une densité cellulaire initiale de 2,2 g/L. D'après la comparaison du comptage en cellule de Nageotte des cellules BY-2, avec les mesures de biomasse (Masse Fraîche), nous considérons qu'1g de cellules BY-2 correspond à environ $15 \cdot 10^6$ cellules. Ainsi, au moment du repiquage nous inoculons $45 \cdot 10^6$ cellules/L de milieu (**Figure 34A**). Après 7 jours de culture, nous obtenons une biomasse de 257 g/L soit $3900 \cdot 10^6$ cellules/L de milieu.

L'indice mitotique correspond au pourcentage de cellules en phase de mitose (de la prophase à la télophase) à un moment donné. Nos mesures (**Figure 34B**), montrent des résultats similaires à ceux de Nagata (**Figure 33**). Les cellules en phase stationnaire de croissance n'ont qu'un très faible indice mitotique (0,4%). Mais très vite, après 24 h, 7,5% des cellules rentrent en mitose. Pendant la phase exponentielle de croissance, les cellules atteignent un indice mitotique maximal vers 8-9%, qui diminue à un niveau sensiblement nul, lorsque les cellules atteignent la phase stationnaire aux alentours du 5-6^{ème} jour. Les cellules n'évoluent pas davantage durant les 7 jours suivant.

Des observations préliminaires et de la littérature avaient montré que l'absence d'auxine ajoutée dans le milieu de culture provoquait une expansion cellulaire importante. Cela nous a conduit à décider de mesurer la pression de turgescence de ces cellules dans ces conditions. Au préalable nous l'avons mesuré lors d'un cycle de culture en conditions standard (**Figures 34C et 34D**).

Sur la **figure 34C** nous pouvons voir que le milieu de repiquage a une pression osmotique de 5 bar. Cette pression diminue tout au long du cycle de culture (surtout à partir du 4^{ème} jour) et atteint une pression

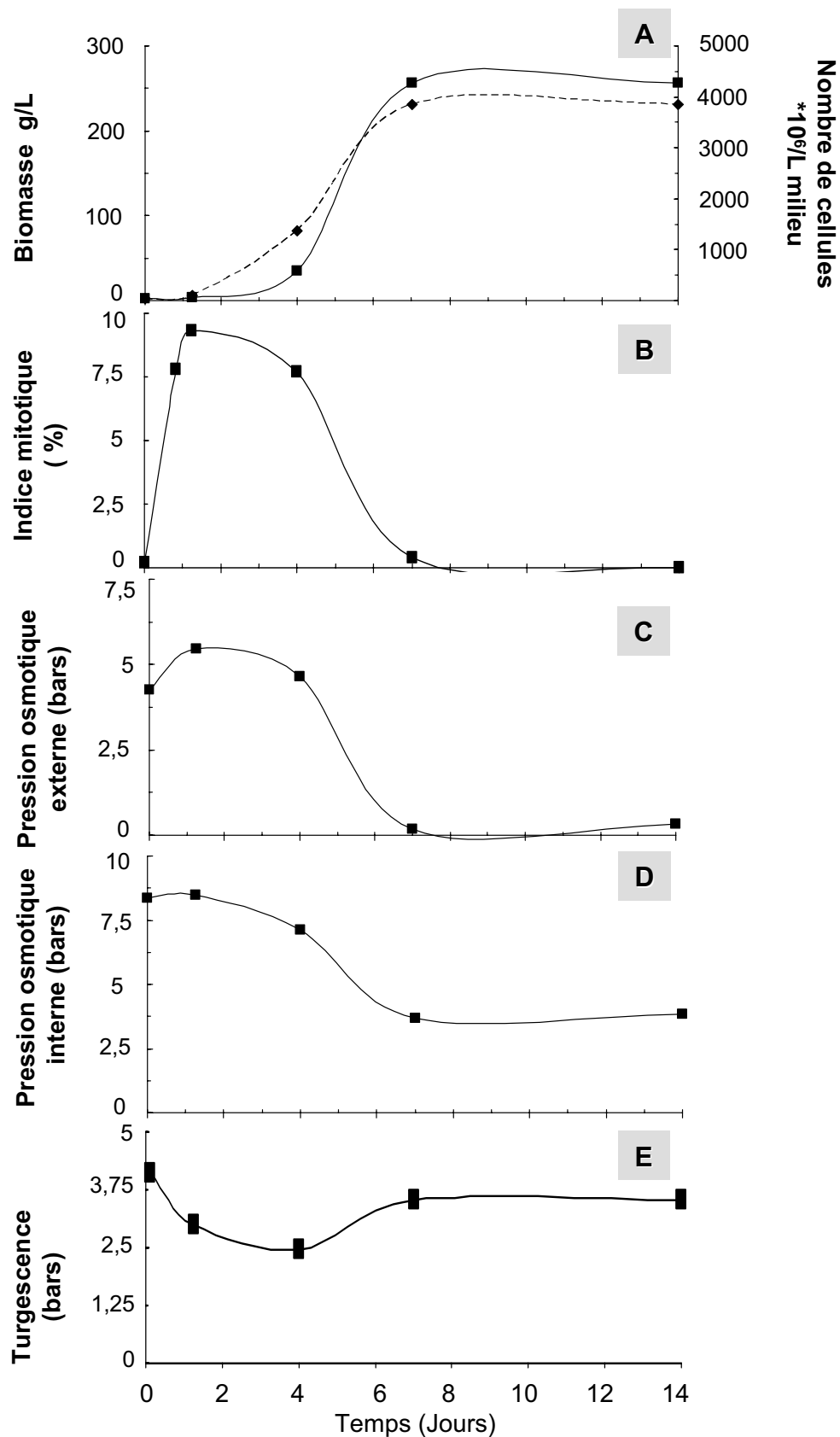


Figure 34. Caractérisation physiologique des cellules BY-2 sur 2 semaines.

Les cellules sont repiquées tous les 7 jours, en présence de 0,9 μM de 2,4-D.

Pour les cellules analysées à 14 J, elles ont été laissées 7 jours supplémentaires sans renouvellement du milieu ni apport d'auxine. **A-** Évolution de la biomasse (trait continu) et du nombre de cellules par litre de milieu de culture (trait en pointillés). **B-** Indice mitotique. **C-** Évolution de la pression osmotique interne. **D-** Évolution de la pression osmotique externe. **E-** Évolution de la turgescence, calculée par la différence entre la pression osmotique du milieu de culture par la pression osmotique interne des cellules.

de 0,15 bar à 7 jours. Ceci montre que le milieu est épuisé, résultats de la consommation complète des nutriments solubles par les cellules.

Au moment du repiquage les cellules âgées de 7 jours passent donc d'un milieu pauvre à un milieu très riche en nutriments. En réponse à cela, leur pression osmotique intracellulaire va doubler pendant les quelques minutes qui séparent le repiquage de la récolte des cellules (résultats non montrés). Pendant les deux premiers jours la pression va stagner aux alentours de 8 bar (**Figures 34D**), puis va diminuer jusqu'à 3,7 bar à la fin du cycle de culture.

Chez les cellules végétales la membrane plasmique restreint les échanges d'eau et donc la régulation osmotique et la présence d'une paroi qui présente une élasticité limitée, exerce une contre-pression qui s'oppose au flux d'eau. Celle-ci est appelée potentiel de turgescence, et elle est décrite comme le "moteur" du grandissement cellulaire.

L'accès facile aux mesures dans le compartiment apoplastique (le milieu extra-cellulaire) permet d'obtenir une estimation de la turgescence des cellules en culture par la différence des potentiels osmotiques externes et internes. Ce dernier est mesuré par la pression osmotique des jus cellulaires obtenus après congélation, décongélation et centrifugation.

En effet, si nous faisons le bilan du potentiel hydrique d'une cellule nous obtenons :

$$\Psi_{int} = \pi_{int} + P_{int} + \phi_{int} + \tau_{int}$$

Où Ψ_{int} est le potentiel hydrique de la cellule, π_{int} est le potentiel osmotique intracellulaire

P_{int} le potentiel de turgescence, ϕ_{int} est le potentiel de gravité = une constante

τ_{int} est le potentiel matriciel qui correspond aux colloïdes et aux constituants cytoplasmiques, cependant nous la négligeons à l'échelle cellulaire car la vacuole prend entre 90 et 99% du volume d'une cellule végétale.

Dans la mesure où l'on admet que la cellule est en équilibre hydrique avec son milieu, on peut écrire :

$$\Psi_{int} = \Psi_{ext} \text{ soit}$$

$$\Psi_{int} - \Psi_{ext} = 0 \text{ et étant donné que } \Psi_{ext} = \pi_{ext}$$

$$\text{Donc } \pi_{int} - \pi_{ext} + P_{int} + \phi_{int} - \phi_{ext} = 0$$

Le potentiel de gravité étant identique dans les deux compartiments.

Ainsi $P_{int} = \pi_{int} - \pi_{ext}$, c'est-à-dire que le potentiel de turgescence équivaut à la différence entre la pression osmotique intracellulaire et externe.

Après avoir été repiquées dans un milieu neuf, les cellules ont un potentiel de turgescence de 4 bar (**Figure 34E**), et durant la phase exponentielle de croissance il va diminuer de 35% (elles atteignent environs 2,5 bar le 4^{ème} jour). A la fin du cycle de culture, la turgescence remonte à une valeur proche de la valeur initiale. On peut donc constater que la turgescence diminue en parallèle d'une augmentation de la prolifération cellulaire, et inversement.

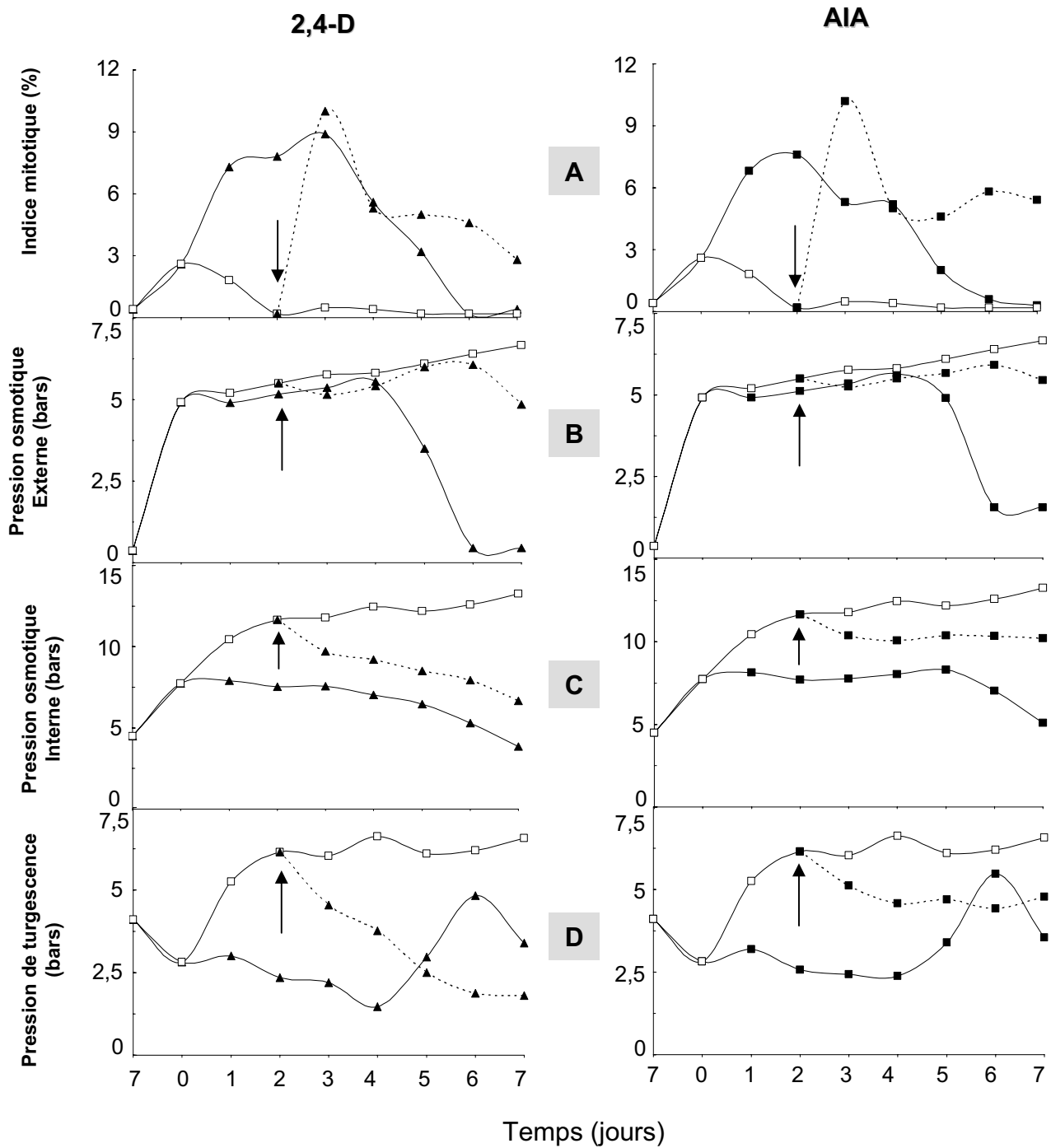


Figure 35. Réponses sur 7 jours des cellules BY-2 à l'auxine

Suivi en **A-** de l'Indice mitotique; en **B-** de l'évolution de la pression osmotique interne; en **C-** de la pression osmotique externe; et en **D-** de la turgescence.

Les cellules ont subi un lavage avant le repiquage dans différentes conditions auxiniques:

- Carence complète
- ▲— Traitement par 0,9 μM de 2,4-D
- -▲- - Carence ménagée: rajout de 0,9 μM de 2,4-D après 2 jours de carence (flèche)
- Traitement par 10 μM d'AIA;
- -■- - Carence ménagée: rajout de 10 μM d'AIA après 2 jours de carence (flèche)

1.2. Influence de l'auxine sur les divisions cellulaires

Pour les cultures d'entretien des cellules BY-2, nous utilisons comme auxine synthétique le 2,4-D. Désirant connaître précisément le comportement des cellules face à l'AIA, nous avons comparé (**Figure 35**) l'évolution de la division cellulaire et la turgescence sur un cycle de culture en présence de 0,9 μM de 2,4-D et 50 μM d'AIA. Car des expériences préliminaires ont montré que cette concentration était le seuil qui permettait une croissance normale de notre culture cellulaire.

Dans cette expérience, afin d'éviter l'action du 2,4-D résiduelle à la fin du cycle de culture, nous avons lavé les cellules pendant 1 h dans un ballon de 6 L contenant 1 L de milieu de culture neuf dépourvu d'hormones. En carence d'auxine, les cellules se sont légèrement divisées pendant les premières 24 h, mais elles n'ont réalisé qu'un cycle de division et dès le deuxième jour, la culture cellulaire ne croît plus.

Sur la **figure 35A**, nous pouvons constater que l'utilisation de l'AIA à la place du 2,4-D n'a que peu d'impact sur l'activité mitotique des cellules BY-2 à long terme. Les cellules se divisent activement entre le premier et le 4^{ème} jour après repiquage. Pourtant, les cellules cultivées avec l'AIA commencent à ne plus se diviser 24 h avant les cellules avec du 2,4-D. Ceci est une variation du comportement des cellules BY-2, qui traduit une métabolisation plus rapide de l'AIA. La concentration de celle-ci, passerait plus rapidement en dessous du seuil requis pour induire les mitoses du fait de sa métabolisation plus importante. D'un point de vu quantitatif il est cependant difficile de comparer l'action de l'AIA et du 2,4-D car leurs concentrations intracellulaires n'étant pas régulées de la même façon (voir introduction paragraphe 2), la concentration efficace pour induire une réponse spécifique est différente, avec une action sur un plus long terme. D'où l'expression "d'efficacité plus importante" du 2,4-D : non seulement il n'est pas transporté exactement comme l'AIA, mais il est métabolisé plus lentement par les cellules.

Lorsque l'on carence les cellules en auxine pendant 48 h (trait en pointillé sur la figure 35A), l'activité mitotique est nulle. Le rajout d'auxine, que ce soit d'AIA ou de 2,4-D entraîne une reprise des divisions cellulaires plus rapidement, avec un indice mitotique plus important que dans les conditions non carencées décrites précédemment. Si l'on considère un cycle cellulaire de 15 h (comme Nagata l'a décrit et vérifié par cytométrie en flux dans nos expérience préliminaires), et que la phase de division est d'une heure, alors environs 6% des cellules se trouvent en phase de mitoses. L'obtention d'un pourcentage de 10% des cellules montre donc une faible synchronisation des cellules de tabac sous l'effet d'une carence en auxine. Pourtant il ne s'agit pas d'une synchronisation comme avec l'aphidicoline. Cet inhibiteur de la polymérase, empêche la réplication de l'ADN et bloque toutes les cellules qui arrivent en phase S. L'élimination de l'aphidicoline par un simple lavage, permet à ces cellules de repartir en G2 en même temps. Ceci se traduisant par un indice mitotique entre 70 et 90%. Dans nos expériences les cellules ne sont pas arrêtées à un moment du cycle, sous l'effet de la carence auxinique elles sont restées plus longtemps en phase G0. L'ajout d'auxine, que ce soit le 2,4-D ou l'AIA, induit l'entrée des cellules en phase G1. Nous avons alors après 24 h de traitement à l'auxine, 11% des cellules (au lieu de 6%) qui se divisent en même temps, alors que 90% sont naturellement dispersées dans toutes les phases du cycle.

Quarante-huit heures après l'ajout d'auxine, l'indice mitotique chute de moitié et les trois jours suivants, les cellules se divisent de moins en moins, que ce soit avec le 2,4-D ou l'AIA.

1.3. Influence de l'auxine sur la turgescence et le grandissement cellulaire

Comme nous l'avons déjà vu, la turgescence peut dans nos conditions être ramenée à la différence entre la pression osmotique interne et externe.

En absence d'auxine la **pression osmotique externe** n'augmente que de 25% (soit 1,6 bar) en 7 jours (carrés blancs figure 35B), qui peut être causée par la libération de composés par les cellules BY-2. En présence d'auxine, la pression osmotique du milieu reste constante jusqu'au 4^{ème} jour. Pendant les deux derniers jours de la phase exponentielle de croissance (de 4 à 6 jours) cette pression va diminuer de 4 à 5 bar en présence d'auxine (carrés et triangles noirs figure 35B). Ainsi la tendance est identique entre les cellules cultivées en présence de 2,4-D et celles avec l'AIA.

La **pression osmotique interne** évolue différemment en absence ou en présence d'auxine (**figure 35C**). Alors que la carence en auxine entraîne une augmentation graduelle de 70% en 7 jours (soit une augmentation de 5 bar), la présence d'auxine entraîne une diminution de 50% (soit d'environ 4 bar). Cette baisse de la pression intracellulaire s'accroît davantage durant les deux derniers jours.

La différence des variations osmotiques intracellulaires et extracellulaires met en évidence une réponse auxinique peu étudiée : l'effet de l'auxine sur la turgescence cellulaire (**figure 35D**). En réponse au changement de milieu, lors de leur lavage d'une heure, les faisant passer d'un milieu de 1,7 (milieu après 7 jours de culture) à 5 bar (milieu neuf), leur potentiel de turgescence diminue de 60% (soit 1,26 bar en 1 h). La carence en auxine va avoir pour conséquence d'augmenter la turgescence de plus de 60% en 2 jours. Les jours suivants le potentiel augmente légèrement, et au bout de 7 jours de culture la turgescence des cellules carencées en auxine est trois fois plus importante qu'au moment du repiquage.

En présence d'auxine (triangles et carrés noirs **figure 35D**), la turgescence (P) continue de diminuer pendant les 4 jours suivant le repiquage, de l'ordre de 15 à 50% avec respectivement de l'AIA (P variant de 2,8 à 2,5 bar) ou du 2,4-D (P variant de 2,8 à 1,5 bar). Ensuite vers la fin de la phase exponentielle de croissance cellulaire (entre le 4^{ème} et le 6^{ème} jours de culture), la turgescence augmente fortement de 3 bar en présence d'auxine. Pendant le dernier jour, la turgescence diminue à nouveau de 42% (soit 1,91 bar), que ce soit avec du 2,4-D ou de l'AIA.

L'ajout d'auxine, après 48 h de carence hormonale, entraîne une faible augmentation de la pression osmotique externe (traits en pointillés **figure 35B**) de l'ordre de 3 à 10% jusqu'au 5^{ème} jour, puis elle baisse entre 4 et 20% en 24 h (selon la nature de l'auxine). La période précédant cette diminution, correspond à la même que pour le milieu des cellules non carencées pendant 48 h.

L'ajout d'auxine après la carence a pour effet de diminuer la pression osmotique intracellulaire en 24h (traits en pointillés **figure 35C**), de 1 à 2 bar suivant si l'on ajoute respectivement soit de l'AIA, soit du 2,4-D. Comme la pression osmotique externe varie peu ou pas pendant les premiers jours du rajout d'auxine, il en résulte donc une forte diminution de la turgescence dès les premières 24 h. En 4 jours les cellules diminuent ainsi leur turgescence de 70% avec du 2,4-D contre 20% après un ajout d'AIA.

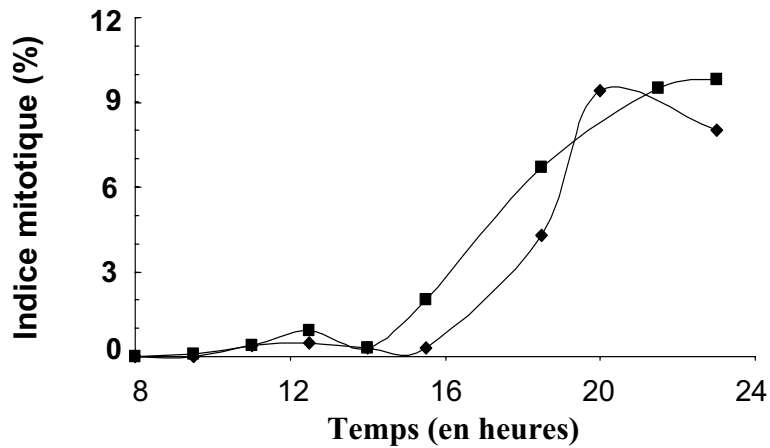


Figure 36. Évolution de l'indice mitotique des cellules BY-2 pendant 24 h en présence de $0,9 \mu\text{M}$ de 2,4-D ou $10 \mu\text{M}$ d'AIA

Des cellules de 7 jours ont été lavées pendant une heure avant d'être repiquées en présence de 2,4-D ou d'AIA.

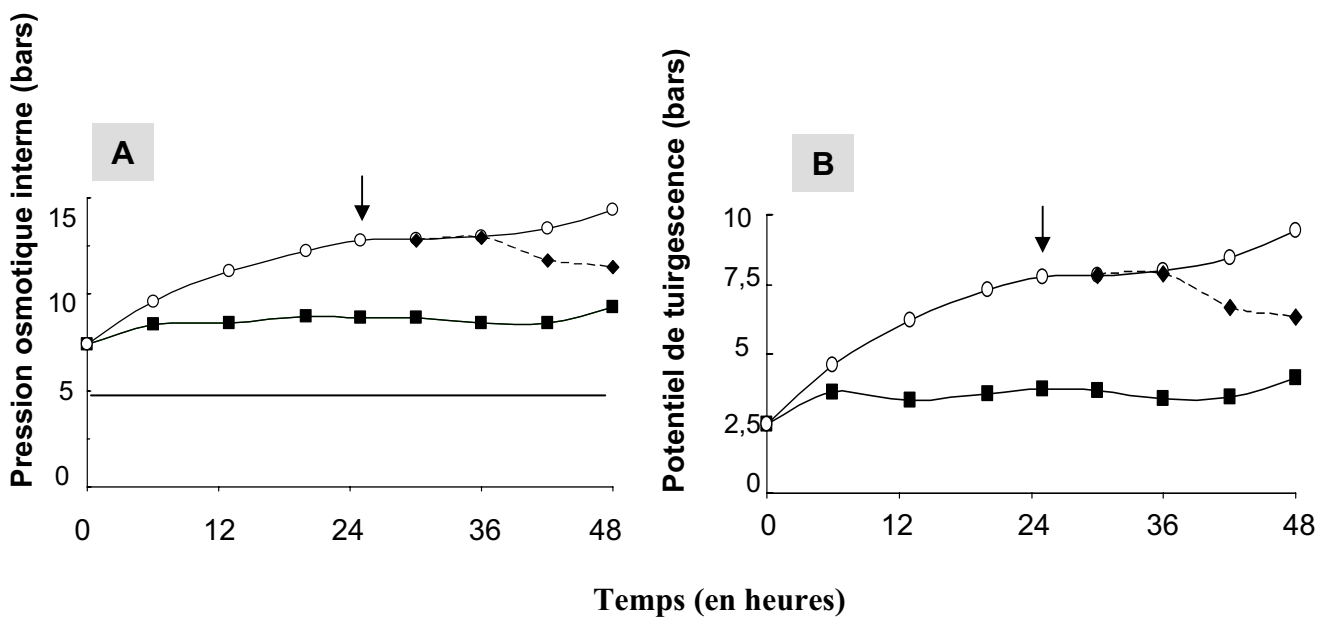


Figure 37. Évolution de la pression osmotique interne (A) et de la turgescence (B) des cellules BY-2 pendant 48h.

■ $10 \mu\text{M}$ d'AIA; ○ Carence complète (48h);
 ◆ Carence ménagée (rajout de $10 \mu\text{M}$ d'AIA (flèche) après 25h de carence).

Le trait plein sur le graphe A correspond à la pression osmotique du milieu.
 La flèche correspond au rajout d'auxine

2. Réponses cellulaires rapides à l'auxine et étude des effets-doses

2.1. Mise en évidence de la régulation rapide de l'activité mitotique et de la pression de turgescence par l'auxine

L'observation de l'effet d'un rajout d'auxine à des cellules carencées a montré que des variations au niveau de l'indice mitotique et de la turgescence sont visibles durant les premières 24 h suivant le rajout. La culture cellulaire a l'avantage d'intégrer les signaux externes très rapidement, et contrairement aux plantes entières, l'observateur a la possibilité d'analyser au niveau cellulaire l'action directe de l'auxine. Des mesures de l'indice mitotique et de la turgescence des cellules ont donc été réalisées sur 24 h après avoir effectué un lavage pendant 1 h.

Grâce à une étude préliminaire, nous avons observé que 50 μM d'AIA (utilisée jusqu'à présent) est une concentration trop grande, c'est à dire surpa-optimale pour induire une réponse cellulaire à court terme. Et nous avons pu déterminer que 10 μM semblait être la plus appropriée. La concentration de 2,4-D à 0,9 μM a été conservée comme référence par rapport à l'entretien des cellules BY-2 et parce qu'elle induisait les mêmes effets en temps court que des concentrations inférieures.

Le suivi de l'indice mitotique toutes les 3 h a permis de détecter la reprise de mitoses vers 16 h (**Figure 36**). Le taux de mitoses croît rapidement pour arriver à un maximum vers 20 h, où 10% des cellules sont en cours de division. Nous observons alors que les cellules poussent soit avec du 2,4-D ou de l'AIA, nous obtenons la même cinétique de reprise du cycle cellulaire. La réplication du suivi des cellules en cinétique a montré que les différences entre la courbe représentant l'évolution de l'indice mitotique avec l'AIA et le 2,4-D ne sont pas significatives. La diminution de l'indice mitotique vers 23 h en est un exemple.

Une variation significative de la turgescence est également visible dès les premières 24 heures de traitement par 10 μM d'AIA (**Figure 37B**).

La pression osmotique externe reste constante à 5 bar pendant les deux jours suivant le repiquage. La turgescence suit donc la même évolution que la pression osmotique interne des cellules de tabac présentée **figure 37A**. Vers 6-8 h après le repiquage, la turgescence des cellules carencées en auxine est beaucoup plus grande que celles repiquées avec de l'auxine, avec une différence d'environ 30%. Celle-ci s'accroît au court du temps. La turgescence des cellules BY-2 carencées augmente de 285% en 48 h (correspondant à 7 bar d'augmentation), contrairement à celle des cellules en présence d'auxine qui n'augmente que de 70% (soit 1,5 bar). De ce fait, la turgescence des cellules carencées est 2 fois plus importante que pour des cellules non carencées.

Cette augmentation de la turgescence est réversible, par un ajout d'AIA, comme le montre les courbes en pointillés sur la **figure 37**. Après 25 h de carence, l'ajout de 10 μM d'AIA induit une baisse significative de la turgescence visible au delà de 6 h après le rajout. La turgescence diminue et tend à rejoindre la faible turgescence des cellules cultivées en présence d'auxine. Ainsi 18 h après le rajout d'AIA, la turgescence a diminué de 20%.

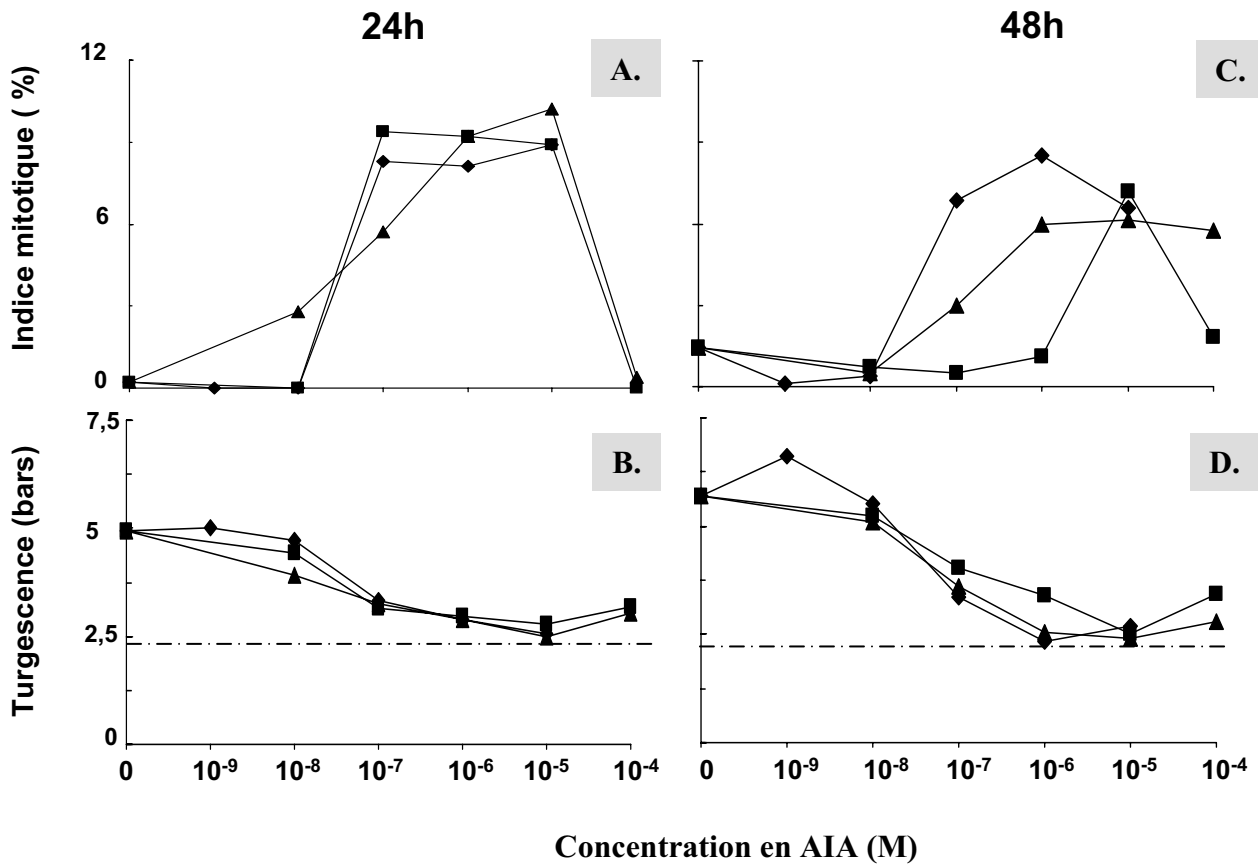


Figure 38. Réponses rapides des cellules BY-2 à la concentration et à la nature de l'auxine.

Les cellules ont été repiquées avec de l'AIA —■—, du 2,4-D —◆— ou de l'ANA —▲—
 Les effets sur l'IM et la turgescence ont été mesurés après 24 heures et 48 heures.

Les cellules ont été lavées pendant 1h au préalable.

L'indice mitotique mesuré au moment du repiquage était à 0,2.

Le trait en pointillé correspond à la turgescence au moment du repiquage.

2.2. Etude de l'effet de la concentration d'auxine sur les réponses rapides à cette hormone

L'auxine naturellement extraite à partir des plantes est l'acide-3-indole acétique, son activité a été démontrée dès 10 nM (Woodward and BARTEL, 2005). Deux types de facteurs de croissance ont été synthétisés, l'acide-1-naphtalacétique (ANA) et l'acide 2,4-Dichlophénoxyacétique (2,4-D), pour leur action similaire à l'AIA sur les plantes. Bien que l'on ne connaisse pas en détails les voies de métabolisation et de signalisation de ces trois auxines, les données de la littérature montre des actions différentes induites par ces molécules sur certains mutants. Alors que l'on ne sait pas si elle agit par l'intermédiaire d'un récepteur extra- ou intra- cellulaire, l'action de l'auxine dépend de sa concentration. C'est pour cela que nous avons voulu connaître le comportement des cellules BY-2 face à différentes natures d'auxines et pour différentes concentrations.

2.2.1. Etude du contrôle rapide de la division cellulaire et de la turgescence par 3 auxines exogènes

Nous avons comparé l'action de l'auxine naturelle (AIA) avec celle des 2 auxines synthétiques couramment utilisées dans les cultures cellulaires (2,4-D et ANA). Pour cela nous avons mesuré l'indice mitotique et le potentiel de turgescence après 24 et 48 h de traitement pour une gamme de concentration d'auxine de 0 à 100 μ M et illustrés par les graphes de la **figure 38**.

Dès 24 h, nous pouvons discerner deux comportements de l'entrée en division des cellules BY-2 (**figure 38A**). D'une part avec l'ANA les cellules commencent à se diviser dès 10 nM avec un indice mitotique qui augmente proportionnellement à la dose d'auxine jusqu'à 10 μ M, la concentration optimale pour cette réponse. En présence de 2,4-D ou d'AIA, la majorité des cellules BY-2 (10%, voir paragraphe précédent) n'entrent en division que pour une gamme allant de 100 nM à 10 μ M. Dans cette gamme, les concentrations semblent avoir la même efficacité, contrairement au cas de l'ANA, qui correspond davantage à une réponse type "effet-dose". Quelle que soit la nature de l'auxine une concentration de 100 μ M ne favorise pas l'entrée en mitose des cellules BY-2.

Une différence de comportement analogue est observée en ce qui concerne la turgescence cellulaire (**figure 38B**). A partir de cellules ayant une pression de turgescence de 2,5 bar au moment du repiquage, une gamme de concentrations d'auxine, inférieure à 10 nM, entraîne une augmentation significative de 20 à 100% de cette pression. Cette augmentation étant d'autant plus faible que la concentration en auxine est grande. Les trois auxines entraînent une telle réponse, mais notons que l'ANA agit plus fortement sur la turgescence que les deux autres. En particulier par rapport au traitement avec 10 nM de 2,4-D, où la turgescence de ces cellules est 30% plus grande que celle observée (correspondant à une différence d'environ 1,25 bar) pour les cellules traitées avec l'ANA.

Pour des concentrations supérieures, la turgescence est sensiblement la même et ce, quelle que soit la nature de l'auxine ajoutée : en 24 h la turgescence des cellules a peu ou pas varié pour des

concentrations en auxine supérieures à 1 μM (par rapport au T=0 **Figure 38B**), ces pressions de turgescence calculées oscillant entre 2,5 et 3 bar.

Si l'on considère la courbe effet-dose dans son ensemble, la turgescence diminue en fonction de la concentration croissante d'auxine, et atteint des valeurs minimales pour des concentrations en auxine qui induisent la division.

Après 48h de culture, de plus grandes différences sont observées (**Figure 38C**) en ce qui concerne l'entrée en division des cellules BY-2 en fonction de la nature de l'auxine appliquée.

Dans le cas de l'AIA, seule une concentration de 10 μM induit encore des divisions. Les concentrations inférieures n'ont donc permis aux cellules BY-2 de ne se diviser qu'une seule fois, ces cellules n'ont réalisé qu'un seul cycle cellulaire.

En présence de 2,4-D, 8 à 9% des cellules continuent de se diviser pour une gamme de concentrations de 100 nM à 10 μM , qui est identique à celle dont l'efficacité avait été observée à 24 h. Cette même gamme de concentrations d'ANA continue aussi d'induire des divisions, pour 3 à 6% des cellules, alors qu'à 24 h, 10 nM était suffisant pour induire des divisions. En comparant avec la réponse à 24h (figure 38A) nous observons d'une part que l'AIA, qui induisait un comportement cellulaire similaire au 2,4-D, n'agit plus que pour de fortes concentrations.

En outre la concentration de 100 μM qui n'entraînait aucune réponse mitotique des cellules, quelque soit la nature de l'auxine, permet après 48 h de traitement, l'entrée en divisions de 3 à 6% des cellules (derniers points de la figure **38C**) avec respectivement 100 μM d'AIA ou d'ANA.

Au bout de 48h de traitement à l'auxine, le 2,4-D se révèle donc plus efficace pour induire des mitoses que l'ANA et l'AIA. Il est possible que ces différences de sensibilité des cellules BY-2 à différentes auxines soient causées par le métabolisme et le transport spécifiques de chaque auxine.

L'évolution de la turgescence de façon opposée à la dose d'auxine est similaire (**figure 38D**) après 48 h de traitement. Par rapport au moment du repiquage, la turgescence des cellules a augmenté de 27 à 56%. Cependant une gamme de concentrations entre 1 et 100 nM de 2,4-D induit des différences plus forte de la turgescence en fonction de la dose d'auxine, par rapport à ce qui avait été mesuré 24 h avant. La pression passant de 6 à 3 bar en fonction de la dose croissante d'auxine, alors qu'après 24 h de traitement, elle passait de 5 à 3 bar. Ce qui correspond à une accentuation de 30% de la différence de turgescence entre 1 et 100 nM. L'évolution de la turgescence en fonction des doses d'AIA et d'ANA est similaire par rapport à 24 h de traitement (figure **38B**). Notons pourtant, qu'1 μM d'AIA favorise une augmentation du potentiel de turgescence de 60% en 48 h de traitement, contrairement au 2,4-D et à l'ANA, qui pour la même concentration n'ont induit aucune variation de la turgescence par rapport au moment du repiquage. Ainsi pour une gamme de concentration de 0 à 100 nM, une concentration d'auxine croissante induit une augmentation de la turgescence de plus en plus faible. Alors qu'au delà d'1 μM la turgescence n'a toujours pas varié quelle que soit la nature de l'auxine et le temps du traitement.

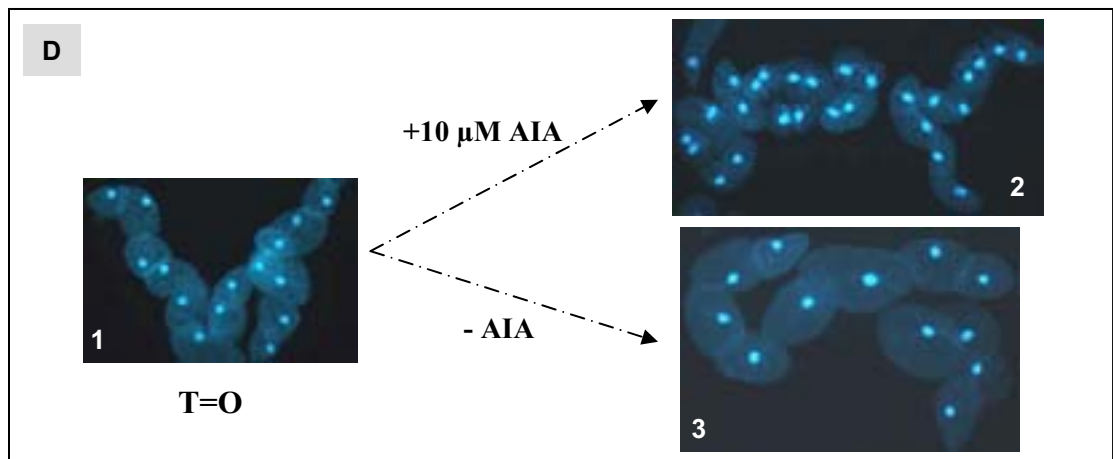
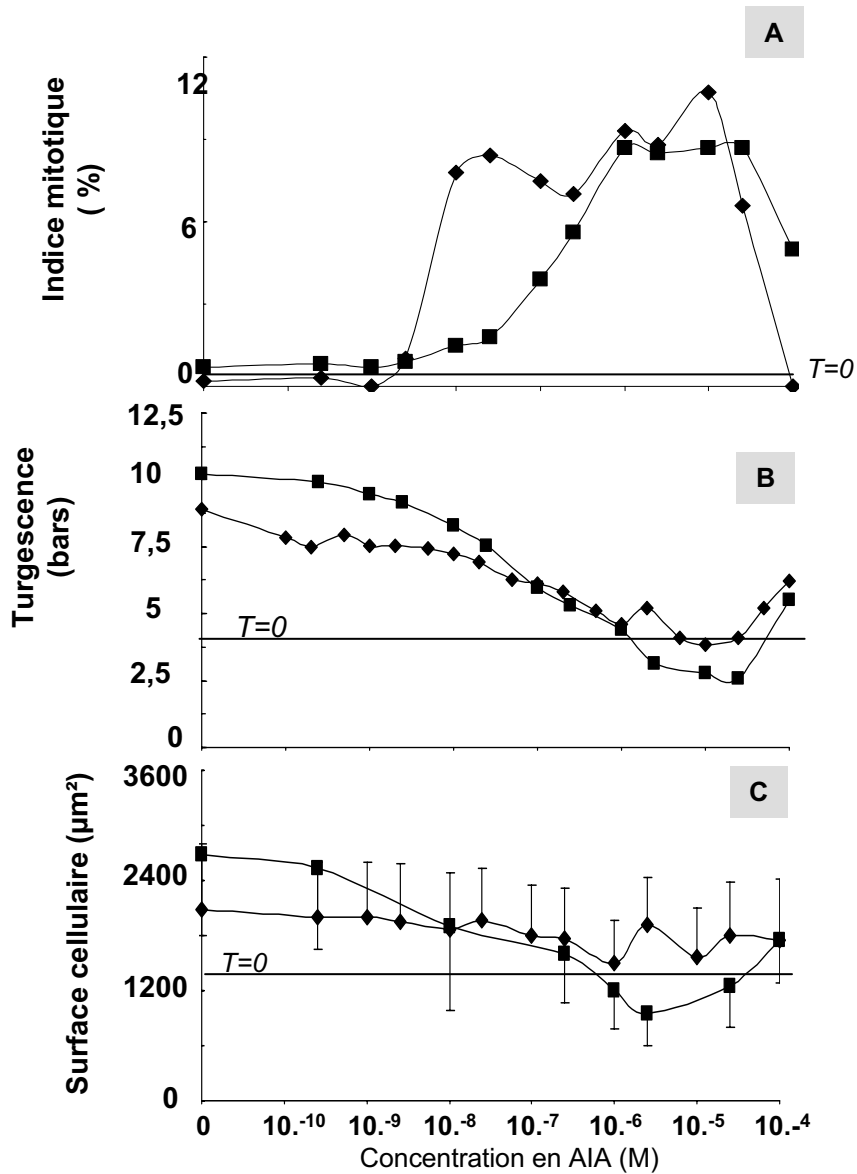


Figure 39. Réponses physiologiques et cellulaires des BY-2 en fonction de la concentration en auxine

Après 24 h (losanges noirs) et 48 h (carrés noirs) de traitement aux concentrations indiquées d'AIA
 Les cellules ont été lavées pendant 1h au préalable.

Dans cette expérience l'Indice mitotique (A), la turgescence (B) ont été mesurés. Les surfaces cellulaires (C) ont été mesurées à partir de clichés photographiques, dont un exemple est présenté en D. Les cellules au moment du repiquage (photo 1) sont traitées pendant 48 h avec (photo 2) ou sans 10 µM d'AIA (photo 3). Grossissement x80

2.2.2. Etude de l'effet de la concentration d'AIA sur la division et la turgescence cellulaire

D'après les résultats précédents, nous avons vu que les auxines peuvent induire chez les cellules BY-2 des réponses rapides pour de très faibles concentrations. Afin d'affiner l'effet de l'auxine sur les cellules BY-2, en fonction de sa concentration, nous avons mené une expérience avec un plus grand nombre de concentrations d'AIA (**Figure 39**).

Après 24h de traitement avec 10 nM d'AIA la première entrée en phase de mitose est induite pour la majorité (9%) des cellules BY-2 (**Figure 39A**). Les concentrations supérieures induisent des mitoses, sans amélioration de l'efficacité, comme précédemment. Au-delà de 50 μ M les cellules ne se divisent pas, ce qui signifie un effet supra-optimal de cette gamme de concentrations d'auxine sur la première division cellulaire des cellules BY-2. Après 48 h, les concentrations inférieures à 100 nM sont moins efficaces pour induire une réponse mitotique (entre 0 et 2% des cellules se divisent). En outre l'effet supra-optimal est bien moins net, puisque les fortes concentrations d'AIA (50-100 μ M) entraînent 5 à 8% des cellules à rentrer en mitoses.

Sur la **figure 39B**, on peut constater que la turgescence est très finement régulée en fonction de la concentration en auxine. En carence d'auxine, la turgescence passe de 3,7 à 8,7 bar, soit une augmentation de 135% en 24 h. Cette augmentation est d'autant moins grande que la concentration en auxine appliquée croît. Ceci est visible pour un traitement jusqu'à 100 nM d'auxine, où l'augmentation de la turgescence n'est plus que de 35% par rapport au moment du repiquage. Ce qui signifie qu'entre une condition de carence en auxine et une autre avec un traitement de 100 nM d'AIA, le potentiel de turgescence des cellules BY-2 est à peu près 2 fois plus grande dans l'une que dans l'autre, en à peine 24 h. Au-delà de 100 nM, les cellules n'ont pas subi de variations de leur turgescence, excepté pour des concentrations supérieures à 50 μ M.

Après 48 h de culture (carrés noirs **figure 39B**) sans auxine la turgescence est passée de 3,7 à 10 bar. Ce qui correspond à une augmentation de 87% en 24 h de la turgescence (entre 24 et 48 h). Jusqu'à 100 nM la turgescence diminue comme précédemment en fonction de la dose d'auxine. En outre pour une gamme de concentrations d'auxine entre 50 nM et 1 μ M nous pouvons observer que la turgescence des cellules n'a pas varié durant les dernières 24 h. Les cellules traitées avec une concentration d'AIA entre 1 et 50 μ M ont une turgescence plus faible de l'ordre de 30% par rapport au moment du repiquage. Au delà de cette gamme la turgescence des cellules n'a pas diminué.

Lors de cette expérience nous avons également mesuré la surface cellulaire à partir de clichés photographiques des cellules BY-2 traitées à l'auxine (**Figure 39C**). Cette surface correspond à celle de la plus grande section des cellules, étant donnée qu'elles sont aplaties entre lame et lamelle. Après 24 h de traitement, la surface cellulaire ne varie pas significativement en fonction de la concentration d'auxine ajoutée. En condition de carence la taille cellulaire a grandi de 55% alors que l'ajout d'AIA (entre 10 nM et 100 μ M) s'accompagne d'une augmentation d'environ 30%.

Après 48 h de traitement la croissance des cellules en fonction de la concentration en auxine est marquante. En conditions de carence les cellules doublent leur taille cellulaire. L'ajout d'une concentration

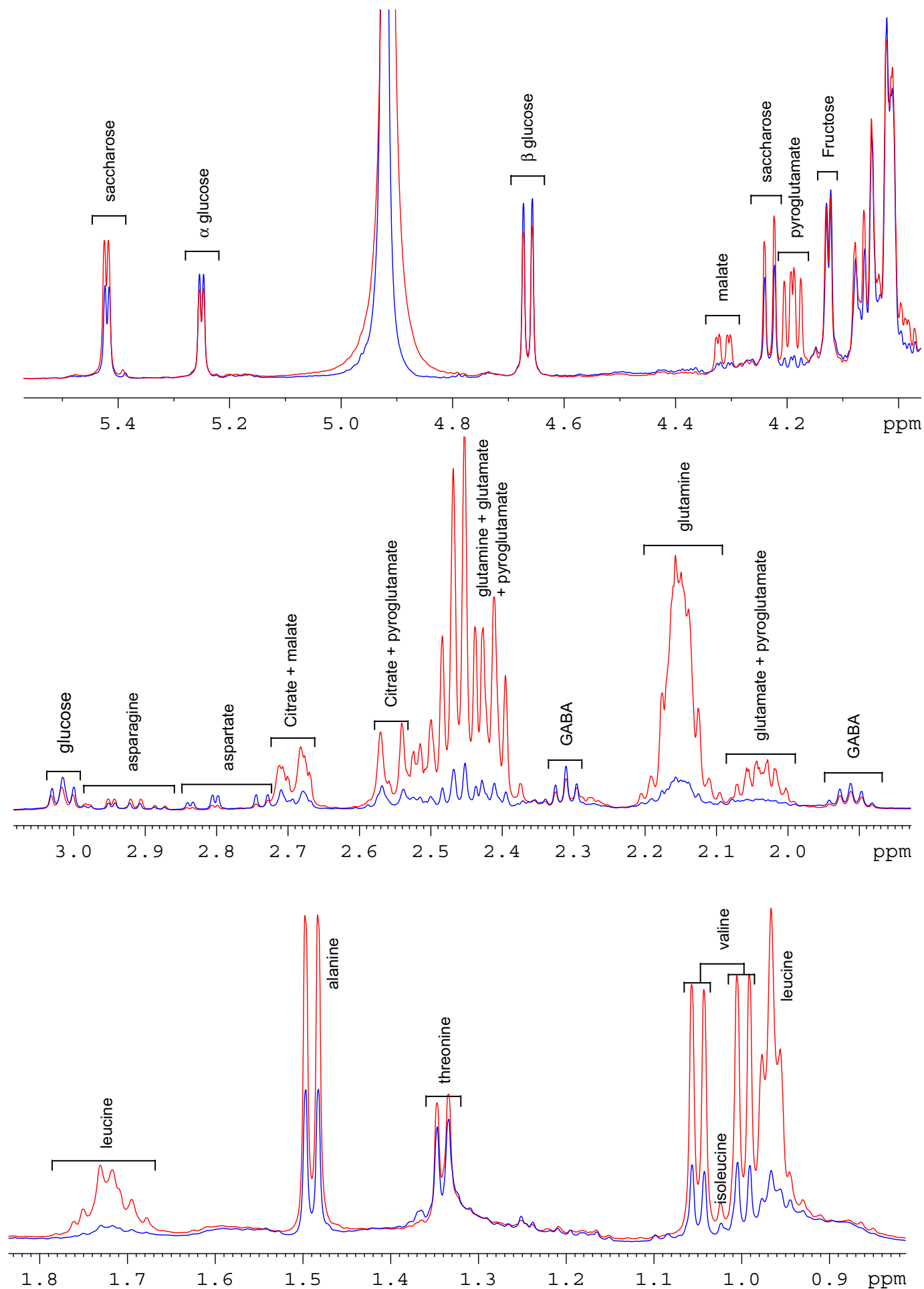


Figure 40. Profil métabolique par Résonance Magnétique Nucléaire du proton des cellules BY-2 carencées en auxine (tracé rouge) ou cultivées en présence de 0,9 μM de 2,4-D (tracé bleu).

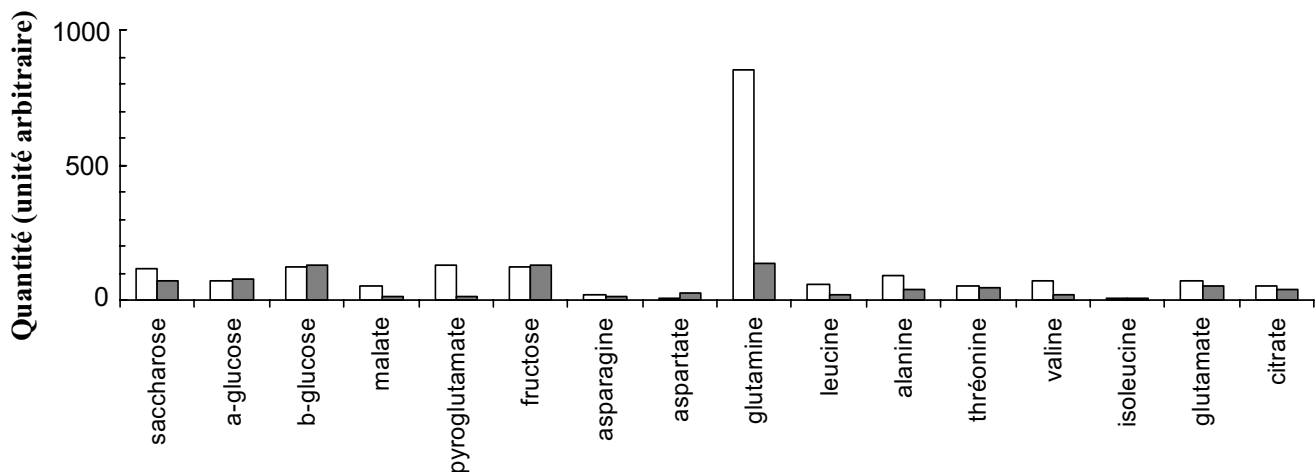


Figure 40bis. Analyse des intégrales du profil métabolique par RMN du proton des cellules BY-2 carencées en auxine (histogramme blanc) ou cultivées en présence de 0,9 μM de 2,4-D (histogramme gris).

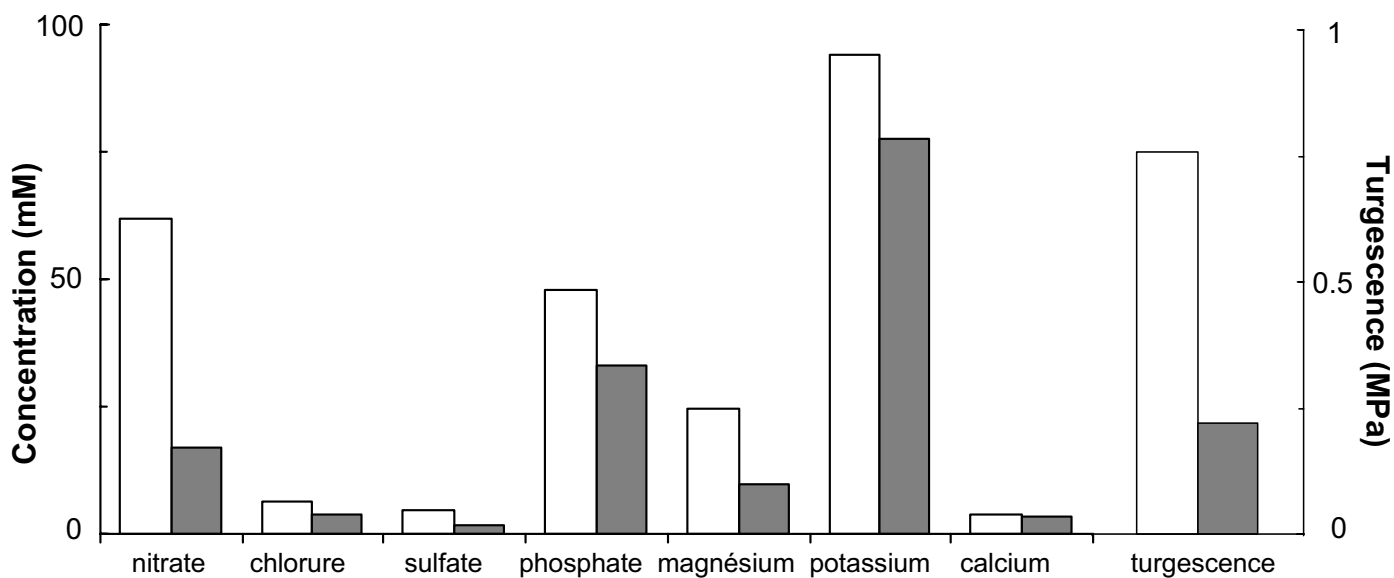


Figure 41. Turgescence et dosage du contenu en ions minéraux dans les cellules BY-2 carencées en auxine (histogramme blanc) ou cultivées en présence de 0,9 μM de 2,4-D (histogramme gris).

de plus en plus grande d'AIA a pour conséquence de baisser davantage la surface des cellules BY-2. De telle sorte qu'entre des cellules carencées en auxine et des cellules traitées avec 250 nM d'auxine, il y a une différence approximative de 1200 μm^2 . Sachant que les cellules au départ faisaient en moyenne 1350 μm^2 , la différence entre des cellules qui ont poussé avec ou sans auxine est donc très importante. Au delà de 250 nM d'AIA la taille des cellules a diminué environ de 34%, alors que la taille des cellules traitées avec une concentration d'AIA supérieure à 50 μM n'a peu ou pas varié. Si l'on compare la **figure 39C** avec la **figure 39A**, on s'aperçoit que la diminution de la taille cellulaire correspond aux cellules qui se sont divisées sous l'action de l'AIA dans une gamme de concentrations de 100 nM à 10 μM .

Ces résultats sont la combinaison de plusieurs expériences qui se recourent et montrent la variabilité du système cellulaire végétale. Même si il y a des différences entre les expériences, une cohérence des comportements cellulaires au sein d'une même expérience est observée : en effet pour cette expérience on remarque après 24 h de traitement par l'AIA une petite augmentation de la taille des cellules pour 2,5 μM , or la turgescence est également légèrement plus grande et l'indice mitotique diminue aussi faiblement pour cette concentration.

En résumé, nous avons montré que l'auxine pouvait induire des réponses précises sur l'entrée dans le cycle cellulaire et sur la taille cellulaire et ceci pour des temps plus courts (moins de 48 h) que pour les expériences relatées dans la littérature jusqu'à maintenant (traitement analogue analysé sur une période supérieure à 4 jours). Nous avons également montré que l'AIA dans une faible gamme de concentrations, entre 0,1 et 100 nM, régulaient finement le potentiel de turgescence et que ces changements paraissaient en corrélation avec les variations de la taille cellulaire.

3. Variations du contenu cellulaire en fonction de la dose d'auxine et de la composition du milieu de culture

3.1. Mise en évidence de nombreux changements métaboliques accompagnant les variations de teneur en auxine appliquées aux cellules BY-2

De grandes différences du potentiel de turgescence sont visibles dès 24 h entre les cellules carencées en auxine et celles qui ont reçu une concentration d'auxine suffisante pour induire l'entrée en division cellulaire. Pour comprendre l'origine de ces différences, des dosages préliminaires de sucres ont été réalisés (résultats non montrés). De façon surprenante aucune différence de teneur en sucre n'a été détectée entre les cellules carencées ou non en auxine. Afin d'avoir une vue générale du métabolisme des cellules BY-2, nous avons réalisé un profil métabolique par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) de cellules ayant poussé pendant 24 h dans un milieu avec ou sans 0,9 μM de 2,4-D, leur turgescence étant alors respectivement de 2,2 et 7,5 bar. Les résultats de l'analyse RMN sont indiqués **figure 40**.

L'identification des principaux pics a confirmé que les sucres ne sont pas responsables des variations de turgescences observées entre les deux conditions auxiniques. D'autre part il nous apparaît que des familles de composés tels que les acides aminés et les acides organiques varient de façon significative entre les deux conditions auxiniques. Si l'on regarde d'un peu plus près l'analyse des intégrales

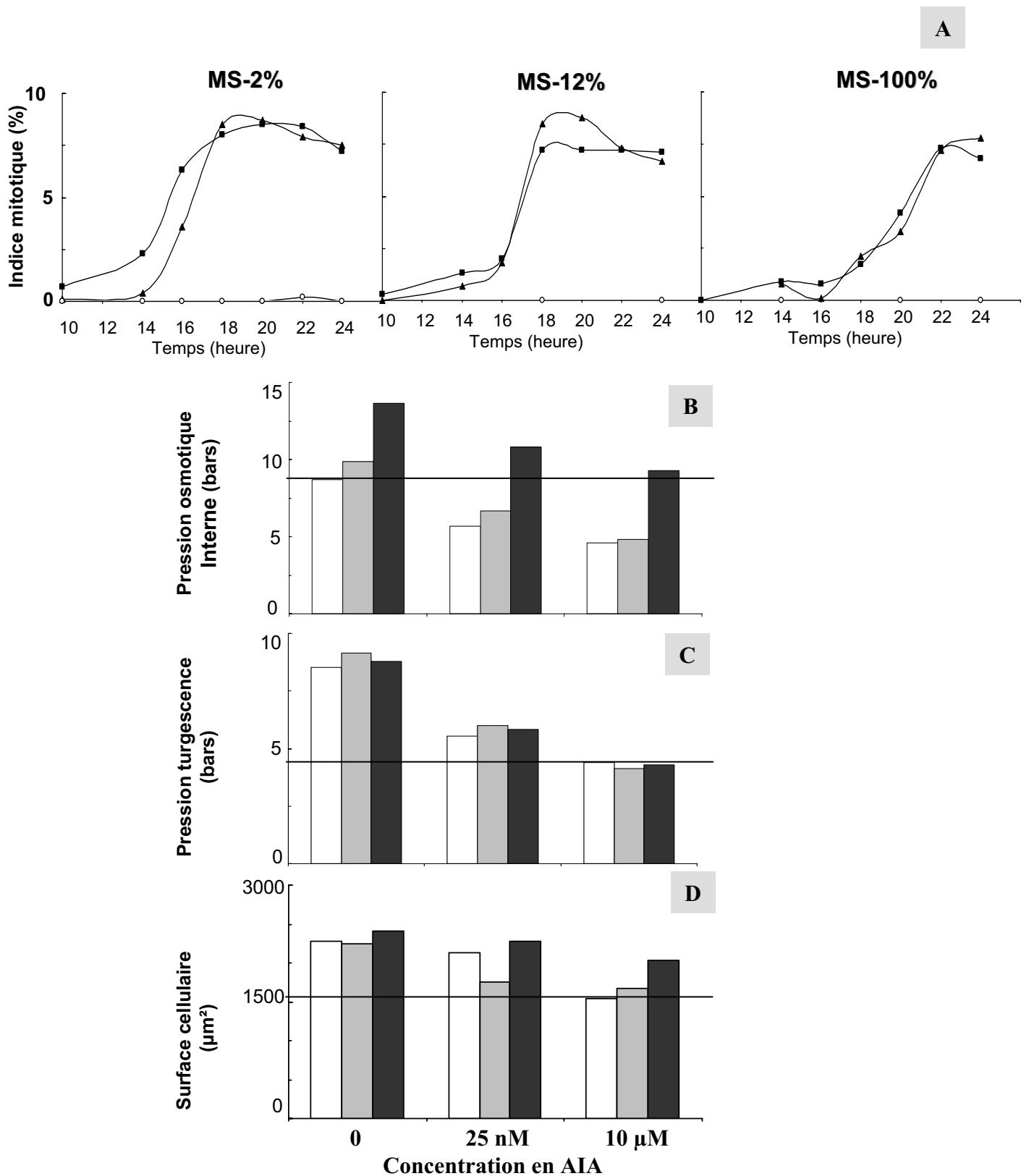


Figure 42. Influence de la dilution du milieu extracellulaire et de la teneur en auxine sur les réponses cellulaires après 24 h de traitement.

A- Évolution de l'indice mitotique dans les trois milieux de cultures sans auxine (cercles blancs) ou

avec 25 nM d'AIA (carrés noirs) ou 10 μM d'AIA (triangles noirs).

Évolution de la pression osmotique intracellulaire (**B-**), de la turgescence (**C-**) et de la taille cellulaire (**D-**), dans le milieu MS-2% (blanc), MS-12% (gris) ou MS-100% (histogramme noir) en fonction de la concentration en auxine (0-25 nM ou 10 μM).

des différents composés, **figure 40bis**, on constate une augmentation relative, d'un facteur 4, du citrate et du malate en absence d'auxine. Parmi les acides aminés, il y a trois fois plus de valine, et de leucine et six fois plus de glutamine dans les cellules carencées. Par contre l'alanine, l'asparagine, l'acide aspartique, la thréonine, l'isoleucine et le glutamate ne semblent pas varier entre les deux conditions. Afin de compléter ce profil métabolique, nous avons réalisé des analyses minérales sur ces mêmes échantillons (**Figure 41**).

Il s'est avéré que la concentration en nitrates était 3,6 fois plus grande en situation de carence auxinique. Les phosphates et le potassium sont également plus abondants dans ces cellules avec une différence respective de 40 et 20% ; le magnésium aussi avec un rapport de l'ordre de 2,5. La concentration des autres ions analysés tels que les chlorures, les sulfates et le calcium, ne change pas entre les deux échantillons.

Cette première expérience met en évidence que l'auxine induit des changements multiples sur le comportement physiologique des cellules BY-2 (division cellulaire, variation de la turgescence et de la taille cellulaire) qui affectent la teneur d'un certain nombre d'espèces organiques et minérales, tels que des acides aminés, des acides organiques ou des ions minéraux.

3.2. Influence de la dilution du milieu extracellulaire et de la teneur en auxine sur les réponses cellulaires

Nous avons mis en évidence lors de l'expérience précédente que les ions nitrates, magnésium et potassium intervenaient dans les variations de pression osmotique interne entre des cellules BY-2 carencées ou non en auxine. Or ces minéraux sont absorbés par les cellules BY-2 à partir du milieu de culture. Afin d'étudier l'impact de la présence ou non de ces ions dans le milieu, sur la régulation du potentiel de turgescence des cellules BY-2, nous avons cultivé les cellules en présence de trois concentrations en auxine (0 M; 25 nM ou 10 μ M d'AIA) ainsi que dans trois milieux de culture différents : l'eau pure déionisée, du milieu de culture dilué au dixième ou le milieu de culture habituel. Dans ces expériences, les cellules sont lavées pendant 1 h dans du milieu de culture neuf dépourvu d'auxine. Etant donné que le repiquage est effectué à partir de 2,5 mL de cellules resuspendues dans le milieu de culture habituelle (on considère qu'il y a 0,5 mL de cellules et 2 mL de milieu), la teneur en nutriments dans les milieux "eau distillée" et "milieu MS dilué au dixième" est légèrement plus grande. Le milieu "eau distillée" correspond donc au milieu appelé "MS-2%", le milieu dilué, au milieu "MS-12%" et le milieu habituel au milieu "MS-100%".

3.2.1. Description des réponses physiologiques

La figure 42 relate une des expériences répliquées. Il est intéressant de noter que dans les trois milieux, les concentrations de 25 nM et 10 μ M d'AIA induisent des divisions cellulaires.

La culture dans le milieu MS-12% a pour effet d'avancer l'entrée en mitoses, et cet effet est proportionnel à la dilution du milieu. En effet en comparant les courbes des indices mitotiques (**Figure 42A**) nous nous apercevons d'une manière générale, sans prendre en compte l'effet dose de l'auxine, que dans le milieu MS 100% les cellules se divisent majoritairement entre 21 h 30 et 24 h après l'ajout d'AIA. Tandis que dans

le milieu MS-12%, l'entrée en division cellulaire est avancée entre 18 h et 22 h. La plus grande différence est observée dans le milieu MS-2% où l'entrée en division de 10% des cellules (la majorité) est avancée entre 17 h 30 et 20 h après le repiquage. Plus précisément, dans le milieu MS-100%, 2% des cellules commencent à se diviser vers 18 h, mais dans le milieu MS-2% ce seuil est atteint après 14 h de traitement.

La **figure 42B** indique l'évolution de la pression osmotique interne en 24 h, en fonction de la dose d'auxine et du milieu de repiquage, sachant que la pression osmotique externe est de 0,15 bar pour le milieu MS-2%, 0,65 bar pour le milieu MS-12% et 5 bar pour le milieu MS-100%.

Pour une concentration d'auxine fixée, la pression osmotique interne est de plus en plus forte au fur et à mesure que le milieu est plus riche. Au moment du repiquage, la pression osmotique interne était d'environ 8 bar et en 24 h, en carence d'auxine par exemple, elle a augmenté de 3,5% dans le milieu MS-2%, de 18% dans le MS-12% et de 63% dans le MS-100%. Par contre pour un milieu donné, l'auxine favorise la diminution de cette pression. De sorte que l'ajout de 25 nM d'auxine a pour résultat de faire baisser la pression interne de 30% dans le milieu MS 2% et de 20% dans le milieu MS-12%. Le traitement par une plus forte concentration d'auxine (10 μ M) a entraîné une diminution de 40% de cette pression dans ces deux mêmes milieux. Dans le milieu MS-100%, 25 nM d'AIA a fait augmenter de 30% la pression alors que le traitement des cellules avec 10 μ M d'AIA ne l'a fait augmenter que de 10%. La diminution de la pression osmotique intracellulaire en fonction d'une concentration d'auxine croissante est présentée ici après 24 h de traitement mais elle a été déterminée dès 12 h après l'ajout d'auxine, il s'agit donc d'une réponse rapide des cellules BY-2 face à l'auxine.

Sachant que la pression osmotique externe est de 0,15 bar pour le milieu MS-2%, 0,65 bar pour le milieu MS-12% et 5 bar pour le milieu MS-100%, nous avons pu calculer le potentiel de turgescence des cellules (**Figure 42C**). Nous observons alors que cette pression varie peu ou pas en fonction des milieux de culture. Par contre elle est régulée en fonction de la concentration en auxine, de telle sorte qu'en 24 h, la turgescence des cellules a augmenté en moyenne de 100%, de 25 à 30% ou pas du tout en fonction de la dose d'AIA (0 nM, 25 nM ou 10 μ M). Le plus intéressant est de voir que ces variations de turgescence sont identiques quel que soit le milieu de culture. Ainsi le bilan osmotique des cellules cultivées dans l'eau est toujours bien plus faible que celui des cellules cultivées dans le milieu MS-100%. Dans les deux milieux, on observe toujours un net effet de la concentration d'auxine sur le potentiel osmotique cellulaire.

L'auxine a un effet similaire sur la taille cellulaire. La mesure de la surface cellulaire présentée **figure 42D** montre par exemple que les cellules ont grandi de 40% en moyenne en carence d'auxine alors que le traitement avec 25 nM d'AIA entraîne un grandissement de l'ordre de 10 à 30% ou seulement de 2 à 8% avec 10 μ M d'AIA.

Ainsi l'initiation de la division cellulaire par l'AIA s'accompagne d'une faible turgescence et d'une faible surface cellulaire. Alors que pour de faibles concentrations d'auxine on constate un grandissement cellulaire et une forte turgescence.

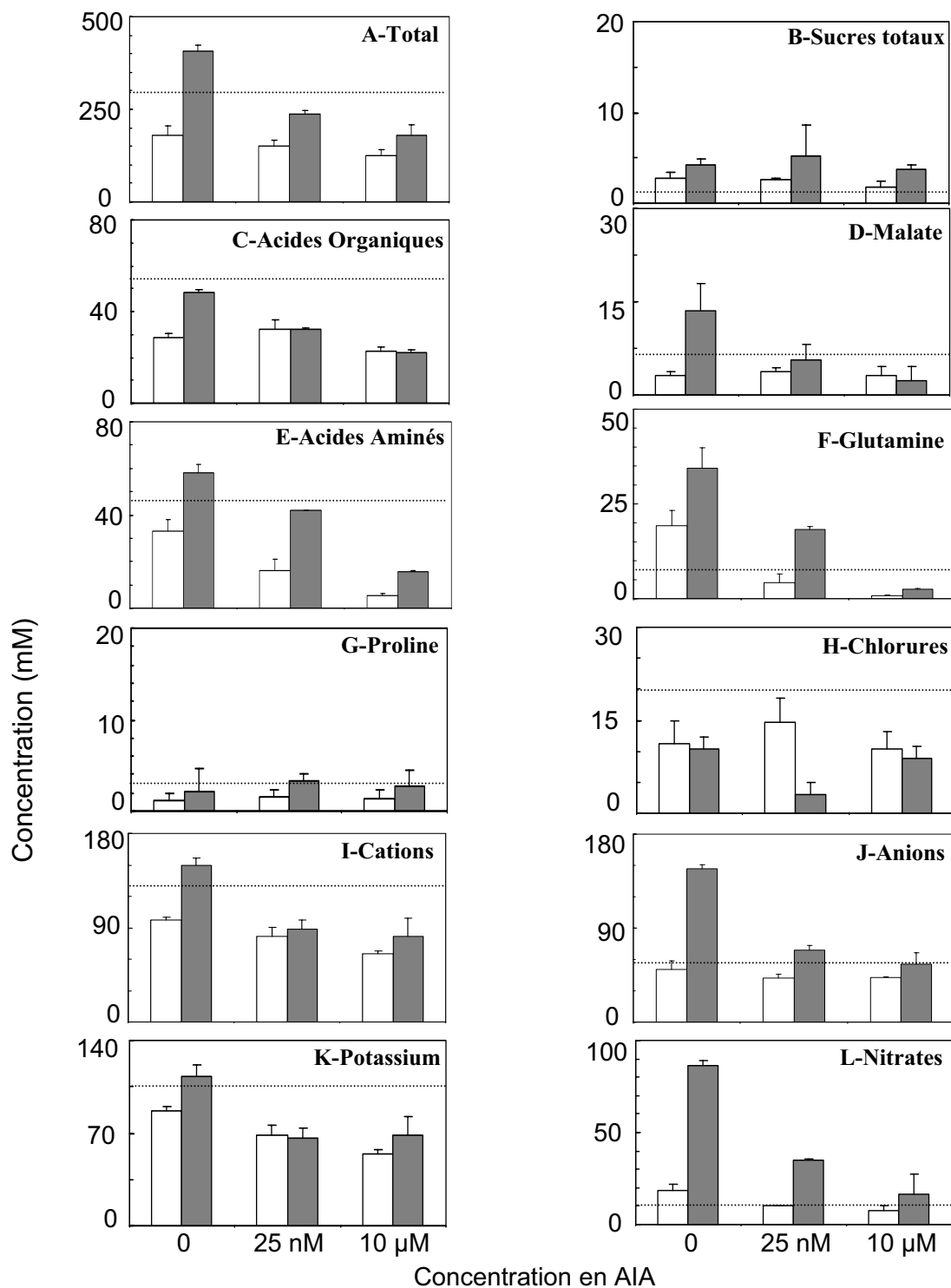


Figure 43. Contenu en solutés des cellules BY-2 en fonction de la concentration en auxine et de la dilution du milieu extracellulaire

Les cellules ont été cultivées dans deux milieux de cultures différents : le milieu MS-2% (blanc) ou le milieu MS-100% (gris) en présence ou pas d'auxine (0; 25 nM ou 10 μM).

La ligne en pointillés correspond à la concentration du composé au moment du repiquage, après le lavage d'1 h dans du milieu MS-100% et avant tout traitement auxinique (T=0)

Le **total** correspond à la somme des concentrations des sucres, des acides organiques, des acides aminés et des ions minéraux. Les **sucres** correspondent à la somme des concentrations du saccharose, glucose et fructose

Les **acide organiques** sont la somme des teneurs en malate, quinate, citrate oxalate et acétate

les **acides aminés** sont la somme des concentrations en SER, PHE, TYR, GLY, CYS, ALA, VAL, LEU, GLU, GLN, HIS, ARG, PRO, ASP, ASN, THRE, MET, ILEU, LYS.

Les **cations** sont la somme des magnésium, potasssium et calcium. Les **anions** sont la somme des concentrations en nitrates, chlorures et sulfates.

Les barres d'erreur correspondent à l'écartype réalisé sur deux expériences indépendantes.

3.2.2. Effet sur les teneurs en composés organiques et inorganiques

Nous avons analysé par HPLC la composition en sucres et en acides aminés et organiques des cellules BY-2 traitées avec les trois concentrations d'AIA précédentes et cultivées dans le milieu MS-2% ou le milieu MS-100%. Ces résultats confirment les analyses RMN. Le résumé des mesures est présenté **figure 43** et les détails sont en annexe 1.

Le milieu intracellulaire est globalement moins concentré après 24 h de culture (**Figure 43A**) qu'au moment du repiquage, excepté pour les cellules qui ont été carencées en auxine dans le milieu MS-100%. Par rapport au moment du repiquage, le contenu des cellules cultivées dans le milieu MS-2% a diminué de 35%, 45% et 55% suivant la concentration d'auxine ajoutée dans le milieu (0 nM, 25 nM et 10 μ M respectivement). Dans le milieu MS-100%, les cellules carencées ont accumulé 44% de solutés, alors que l'ajout d'auxine a entraîné une perte de 15% (avec 25 nM d'AIA) à 45% (avec 10 μ M d'AIA) du contenu cellulaire. Ainsi les cellules carencées en auxine et cultivées dans le milieu MS-100% ont accumulé des osmolites afin de réguler leur turgescence. Dans tous les autres cas les cellules ont plutôt eu tendance à diminuer la quantité de leurs solutés organiques et inorganiques.

Globalement la somme de la teneur des solutés mesurés a diminué en 24 h de culture (**Figure 43A**), mais il y a une grande disparité suivant les espèces. Le bilan par famille de composés permet d'identifier ceux responsables des variations de pression osmotique intracellulaire à l'origine de la régulation de la turgescence par l'auxine.

Comme il a déjà été montré ci-dessus le contenu en sucres totaux (**Figure 43B**) (somme du dosage du fructose, du glucose et du saccharose) ne varie pas entre les différentes conditions auxiniques. Les sucres n'interviennent donc pas dans la régulation de la turgescence, d'autant que l'impossibilité pour les cellules cultivées dans l'eau de prélever des sucres ne perturbe pas la régulation de leur turgescence en fonction de la dose d'auxine.

La somme des **acides organiques** (**Figure 43C**) (malate, quinate, oxalate, acétate et citrate) varie davantage en fonction de la présence d'AIA qu'en fonction de la nature du milieu. En effet dans les deux milieux, en présence de 25 nM d'AIA, les acides organiques ont diminué de 39% et avec 10 μ M ils ont diminué de 58%. En carence d'auxine, les cellules BY-2 ont perdu 47% d'acides organiques dans le milieu MS-2% mais seulement 10% dans le milieu MS-100%. Parmi les acides organiques les variations de la teneur en malate sont majoritairement responsables des différences observées pour cette famille métabolique (**Figures 43C et D**). La teneur en malate augmente notamment de 93% dans les cellules carencées en auxine dans le milieu MS-100%.

La somme des **acides aminés** (**Figure 43E**) varie à la fois en fonction du milieu et de l'auxine. L'auxine agit fortement sur le contenu en acides aminés dans les deux milieux. Mises à part les cellules carencées en auxine dans le milieu MS, où elles ont accumulé 35% d'acides aminés, globalement elles ont perdu entre 2 et 90% de leur teneur en acides aminés du départ. Et pour une même concentration en AIA, la quantité d'acides aminés est supérieure de 76 à 180% pour les cellules dans le milieu MS-100% par rapport à celles dans le milieu MS-2%. La diminution de la teneur des acides aminés est d'autant plus grande que la concentration d'auxine ajoutée dans le milieu est importante. Ainsi par rapport au moment du repiquage, dans le milieu MS-2%, les cellules carencées en auxine n'ont perdu que 33% d'acides aminés,

mais avec l'ajout de 25 nM et de 10 μ M d'AIA, elles en ont perdu respectivement 60 et 90%. Les changements observés sous l'action de l'auxine sont donc proportionnels à sa concentration. Parmi les acides aminés, les concentrations en glutamine et en proline sont représentées **figures 43 F et 43G** et les autres sont en annexe 1. La proline est décrite dans la littérature comme un soluté souvent régulé lors d'un stress osmotique (Brugiere et al., 1999; Verslues and Bray, 2006). Cependant dans nos expériences la concentration de proline ne varie pas de façon significative, ni en fonction du milieu, ni en fonction de la concentration en auxine (**Figure 43G**). La glutamine, au contraire apparaît comme un "acteur" essentiel dans les changements intracellulaires de la pression osmotique (**Figure 43F**). En effet, le contenu en glutamine est 10 à 20 fois (dans le milieu MS-2% et dans le milieu MS-100%) plus concentré dans les cellules carencées en auxine que dans les cellules traitées avec 10 μ M d'AIA. L'accumulation de glutamine, comme les acides aminés, diminue en fonction de la dose d'auxine. Ainsi dans le milieu MS-100%, les cellules n'accumulent plus que 260% de Gln, 24 h après l'ajout de 25 nM d'AIA (contre 580% sans auxine) et en perde 50% lors d'un traitement avec 10 μ M d'auxine. Cette réponse de la régulation de la teneur en glutamine en fonction de la dose d'auxine est retrouvée dans le milieu MS-2%. Dans ce milieu les cellules accumulent 80% (soit 4 mM) de glutamine quand elles sont carencées en auxine mais en perdent 70 et 90% après 24 h en présence de 25 nM et de 10 μ M.

L'analyse de la teneur des ions minéraux (**Figure 43 I et J**) a révélé que leur concentration était également régulée par la dose d'auxine exogène.

Les cellules cultivées dans le milieu MS-2% ont perdu 20 à 50% de leur teneur en **cations minéraux (Figure 43I)** en 24 h et cette diminution est proportionnelle à la dose d'auxine. Dans le milieu MS-100% les cellules carencées en auxine ont accumulé 20% de cations. Le traitement à l'auxine des cellules a eu pour résultat de sécréter dans le milieu 30 à 35% des cations contenus dans les cellules au moment du repiquage.

Ceci se vérifie également dans la régulation de la teneur en potassium intracellulaire (**Figure 43K**), qui peut se résumer par une perte de l'ordre de 30 à 50% en fonction de la dose d'auxine ajoutée aux cellules cultivées dans le milieu MS-2%. Dans le milieu MS-100%, les cellules carencées accumulent 70% de potassium en 24 h, tandis que l'ajout d'auxine n'entraîne aucune variation de la teneur en potassium dans ces cellules.

Globalement les cellules cultivées dans le milieu MS2% ont perdu de l'ordre de 10 à 30% d'**anions minéraux (Figure 43J)**, tandis que dans le milieu MS-100% la régulation dépend davantage de la dose d'auxine. Dans ce dernier, les cellules ont accumulé en 24 h de carence auxinique, 153% d'anions et cette accumulation diminue en fonction de la concentration en AIA. De sorte que l'ajout de 25 nM d'AIA n'entraîne l'accumulation que de 20% d'anions, et que 10 μ M engendre une perte de l'ordre de 5%.

Ces variations sont confirmées par le dosage des nitrates (**Figure 43L**) qui sont 8 fois plus concentrés dans les cellules carencées en auxine dans le milieu MS-100%, et dont l'accumulation diminue avec la dose d'auxine (3 fois plus concentrés après 25 nM d'AIA et 1,5 fois plus concentrés avec 10 μ M). Après 24 h de cultures, les nitrates sont 2 fois plus concentrés dans les cellules carencées par rapport au moment du repiquage. La teneur en nitrate n'a par contre pas changé suite au traitement avec de l'auxine (voir une perte de 30% avec 10 μ M d'AIA). Les résultats des dosages des autres anions indiqués en

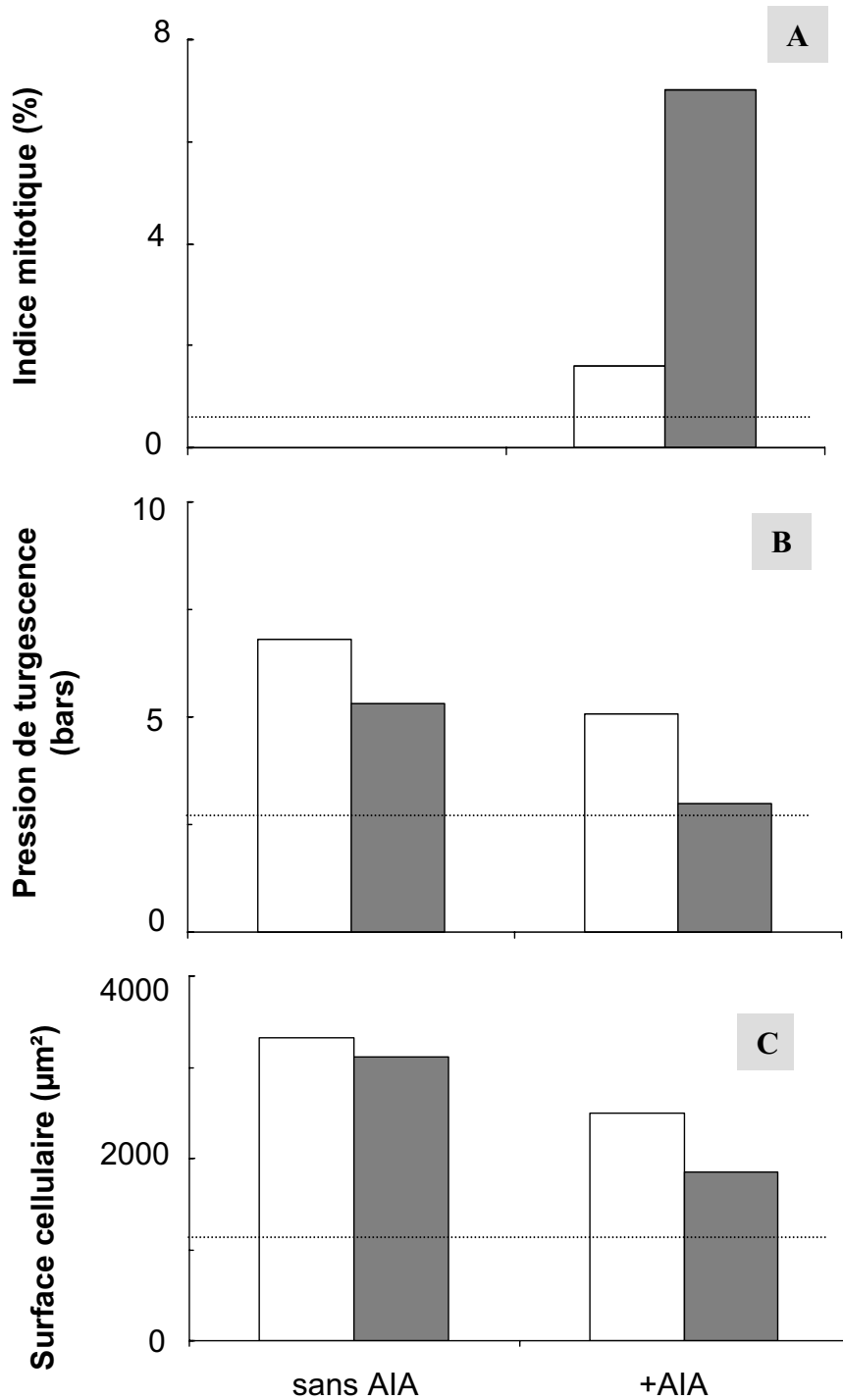


Figure 44. Influence d'une carence en nitrate sur les réponses cellulaires.

Après un lavage d'1 heure les cellules ont été cultivées pendant 24 h en présence ou pas d'auxine (0 ou 10 µM), dans deux milieux de cultures différents : le milieu MS (gris) et le milieu MS sans nitrates (blanc) qui a été remplacé par $24 \cdot 10^{-3}$ M de KCL et $1,4 \cdot 10^{-3}$ M de Na_2SO_4 .

Le trait noir correspond au statut cellulaire au moment T=0.

annexe 1 montrent qu'ils n'interviennent pas significativement dans la régulation de la teneur des anions minéraux. Ainsi les cellules cultivées dans le milieu MS ont plutôt accumulé des anions et cette accumulation diminue en fonction de la dose d'auxine alors que les cellules cultivées dans le milieu MS-2% ont perdu des cations et cette perte s'accroît en fonction de la dose d'auxine, ajouté dans le milieu.

Ces analyses quantitatives de la concentration intracellulaire des composés organiques et inorganiques mettent en évidence que l'auxine ajoutée au milieu de culture diminue l'accumulation de glutamine, de nitrates ainsi que du potassium et accentue la diminution des acides organiques, en particulier le malate.

3.3. Influence d'une carence en nitrate sur les réponses cellulaires

Les expériences précédentes ont montré qu'en absence d'auxine les cellules accumulaient beaucoup de nitrates et de glutamine et que la teneur intracellulaire de ces deux molécules contribuait notablement à la régulation du potentiel de turgescence. Les nitrates sont importés du milieu extérieur, tandis que l'accumulation de glutamine peut avoir des origines diverses. Elle peut provenir, soit de la dégradation des protéines, occasionnée par le stress de la carence auxinique, l'absorption de beaucoup de nitrates par la cellule, active la voie de la GS/ GOGAT dont l'un des produits est la glutamine. Afin d'avoir une idée sur la source de glutamine et sur la participation réelle des nitrates à la régulation de la turgescence, nous avons repiqué les cellules dans un milieu MS dépourvu d'azote (MSN0). Ainsi nous pouvons observer le comportement des cellules de tabac face à une carence en nitrates, l'un de leur principal osmolyte. Pour limiter un effet osmotique du milieu externe, nous avons remplacé le KNO_3 et le NH_4NO_3 du milieu MS par du KCl et du Na_2SO_4 . La composition exacte est détaillée dans le "matériels et méthodes". Avant tout traitement auxinique, les cellules ont été lavées pendant 1 h dans le milieu sans azote (MSN0), et non pas dans du milieu MS comme dans les expériences précédentes, afin d'éviter l'accumulation de nitrates pendant le lavage.

3.3.1. Description des réponses physiologiques

La **figure 44** relate le comportement physiologique des cellules BY-2 après avoir été cultivées pendant 24 h avec ou sans $10 \mu\text{M}$ d'AIA, et dans deux milieux différents : MS habituel ou MS sans azote (MSN0).

Dans le milieu MS, l'auxine induit l'entrée en division cellulaire avec un indice mitotique de 7% après 24 h de culture (**Figure 44A**) et son action sur la diminution du potentiel de turgescence et sur la taille cellulaire est confirmée. La **figure 44B** montre que la turgescence des cellules carencées en auxine est passée de 3,5 bar à 7 bar en 24 h (augmentation de 100%), contrairement à celle des cellules repiquées avec de l'AIA, qui n'est passée que de 3,5 à 4,4 bar (augmentation de 25%). De telles variations sont observées pour la taille cellulaire (**Figure 44C**) qui, en conditions de carence auxinique, passe de 1627 à $3118 \mu\text{m}^2$ (augmentation de 92%). Alors que la surface cellulaire passe seulement de 1600 à $1800 \mu\text{m}^2$ (augmentation de 13%) en 24 h de traitement auxinique.

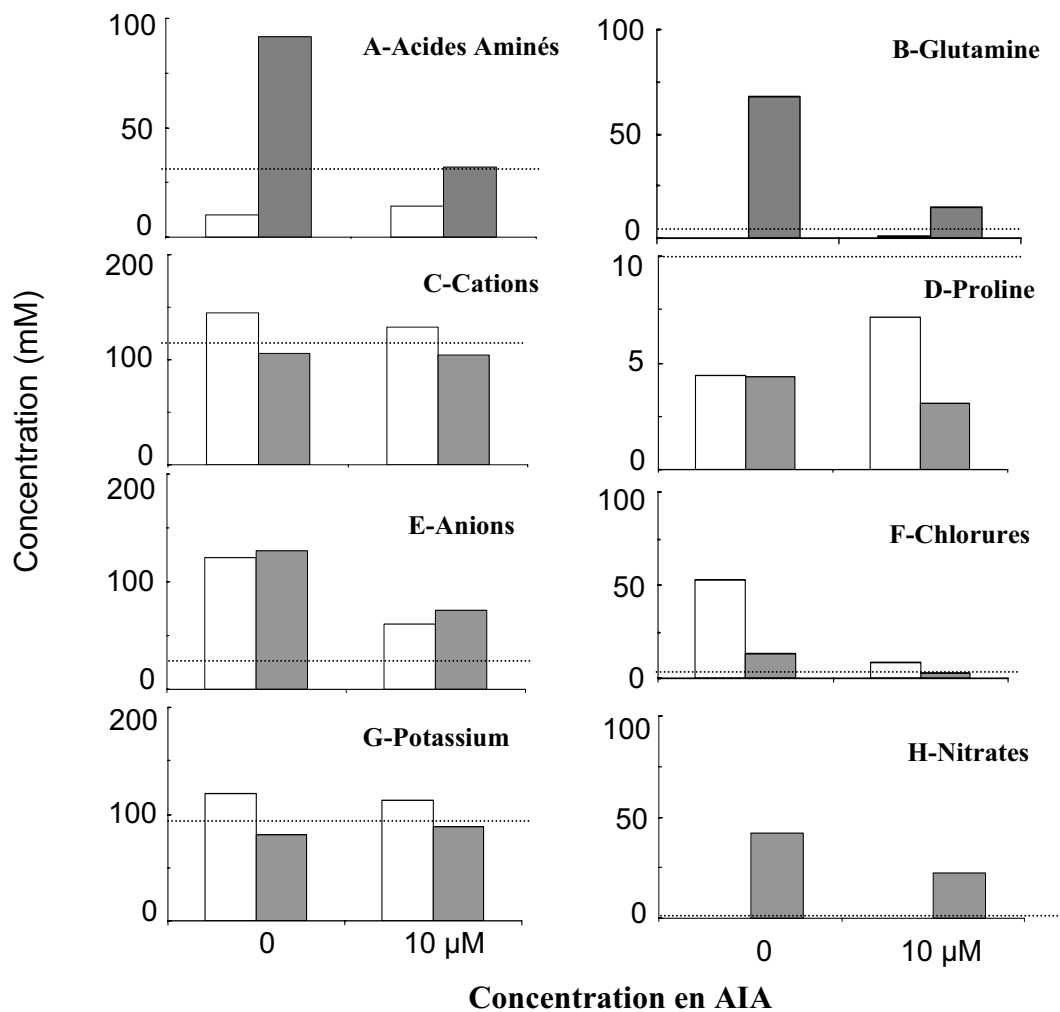


Figure 45. Contenu en solutés des cellules BY-2 en fonction de la concentration en auxine dans un milieu de culture carencé en azote.

Après un lavage d'une heure les cellules ont été cultivées en présence ou pas d'auxine (0 ou 10 μM), dans deux milieux de cultures différents : le milieu MS (gris) et le milieu MS sans azote (blanc) qui a été remplacé par 24 mM de KCL et 1,4 mM de Na₂SO₄

La ligne en pointillé correspond à la concentration du composé au moment du repiquage, après le lavage.

Dans le milieu MS dépourvu d'azote (MSN0), l'auxine induit également la division cellulaire mais pour un faible pourcentage de cellules (1,6%) (**Figure 44A**).

Sur la **figure 44B** nous remarquons que la turgescence des cellules cultivées dans ce milieu est plus forte que pour celles dans le milieu MS, quelle que soit la dose d'auxine. En 24 h la turgescence des cellules BY-2 carencées en auxine a augmenté de 140% et de 84% en présence d'auxine. La pression osmotique du milieu MSN0 étant légèrement plus faible que le milieu MS (4 bar au lieu de 5 bar), la différence de turgescence (plus grande dans le milieu MSN0 que dans le milieu MS), résulte donc d'une plus forte pression osmotique interne, et n'est pas due à un effet osmotique du milieu.

On observe que les variations de la taille cellulaire (**Figure 44C**) vont dans le même sens que celles de la turgescence, notamment pour les cellules traitées avec de l'auxine. En carence d'auxine la surface cellulaire a augmenté de 100% en 24 h, comme pour les cellules repiquées dans le milieu MS (92%). Par contre la taille de celles traitées avec de l'auxine a augmenté de 50% dans le milieu MSN0, alors que dans le milieu MS elle n'avait augmenté que de 13%.

Ainsi ces résultats indiquent que les cellules BY-2 peuvent acquérir un fort potentiel de turgescence en carence d'auxine même dans un milieu sans azote minéral. Nous avons donc analysé leur contenu, afin de savoir comment elles pouvaient réguler leur turgescence en absence de source de nitrates.

3.3.2. Effet sur les teneurs en composés organiques et inorganiques

La composition des cellules BY-2 en composés organiques et inorganiques est indiquée **figure 45**, selon la présence ou non d'auxine ou d'azote dans le milieu de culture. Nous constatons que dans le milieu **MSN0**, la teneur en acides aminés a diminué de 60 à 70%, respectivement pour les cellules traitées ou pas avec de l'auxine. Dans le milieu **MS**, la teneur en acides aminés des cellules non carencées n'a pas variée en 24 h de traitement, par contre la carence en auxinique a entraîné une accumulation d'acides aminés de l'ordre de 160% (**figure 45A**).

Si l'on regarde le dosage de la **glutamine** on s'aperçoit que sa concentration intracellulaire est nulle dans les conditions de carence en azote. Au contraire, dans le milieu MS, cet acide aminé s'est accumulé dans la cellule, et sa teneur est plus de 5 fois inférieure dans les cellules cultivées en présence d'auxine que sans (**figure 45 B**).

Les **ions minéraux** ont aussi été dosés dans ces cellules. Dans les cellules qui ont poussé dans le milieu MS, la concentration en **cations minéraux** n'a pas beaucoup varié en 24 h de traitement, que ce soit avec ou sans AIA (**figure 45 C**). Or ils ont eu tendance à s'accumuler dans les cellules (avec ou sans AIA) qui ont poussé dans le milieu MSN0 de l'ordre de 35% par rapport aux cellules dans le milieu MS. Cette différence est due à une entrée accrue de potassium dans les cellules cultivées dans le milieu MSN0, ce qui équivaut à une différence de 20 mM de potassium entre les cellules du milieu MSN0 et celles du milieu MS.

La teneur en **anions minéraux** (**Figure 45E**) est 2 fois plus importante dans les cellules carencées en auxine que celles traitées pendant 24 h avec 10 μM d'AIA : les cellules carencées passent en moyenne

Etiquette C1M41-13 : NtGln1-5

A.

>C1M41-13

GTCTTTTGAGGATTCAATGAGTATTACTCAGGACTCATCAAAAGACGACTACACACTCAAGGCTCGTTATAGGATAGTGG
TCTCAGCAATTCATGGAAGTCACGACGTATGGATCACTACGCAGTC

>C1M41-13 complémentaire (C1M41cpl)

GATCCATACGTCGTGACTTCCATGATTGCTGAGACCACTATCCTATACGAGCCTTGAGTGTGTAGTCGTCTTTTGA

B.

DB ID	Source	Length	Score	Identity%	Positives%	E0
EM_PL_NTGLN15GN	N. tabacum mRNA for glutamine synthetase , gln1-5	1381	68	97		3e-29

C.

Nt-Gln1-5 CGAGGATAGGAGGCCTGCTTCGAATATGGATCCATTCGTCGTGACTTCCATGATTGCTGAGACCACTATCCTATCCGAG *1118 pb*
C1M41cpl -----GATCCATACGTCGTGACTTCCATGATTGCTGAGACCACTATCCTATACGAG *51 pb*

Nt-Gln1-5 CCTTGAGTGTGTAGTCGTCTTTTGAGGATTCAATGAGTATTAATTCCTGGGTGTAATATTTGGAGAAAGAATTGAATTT *1197 pb*
C1M41cpl **CCTTGAGTGTGTAGTCGTCTTTTGA**----- *76 pb*

Figure 46. Identification de l'étiquette C4M41-13

- A.** Séquence de l'étiquette C1M41-13 issue des expériences de cDNA-AFLP. La partie soulignée correspond aux amorces lors de l'analyse de l'expression de cette étiquette (voir partie 2 des résultats). C1M41cpl correspond à la séquence inverse et complémentaire de C1M41-13.
- B.** Résultats de la recherche d'homologies nucléotidiques de la séquence de C1M41-13, grâce au programme Blastn d'EBI.
- C.** Alignement de la séquence de l'étiquette C1M41cpl avec la partie correspondante de la séquence de Nt-Gln1-5

de 25 mM à 125 mM en 24 h, alors que les cellules traitées avec de l'AIA passent de 25 mM à 65 mM. L'auxine entraîne ainsi une diminution de la concentration en anions.

Dans les cellules qui ont poussé dans le milieu MS ou MSN0, la teneur totale en anions minéraux est équivalente, ceci s'explique par une compensation de l'absence de nitrates par l'accumulation de chlorures dans les cellules du milieu MSN0.

Lorsque l'on dose la concentration en **chlorures (Figure 45F)** on s'aperçoit d'ailleurs que les cellules carencées en auxine dans le milieu MSN0 ont accumulé 4 fois plus d'ions chlorures que celles qui ont poussé dans le milieu MS (correspond à une différence de 40 mM) ; et par rapport aux cellules non carencées dans le milieu MSN0, elles en ont 6 fois plus. La concentration intracellulaire en chlorures est donc fonction de la concentration en auxine.

Le dosage des **nitrates (Figure 45H)** révèle que ces anions s'accumulent davantage dans les cellules repiquées dans le milieu MS et carencées en auxine. En 24 h la concentration en nitrates intracellulaires est passée de 0,5 mM à 40 mM en condition de carence et 0,5 mM à 20 mM avec 10 μ M d'AIA : la concentration est donc 2 fois plus importante dans les cellules carencées que dans celles qui ne l'ont pas été.

En résumé la carence en auxine entraîne une augmentation de la taille cellulaire et du potentiel de turgescence. Cette dernière est due notamment à une accumulation de glutamine et de nitrates dans les cellules cultivées dans du milieu MS habituel. Lorsque les cellules BY-2 sont repiquées dans du milieu MS où les nitrates ont été remplacés par des ions chlorures et du Na_2SO_4 , elles régulent de la même manière leur turgescence en utilisant notamment les chlorures disponibles dans le milieu. L'ensemble de ces résultats indique que la cellule végétale régule sa turgescence sous l'action de l'auxine et que cette régulation se réalise, d'une façon ou d'une autre, quelles que soit les conditions environnementales.

D'autre part la suppression de toute source de nitrates, met en évidence que l'accumulation de la glutamine n'était pas liée à la dégradation protéique mais à l'entrée de nitrates à partir du milieu de culture, qui lors de leur réduction en NH_4^+ , activent la synthèse de glutamine.

3.3.3. Régulation de l'expression d'une Glutamine Synthétase cytosolique et d'un transporteur de nitrates de type NRT2

Après avoir caractérisé les cellules BY-2 d'un point de vue physiologique et biochimique, nous avons entrepris une étude globale du profil transcriptionnel de la réponse à l'auxine en utilisant la technique de cDNA-AFLP (cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism). Le but étant de caractériser et d'identifier des gènes de réponses à l'auxine. Les détails de cette étude sont décrits dans la deuxième partie des résultats. A peu près 500 étiquettes de gènes différentiellement exprimées au cours du temps (entre 30 min et jusqu'à 12 h de culture) et en fonction de la concentration en auxine (de 0 M à 100 μ M d'AIA) ont été isolées et séquencées. Parmi elles, deux étiquettes montraient un profil d'expression qui diminuait en fonction de la concentration en auxine. Ces deux étiquettes étaient nommées C1M41-13 et T4M32-2. Comme le montre l'alignement des séquences nucléotidiques (**Figures 46 et 47**), la séquence obtenue de C1M41-13, d'une longueur de 76 bp, correspond à l'ARNm d'une glutamine synthétase

Etiquette T4M32-2 : Nitrate transporteur Nt-NRT2

A.

>T4M32-2

CTGTGTTTGGCTTGGCAAAGCAGAAACCCTTCCCACAGCCATTGTGGCCATGATCTTGTCTCCGTTGGAGCTCAAG
CTGCATGTGGTCTACCTATGGTGTCAATCCCTTTCGTGTCGCGAAGATCATTAGGC

B.

DBID	Source	Length	Score	Identif%	Positives%	E0
EM_PLAJ719359	Nicotiana tabacum cDNA-AFLP-fragment DSTT43-3-200, cultivar Bright Yellow 2	143	99	99		8e-48
EM_PLAJ718285	Nicotiana tabacum cDNA-AFLP-fragment DSTT4-02-200, cultivar Bright Yellow 2	133	99	99		8e-48
EM_PAT:Q9809263	Sequence 566 from Patent WO2003097790.	135	79	94		7e-36
EM_PLAF047718	Glycine max putative high affinity nitrate transporter (NRT2) mRNA, complete cds.	1890	32	93		8e-08
EM_PLNTA557583	Nicotiana tabacum mRNA for high affinity nitrate transporter protein (nrt2.1 gene)	1611	26	90		3e-04

N° d'accension

GENbank:

C.

CAC35729	LjNRT2	CIWLGRANSLPIAVLAMILFSVGAQAACGATFGIIPFISKRSLG
AAC09320	GmNRT2	CIWLGRANSLPIAVLAMILFSIGAQAACGATFGIIPFISRRSLG
BAD22822	NpNRT2.2	CIWLGRANSLPIAVFAMILFSVGAQAACGATFGVIIPFISRRSLG
BAB10099	AtNRT2.3	CIWLGRASSLPPIAILAMMLFSIGTQAACGALFGVAPFVSRRSLG
CAA69387	NpNRT2.1	CVLLGRSNSLPPIAVTFMILFSVGAQAACGATFGIIPFISRRSLG
CAD89798	NtNRT2.1	CVLLGRSNPLPIAVTFMILFSIGAQAACGATFGIIPFISRRSLG
CAD89799	NtNRT2.2	CFLLGKANTLPMIAWMIIFSLGAQAACGATFGIIPFISRRSLG
NP172288	AtNRT2.1	CVWLGRANTLVTAVVAMVLFMSGAQAACGATFAIVPFVSRRALG
NP172289	AtNRT2.2	CVWLGRANTLVTAVVSMVLFSLGAQAACGATFAIVPFVSRRALG
NP200885	AtNRT2.4	CLWLGRATTLPTAVVFMILFSLGAQAACGATFAIIPFISRRSLG
	T4M32-2	CVWLGAETLPTAIVAMILFSVGAQAACGATYGVIPFVSRRSLG

*. **: . * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

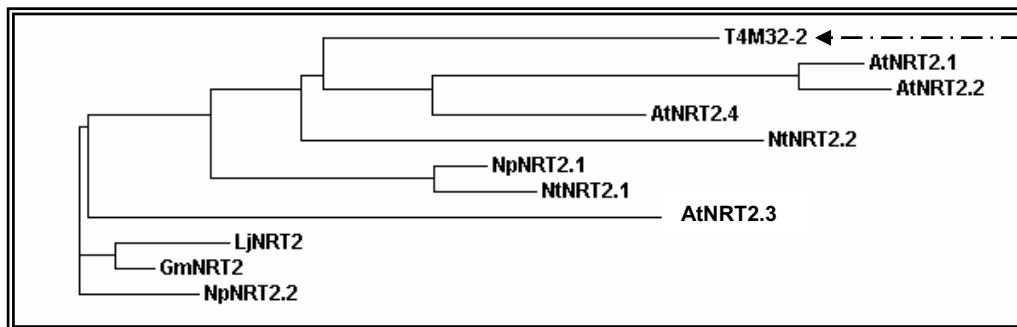


Figure 47. Identification de l'étiquette T4M32-2

A. Séquence de l'étiquette T4M32-2 issue des expériences de cDNA-AFLP. La partie soulignée correspond aux amorces lors de l'analyse de l'expression de cette étiquette (voir partie 2 des résultats).

B. Résultats de la recherche d'homologies nucléotidiques de la séquence de T4M32-2, grâce au programme Blastn d'EBI.

C. Alignement de la séquence protéique de l'étiquette T4M32-2 avec la partie correspondante de celles de NRT2 de différentes espèces végétales : **Lj**: Lotus corniculatus var. japonicus **Gm**: Glycine max **Np**: Nicotiana plumbaginifolia **Nt**: Nicotiana tabacum **At**: Arabidopsis thaliana. Cet alignement a servi de base pour réaliser l'arbre phylogénétique ci-dessus.

cytosolique déjà clonée chez le tabac (*Nicotiana tabacum*) sous le nom de "glutamine synthetase gln1-5" et faisant 1381bp (N° d'accèsion X95932). Nous avons dû prendre la séquence inverse et complémentaire de la séquence de l'étiquette de C1M41-13 (**Figure 46A**), pour l'aligner avec la séquence de NtGln1-5 (**Figure 46B**). Ceci est dû au séquençage de l'étiquette et surtout de son sens lors de la confection des cDNA-AFLPs.

La séquence obtenue de T4M32-2, d'une longueur de 133 bp, correspond à un transporteur de nitrate de haute affinité (classe HATS), de la sous-famille NRT2.

L'identification de ces étiquettes, a été réalisée par la recherche de séquences homologues, grâce aux différents programmes d'alignements de séquences : Blastn et tBlastx disponible sur le site du European Bioinformatics Institut (EBI).

Afin d'identifier plus précisément T4M32-2, un arbre phylogénétique a été réalisé à partir de l'alignement (programme clustalW) (**Figures 47B et 47C**) de la séquence de l'étiquette, avec des séquences de NRT2 provenant de différentes espèces végétales. Cette analyse montre que nous sommes en présence d'une séquence partielle, l'identification stricte d'un gène homologue, voir orthologue, reste incertain, mais apparemment nous ne sommes en présence ni de *NtNRT2.1*, ni *NtNRT2.2*, il s'agit donc d'un transporteur de nitrate de type NRT2, qui n'a pas encore été caractérisé chez le tabac (*Nicotiana tabacum*) (**Figure 47C**).

L'étude de l'accumulation des ARNm de *NtGln1-5* et *NtNRT2* a été réalisée par RT-PCR semi-quantitative. La transcription inverse a été réalisée sur les ARN totaux extraits des mêmes cellules BY-2 utilisées lors de l'étude physiologique précédente (**Figures 44 et 45**), c'est à dire des cellules BY-2 récoltées 6 h après le repiquage dans du milieu MS habituel ou dans le milieu MSN0, avec ou sans auxine. La figure 48 indique le niveau d'expression relatif des étiquettes *C1M41-13*, *T4M32-2* et *Ntiaa2.3*, qui est un gène primaire de réponse à l'auxine de la famille des AUX/IAAs. L'expression de ce gène correspond à un contrôle de l'action de l'auxine dans notre système.

Le gène *NtNRT2* a un niveau d'expression basal que l'on visualise au moment du repiquage, avant d'avoir traité les cellules avec l'auxine (T=0) (**Figure 48**). Au bout de 6 h, nous constatons qu'en absence d'auxine la quantité d'ARNm de *NtNRT2* a doublé, que ce soit dans les cellules cultivées à la fois dans le milieu MS et dans le milieu sans azote. Par contre les cellules traitées avec 10 µM d'AIA n'expriment que très faiblement ce gène. Ainsi dans le milieu MS l'expression de *NtNRT2* a diminué d'un facteur 4 et dans le milieu MSN0 d'un facteur 1,5.

En ce qui concerne l'expression du gène *NtGln1-5*, elle n'est pas détectée au moment du repiquage. Les ARNm de *NtGln1-5* s'accumulent en 6 h dans les cellules cultivées dans le milieu MS et sans auxine. La présence d'auxine diminue l'expression de ce gène presque de 100%. Il en est de même pour les cellules qui ont été repiquées dans le milieu MSN0, l'expression du gène étant très faible en carence auxinique et nulle en présence d'auxine.

Ainsi l'accumulation des ARNm d'un transporteur de nitrate de type NRT2 et de la glutamine synthétase NtGln1-5 est activée, dans notre système cellulaire, en situation de carence d'auxine et l'ajout d'auxine a pour conséquence de réguler négativement leur expression. Contrairement à l'expression de *NtNRT2*, celle de *NtGln1-5* est dépendante de la disponibilité des nitrates (à partir du milieu).

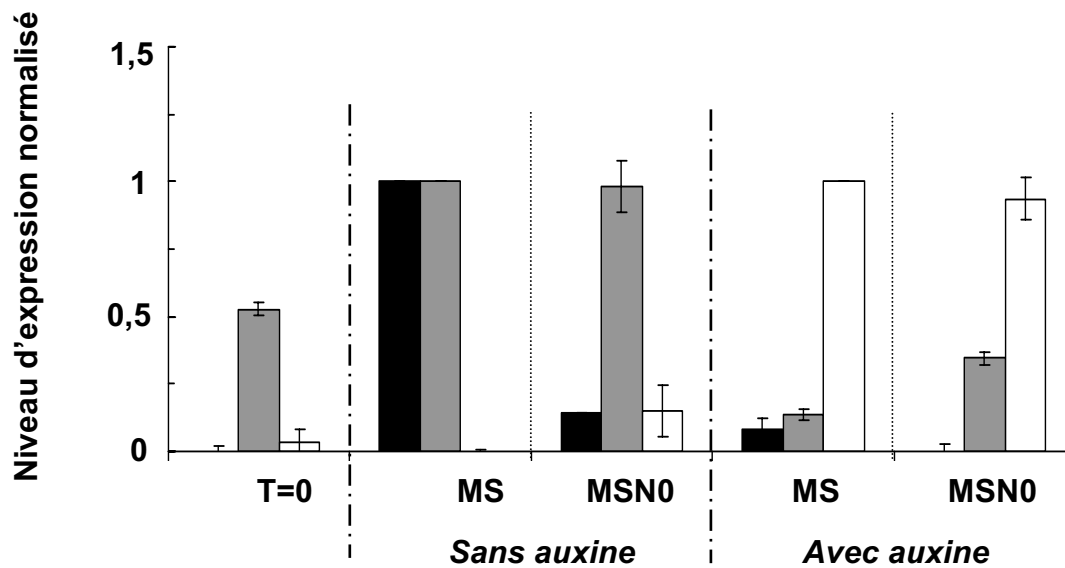
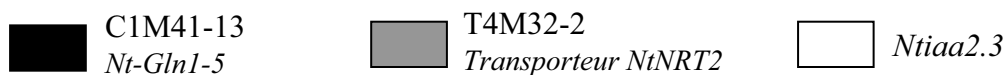


Figure 48. Analyse par RT-PCR semi-quantitative des effets d'une carence en nitrates des cellules BY-2 sur l'expression de gènes de réponse à l'auxine.

Après un lavage dans du milieu MS sans azote, les cellules BY-2 ont été mises en culture, pendant 6 h, en présence ou en absence d'auxine, soit dans du milieu MS, soit dans le même milieu MS dépourvu d'azote (MSN0).



La normalisation a été réalisée par rapport à la plus forte expression puis ramenée à l'expression du gène constitutivement exprimé dans nos conditions. 27 cycles. Les barres d'erreurs correspondent aux écartypes entre 3 expériences indépendantes de RT-PCR, à partir d'ARN extraits des mêmes cellules.

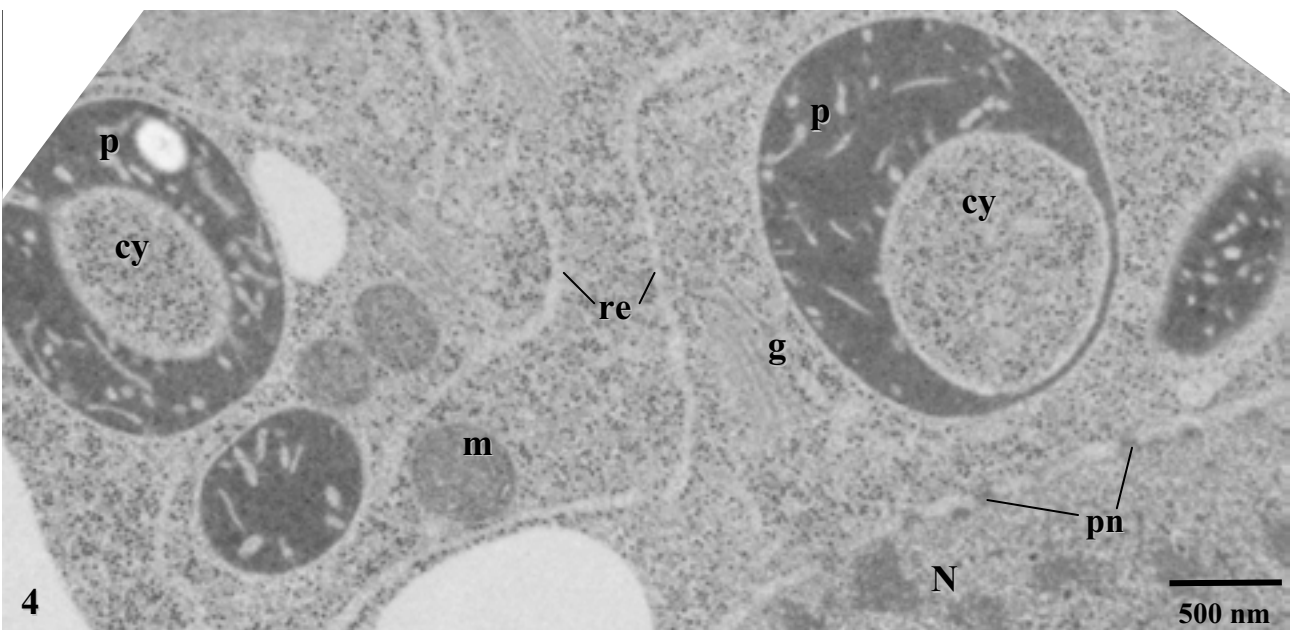
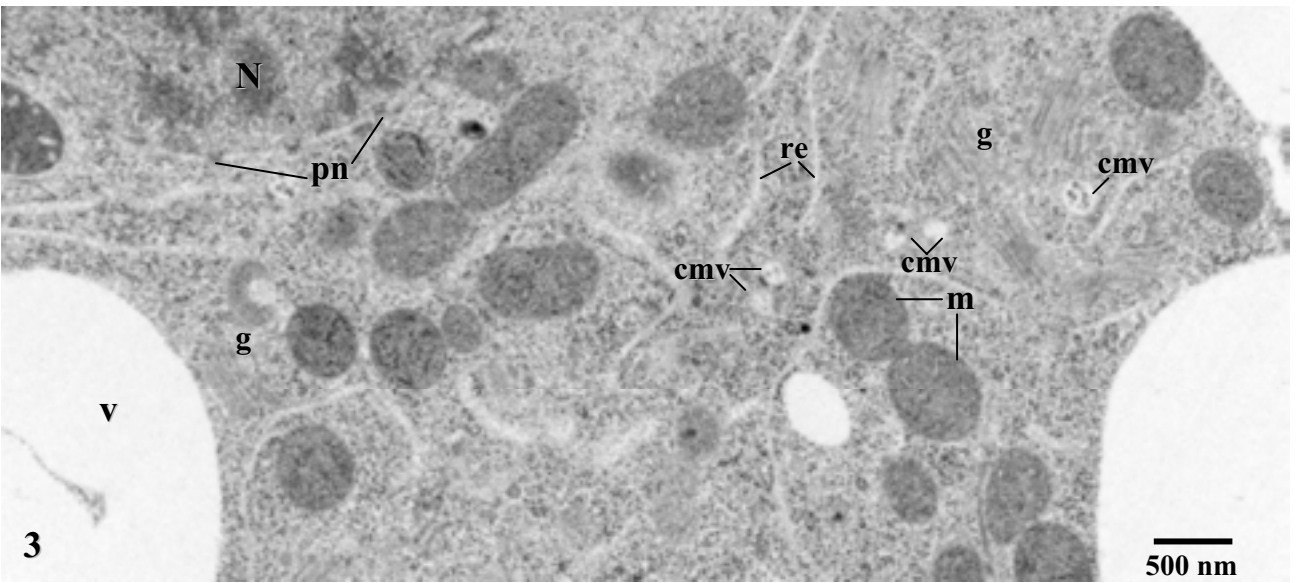
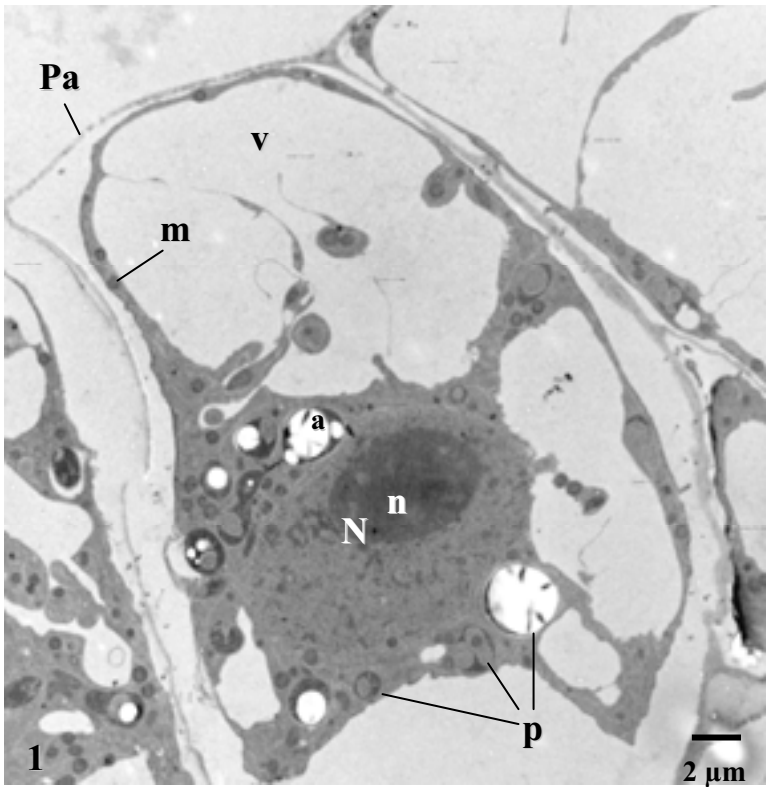
Abréviation	Nom
a	amidon
comt	centre organisateur des microtubules
cmv	corps multivésiculaire
cy	cytoplasme
en	enveloppe nucléaire
g	golgi
m	mitochondrie
mp	membrane plasmique
mt	microtubule
N	noyau
n	nucléole
Pa	paroi
p	plaste
pn	pore nucléaire
po	polyribosome
px	peroxysome
re	reticulum endoplasmique
v	vacuole
vmg	vésicule membranaire granuleuse

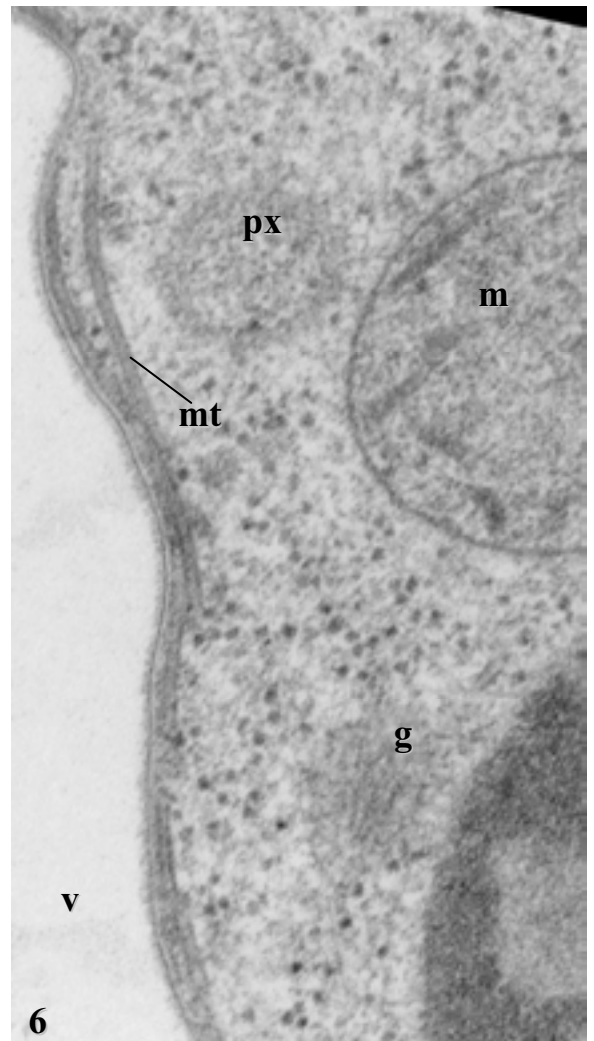
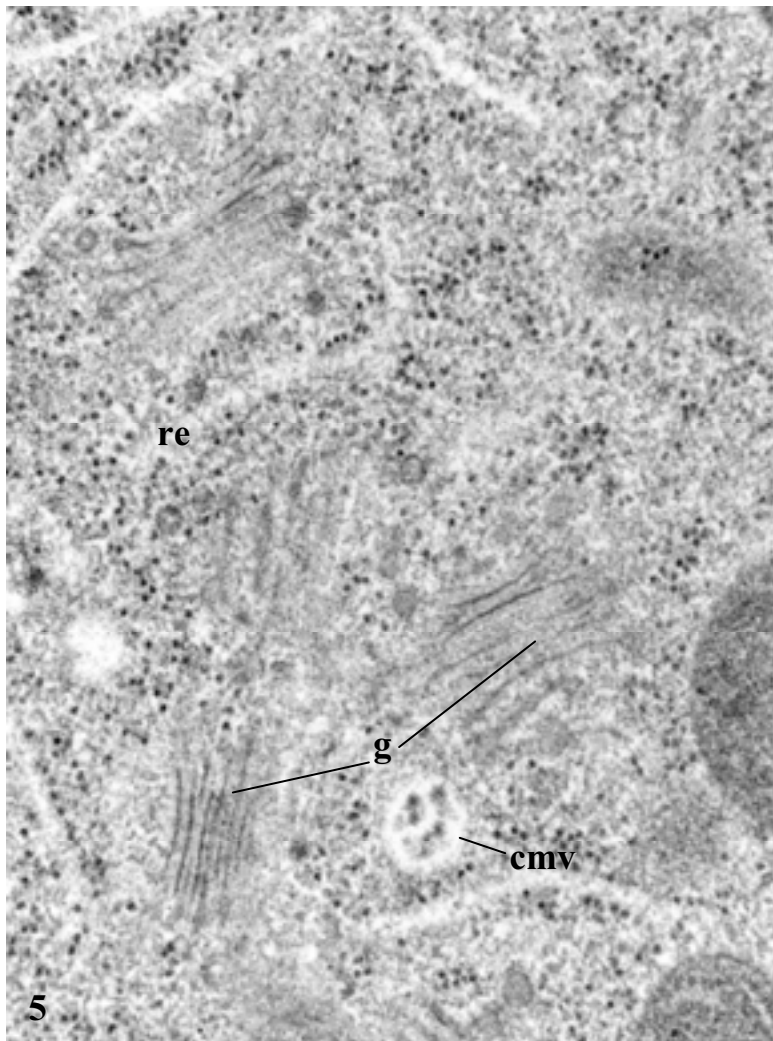
4. Etude de l'ultrastructure des cellules BY-2

L'analyse ultrastructurale a été menée sur des cellules BY-2, aussitôt après le repiquage suivant un cycle de 7 j de culture (T=0). Ces mêmes cellules ont ensuite été traitées ou non avec 10 μ M d'AIA, pendant 12 h ou 24 h (sans lavage préalable). Nous avons également réalisé une expérience consistant à ajouter de l'auxine pendant 12 h à des cellules carencées en auxine pendant 24 h, dans un milieu de culture neuf.

Les cellules ont ensuite été fixées par congélation ultrarapide sous haute pression. L'objectif de ces observations a été d'étudier d'un point de vue qualitatif les changements des différents compartiments cellulaires pendant les premières 24 h qui suivent le repiquage et l'ajout ou non d'auxine. Nous nous sommes particulièrement attachés à la caractérisation des plastes, des mitochondries, de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique et de l'agencement des ribosomes entre eux, ainsi qu'au degré de vacuolisation des cellules qui a été défini suivant une échelle de 1 à 5, allant d'une cellule peu vacuolisée (1) à très vacuolisée (5).

Chaque planche (de I à VII) correspond à une situation donnée : cellules au moment du repiquage (T=0 ; Planche I) ; cellules après 12 h en présence d'auxine (Planche II : 12 h +AIA) et après 24 h en présence d'auxine (Planche III : 24 h +AIA), cellules carencées en auxine pendant 12 h (Planche IV : 12 h - AIA) et pendant 24 h (Planche V : 24 h -AIA). Enfin, sont présentées les cellules qui ont été carencées pendant 24 h et auxquelles on a rajouté de l'auxine (Planche VII : carence 24 h + 12 h + AIA) ou non (Planche VI : carence 24 h + 12 h - AIA). Les clichés présentés sur ces planches ont été sélectionnés comme représentatifs des nombreuses observations réalisées.

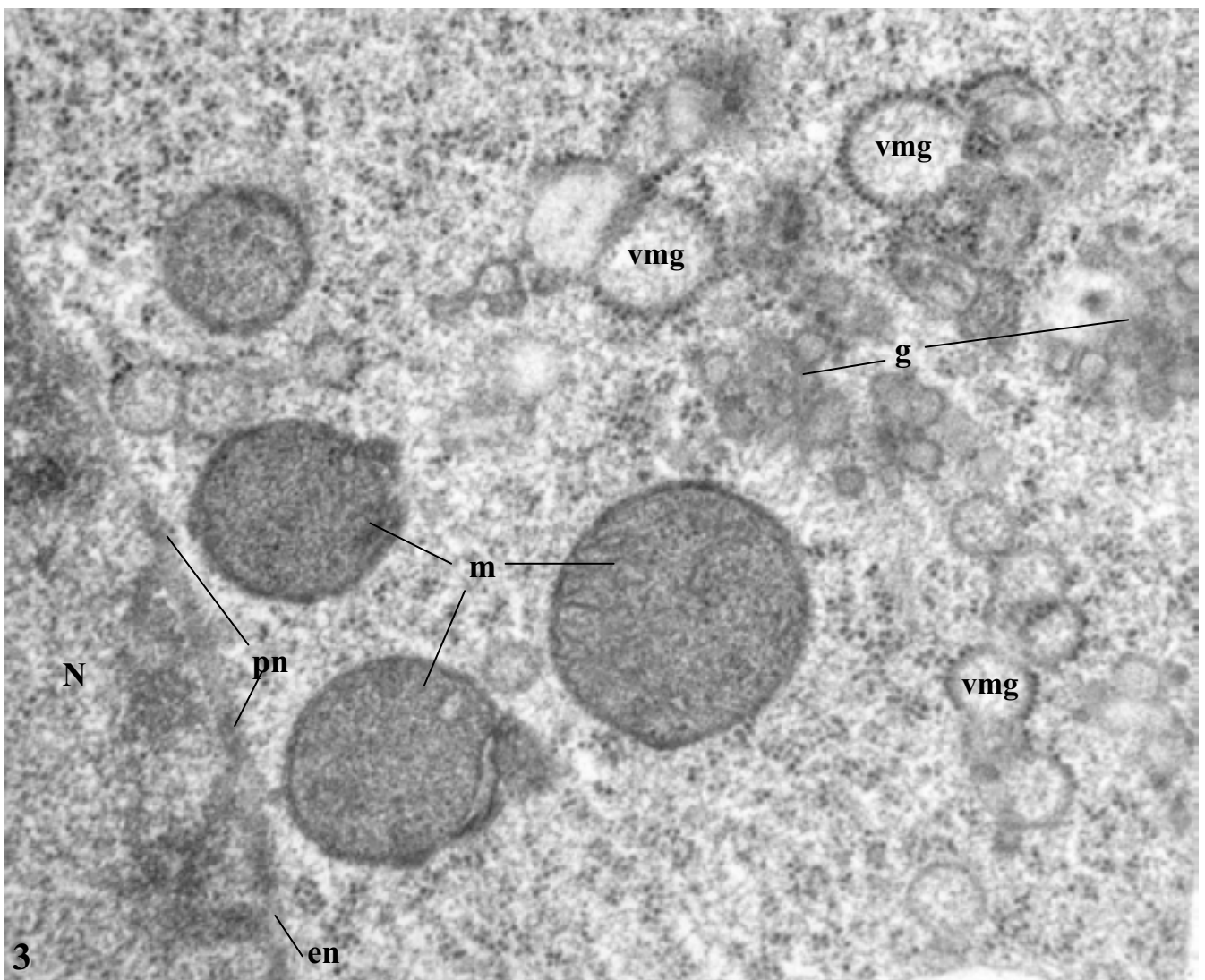
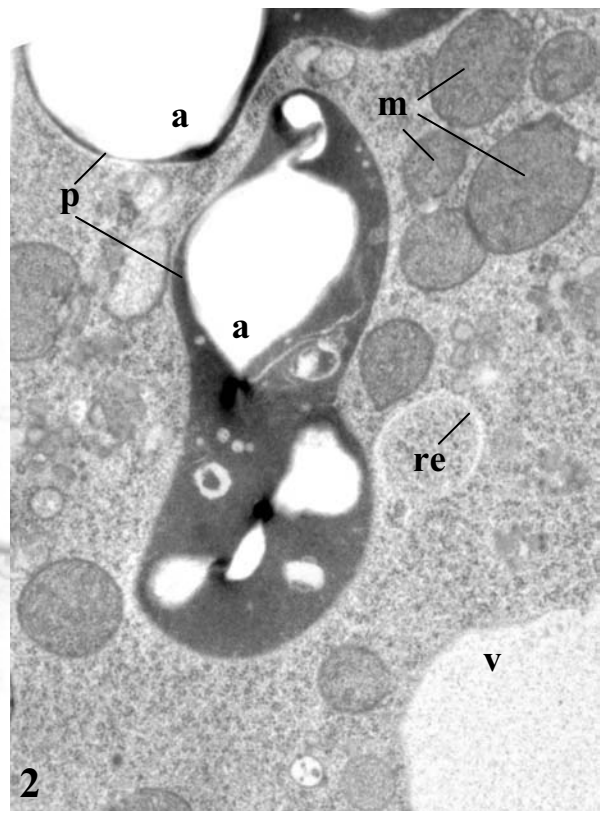
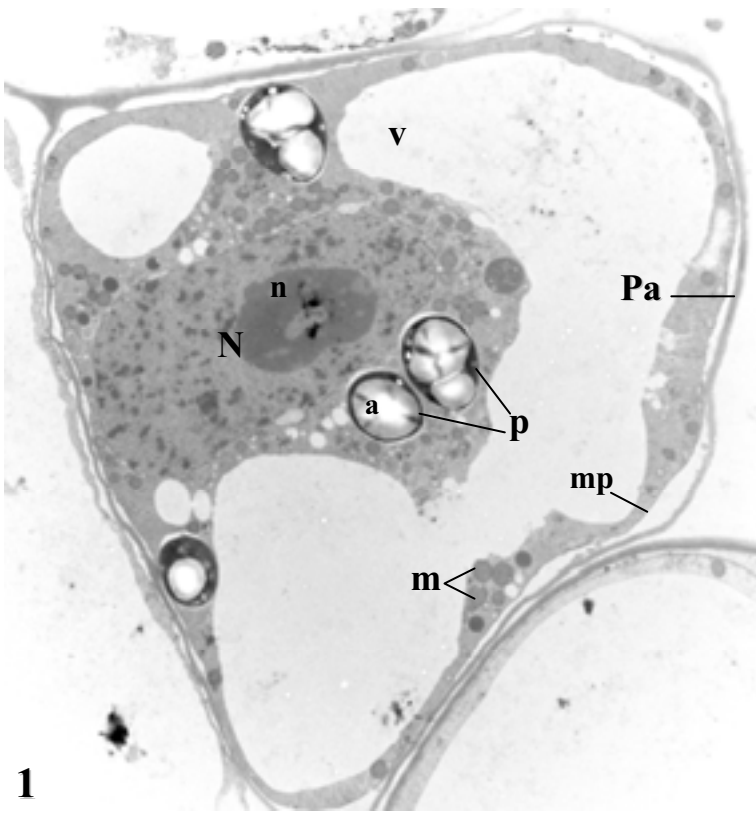


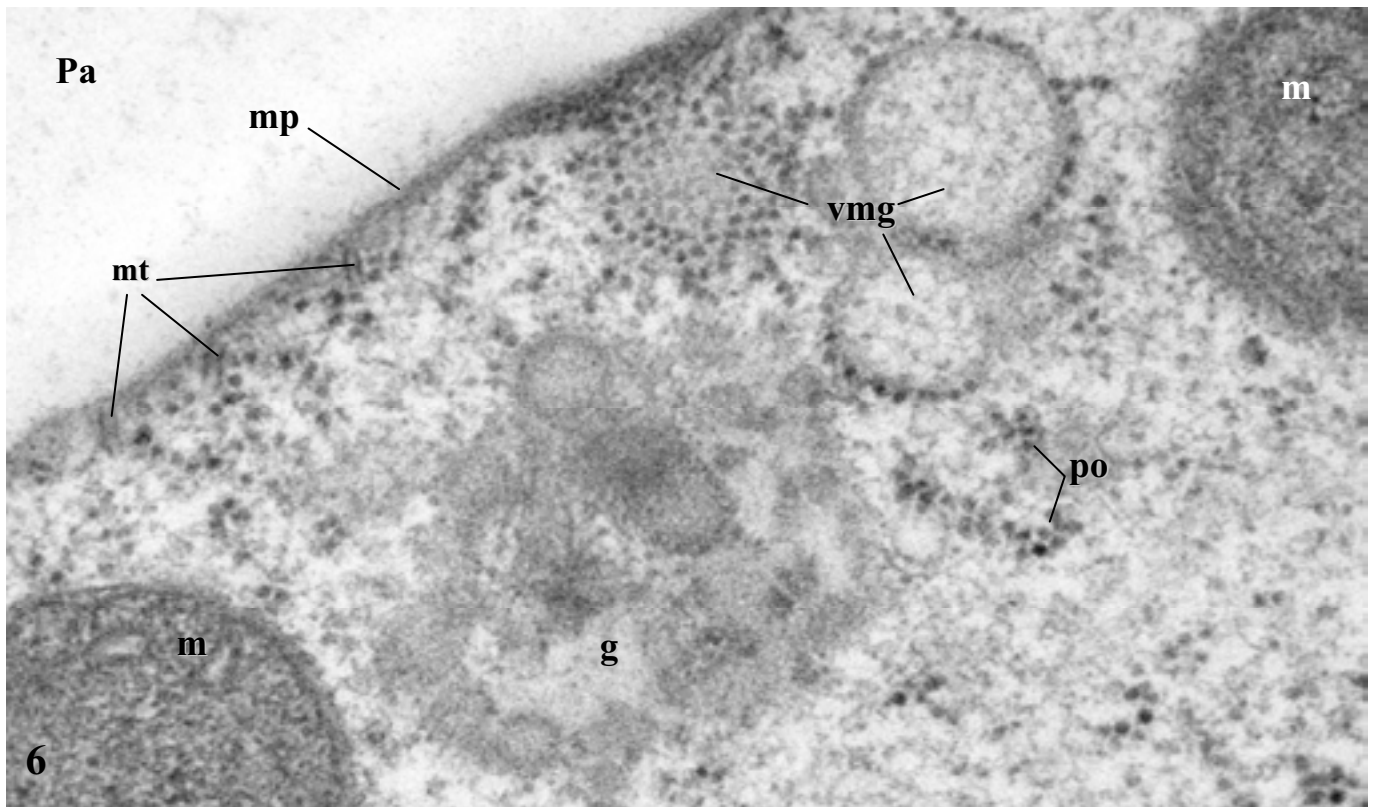
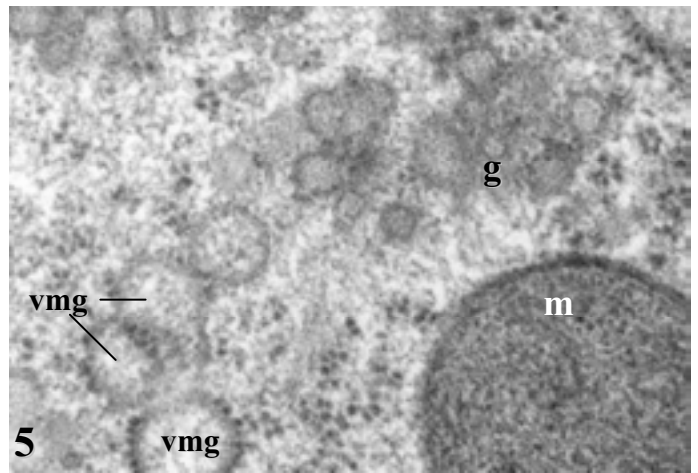
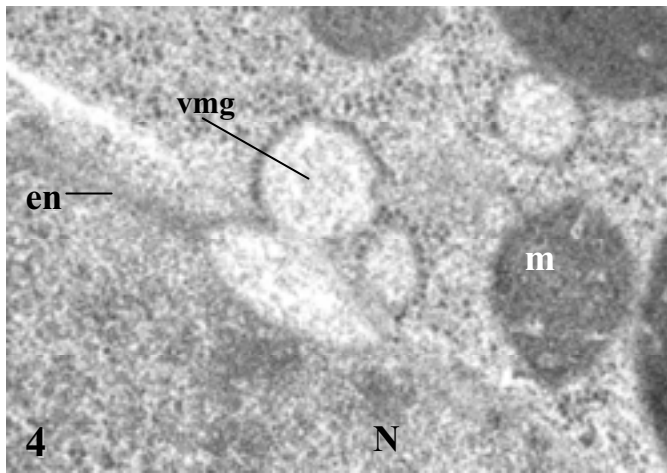


500 nm

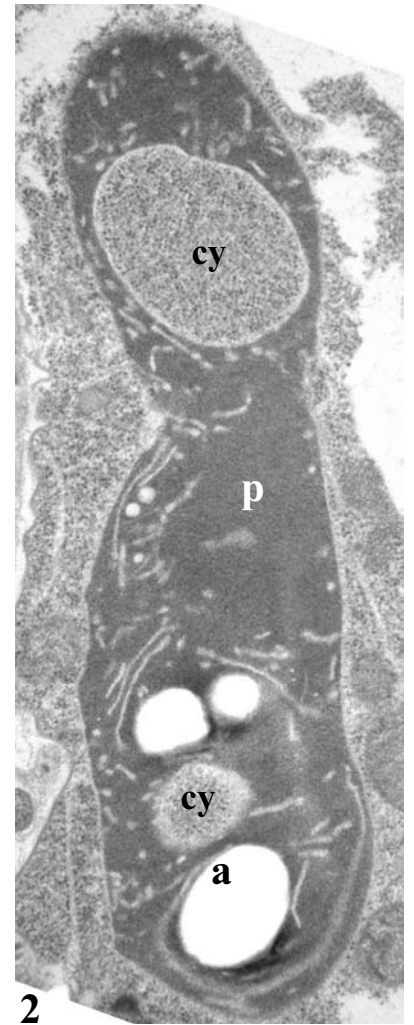
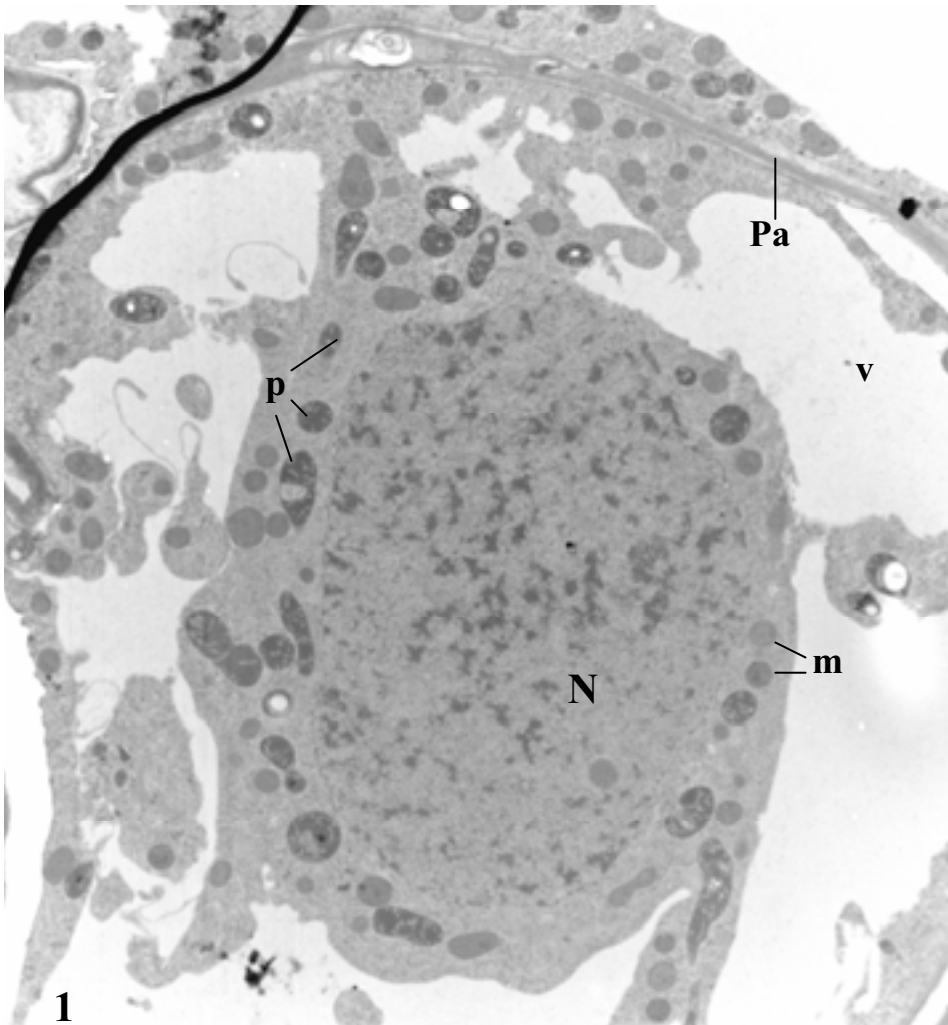
100 nm

Cellule	Degré de vacuolisation moyen à élevé (3-4 sur 5)
Plastes	Forme très flexueuse, souvent en cloche (4), voire double cloche (1), rapport surface/volume très élevé, stroma dense, grains d'amidon le plus souvent de petite taille, système membranaire interne développé (extensions de la membrane interne de l'enveloppe)
Mitochondries	Crêtes souvent peu formées (2,6)
Appareil de Golgi	Dictyosomes très nombreux, souvent groupés (5), fibrilles intersacculaires denses (5)
Reticulum endoplasmique	Nombreux éléments, parfois rugueux
Ribosomes	Isolés, dispersés dans tout le cytoplasme (2 à 5)
Noyau	Nucléole parfois multiple ou multilobé
Autres observations	Présence de microtubules bordant la membrane plasmique (6)



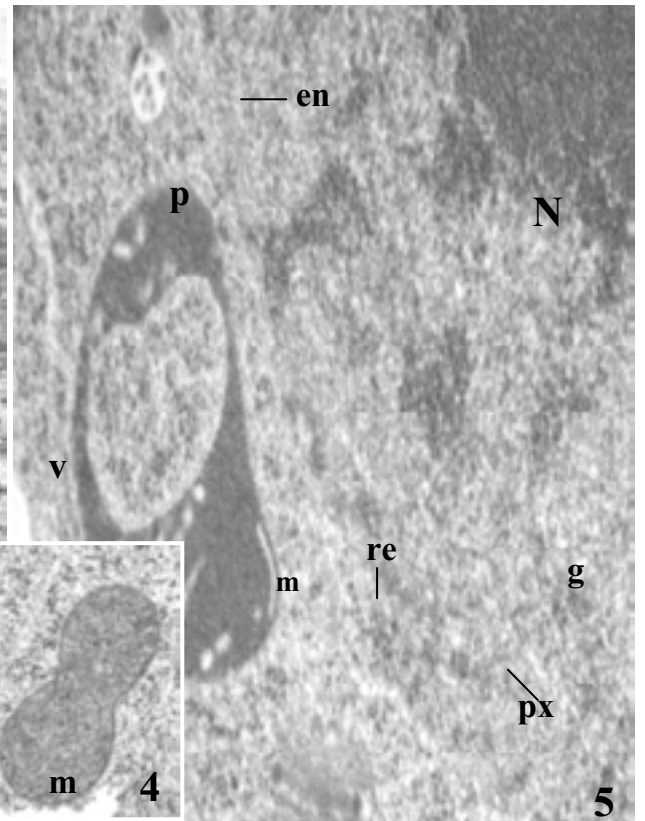
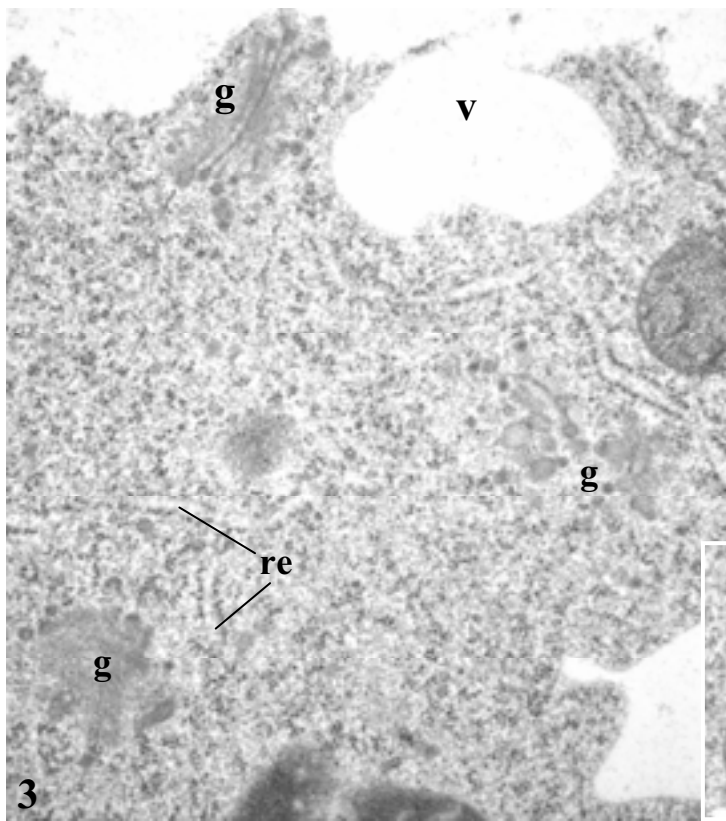


Cellule	Peu vacuolisée (degré 2 sur 5)	100 nm
Plastes	Stroma très dense, système membranaire peu développé, grains d'amidon de taille très variable	
Mitochondries	Nombreuses, stroma dense, système de crêtes peu développé, désorganisé, enveloppe présentant des perturbations (bourgeonnements)	
Appareil de Golgi	Entièrement détroustré, se présentant sous forme d'amas de vésicules à membrane diffuse, sans saccules visibles (3,5,6)	
Reticulum endoplasmique	Peu développé, membranes peu visibles (2). On note la néoformation de re à partir de vésicules membranaires couvertes de ribosomes (vmg) provenant de l'enveloppe nucléaire (4), et formant des chainettes (3,5)	
Ribosomes	La plupart groupés en amas ou associés au re ou à des vésicules (3,6)	
Noyau	Nucléole volumineux et dense, chromatine condensée en petits amas dispersés dans tout le nucléoplasme	
Autres observations	Fusion de vésicules membranaires granuleuses avec la membrane plasmique (6) Présence de microtubules perpendiculaires au plasmalemma (6), à proximité de vmg.	



2 μ m

500 nm



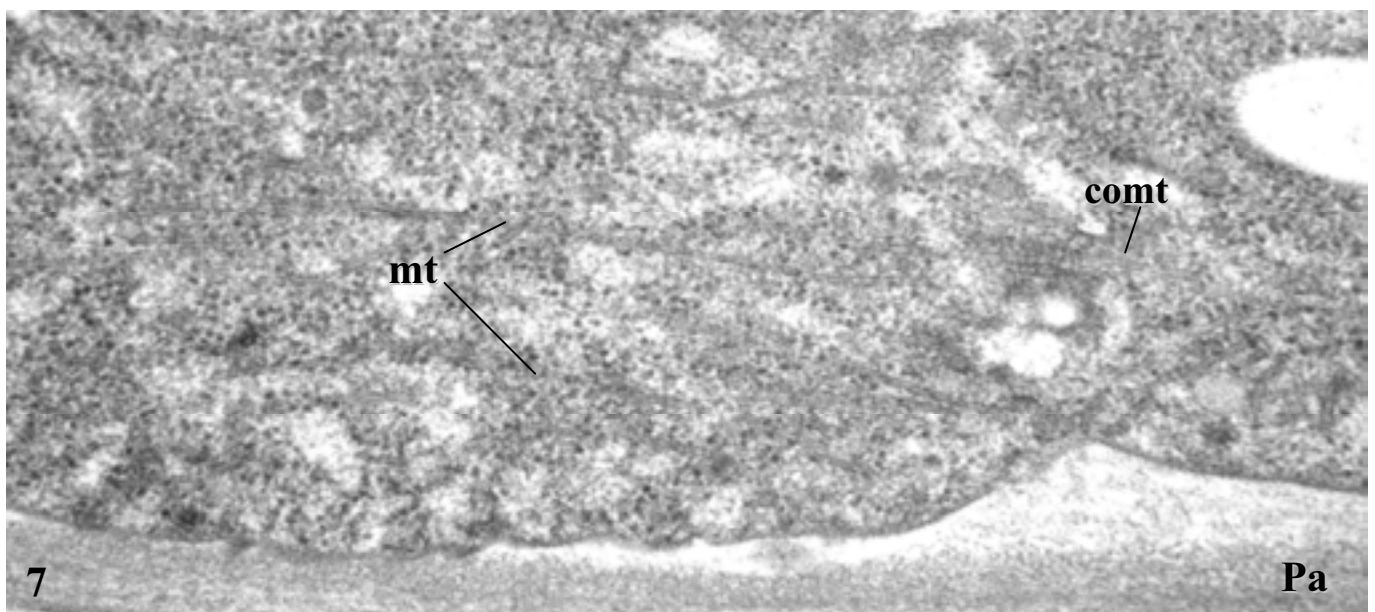
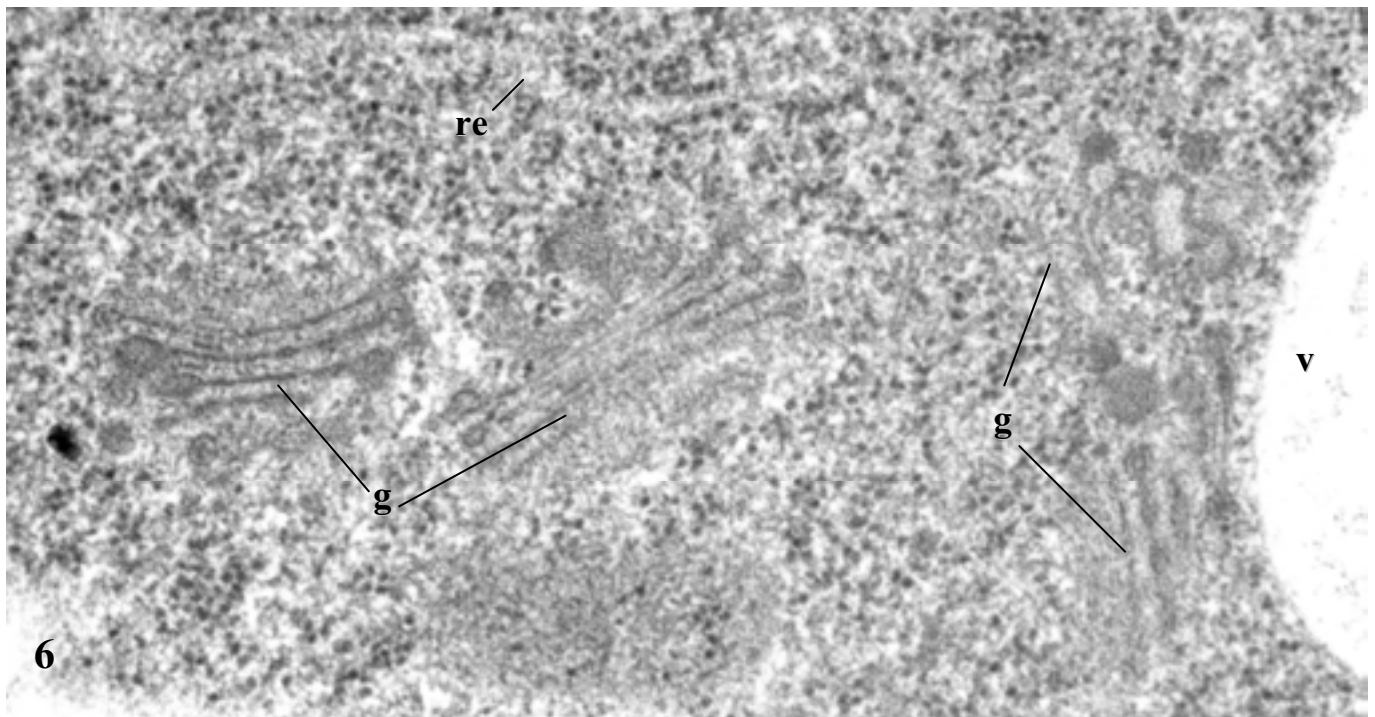
500 nm

500 nm

3

4

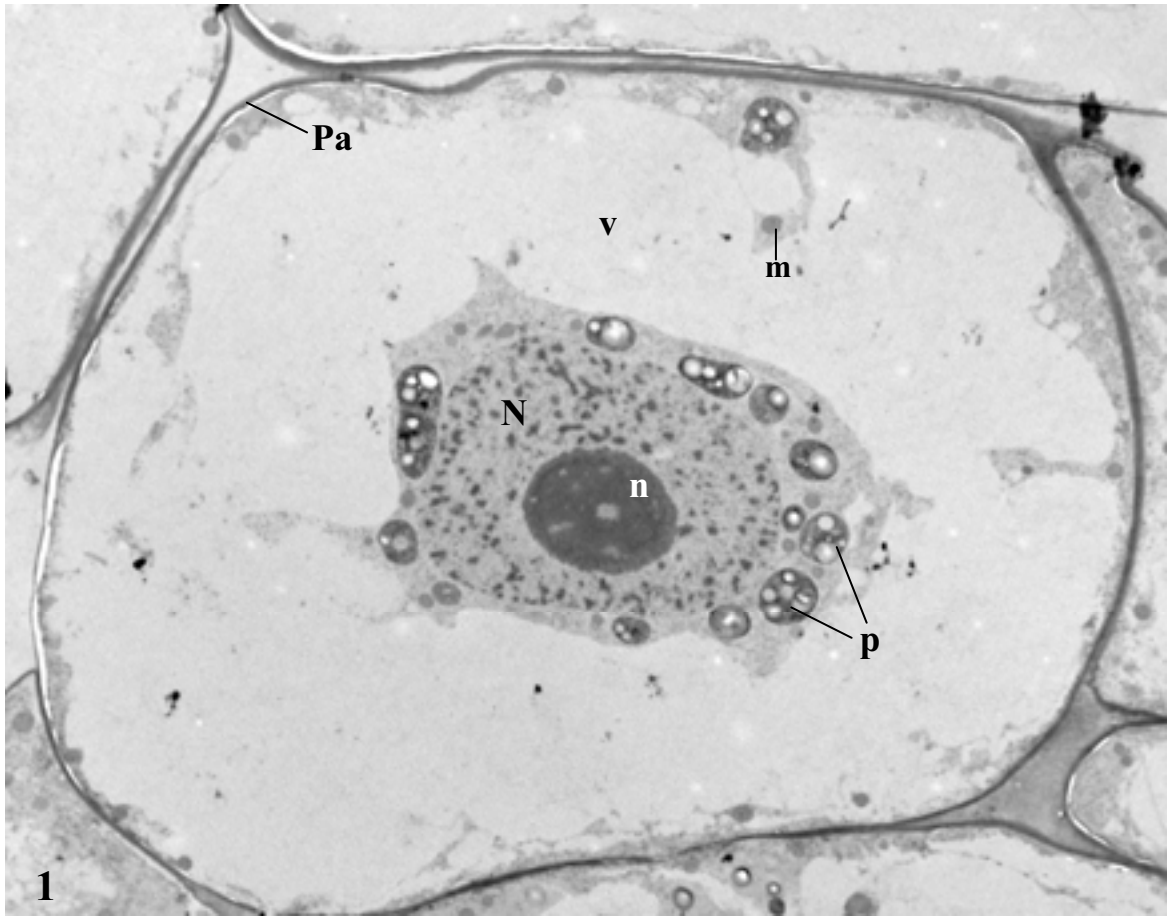
5

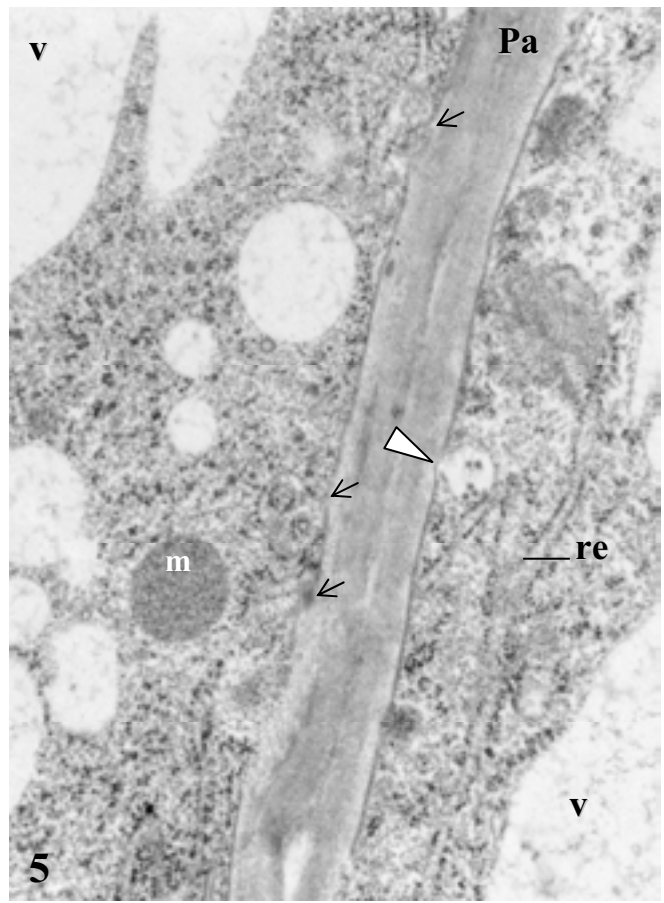
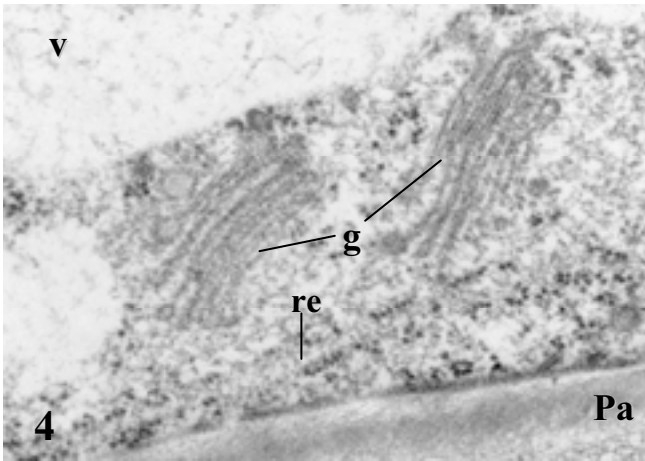
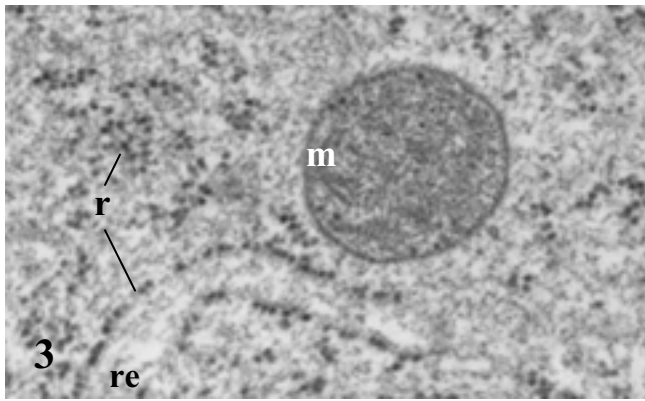


500 nm

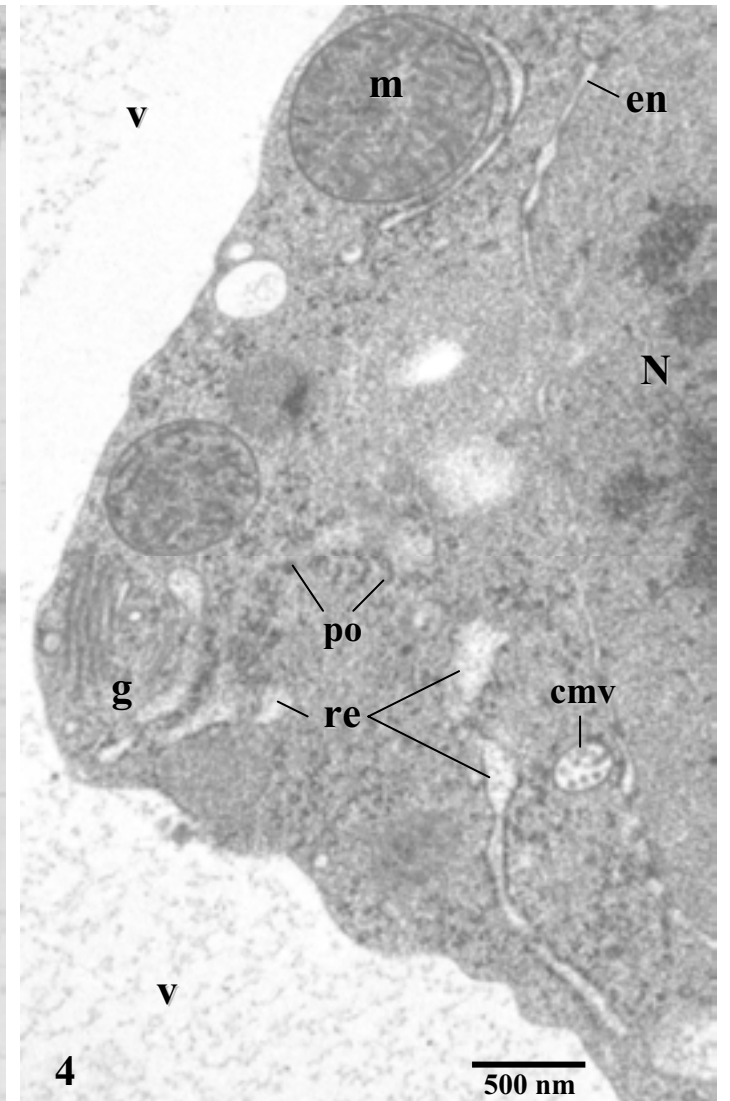
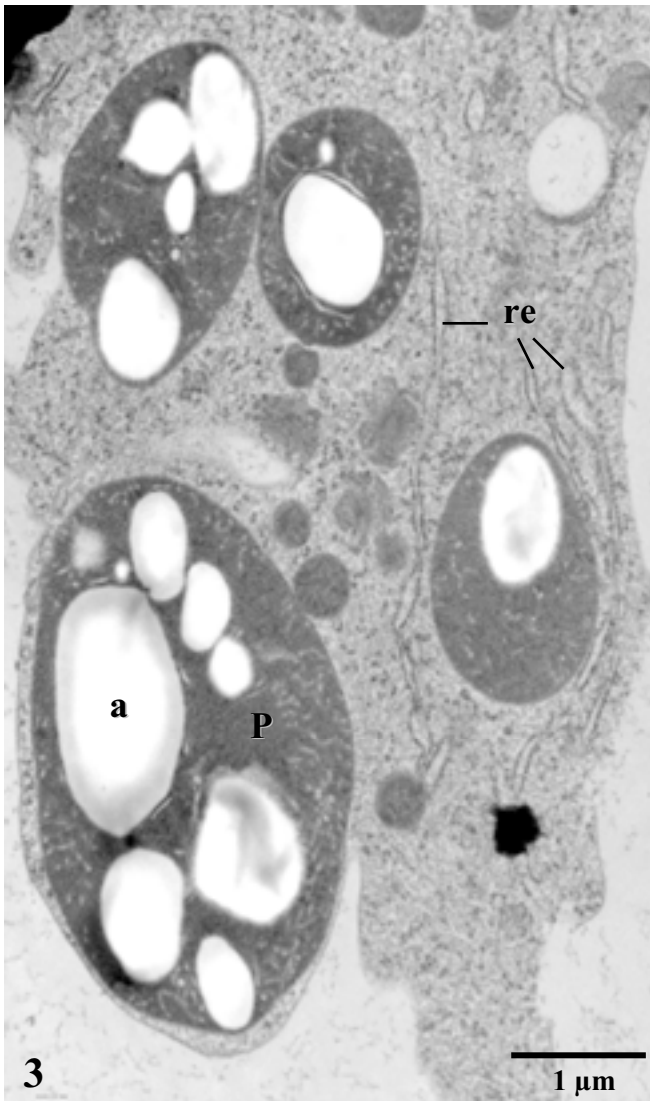
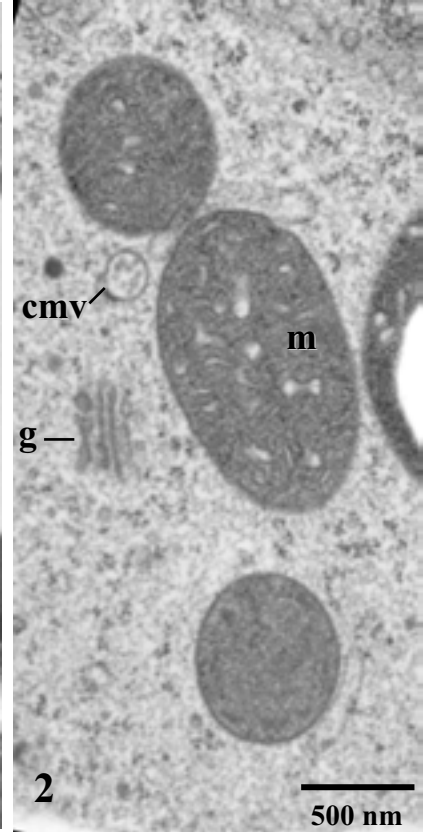
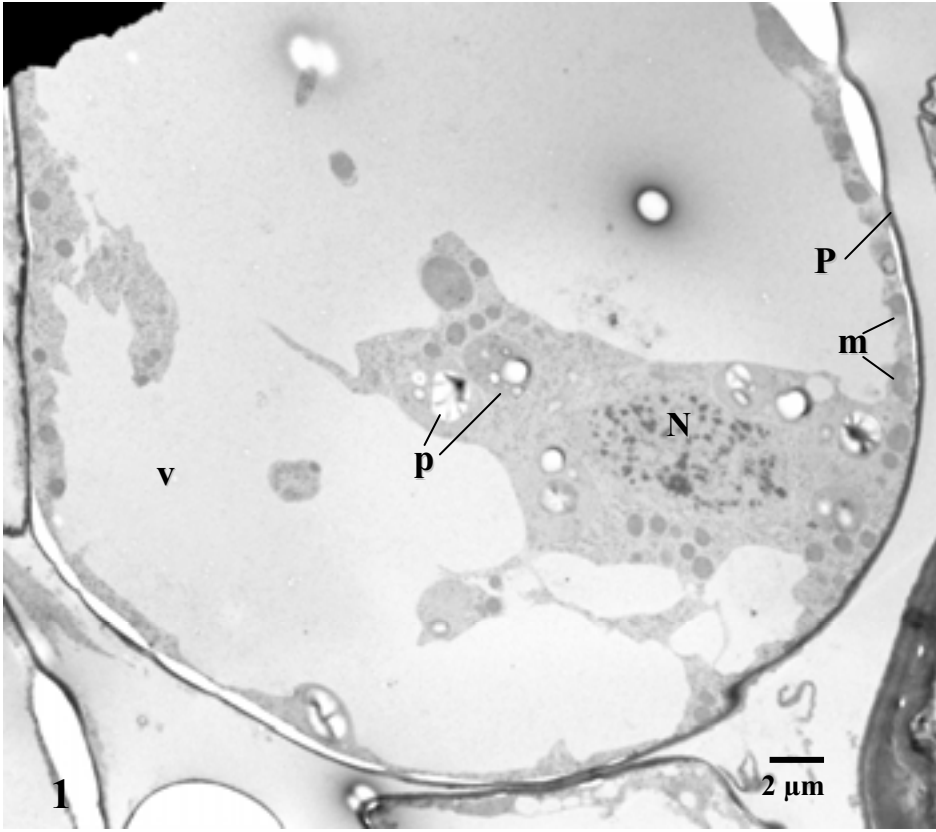
500 nm

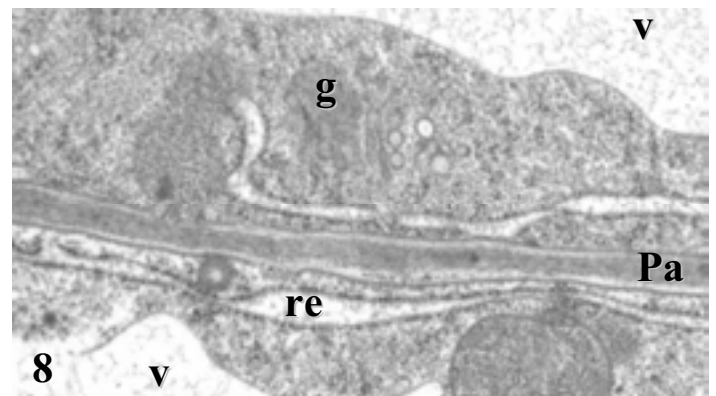
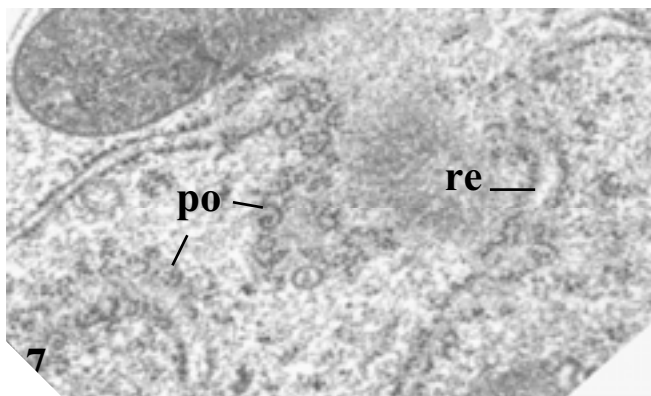
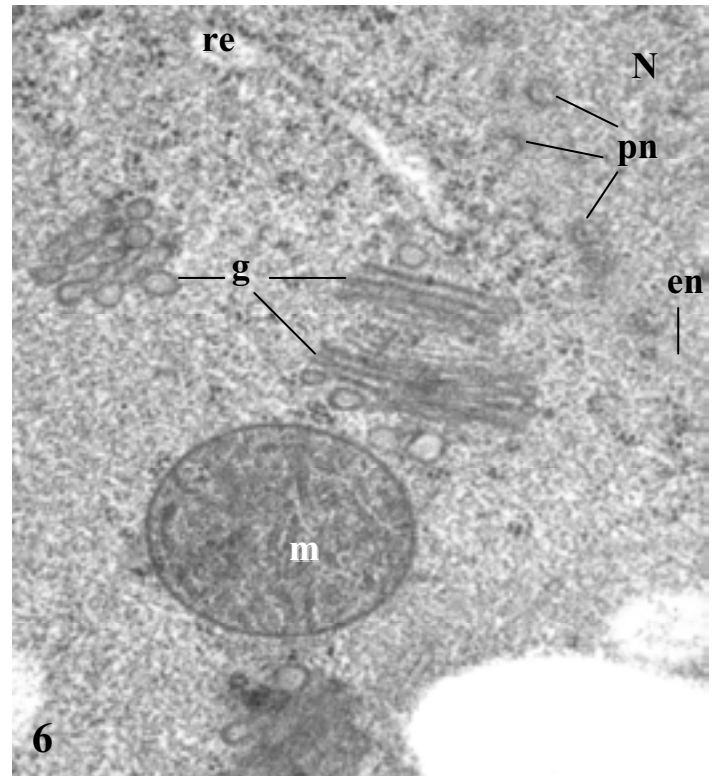
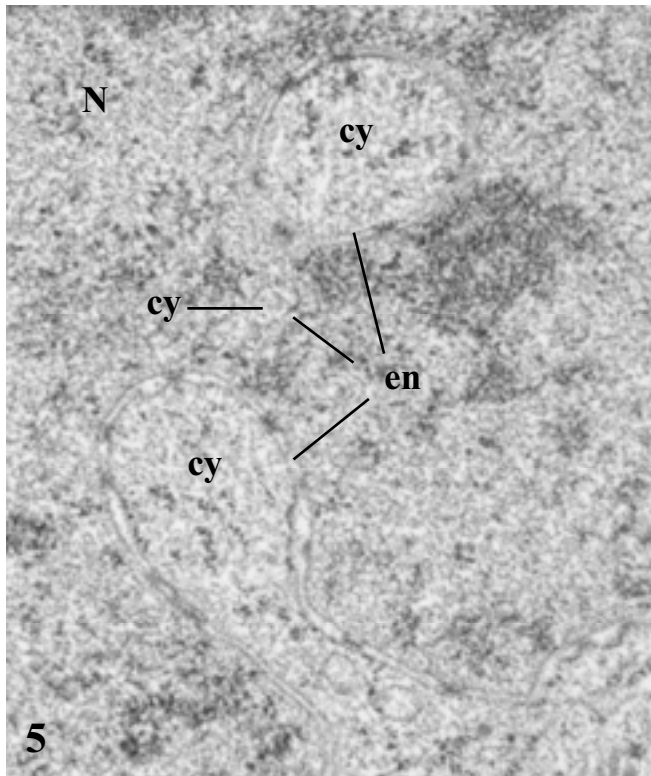
Cellule	Très peu vacuolisée (degré 1 sur 5), rapport volume noyau/ volume cellule élevé
Plastes	Taille et forme très variable, souvent flexueuse ou en forme de cloche (2,5), stroma dense, très peu d'amidon, système membranaire développé, surtout périphérique
Mitochondries	Nombreuses, taille et forme variable, certaines en cours de division (4), crêtes plus ou moins développées
Appareil de Golgi	Soit diffus, en cours de différenciation (3,5), soit différencié (6, membranes bien définies, contenu dense dans les saccules et vésicules, fibrilles intersaccules denses)
Reticulum endoplasmique	Abondant, parfois rugueux (3)
Ribosomes	Très nombreux, souvent associés au RE (3,6)
Noyau	Dans certaines cellules l'enveloppe nucléaire est peu, voire pas visible (5), suggérant un début de déstructuration associée à la prophase
Autres observations	Présence dans quelques cellules de microtubules alignés indiquant la mise en place d'un fuseau mitotique (7)



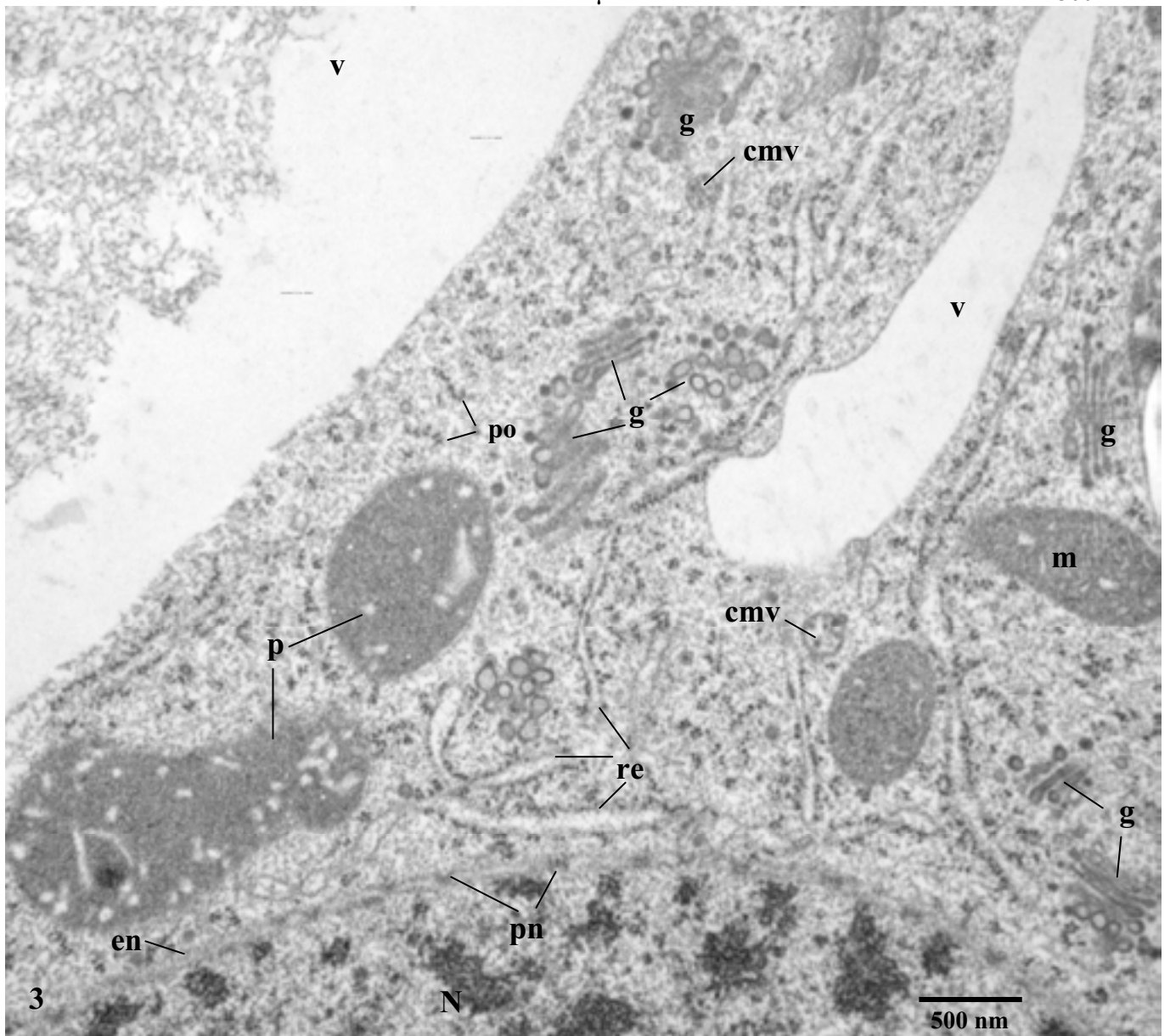
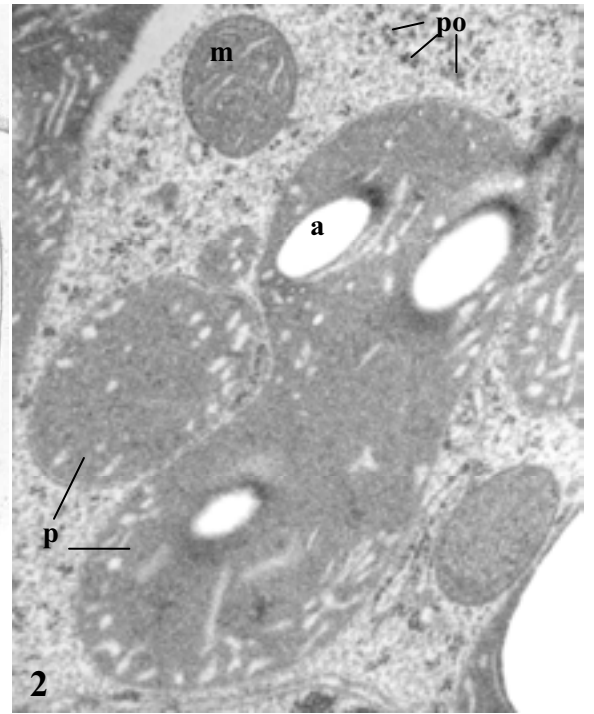
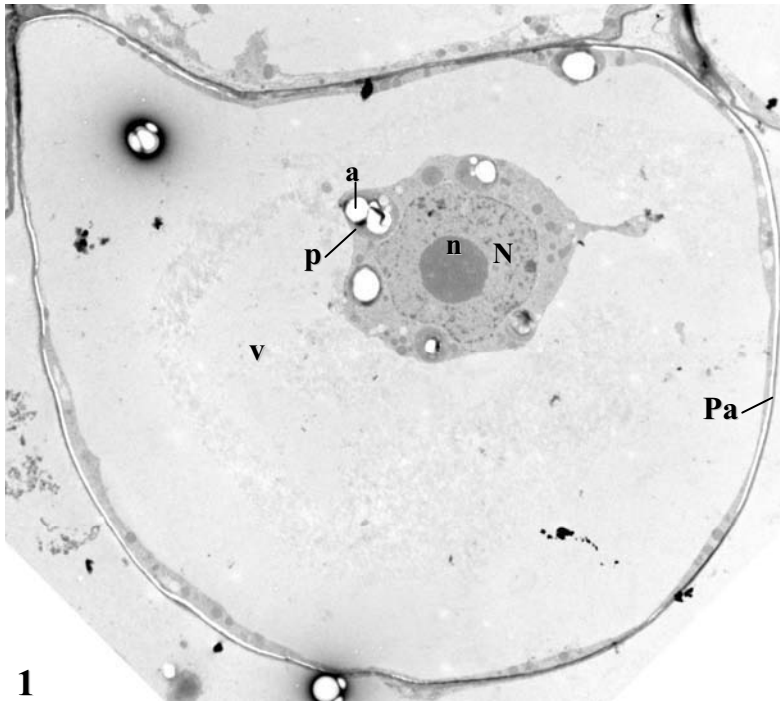


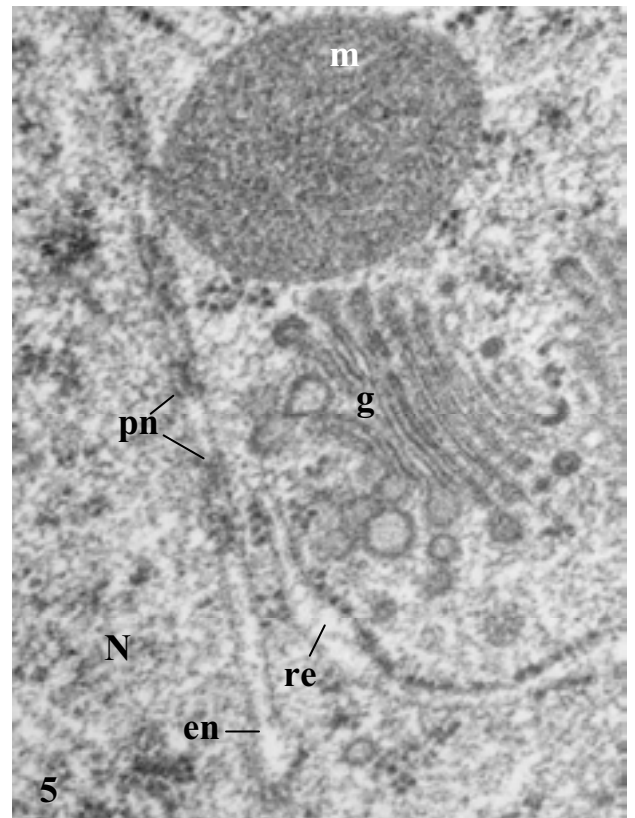
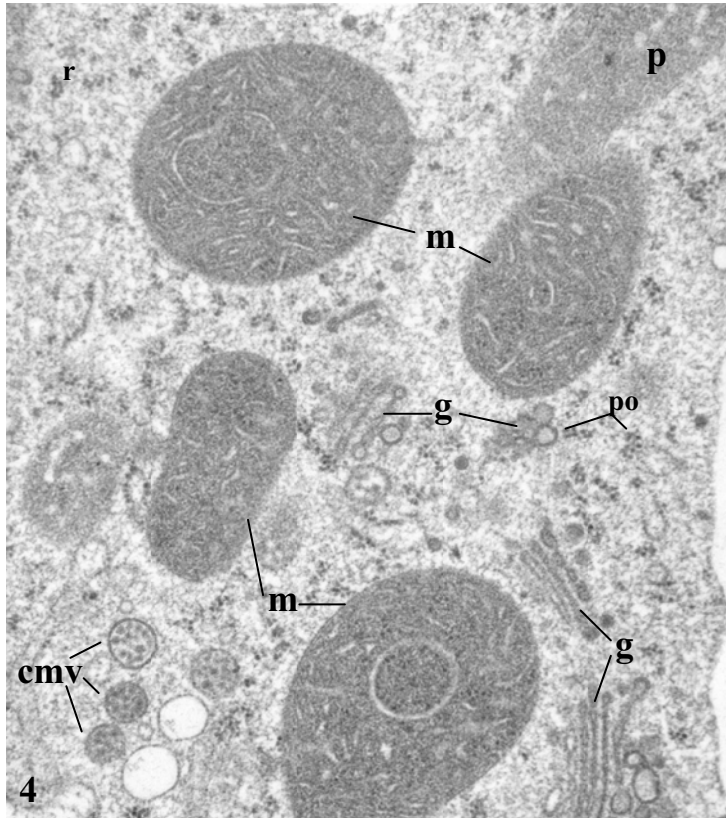
Cellule	très vacuolisée (degré 4 sur 5)
Plastes	stroma dense, amidon en nombreux granules de taille moyenne, système membranaire très développé (2)
Mitochondries	stroma peu dense, crêtes abondantes et bien formées (3), forme souvent flexueuse (2)
Appareil de Golgi	dictyosomes peu abondants, structurés (5-7 saccules), peu actifs (4)
Reticulum endoplasmique	développé, souvent rugueux (2,3,4,5), parfois dilaté. De nombreuses images suggèrent une synthèse active de protéines et une excrétion vers la vacuole (2, flèche) ou vers la paroi, directement à partir de re (4 et 5, flèches) ou à partir de vésicules (5, pointe de flèche)
Ribosomes	peu nombreux, dispersés ou associés au re
Noyau	nucléole volumineux et dense, chromatine condensée en petits amas dispersés dans tout le nucléoplasme
Autres observations	Présence d'un contenu dense dans la vacuole (2,4, 5)





Cellule	très vacuolisée (degré 4 sur 5)
Plastes	stroma dense, amidon en multiples granules, système membranaire développé (3)
Mitochondries	peu nombreuses, bien différenciées, crêtes nombreuses (2,6)
Appareil de Golgi	bien défini, organisé, mais semblant peu actif (4, 6)
Reticulum endoplasmique	développé, souvent rugueux (3), membranes bien visibles, nombreuses dilatations et formation de vésicules (4,8), extrusion vers la paroi (8)
Ribosomes	peu de ribosomes isolés (4,6), mais nombreux ribosomes associés en polysomes, souvent à la surface du re (7) ; certaines zones de cytoplasmes sont dépourvues de ribosomes (6, moitié inférieure)
Noyau	chromatine condensée en petits amas dispersés dans tout le nucléoplasme invaginations parfois profondes de l'enveloppe(7)
Autres observations	présence de corps multivésiculaires (2, 4) un contenu dense est parfois visible dans la vacuole (4,8).

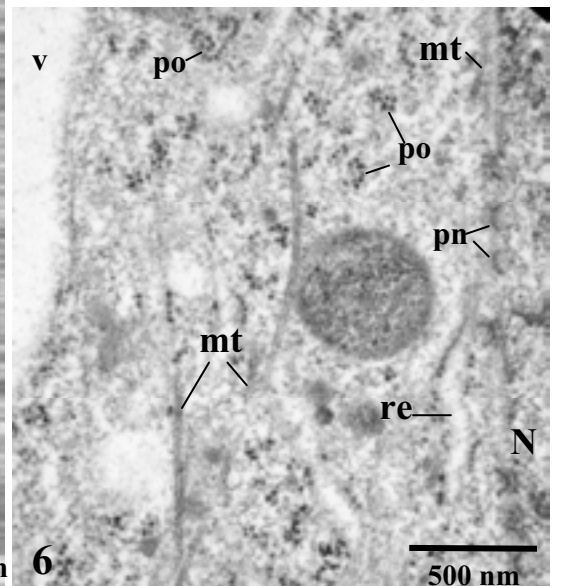
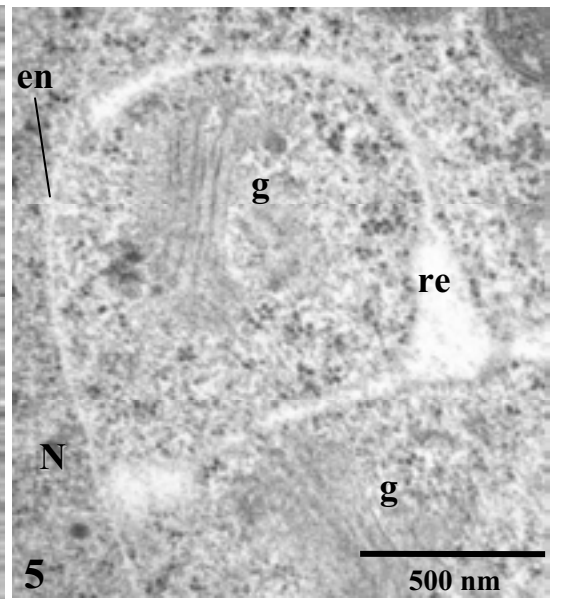
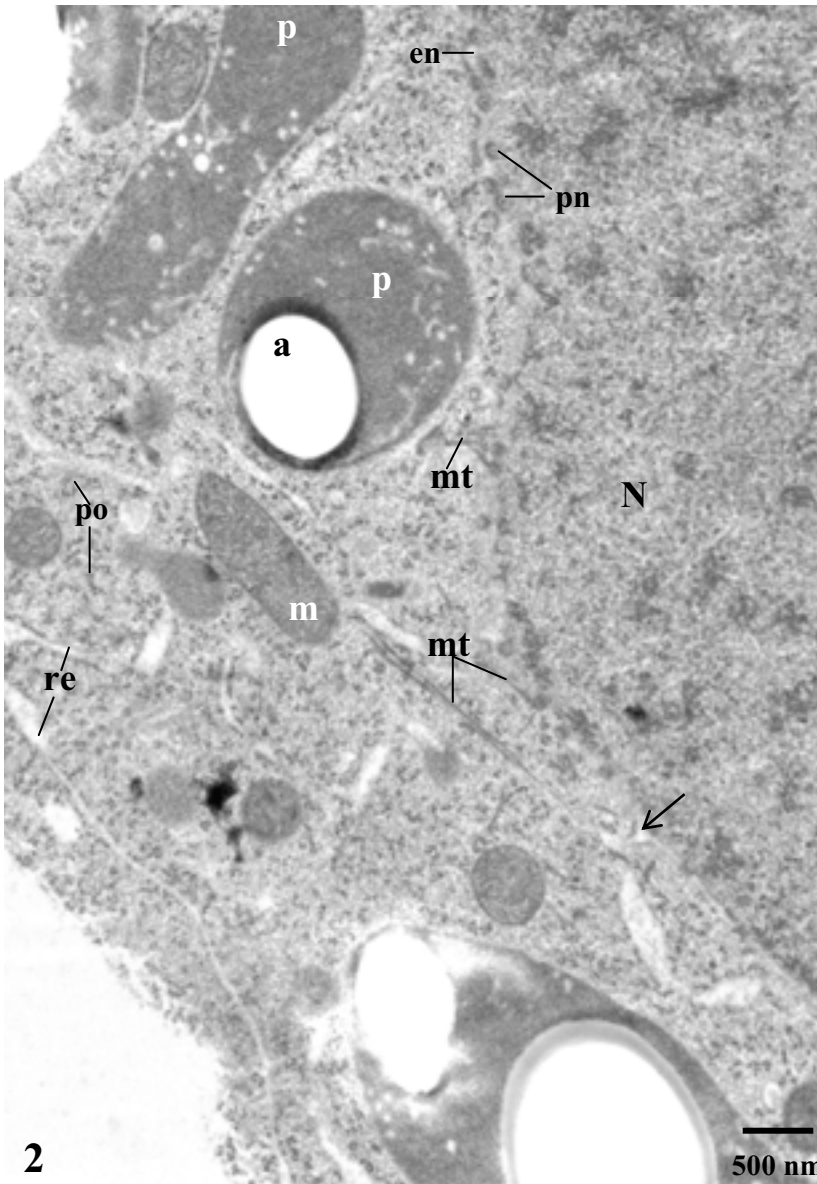
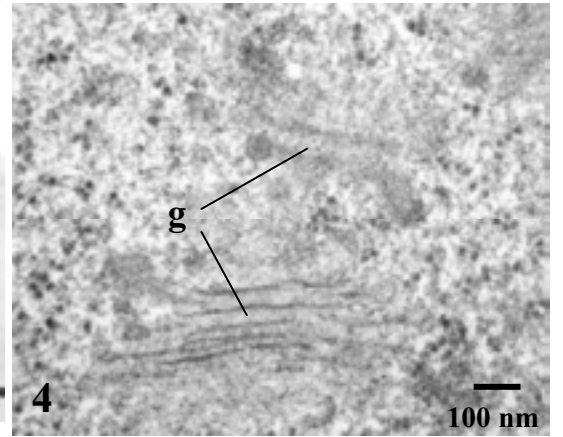
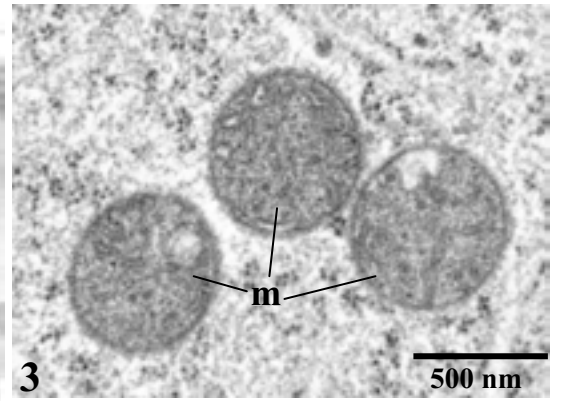
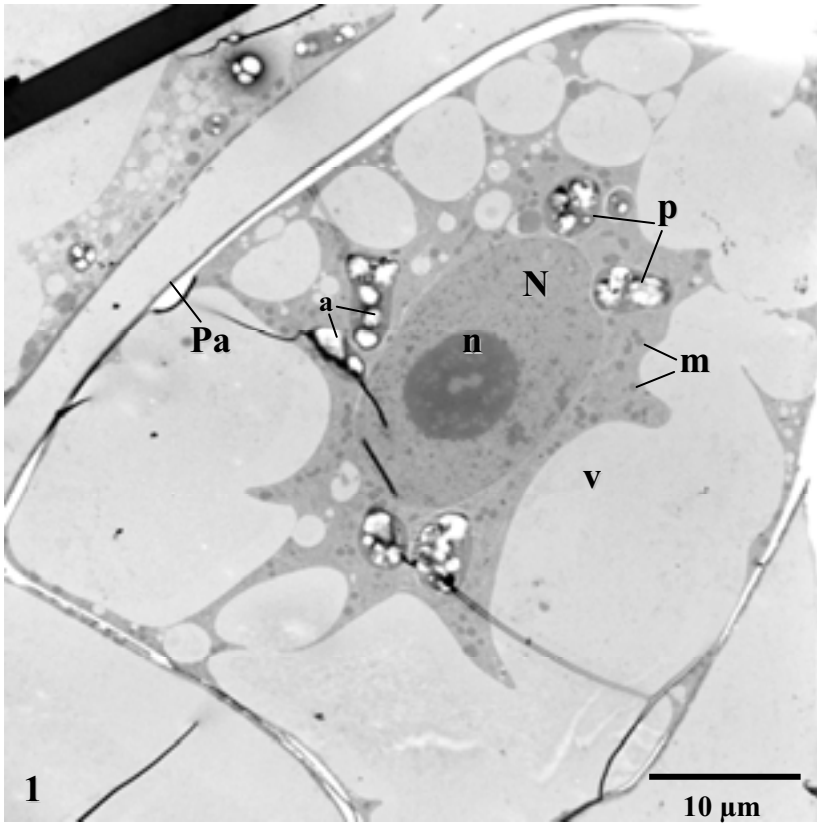


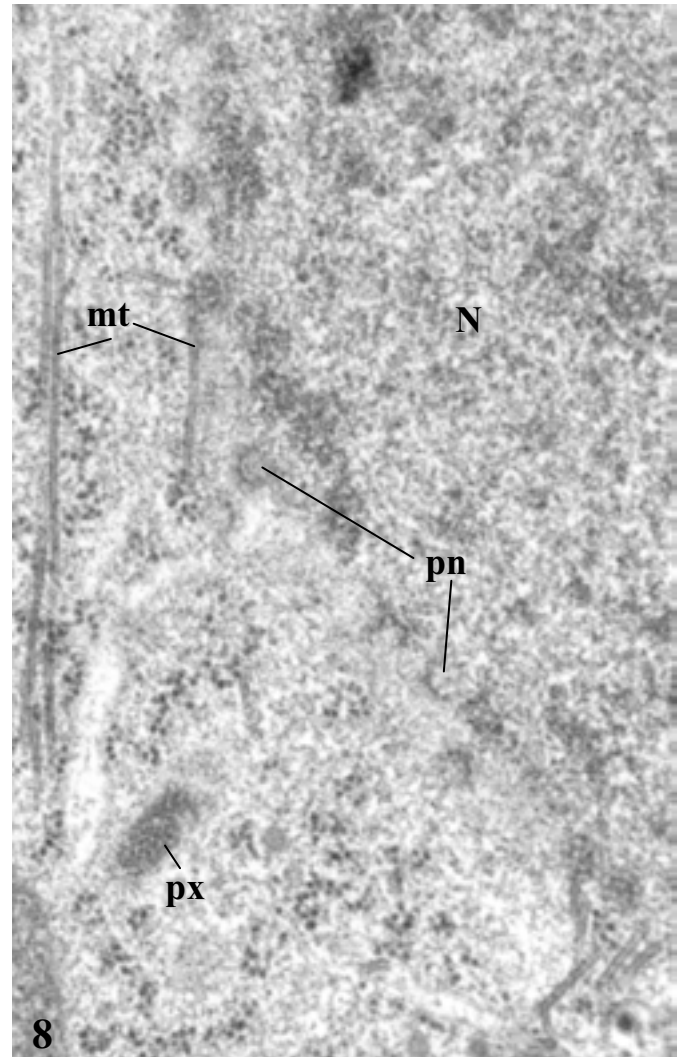
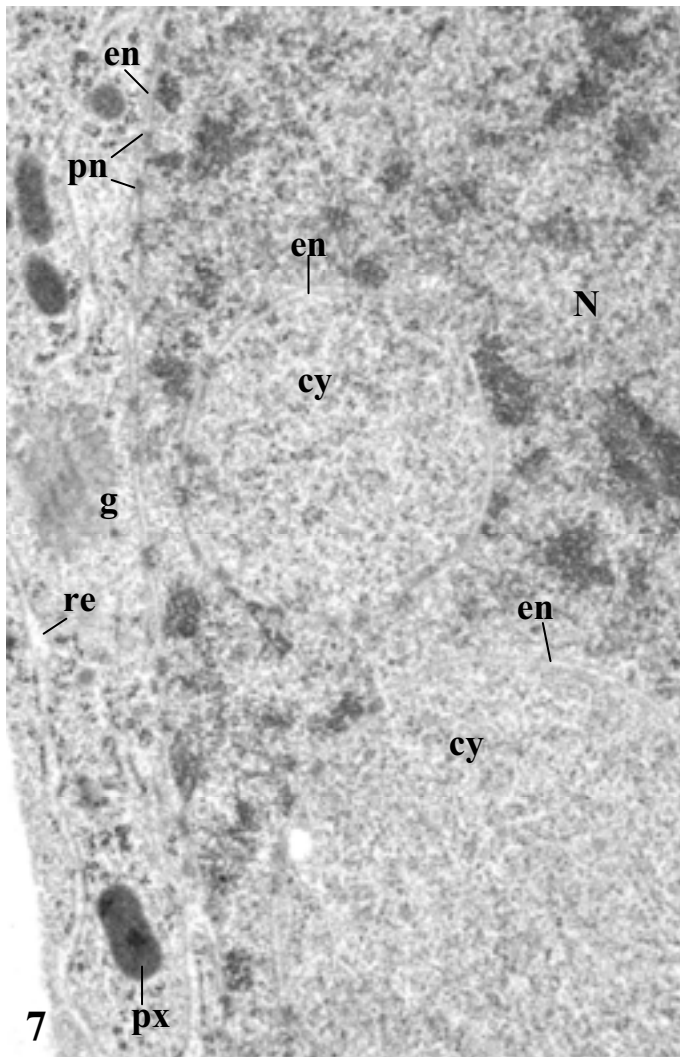


500 nm

100 nm

Cellule	très vacuolisée (degré 5 sur 5), rapport volume noyau / volume cellule faible, peu de travées cytoplasmiques, cytoplasme périphérique très mince (1)
Plastes	forme et taille variable, stroma dense, teneur en amidon très variable, système membranaire développé, surtout périphérique (2,3)
Mitochondries	stroma dense, système de crêtes particulièrement développé, celles-ci sont parfois circulaires (4)
Appareil de Golgi	dictyosomes nombreux, structurés, membranes bien définies, contenus des saccules peu denses, fibrilles intersacculaires peu visibles (3,4,5)
Reticulum endoplasmique	très développé, souvent dilaté et rugueux (3,5)
Ribosomes	assez peu nombreux, la plupart regroupés en amas ou polysomes (3,4,5) ou associés au Re
Noyau	nucléoplasme clair ; c'est le seul cas où de la chromatine condensée est visible le long de l'enveloppe (3)
Autres observations	présence de nombreux corps multivésiculaires (3,4) et d'un contenu dense dans certaines vacuoles (3)





500 nm

500 nm

Cellule	Vacuolisation moyenne (degré 3 sur 5), nombreuses travées cytoplasmiques
Plastes	Souvent de grande taille (1), contenant de nombreux grains d'amidon, stroma dense, système membranaire peu développé
Mitochondries	Différenciées (2,3), présentant parfois des crêtes dilatées en périphérie (3)
Appareil de Golgi	dictyosomes souvent diffus (4,5,7), membranes des saccules peu visibles, fibres intersaccules denses (4,5)
Reticulum endoplasmique	abondant, souvent en longues travées interconnectées délimitant des territoires cytoplasmiques (5), souvent rugueux ; néoformation de re à partir de l'enveloppe nucléaire (2, flèche)
Ribosomes	Abondants (2), groupés en petits amas ou polysomes (5,6)
Noyau	Forme souvent invaginée, créant des « enclaves » cytoplasmiques (7), contenant parfois des mitochondries. Nucléoplasme clair, peu de chromatine condensée
Autres observations	Présence de microtubules à proximité ou au contact de l'enveloppe nucléaire (2,6,8), suggérant la mise en place d'un fuseau mitotique Nombreux peroxyosomes (7,8) en formation

4.1. Analyse ultrastructurale des cellules à l'état stationnaire

Les cellules BY-2 récoltées au moment du repiquage sont des cellules âgées de 7 jours et correspondent à l'état stationnaire induit après 7 jours de culture. A ce stade les cellules sont en début de carence trophique (carence en phosphate et saccharose notamment). Ces cellules ont un volume cytoplasmique important (**Planche I**). Elles apparaissent métaboliquement actives, au vu des nombreuses **mitochondries**, même si les crêtes sont assez peu développées, et du réticulum endoplasmique fortement développé à travers l'ensemble du cytoplasme. Ce dernier apparaît très dense et contient de nombreux ribosomes dispersés. Les **plastés** sont caractérisés par une forme en cloche qui indique une forte réduction du volume plastidial au profit d'une augmentation de la surface d'échanges entre les plastés et le cytoplasme. La majorité d'entre eux possèdent peu d'amidon et ont un système membranaire développé. Les **dictyosomes** sont concentrés dans certaines zones du cytoplasme et sont caractérisés par de nombreux saccules, avec des fibrilles intersaccules très denses aux électrons. Ces fibrilles sont des marqueurs de la différenciation de l'appareil de Golgi. Ils sont indispensables à l'association des saccules entre eux et à leur bon fonctionnement (Staehelin et al., 1990). Nous avons également identifié plusieurs corps multivésiculaires contenant des particules sphéroïdes denses aux électrons (Tse et al., 2004). La présence de microtubules alignés le long de la membrane plasmique matérialise la présence du cytosquelette qui constitue une cage autour de la cellule (Granger and Cyr, 2000; McCutcheon et al., 2001)) et dont le rôle consiste à maintenir l'architecture cellulaire (cliché I.6).

4.2. Analyse ultrastructurale des cellules en présence d'auxine

L'observation des cellules traitées pendant 12 h avec 10 μM d'AIA, (**Planches II et VII**), ou pendant 24 h (**Planche III**) révèle que ce traitement entraîne des changements très rapides de l'organisation ultrastructural.

Les changements les plus remarquables concernent le **système endomembranaire** (réticulum endoplasmique et Golgi). Après 12 h de traitement à l'auxine, les dictyosomes apparaissent plus ou moins destructurés selon les cellules, et la plupart des travées de réticulum endoplasmique ont disparu. Par contre, de nouveaux éléments de réticulum endoplasmique se forment à partir de l'enveloppe nucléaire. Après 24 h de traitement l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique semblent avoir recouvré une organisation "typique". Les dictyosomes commencent par exemple à s'organiser en saccules et à rentrer dans une phase de maturation protéique accompagnée d'une activité sécrétoire (vésicules de sécrétions autour des dictyosomes).

Après une carence supplémentaire de 24 h et le rajout d'auxine pendant 12 h (**Planche VII**), le réticulum endoplasmique se développe largement à partir de l'enveloppe nucléaire, et présente souvent des dilatations (cliché VII.2) ou des circularisations qui isolent des territoires cytoplasmiques (cliché VII.5). On observe souvent ce phénomène lors de l'autophagie des cellules en cours de vacuolisation. En comparant néanmoins ces cellules à d'autres carencées pendant 24 h (qui présentent une forte vacuolisation, **Planche V**), nous constatons plutôt un phénomène de synthèse de cytoplasme que de vacuolisation.

Les plastes évoluent à la suite du repiquage des cellules dans un milieu contenant de l'auxine. Ils passent par une phase de transition, 12 h après l'ajout d'auxine : leur teneur en amidon semble augmenter à 12 h, puis rediminuer après 24 h ; leur forme devient plus massive à 12 h puis reprend à 24 h l'aspect "en cloche" observé à l'état stationnaire ; le système membranaire interne régresse à 12 h puis se développe à nouveau (clichés II.1 et III.1).

Les mitochondries, aussi nombreuses qu'au moment du repiquage, possèdent également un stroma dense, un compartiment membranaire interne peu développé. Après 12 h de traitement, elles sont caractérisées par des expansions des membranes limitantes, qui traduisent des fusions ou des bourgeonnements de mitochondries (cliché II.3). Après 24 h de traitement, quelques mitochondries sont en cours de division (cliché III.4).

La présence de microtubules dirigés perpendiculairement à la membrane plasmique, permettrait de guider les vésicules golgiennes jusqu'à celle-ci, par exemple vers les rosettes qui synthétisent la cellulose constituant la paroi (Lloyd, 2006) (cliché II.6).

Après un rajout d'auxine pendant 12 h, la présence de nombreux microtubules qui s'ancrent à l'enveloppe nucléaire ou qui s'organisent autour du noyau (cliché VII.8) suggère que certaines cellules se préparent à se diviser.

Après 24 h de culture en présence d'auxine, nous observons que dans certaines cellules l'enveloppe nucléaire est peu visible et que dans d'autres de nombreux microtubules forment le fuseau mitotique (cliché III.7). Tous ces éléments indiquent que certaines cellules seraient à un stade pré-mitotique ou en cours de division.

4.3. Analyse ultrastructurale des cellules en carence d'auxine

Les cellules carencées en auxine jusqu'à 36 h après le repiquage (**planches IV à VI**) sont caractérisées par un accroissement du volume vacuolaire qui accompagne l'augmentation de la taille cellulaire et la concentration du cytoplasme, principalement autour du noyau et contre la membrane plasmique.

Dans ces cellules, les **plastés** ont un stroma dense et un système membranaire interne peu développé (clichés VI.1 et VI.2), et au cours de la carence, ils deviennent de plus en plus amylières.

On constate également que dans ces conditions, le nombre de **mitochondries** diminue très rapidement (dès 12 h de carence), alors que leur système de crêtes est de plus en plus abondant (cliché IV.2). Ces mitochondries sont également caractérisées par des formes flexueuses avec des isthmes (cliché IV.2) ou des invaginations de leur système membranaire interne (cliché VI.4). La diminution du nombre de mitochondries semble être un phénomène réversible, car le rajout d'auxine à des cellules carencées pendant 24 h, s'accompagne d'une augmentation du nombre de mitochondries.

Le compartiment endomembranaire ne semble pas subir une profonde réorganisation, à la différence des cellules cultivées en présence d'auxine. De nombreux polyribosomes (dont le nombre diminue après 36 h de carence) sont associés aux membranes du réticulum endoplasmique qui est très développé dans le cytoplasme. Il se dilate (clichés VI.3 et VI.5) pour former des vésicules au contenu dense (clichés IV.3, IV.4 et IV.5) (clichés VI.3 et VI.4) qui se déversent dans l'espace périplasmique (cliché IV.5 :

flèches) ou dans la vacuole (clichés IV.2 (flèche), IV.4 et IV.5). Il donnerait également naissance aux corps multivésiculaires dont le nombre semble croître avec la carence.

La vacuole contient d'ailleurs un composé vraisemblablement protéique, dispersé de façon homogène (clichés V.3, V.4, et V.8) et qui devient de plus en plus dense au fur et à mesure que la carence auxinique se prolonge (clichés IV.2, V.4, VI.3).

L'appareil de Golgi est peu actif avec des saccules aux contours bien définis, ce qui sous-entend qu'il n'est probablement pas en phase de sécrétion active. L'intérieur dense aux électrons, prouve une forte maturation protéique à partir desquelles bourgeonnent des vésicules golgiennes qui assurent le transit des protéines de la partie *Cis*-golgienne vers la partie *Trans*-golgienne (cliché VI.5).

Enfin au cours de la carence, l'enveloppe du **noyau** présente, fréquemment des invaginations (cliché IV.2) de plus en plus profondes, ce qui traduirait le besoin croissant d'augmenter la surface d'échange avec le cytoplasme.

5. Discussion

5.1. Action de l'auxine sur la division cellulaire

5.1.1. Intérêts des expériences menées sur une longue ou courte cinétique

L'étude de l'effet des hormones végétales sur l'entrée en mitose des cellules en culture, a souvent été réalisée sur plusieurs jours de traitement, à l'exception des suspensions cellulaires qui sont synchronisées pour suivre le cycle cellulaire pendant les premières 24 h après avoir levé le blocage du cycle.

Les expériences reposant sur la culture cellulaire se déroulent généralement entre 4 j (cellules de tabac) et 25 j (cellules d'Acer) après le traitement auxinique (Everett et al., 1981; Zazimalova et al., 1995; Chen et al., 2001; Chen et al., 2001; Petrasek et al., 2002; Polit et al., 2003; Campanoni and Nick, 2005; Chen et al., 2006). Or à long terme, l'auxine est métabolisée par les cellules dont le nombre augmente exponentiellement, rendant difficile la relation entre les effets observés et la dose d'auxine. En outre l'un des avantages de l'étude en temps court est l'analyse de l'effet de l'auxine sur la première entrée dans le cycle cellulaire, ce qui est impossible sur plusieurs jours, où les cellules ont déjà accompli n cycles cellulaires et sont complètement désynchronisées.

Dans le cadre de nos études, une étude préliminaire du comportement physiologique des cellules BY-2 face à un traitement auxinique montrait plusieurs changements notables pendant les 2 premiers jours (Renaudin et Laizet, non montrés). Ce travail a conduit à caractériser, dans le cadre de cette étude, des réponses cellulaires à l'auxine sur une durée inférieure à 24 h de traitement. Ces réponses concernent l'entrée en division cellulaire, la régulation de la turgescence et du contenu osmotique.

5.1.2. Action du traitement auxinique sur la division cellulaire

L'auxine induit rapidement la division des cellules BY-2 et la maintient sur plusieurs jours. Les cellules rentrent dans le cycle cellulaire pendant le 1^{er} jour de traitement, et y restent pendant 5 jours (**Figure 35A**). Les mitoses apparaissent vers 15 h après l'ajout d'auxine (**Figure 36**), ce qui est en accord avec les données de la littérature qui montrent une reprise de l'activité mitotique après 12 à 21 h de culture (Nagata et al., 1992; Ishida et al., 1993; Mizoguchi et al., 1994; Tena and Renaudin, 1998).

Pour étudier une réponse spécifique induite par l'auxine dans les cultures cellulaires, le moyen le plus facile est de rajouter de l'auxine à des cellules carencées plus ou moins longtemps (souvent 48 h) et de suivre leur comportement cellulaire.

Bien que le seuil minimal d'auxine indispensable à la survie cellulaire ne soit pas connu, on observe que la viabilité et la capacité des cellules BY-2 à revenir dans le cycle cellulaire, suite à l'ajout d'auxine, diminue si la durée de la carence augmente (Renaudin, 2004). Par exemple, le lavage des cellules pendant une heure, qui permet notamment d'enlever l'auxine résiduelle, suivi d'une carence d'auxine de 4 jours, entraîne une diminution du taux de viabilité de 50% (résultats non présentés).

Après le rajout d'auxine, nous avons pu constater une synchronisation partielle et rapide des cellules BY-2. Le taux de mitoses atteint 10%, alors que pour une culture non synchronisée (où toutes les cellules sont engagées dans le cycle cellulaire) il est de l'ordre de 6%, selon les données de Nagata (soit la durée de la mitose, 1 h, divisée par la durée du cycle, 15 h) (Nagata et al., 1992). Après cette courte phase de synchronisation, dès le cycle cellulaire suivant, les cellules perdent leur synchronisme.

Ce niveau de synchronisation est relativement faible devant celui que l'on peut obtenir avec les cellules en les traitant par l'aphidicoline, qui bloque l'action de l'ADN polymérase α , et entraîne une synchronisation, de 50 à 80% des cellules (Nagata et al., 1992). Le fait, qu'au moment du repiquage, les cellules soient en G0 (phase de quiescence atteinte après 7 jours de culture) expliquerait le faible taux de synchronisation des cellules BY-2 arrivées en phase M (**Figures 34C et 35B**), ce qui serait davantage dû à la carence trophique qu'hormonale. De plus il a été observé que l'augmentation de la durée de la carence auxinique dans un milieu neuf, permet une plus grande synchronisation des cellules, sous l'effet du rajout d'auxine. La synchronisation serait causée par l'auxine plutôt que par la combinaison du rajout d'auxine et de nutriments, comme c'est le cas quand le rajout d'AIA s'effectue après le lavage des cellules.

L'action potentielle de l'auxine sur l'arrêt des cellules à une étape particulière du cycle cellulaire est discutée dans la littérature (Renaudin, 2004). Dans les années 80, la synchronisation partielle des cellules carencées, auxquelles on rajoute de l'auxine, était interprétée comme la conséquence d'un arrêt des cellules en G1 induit par la carence (Nishi et al., 1977). A partir de l'étude des effets du 2,4-D sur les cellules du méristème de *Vicia faba*, Polit et ses collaborateurs proposent que le 2,4-D ne régulerait pas la division cellulaire en interagissant avec des points de contrôle spécifiques de cycle. Il jouerait un rôle permissif en régulant le déroulement au travers du cycle cellulaire, par exemple en agissant sur des systèmes métaboliques essentiels à la prolifération et à l'entrée en phase M, mais qui seraient inhibés périodiquement. Pour ces auteurs la carence en auxine entraîne un arrêt des cellules en phase G2 (Polit et al., 2003). Alors que pour Koens et ses collaborateurs (Koens et al., 1995), la carence en auxine empêche les cellules de passer en phase M. et pour Everett (travaillant sur les suspensions cellulaires d'érable (*Acer pseudoplatanus* L..), les cellules carencées en auxine ne s'arrêtent pas à une phase particulière du cycle (Everett et al., 1981). Cette dernière hypothèse est désormais privilégiée (Renaudin, 2004).

5.1.3. Régulation de la division cellulaire en fonction de la concentration en auxine

5.1.3.1. Concentration efficace d'auxine intracellulaire ou extracellulaire ?

L'intensité des réponses induites par l'auxine est liée à la sensibilité des cellules BY-2 à l'auxine exogène, alors qu'elles sont indépendantes d'un apport en cytokinines exogènes, qu'elles produisent en quantité suffisante (Zazimalova et al., 1995; Redig et al., 1996; Zazimalova et al., 1996).

La présence d'un récepteur extracellulaire (ABP1) et d'un récepteur intracellulaire (TIR1), pose le problème de la coordination de deux voies de signalisation, où le rôle de l'auxine extracellulaire (apoplastique ou dans le milieu de culture dans le cas des suspensions cellulaires) serait aussi important,

que l'auxine intracellulaire (Jones et al., 2004). Les interrogations portant sur l'action extra- ou intracellulaire de l'auxine restent encore sans réponse et sont discutées ici.

Dans les suspensions cellulaires, la concentration optimale d'auxine extracellulaire est dépendante de la densité cellulaire, de la période et de la nature de la réponse observée, dans des conditions nutritionnelles et environnementales particulières (Renaudin, 2004). La variation de tous ces paramètres peut entraîner un comportement cellulaire différent pour une même concentration d'auxine exogène.

Par exemple, la faible densité cellulaire au moment du repiquage, accroît la sensibilité des cellules à l'auxine. Dans les exemples précédemment cités, l'inoculation des cellules au moment du repiquage est d'environ $4 \text{ à } 5 \cdot 10^4$ cellules/mL, comme dans nos expériences. Cependant Campanoni et Nick, qui ont étudié l'influence des 3 auxines (ANA, AIA, 2,4-D), sur la division et l'expansion des cellules de tabac (VBI-0), repiquent à $6 \cdot 10^5$ cellules/mL, pour des cultures cellulaires menées sur 3 semaines (Campanoni and Nick, 2005). Avec les même suspensions cellulaires, Zazimalova et Petrsek, ensemencent un milieu liquide à partir de cals, à une densité cellulaire entre $5 \cdot 10^3$ et $1 \cdot 10^5$ cellules/ mL. En outre Chen, qui travaille avec le modèle des cellules BY-2, repique à $1 \cdot 10^5$ cellules/mL, soit le double par rapport à nos inoculations (Chen et al., 2001; Chen et al., 2001; Chen et al., 2006). Chaque équipe montre de sensibles différences dans le comportement des cellules face à l'auxine, mettant en évidence l'importance de la densité cellulaire au moment du repiquage.

Les expériences menées par le groupe de Zazimalova (Zazimalova et al., 1995; Petrsek et al., 2002) sur les cellules VBI-0 de tabac, soulignent également l'importance de la densité cellulaire et de la teneur en auxine dans les cellules. Comme pour nos cellules BY-2 (résultats non présentés), une dilution trop importante de l'inoculum entraîne leur mort cellulaire, alors qu'une concentration beaucoup plus forte que celle optimisée pour les cultures en batch, entraîne un raccourcissement notable de la phase de croissance exponentielle (Zazimalova et al., 1995). Les auteurs rapportent aussi que la culture sans auxine (et sans lavage) n'inhibe que partiellement les divisions cellulaires et la croissance, résultant en une plus faible biomasse finale. Ils en concluent alors que leur « inoculum était probablement assez important pour conserver la teneur intracellulaire d'auxine au dessus d'un certain seuil critique » (Zazimalova et al., 1995).

Le lavage des cellules avant le repiquage est également un élément important, afin que la réponse cellulaire observée soit spécifique de la concentration d'auxine ajoutée. Et non pas d'une accumulation avec l'auxine résiduelle du milieu précédent. Il a d'ailleurs été observé, au cours de nos expérimentations, qu'en absence de lavage, les cellules se divisaient au bout de 24 h de culture même en absence de rajout d'auxine (de l'ordre de 4%). Ce lavage des cellules n'est pas systématique, dans les travaux présentés sur les suspensions cellulaires. Par exemple, Campanoni ne réalise aucun lavage préalable à ces traitements auxiniques, alors que Chen et ses collaborateurs, oui (Chen et al., 2001; Chen et al., 2001; Chen et al., 2006).

Pour faire varier le contenu intracellulaire en auxine deux stratégies sont souvent employées. D'une part, le transport d'auxine peut être inhibé grâce à l'utilisation de phytotropines (e.g. NPA) (Vesper and Kuss, 1990) (Zazimalova et al., 1995; Zazimalova et al., 1996; Petrsek et al., 2002; Petrsek et al., 2003),

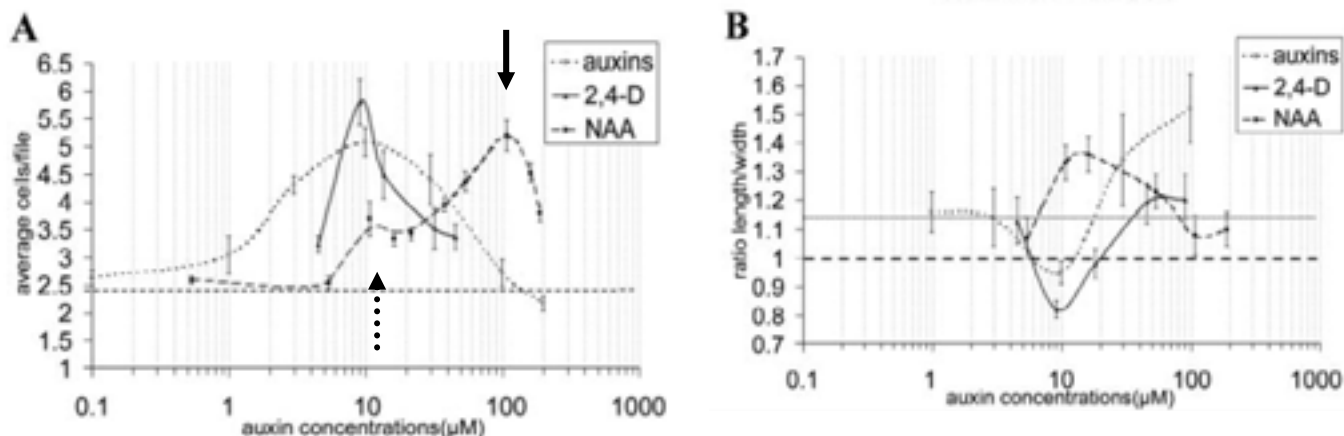


Figure 49. Réponse effet-dose de la division cellulaire (A) et de l'élongation cellulaire (B) par rapport à différentes concentrations de 2,4-D et d'ANA

La courbe en pointillés indique le niveau basal de division cellulaires en absence d'auxine exogène.

'auxins' correspond au traitement ANA+2,4-D dans des proportions 1:1

Les auteurs rapportent que l'AIA aurait les mêmes effets que l'ANA.

Campanoni 2005

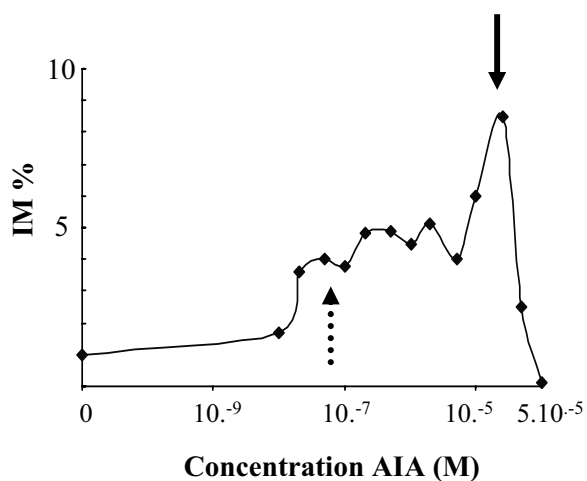


Figure 50 Réponse effet-dose de la division cellulaire en fonction de la concentration en AIA exogène (résultats supplémentaires de la figure 7)

Les flèches correspondent aux deux pics d'indice mitotique induits par l'auxine. Les mêmes flèches sont indiquées sur la figure 49.

ce qui empêche l'auxine de sortir par les transport d'efflux, l'emprisonne à l'intérieur de la cellule, et a pour conséquence d'augmenter sa teneur endogène.

D'autre part l'ajout de fortes concentrations d'AIA exogène peut être aussi une approche utilisée (Zazimalova et al., 1995; Zazimalova et al., 1996). Dans les deux cas une forte augmentation de la concentration d'AIA libre entraînerait un rétro-contrôle négatif sur la biosynthèse de l'AIA et une augmentation de sa conjugaison (Ljung et al., 2001), pouvant alors perturber la réponse cellulaire à long terme, mais cette action n'a pas de conséquences sur les effets de l'auxine observés en temps court.

L'ensemble de ces données extraites de la littérature indique qu'il n'est pas aisé de découpler les effets cellulaires de l'auxine extracellulaire de ceux de l'auxine intracellulaire et ainsi de connaître les différentes voies de signalisation auxinique.

5.1.3.2. Action de la concentration d'auxine ajoutée dans le milieu

L'action de l'auxine sur l'entrée en division des cellules BY-2 est dépendante de la dose d'auxine et suit une courbe effet-dose en forme de cloche, en fonction de la concentration en auxine ajoutée dans le milieu. Ces résultats sont en accord avec ceux de Chen et ses collaborateurs, où le nombre de cellules BY-2 suit également une courbe effet-dose gaussienne après 4 jours de cultures (Chen et al., 2001; Chen et al., 2001). Les cellules VBI-0 réagissent de la même manière dans les expériences de Campanoni. (**Figure 49**) (Campanoni and Nick, 2005). La gamme de concentrations entre 0 et 10 nM d'AIA ne donne lieu à aucune division des cellules, ce sont des concentrations infra-optimales. La réponse des cellules BY-2 est optimale pour une gamme de concentrations entre 100 nM et 10 μ M (**Figures 38A et 39A**) alors que de plus fortes concentrations d'auxine n'induisent pas la division cellulaire rapidement. En effet la mesure de l'IM après 24 h en présence d'auxine, montre que les concentrations supérieures à 50 μ M, ont un effet supra-optimal sur l'entrée en division des cellules BY-2 (**Figures 38A et 39A**). Or les mesures de viabilité (résultats non présentés) et les divisions observées après 48 h de traitement, montrent que les cellules ne sont pas mortes.

La division des cellules BY-2 est maintenue au-delà de 24 h pour une gamme de concentrations d'AIA comprise entre 1 μ M et 100 μ M d'AIA (**Figures 38A et 39A**). Car pour des concentrations inférieures, les cellules sont retournées en G₀, après avoir effectué 1 seul cycle cellulaire et parce que les concentrations qui étaient supra-optimales à 24 h ne le sont plus, ou beaucoup moins, à 48 h (**Figures 38C et 39A**).

Après 48 h de traitement, les très faibles doses d'auxine ne sont plus efficaces et les doses supra-optimales sont moins inhibitrices : ces deux observations suggèrent ainsi un effet de dilution de l'auxine, causée par sa métabolisation par les cellules, dont le nombre augmente exponentiellement au cours du cycle de culture.

Mise à part l'action sur l'entrée en division cellulaire, l'auxine a également un effet sur la définition du plan de division des cellules. Il a été rapporté que le traitement par le NPA des cellules VBI-0, entraîne un retard de leurs divisions (de 6 à 7 jours), mais également un changement de leur plan de division d (voir Introduction paragraphe 2).

Le signal auxinique serait donc impliqué dans l'entrée en division cellulaire et dans la régulation des mécanismes qui y sont liés, tels que la définition de l'emplacement du phragmoplaste (Chen et al., 2001; Petrasek et al., 2002).

5.1.4. Influence de la nature de l'auxine sur l'entrée en division cellulaire

Les expériences de Campanoni et Nick (Campanoni and Nick, 2005) montrant l'action de l'ANA et du 2,4-D sur les suspensions cellulaires de VBI-0, suggèrent que de faibles concentrations d'ANA (pic à 10 μM) (**Figure 49B**) activent l'expansion cellulaire, alors que de plus fortes concentrations activent la division cellulaire (pic à 100 μM) (**Figure 49A**). Cependant le grandissement est mesuré par le ratio longueur/largeur et la division est mesurée au travers de la longueur de la chaîne de cellules, qui est défini par le nombre de cellules qui la compose. Ces réponses étant mesurées de façon indirecte, elles doivent être considérées avec prudence.

Toutefois les auteurs montrent que l'augmentation de la concentration d'ANA augmente la taille des chaînes cellulaires, suivant une courbe à double pic, mettant en évidence un premier niveau de sensibilité des cellules à une concentration d'ANA aux alentours de 10 μM (**Figure 49A** flèche en pointillé), et un deuxième niveau de sensibilité, pour un plus grand nombre de cellules, vers 100 μM (**Figure 49A** flèche en trait continu). En outre, les auteurs rapportent que l'AIA se comporte comme l'ANA (sans montrer les résultats) pour des concentrations de 10 μM (expansion et divisions) et 50 μM (divisions). En effet, lors de nos mesures d'indice mitotique en fonction de la dose d'AIA, nous constatons ce même effet en forme de courbe à double pic (**Figures 39 et 50**). Un certain nombre de cellules BY-2 sont sensibles à une concentration d'AIA de 100 nM, alors que la majorité des cellules se divisent en réponse à 10 μM . La différence de concentration optimale pour induire la division entre nos expériences et celles de Campanoni, peuvent s'expliquer par une densité cellulaire plus faible dans le cas des cellules BY-2 (5.10^4 cellules/mL contre 6.10^5 cellules/mL), ce qui serait en accord avec l'idée que la quantité d'AIA disponible par cellule est plus importante quand les cellules sont moins nombreuses.

Dans les études de Campanoni, le 2,4-D agirait uniquement sur la division cellulaire avec un optimum à 10 μM (pour cette concentration une diminution de la taille cellulaire est notable) (**Figure 49B**), or ces expériences ont été menées 6 jours après le traitement d'auxine. Nos résultats montrent qu'en temps court (24 h et 48 h) de telles différences ne sont pas visibles, l'ANA, l'AIA et le 2,4-D ayant une efficacité comparable sur l'activation de la division cellulaire, la réponse cellulaire dépend davantage de la concentration hormonale que de leur nature (**Figures 38 A et 38C**).

Cependant les petites différences que l'on peut remarquer (**Figure 35A**), telle qu'un indice mitotique à 8-9% qui est maintenu au bout de 3 j de traitement avec le 2,4-D mais qui redescend à 6% pour l'AIA, peuvent traduire une métabolisation plus rapide de l'AIA. D'un point de vu quantitatif, il est cependant difficile de comparer l'action de l'AIA et du 2,4-D car le transport, la métabolisation et l'affinité des récepteurs (ABP1 (Woo et al., 2002) et TIR1 (Dharmasiri et al., 2005)) varient entre les différentes auxines. Ce qui tend à montrer une efficacité accrue du 2,4-D par rapport à l'AIA.

Le suivi de **l'entrée en mitose sur 24 h** de traitement (**Figure 36, Figure 38A**), permet d'émettre l'hypothèse que dans le cas du 2,4-D et de l'AIA, il y aurait une concentration seuil d'auxine exogène

nécessaire pour induire la première division cellulaire (100 nM, dans nos expériences, **Figure 38A**). Au delà de cette concentration, les cellules potentiellement prêtes à recevoir le signal auxinique rentrent dans le cycle cellulaire.

Par contre, l'action de l'ANA sur la division cellulaire est différente (**Figure 38A**), dans le sens où les cellules rentrant en mitose sont de plus en plus nombreuses en fonction de la concentration croissante du traitement. Cette différence observée pourrait être due à l'absence de transporteur d'influx connus pour l'ANA, ce qui l'obligerait à rentrer dans la cellule par diffusion, donc plus faiblement que le 2,4-D et l'AIA, dont l'entrée est accrue par le transporteur AUX1. Cette hypothèse tend à montrer que ce sont bien les concentrations intracellulaires qui déclencheraient la mitose (Leguay and Guern, 1977).

Après 48 h de traitement le comportement cellulaire en fonction de la nature de l'auxine change. Dans le cas de l'AIA, seules les cellules traitées avec 10 µM se divisent encore (**Figure 38C**).

Alors que le 2,4-D, au contraire, induit encore des mitoses pour la même gamme de concentrations qu'à 24 h, avec une efficacité sensiblement identique, ce qui confirme sa plus grande stabilité métabolique.

Pour l'ANA, seul 10 nM ne permet plus d'entretenir la division cellulaire. En outre à 100 µM (supra-optimal sur la division des cellules BY-2 après 24 h), l'ANA entraîne davantage de cellules à se diviser que 100 µM d'AIA ou de 2,4-D (**Figure 38C**). Ceci est un élément supplémentaire pour soutenir l'hypothèse d'une entrée passive de l'ANA, et la concentration optimale pour induire une réponse division serait alors atteinte plus tardivement.

L'effet supra-optimal de l'auxine est proche de la toxicité induite par différentes auxines synthétiques (Grossmann, 2000), qui a notamment permis le criblage de mutants résistants à l'auxine (Leyser, 2002). Cette action semble relever du stress oxydatif (Kovtun et al., 2000; Kim et al., 2004; Pasternak et al., 2005), hypothèse par ailleurs soutenue par la récente découverte du gène FQR1, impliqué dans le stress oxydatif (Introduction) (Laskowski et al., 2002).

Il semble donc qu'à long terme (perceptible dès 48 h) on puisse détecter une sensibilité différente des cellules par rapport à la nature de l'auxine, principalement liée à sa métabolisation par les cellules. Notons que les études sur 24 h ont l'avantage de s'affranchir le plus possible de ce phénomène et de montrer l'action précoce, voire primaire de l'auxine sur l'entrée dans le cycle cellulaire. Ceci expliquerait les différences de comportement cellulaires rapportées par Campanoni.

5.1.5. Influence du milieu de culture sur la division cellulaire

Très peu de données montrant l'importance de la composition du milieu sur la division cellulaire sont disponibles. La majorité des travaux se focalisent sur certains composés, tels que le saccharose (Richard et al., 2002).

Nos expérimentations ont révélé que le milieu utilisé pour l'entretien des cultures cellulaires, n'est pas adapté pour analyser des réponses auxiniques sur les premières 24 h. Ce milieu contient des concentrations supra-optimales d'auxine mais également de minéraux et de sucres, pour induire la première entrée en division des cellules BY-2. Cette inhibition est levée lorsque l'on dilue le milieu de

culture (**Figure 42A**). Dans ces expériences (**Figures 42 et 43**), le lavage préalable des cellules a été réalisé dans le milieu MS, et les pourcentages indiqués (2%-12%-100%) prennent en compte les nutriments qui proviennent du milieu de lavage. Ceci explique que les cellules n'étaient pas carencées en nutriments pour la 1^{ère} mitose. Par contre dans l'expérience sans azote (**Figures 44 et 45**), les cellules ont été lavées dans le milieu dépourvu d'azote, avant d'être repiquée dans un milieu dépourvu ou pas d'auxine.

Dans un milieu ne contenant que 2% de milieu MS, les cellules rentrent en division 4 h avant celles qui sont cultivées dans le milieu MS-100% (dans un milieu intermédiaire, contenant 12% de MS, les cellules se divisent 2 h avant). Par contre, dans le milieu MS-2% la croissance cellulaire s'arrête au bout de 24 h, faute de nutriments, alors que la culture dans le milieu MS peut croître pendant 7 jours.

Dans le milieu sans azote, l'IM n'a pas été suivi en cinétique, il a été mesuré après 24 h de culture et révèle de même que les cellules carencées en azote, et traitées avec 10 μ M d'AIA se sont bien moins divisées que dans le milieu MS (**Figure 44A**).

L'ensemble de ces résultats indique que certains nutriments, composant le milieu MS sont présents en concentration supra-optimale pour induire la division cellulaire. L'étude de la carence de chacun d'eux devrait permettre d'identifier quels sont ces éléments. Par exemple, la carence en azote a notamment révélé qu'il serait un facteur limitant de l'entrée en division cellulaire. L'implication de ce composé dans la régulation du cycle cellulaire a déjà été montré dans la prolifération des nodules racinaires chez les légumineuses (Foucher and Kondorosi, 2000). En outre, au moment de la réplication de l'ADN, une grande quantité de purine est requise, et cette synthèse de novo, est l'une des principales voix d'assimilation d'azote par les cellules végétales (Smith and Atkins, 2002), ce qui expliquerait le besoin d'azote pour réaliser plusieurs cycles cellulaires.

5.2. Action de l'auxine sur le potentiel de turgescence et l'expansion cellulaire

5.2.1. Régulation du potentiel de turgescence par l'auxine

Le potentiel de turgescence est hautement régulé dans les cellules végétales et on considère qu'il est constant, excepté lors de la croissance cellulaire, où en parallèle du relâchement pariétale, il est le moteur de l'élongation de la cellule. Ce facteur a souvent été étudié dans les suspensions cellulaires, en appliquant des chocs hyper-osmotiques (en ajoutant du mannitol ou du saccharose) ou des chocs hypo-osmotiques (en repiquant les cellules dans de l'eau ou un milieu pauvre en solutés) (Pennarum and Maillot, 1988; Cazale et al., 1998; Felix et al., 2000). Dans tous les cas, la turgescence est régulée, soit en augmentant la pression osmotique intracellulaire, soit en la diminuant, pour atteindre un équilibre avec le milieu externe. Dans nos expériences nous observons le même phénomène : la dilution du milieu de culture a pour conséquence de faire diminuer la pression osmotique intracellulaire afin de maintenir la turgescence constante, quelle que soit la pression osmotique du milieu (**Figure 42B**). Par contre la turgescence est régulée différemment en fonction de la concentration en auxine, de telle sorte qu'en 24 h la turgescence des cellules augmente de 100%, 60% et 30% pour les cellules cultivées respectivement en

absence d'auxine, avec 25 nM et 10 μ M d'AIA (**Figure 42C**). Bien que ce soient des notions anciennes, peu de données sont accessibles sur la manière dont cette régulation est réalisée.

Nos résultats présentent de façon originale l'implication de l'auxine dans l'expansion cellulaire en étudiant la régulation de la turgescence par cette hormone.

Dans le cadre de cette étude, nous avons considéré qu'il y avait un équilibre hydrique entre le milieu de culture et le milieu interne des cellules, approximation déjà utilisée par d'autres auteurs, qui permet donc de calculer la turgescence en faisant la différence entre la pression osmotique intracellulaire et extracellulaire (Zimmermann, 1978; Kurkdjian and Guern, 1981; Pennarum and Maillot, 1988).

5.2.1.1. Effets de l'auxine sur le potentiel de turgescence au cours du temps

En **présence d'auxine**, la turgescence des cellules diminue pendant les 4 premiers jours suivant le repiquage (**Figure 35D**). Du 4^{ème} au 7^{ème} jour, la teneur en osmolites dans le milieu de culture diminue rapidement, créant une grande différence de pression osmotique. La turgescence augmente donc transitoirement, mais suite à sa régulation par la cellule, elle rediminue le 7^{ème} jour (**Figure 35C**).

En réponse à **une carence auxinique**, la turgescence des cellules BY-2 augmente très rapidement pendant les premières 48 h (d'un facteur 2,5) puis reste *quasi* stable jusqu'à la fin du cycle de culture (**Figure 35D**). Un suivi plus précis de la turgescence a permis de détecter cette augmentation, de façon significative, à partir de 9 h après le repiquage (**Figure 37D**). Cette augmentation est réversible, sous l'action d'un rajout de forte concentration d'auxine, le signal auxinique pousse les cellules à rentrer dans le cycle cellulaire, qui s'accompagne d'une diminution du potentiel de turgescence.

5.2.1.2. Action de la concentration d'AIA sur le potentiel de turgescence

La turgescence cellulaire est régulée par la concentration d'auxine appliquée dans le milieu, de telle sorte qu'en carence complète en auxine, la turgescence atteint une valeur maximale, qui diminue en fonction de la concentration en auxine, jusqu'à 10 μ M d'auxine pour laquelle aucune augmentation de pression n'est mesurée (**Figure 39B**). Cet effet de l'auxine est visible dès les premières 24 h, et s'accroît après 48 h de traitement, où les faibles concentrations d'auxines entraînent une plus forte augmentation de la turgescence, alors que pour des concentrations d'auxine autour de 10 μ M, la turgescence a tendance à diminuer par rapport au moment du repiquage.

Le traitement des cellules par une concentration d'AIA supérieure à 10 μ M croissante, provoque un effet inverse d'augmentation de la turgescence (**Figures 38B et 39B**), ce phénomène de concentrations "supra-optimales" a déjà été observé pour les divisions cellulaires.

Contrairement aux réponses mitotiques, qui suivent une courbe en cloche, en fonction de la concentration en auxine appliquée dans le milieu, nous n'avons pas obtenu de concentrations d'auxine suffisamment basses pour ne pas induire d'augmentation de la turgescence. Il est aussi possible que l'augmentation de la turgescence pour 0 nM d'AIA soit due au repiquage des cellules dans un milieu neuf

et non à la carence auxinique, ce phénomène ayant déjà été rapporté par Dracup et ses collaborateurs (DRACUP and GREENWAY, 1988).

Ainsi l'ensemble de ces résultats indique donc que la turgescence est très précisément régulée par la concentration d'auxine exogène, phénomène qui n'a encore jamais été rapporté dans la littérature.

5.2.1.3. Effets de la nature de l'auxine sur le potentiel de turgescence

Nous avons également analysé l'impact de la nature de l'auxine sur la turgescence cellulaire, et en sommes arrivés à la constatation que quelle que soit l'auxine (AIA, ANA ou 2,4-D), la turgescence diminue en fonction de la concentration hormonale exogène (**Figure 38B**). Après 48 h de traitement les trois auxines diminuent la turgescence, avec toutefois un effet plus fort pour le 2,4-D et plus faible pour l'AIA. Cette différence est aussi observée lors du rajout de 2,4-D ou d'AIA après 2 jours de carence (**Figure 35D**), où la diminution de la turgescence est plus rapide et plus efficace avec 0,9 μM de 2,4-D (70% pendant les 4 jours suivant le repiquage) qu'avec 10 μM d'AIA (15% en 4 jours suivant le repiquage).

5.2.1.4. Nature des changements moléculaires induits par l'auxine

*Changements biochimiques

Nous avons pu observer dans nos différentes expériences, que la turgescence des cellules est régulée de façon constante quelle que soit la dilution du milieu (**Figure 42C**), mais qu'elle varie en fonction de la concentration d'auxine, à cause notamment d'une diminution de la pression osmotique intracellulaire.

Dans le but de comparer les pressions osmotiques mesurées, et les teneurs intracellulaires en osmolites, une relation entre la concentration en mM des solutés et la pression osmotique exprimée en mOsm a été établie.

D'une part cette dernière, exprimée en bar dans nos résultats, peut être convertie en considérant qu'un potentiel hydrique de 1 bar correspond à une Osmolarité de 40 mOsm (Heyser and Nabors, 1981). D'autre part des tables de conversion existent pour chaque osmolite (Handbook of Chemistry and Physics), permettant de relier leur concentration avec leur osmolarité, cette conversion variant en fonction de l'espèce moléculaire et de sa concentration. Dans ces tables, l'osmolarité correspond au point de congélation de la molécule, divisé par la constante 1,86. A partir de ces tables nous considérerons en 1^{ère} approximation qu'1 mOsm correspond à 1 mM.

Dans le système cellulaire utilisé, l'auxine régule la turgescence en régulant la teneur intracellulaire de certains composés organiques (acides aminés et acides organiques) et inorganiques (anions et cations minéraux).

Le bilan des solutés intracellulaires ne semble pas exhaustif car la différence entre la pression osmotique et la somme des composés dosés indique que tous les osmolites intervenant dans les variations de cette pression induite par l'auxine n'ont pas été dosés. Par exemple, la détection lors des analyses RMN (pas HPLC) de pyroglutamate pourrait être affinée par d'autres analyses afin de voir l'implication de ce composé dans la réponse auxinique. Néanmoins, la comparaison du bilan de la teneur des solutés

Bilan	T=0	Milieu MS-2%			Milieu MS-100%		
		0 M AIA	25 nM AIA	10 µM AIA	0 M AIA	25 nM AIA	10 µM AIA
Somme AA (mM)	43,668	33,135	16,196	5,547	58,193	42,170	15,626
Somme AO (mM)	53,109	28,722	32,071	22,896	48,241	32,188	22,334
Somme sucres (mM)	0,999	2,710	2,595	1,714	4,268	5,219	3,708
Somme anions (mM)	58,688	50,694	41,910	43,059	147,067	68,973	55,681
Somme cations (mM)	125,231	96,979	81,407	65,334	149,903	88,777	82,053
SOMME totale (mM)	281,696	180,058	150,824	124,114	407,672	237,327	179,403
Pression osmotique interne (mOsmol)	352,529	295,500	203,735	168,441	539,529	411,941	299,500
Bilan charges ioniques (meq)	56,083	41,922	35,827	11,088	-9,809	10,851	10,257
Turgescence (mOsmol)	139,721	191,704	125,797	110,555	343,529	212,941	115,500

Tableau 4. Bilan des teneurs intracellulaires des composés dosés par HPLC variant en fonction du milieu de culture et de la dose d'AIA.

La pression osmotique interne, le bilan des charges ioniques et la turgescence sont également indiqués.

intracellulaires et de la pression osmotique interne (exprimée en mOsmol) montre une bonne corrélation entre les deux (**Tableau 4**). Les dosages réalisés sur les cellules BY-2 cultivées sous différentes conditions auxiniques et environnementales, offrent donc une bonne approche pour comprendre les mécanismes de régulation de la turgescence par l'auxine.

A partir de ces résultats nous avons pu en déduire que les principaux composés intervenant dans la régulation, par l'auxine, de la pression osmotique des cellules cultivées dans le milieu MS, seraient la glutamine, le malate les nitrates et le potassium.

Lorsque l'azote contenu dans le milieu MS est remplacé par d'autres ions, sans que la pression osmotique du milieu ne change énormément (**Figure 44B**), par rapport au milieu MS, on agit alors sur la nature des osmolites disponibles pour la cellule. On observe alors qu'elle régule sa turgescence en utilisant préférentiellement les ions chlorures (**Figure 45F**). L'implication de ces ions chlorures dans la turgescence cellulaire a déjà été montrée notamment dans les cultures cellulaires de Platane (Pennarum and Maillot, 1988).

Les études menées par Stevenson en 1981, sur la régulation de la turgescence des cellules dans le coléoptile d'avoine en expansion montrent l'importance du glucose, du saccharose, du NaCl ou du KCl comme source d'osmolites assimilables, lors de cette réponse induite par l'auxine (Stevenson and Cleland, 1981).

Par ailleurs les études réalisées sur les cultures cellulaires de tabac cv Wisconsin 38 (W38), mettent en évidence deux phénomènes de régulation de la turgescence, en comparant le comportement des cellules face à un choc hyperosmotique, provoqué par une forte concentration de NaCl ou de mélibiose. Ils observent, pendant les premières 24 h, une expansion cellulaire plus rapide en présence de NaCl que de mélibiose, qui s'accompagne d'une forte accumulation de solutés dans la cellule. Au bout de 24 h, l'expansion a atteint son maximum et les jours suivants, la teneur en solutés intracellulaire diminue, mais la turgescence reste constante (observée aussi dans nos expériences avec l'AIA figure 35D), grâce à une accumulation de glucose intracellulaire (DRACUP and GREENWAY, 1988). Ceci est en accord avec nos expériences dans le sens où la teneur en sucres pendant les premières 24 h n'intervient pas dans la régulation de la turgescence par l'auxine.

*Changements moléculaires :

En parallèle des régulations cellulaires, nos analyses moléculaires ont montré que l'auxine régulait transcriptionnellement certains gènes. L'expérience de cDNA-AFLP a permis d'isoler des étiquettes correspondant à la glutamine synthétase (GS) Nt-Gln1-5, un transporteur de nitrates de type NRT2 et une enzyme malique. La carence et 25 nM d'AIA activent l'expression de Nt-Gln1-5 dès 6 h de culture, alors que ce gène n'est pas exprimé en présence de plus fortes doses d'auxine (**Figure 62**).

Les glutamines synthétases jouent un rôle dans l'assimilation de l'ammonium couplé soit à la fixation de l'azote, soit à la réduction des nitrates soit, à la remobilisation de l'azote interne (Dubois et al., 1996). Elles catalysent la condensation de l'ammonium avec le glutamate, de façon dépendante de l'ATP, pour

produire la glutamine, qui fournit des groupements azotés (soit directement, soit via le glutamate) pour la synthèse de tous les composés azotés de la plante (Brugiere et al., 1999). Ces enzymes peuvent être plastidiales ou cytosoliques, ces dernières se retrouvant plutôt dans les tissus non photosynthétiques. Chez le tabac le gène *Nt-Gln1-5* code pour une GS cytosolique. Il est exprimé en particulier dans les cellules compagnes du phloème (Dubois et al., 1996), montrant une implication possible de la protéine dans le transport azoté. Chez les plantes où ce gène est éteint par une construction anti-sens, une diminution de la teneur en proline dans ces cellules a été détectée (Brugiere et al., 1999). Cependant dans nos expériences aucune variation significative de la proline en fonction de l'expression de *NtGln1-5*, ou de la concentration en auxine n'a été détectée (**Figure 43G**).

Le suivi de l'expression de *NtGln1-5* dans les cellules cultivées dans un milieu sans azote a montré qu'il était très faiblement exprimé, même en carence d'auxine (**Figure 48**). Ces résultats suggèrent que le gène *NtGln1-5* serait induit par l'augmentation de la teneur intracellulaire en nitrates, que nous observons en situation de carence auxinique dans le milieu MS (**Figure 48**). L'induction de ce gène serait responsable de la forte augmentation de la teneur en glutamine mesurée dans ces mêmes cellules.

L'entrée de nitrates dans les cellules chez les plantes supérieures est modulée par trois systèmes de transport regroupés sous 2 grandes classes : le système de transport de faible affinité pour les nitrates (LATS), qui semble constitutivement exprimé, et celui de forte affinité (HATS) (Touraine et al., 2001). Ce dernier est subdivisé en un système constitutif (CHATS) et un autre inductible (IHATS) possédant un Km pour les nitrates entre 10 et 100 μM (Aslam et al., 1993). Les deux familles de transporteurs de nitrates NRT1 et NRT2 appartiennent respectivement au système LATS et IHATS. Chez l'orge, les gènes codant pour un IHATS appartiennent à une famille multigénique d'une dizaine de membres et codant pour des protéines de 500 à 550 AA et possédant 12 régions transmembranaires. Chez le soja, l'expression du gène *GmNRT2* est régulée en fonction de la nature de la source d'azote, avec une plus forte induction en présence de nitrates. Cette forte expression s'accompagne d'une accumulation rapide (d'un facteur 4) de nitrates dans la cellule.

Ces résultats semblent contradictoires aux nôtres, car l'expression du gène NRT2 (étiqueté T4M32-2) n'est pas inhibée dans les cellules carencées en azote et en auxine, ce qui suggère que les nitrates n'agiraient pas sur sa transcription. Par contre, la présence d'auxine apparaît réprimer l'accumulation des messagers de ce gène à partir de 6 h de traitement (**Figure 48**). Il est donc possible que dans la famille IHATS de NRT2, il existe des gènes inductibles par les nitrates et d'autres par la carence en auxine. Ces nouveaux résultats illustrent la diversité fonctionnelle des transporteurs de nitrates.

Jusqu'à présent il a été montré que parmi les transporteurs de nitrates, seul *AtNRT1* (*CHL1*) était régulé par l'auxine. Ce gène code pour un transporteur de nitrates, mais il agit aussi sur l'influx d'ion chlorures (Guo et al., 2001; Guo et al., 2002; Guo et al., 2003; Guo et al., 2005). Le gène *AtNRT1* est exprimé dans les organes naissant et dans les régions en élongation de la racine et de la tige. Son expression est surtout localisée à la pointe des racines primaires et latérales ainsi que dans les jeunes feuilles et les boutons floraux en développement. Contrairement à l'action de l'auxine rapportée ici sur l'expression du gène *NRT2* dans les cellules de tabac, l'ajout de cette hormone induit l'expression d'*AtNRT1* en 30 min et particulièrement dans les tissus de forte activité mitotique. Les auteurs ne proposent

aucune hypothèse sur la nature de la relation entre ce transporteur et l'auxine. Récemment ils ont montré que l'ajout de nitrates stimulait la formation des racines latérales uniquement dans le cas où le transport acropétal de l'auxine n'est pas perturbé (Guo et al., 2005). Ce qui tend à montrer que l'initiation (divisions cellulaires) suivie de l'élongation (grandissement cellulaire) des racines latérales induite par l'auxine, passerait par l'entrée accrue de nitrates via la régulation hormonale de l'expression du transporteur NRT1.

En outre, nous avons pu montrer par un traitement des cellules au cycloheximide (CHX), que l'inhibition de l'expression de *Nt-Gln1-5* et de *NRT2* par de fortes concentrations d'AIA était levée par le CHX, ce qui tend à montrer une régulation indirecte de l'auxine sur la régulation transcriptionnelle de ces gènes (**Figure 48 et Figure 64**).

Les expériences de cDNA-AFLPs et de RT-PCR semi-quantitatives ont également révélé que l'expression du gène T2M34-3, correspondant à une enzyme malique, est induite pendant les trente premières minutes, suivant le repiquage des cellules, quelle que soit la teneur en auxine, puis diminue surtout pour les fortes doses d'auxine (10 et 100 μ M d'AIA) (**Figure 61**). Ce résultat est en accord avec l'augmentation de la concentration intracellulaire en malate observée en situation de carence auxinique.

Ces résultats tendent à montrer qu'en parallèle de l'augmentation de la turgescence cellulaire et d'une entrée accrue de nitrates, de très faibles concentrations d'AIA induisent l'expression de la GS. Les concentrations supérieures d'auxine, qui induisent la division cellulaire, sans que l'on observe d'augmentation de la turgescence, réguleraient négativement l'expression du transporteur NRT2 et de l'enzyme malique et n'activeraient pas l'expression de la GS.

L'ensemble de ces résultats met en évidence que la turgescence est étroitement modulée par la teneur en auxine au travers de la transcription de certains gènes associés à la régulation de la teneur intracellulaire de différents composés. *In planta*, les gradients d'auxine sont observés au sein d'un même organe, où différentes réponses cellulaires sont observées. Ces réponses sont liées, suivant les tissus, à l'expression différentielle de certains gènes, mais des paramètres physiques rentrent également en compte. Cela a, par exemple, été montré par Lintilhac et Vesecky en 1984, en appliquant une force de compression dirigée, les cellules, de types méristématiques, se divisent en suivant le même sens. Les plans de divisions sont alors tous perpendiculaires à la direction du champ de force (Lintilhac and Vesecky, 1984). Ces expériences nous permettent de supposer que dans un massif de cellules, les gradients d'auxine pourraient provoquer des gradients de turgescence qui participeraient à la polarité cellulaire, à la définition du plan de division, ou à la direction du grandissement cellulaire.

5.2.2. Régulation de l'expansion cellulaire par l'auxine

La surface cellulaire des cellules a principalement été mesurée à partir de photographies de microscopie photonique de cellules BY-2. Bien que les mesures aient été faites sur 200 cellules en moyenne, les suspensions cellulaires non synchronisées présentent une hétérogénéité de formes et de tailles, qui se répercutent sur le traitement des données. Malgré ces problèmes méthodologiques, nous avons pu caractériser l'effet de l'auxine sur l'expansion des cellules BY-2.

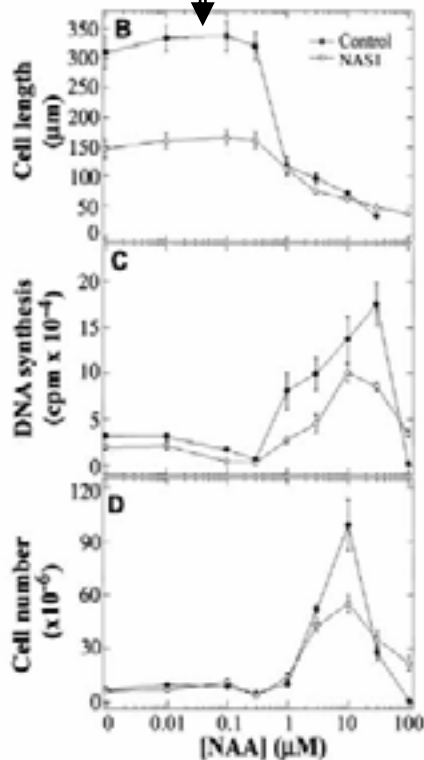


Figure 51. Réponse effet-dose de la suppression d'ABP1 dans les cellules BY-2 (NAS1) à l'auxine.

Réponse "élongation cellulaire" (A), synthèse d'ADN (B) et nombre de cellules (C) en fonction de la concentration en ANA, pour les cellules NAS1 (= cellules transformées antisensABP1) et contrôle, traitées pendant 12 h.

Chen, The plant journal, 2001

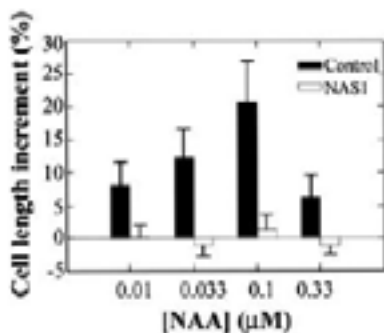


Figure 53. Induction de l'élongation des cellules BY-2 par l'auxine (après 4 jours de traitement).

L'augmentation de la taille cellulaire est montrée comme le pourcentage d'augmentation par rapport aux cellules observées sans auxine.

Chen, Genes and development, 2001

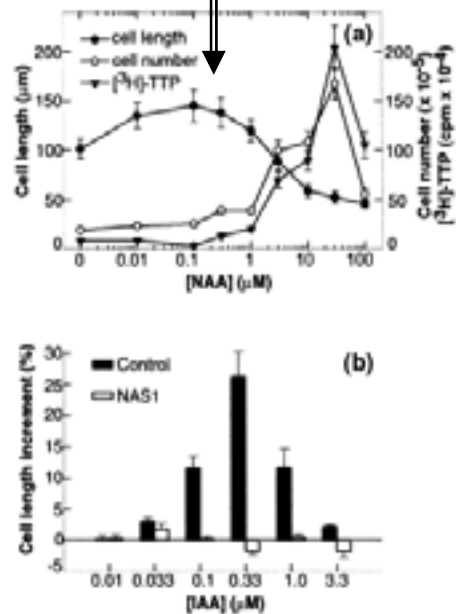


Figure 52. L'inhibition de l'expression d'ABP1 empêche l'élongation induite par l'auxine

Des cellules de sept jours ont été lavées dans un milieu sans hormone et transférées dans un milieu contenant les concentrations indiquées en auxine. après 4 jours la taille des cellules et le nombre ont été déterminés et la $[^3\text{H}]$ thymidine a été ajoutée. **a.** régulation de l'expansion cellulaire et de la division par l'auxine chez les cellules BY-2. cercles noirs: taille cellulaire, cercle blancs, nombre cellulaire, triangle noirs incorporation de thymidine.

b. L'expansion cellulaire induite par l'auxine se passe à de faibles concentrations d'AIA. L'augmentation de la taille cellulaire est montrée comme le pourcentage d'augmentation par rapport aux cellules observées sans auxine cellules NAS1= cellules transformées antisensABP1. (mesure sur 50 cellules)

Chen, The plant journal, 2001

5.2.2.1. Effet de la concentration d'auxine

Les faibles concentrations d'auxine (inférieures à 1 μM d'AIA) sont compatibles avec le grandissement cellulaire, qui diminue en fonction de la dose croissante d'auxine exogène (**Figure 39D**). Après 24 h de traitement, quelle que soit la teneur en auxine, toutes les cellules ont généralement grandi (**Figure 39B**). L'action de l'auxine n'est significativement visible qu'à partir de 48 h après le traitement auxinique.

Le fait que le plus fort grandissement cellulaire soit observé dans les cellules carencées en auxine, indiquerait que l'auxine endogène serait synthétisée en concentration suffisante pour permettre l'expansion cellulaire. Cette interprétation est soutenue par des dosages d'AIA réalisées dans des cellules BY-2, qui indiquent qu'après un repiquage avec 0,9 μM de 2,4-D, elle contiennent 50 nM d'AIA libre (Roef and Van Onckelen, 2004). Cette carence auxinique "insuffisante" expliquerait l'impossibilité d'avoir une absence de grandissement dans nos expériences. Comme pour la turgescence, l'expansion cellulaire est maximale en absence d'auxine exogène, puis diminue en fonction de la concentration d'AIA ajoutée au milieu. Cette gamme de concentrations est retrouvée *in planta*, dans les expériences de Philippar et coll. (Philippar et al., 1999). Stimulées par le gravitropisme, les cellules de la zone en cours d'élongation du coléoptile de maïs augmentent leur turgescence cellulaire. Le dosage d'auxine a révélé que ces cellules contiennent entre 95 nM et 290 nM d'AIA. L'élongation de cet organe semble donc être une réponse à une gamme de faibles concentrations d'auxine.

Comme pour la division et la turgescence, la taille cellulaire répond à une gamme de concentrations d'AIA spécifique, mais cette gamme peut varier suivant les expériences, la densité cellulaire de repiquage, et la souche de cellules et le moment de l'observation. Par exemple, dans les expériences de Campanoni et coll., 10 μM d'AIA, induisent l'élongation des cellules VBI-0 (Campanoni and Nick, 2005). Or la densité de repiquage est de $6 \cdot 10^5$ cellules/mL, et les observations sont menées 6 jours après le traitement, il semble donc que ces résultats n'expriment pas l'effet immédiat de l'auxine.

Pour ces mêmes auteurs la réponse expansion cellulaire suit une courbe en forme de cloche (**Figure 49**, même effet de AIA que de l'ANA), ce qui signifie qu'après 6 jours de traitement, il est possible d'avoir des cellules qui ne grandissent pas pour une très faible gamme de concentrations d'auxine. En outre, la mesure du grandissement cellulaire dans les travaux de Chen et ses collaborateurs indiquent que des cellules traitées pendant 12 h par l'ANA ne suivent pas de courbe en cloche (flèche sur **Figure 51**), alors que la réponse cellulaire au bout de 4 J suit une courbe de cette forme, en fonction de la concentration hormonale (flèche sur **Figure 52**) (Chen et al., 2001; Chen et al., 2001). Ces résultats montrent que les observations de Campanoni et les nôtres ne se contredisent pas, mais au contraire, révèlent une évolution de la concentration hormonale, due à sa métabolisation par les cellules, et confirment que les observations après 6 j de culture ne reflètent pas l'effet immédiat de l'auxine.

5.2.2.2. Effet de la dilution du milieu de culture et de la carence en azote

La dilution du milieu de culture a un faible impacte sur le grandissement cellulaire. Après 24 h de culture, de faibles différences apparaissent davantage en fonction de la concentration en auxine que par rapport au milieu de culture. En carence auxinique, les cellules grandissent autant dans le milieu très dilué (MS-2%), ou carencé en azote que dans le milieu MS normal. Ces observations sont en accord avec le fait que la cellule possède une grande capacité à réguler sa turgescence en fonction de son environnement.

En présence de 10 μM d'AIA les cellules cultivées dans le milieu MS-2% sont plus petites que les cellules cultivées dans le milieu MS, alors que les cellules dans le milieu MSN0, sont un peu plus grandes que celles dans le milieu MS. Ces observations tendent à souligner d'une part l'implication de la teneur en auxine sur la régulation de la taille cellulaire, et d'autre part l'importance de certains solutés dans cette action, en particulier l'azote.

Ainsi nos observations montrent que l'auxine contrôlerait la croissance cellulaire, la division et la turgescence cellulaire. Ces évènements seraient régulés de manière dépendante de la concentration en auxine, et nous amène à tenter de comprendre comment l'auxine régule la turgescence cellulaire qui se traduirait alors par le contrôle de la balance division-expansion cellulaire.

5.3. Relation entre turgescence-expansion cellulaire et turgescence-mitose

L'originalité de notre travail mené sur l'action de l'auxine au niveau cellulaire, est le suivi systématique de la régulation de la turgescence des cellules en réponse à cette hormone. L'intégration de toutes nos données nous amène à la constatation que lorsque les cellules se divisent sous l'action de fortes concentrations d'auxine, la turgescence des cellules est faible (environ 2 à 3 bar) (**Figure 54**). Inversement, quand les cellules grandissent, sous l'action de faibles concentrations d'auxine, la turgescence est importante (5 à 8 bar). Il n'a pas été observé de très grandes cellules avec une turgescence faible (**Figure 54**).

En outre, dans toutes les expériences nous pouvons associer à des cellules en division une faible turgescence et réciproquement, les cellules ayant les plus faibles turgescences sont en cours de division : que ce soit lors d'un suivi sur un cycle de culture normal (**Figures 34B, 34E, 35A et 35D**), ou sur une cinétique de quelques h après le traitement auxinique (**Figures 36 et 37B**).

Dans les études menées par Ishida et ses collaborateurs, les cellules BY-2 carencées en auxine pendant 3 j ont une taille cellulaire 4 fois plus grande qu'au départ (Ishida et al., 1993). Ces résultats corroboraient les nôtres, dans le sens où la turgescence cellulaire augmente d'un facteur 2,5 après 4 jours de carence auxinique, montrant une relation entre la régulation de la taille cellulaire et de la turgescence par l'auxine.

L'analyse du comportement cellulaire en fonction de la dose d'auxine montre que cette turgescence est précisément régulée par la dose d'auxine appliquée dans le milieu (**Figure 39D**). La taille des cellules, comme la turgescence, diminuent en continu en fonction de la concentration croissante d'AIA ajoutée.

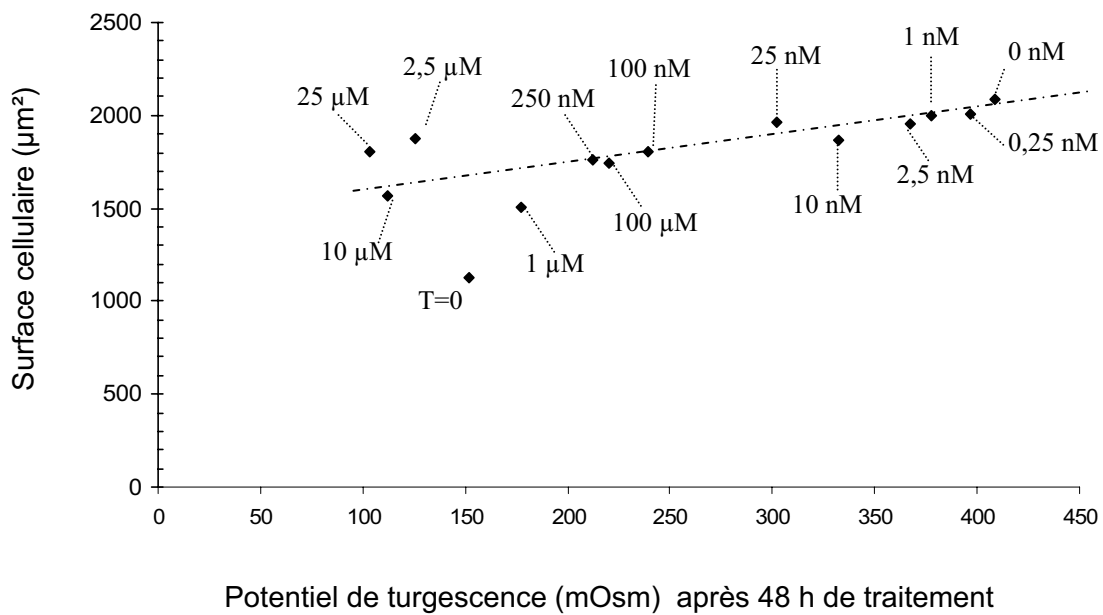


Figure 54. Exemple de relation entre la turgescence et la taille cellulaire

Ces mesures ont été réalisées au cours de l'étude des effets cellulaires en fonction de la dose d'auxine (Figure 39).

Toutefois, pendant les premières 24 h de traitement, la turgescence commence à augmenter différemment en fonction de la concentration d'auxine, alors que l'expansion cellulaire augmente significativement à partir de 48 h de traitement (comparer **Figure 39B et 39C**), durant lesquelles, la turgescence a continué d'augmenter. Pour des concentrations d'auxine induisant la division cellulaire, on observe en parallèle une diminution de la turgescence et de la taille des cellules qui est même inférieure à celles des cellules à l'état stationnaire (7 j), ceci est notamment dû à la division cellulaire, qui produit des "cellules filles" plus petite que les cellules "mères". Il est intéressant de remarquer que même pour une gamme de faibles concentrations d'AIA qui n'induisent pas la mitose, on observe une diminution de la turgescence par rapport à la concentration croissante d'auxine.

L'étude de l'impact de la nature de l'auxine sur le comportement cellulaire montre qu'une augmentation de la turgescence est observée pour les trois auxines testées (2,4-D, AIA ou ANA) en faibles concentrations. Pour des concentrations plus fortes (supérieures à 100 nM), elles poussent les cellules à rentrer en division cellulaire, phénomène qui s'accompagne d'une faible turgescence (**Figures 35A, 3D et Figure 38**). Ces gammes de concentrations sont en accord avec les analyses rapportées par Roef et Van Onckelen (sur les cellules BY-2) où l'ajout de 100 nM d'ANA entraîne l'élongation cellulaire, alors que 30 μ M d'ANA induit la division cellulaire (Roef and Van Onckelen, 2004).

Toutefois, dans nos expériences, on observe que le 2,4-D induit plus longtemps les divisions cellulaires et agit plus fortement sur la diminution de la turgescence. Ce phénomène est observé **figure 38**, mais aussi sur la **figure 35D**, où le rajout de 2,4-D diminue la turgescence de 70%, en 4 j de traitement, contre 20% après le rajout d'AIA (**Figure 35D**).

Les observations de Chen montrent que les cellules BY-2 cultivées pendant 4 j avec une faible concentration d'ANA (entre 50 et 150 nM) grandissent de 20%. De plus la surface de ces cellules est de $2666 \pm 343 \mu\text{m}^2$ (**Figure 52**), ce qui est en accord avec la taille cellulaire que nous avons observé après 2 j de traitement avec de très faibles concentration d'AIA (entre 0 et 10 nM) (**Figure 39C**) (Chen et al., 2001).

De même lors de l'expérience où les composés intracellulaires ont été détectés par RMN, les cellules traitées avec 0,9 μ M de 2,4-D, se divisent et ont une faible turgescence comparée à celle des cellules carencées (**Figure 41**).

En comparant l'évolution de la turgescence (**Figure 39B**) avec celle de la surface cellulaire (**Figure 39C**), nous pouvons émettre une corrélation entre ces deux paramètres et la dose d'AIA. Par exemple à partir de l'une des études de l'effet de la dose d'auxine sur le comportement cellulaire, nous avons pu exprimer la taille cellulaire en fonction de la turgescence (**Figure 54**). Nous pouvons constater que les grandes cellules ont une forte turgescence, et que les petites cellules, qui sont en cours de division, ont une plus faible turgescence, ce qui correspond respectivement à une gamme de faibles concentrations et de fortes concentrations d'AIA (**Figure 39**). Les cellules traitées avec 2,5 μ M, 10 μ M et 25 μ M d'AIA ont une taille légèrement supérieure aux autres, alors qu'elles ont la plus faible turgescence. Cette observation tend à montrer que les cellules qui sont rentrées dans le cycle cellulaire ont une faible turgescence, mais des tailles différentes à cause de la cytokinèse qui n'aurait pas encore eu lieu.

Il est intéressant de noter que la relation entre la turgescence et la division cellulaire existe également pour des concentrations supra-optimales d'auxine. Au bout de 24 h, pour des concentrations supérieures à 50 μM , la division des cellules est inhibée et la turgescence a augmenté, alors qu'après 48 h de traitement, 50 μM commencent à induire l'entrée en division des cellules, tandis que la turgescence commence à diminuer (**Figures 38 et 39**). Nous avons également observé que pour cette gamme de concentrations d'auxine, la taille des cellules augmente. Ces résultats sont en accord avec ceux de Petrasek, où le traitement par le NPA ou par de fortes dose d'auxine (2,4-D et ANA), en concentration 10 fois supérieure à celle du repiquage, stimule l'élongation des cellules de tabac VBI-0, tout en inhibant la division cellulaire (Petrasek et al., 2002).

Lors de l'étude de l'impact de la dilution du milieu de culture (MS-2% ;12% ;100%) sur le comportement cellulaire, nous avons pu constater que la diminution du potentiel de turgescence, après 24 h de traitement était une fois de plus observée en parallèle de la dose croissante d'auxine, et de l'entrée en mitose (**Figure 42C**). Lors de cette expérience, la turgescence a également été mesurée après 12h30 de traitement (résultats non montrés), et présentait déjà des différences en fonction de la concentration d'auxine (300 mOsmol dans le milieu MS-100% carencé en auxine et 175 mOsmol avec 10 μM d'AIA). Ces résultats apparaissent en accord avec la cinétique observée sur 24 h, montrant une augmentation significative de la turgescence à partir de 10-12 h après l'ajout d'auxine (**Figure 37B**).

Contrairement à la turgescence qui est constante, quelle que soit le facteur de dilution du milieu, la taille cellulaire présente des variations. Ainsi lorsqu'il n'y a pas d'auxine dans le milieu, les cellules grandissent de manière équivalente (quelle que soit le facteur de dilution du milieu MS). Par contre en présence de 10 μM d'AIA, les cellules dans l'eau sont plus petites que les cellules dans le milieu MS. Ceci peut s'expliquer par le décalage de la cinétique de mitoses. En effet, les cellules cultivées dans le milieu MS-2% se sont divisées entre 18 et 20 h après le traitement, et celles dans le milieu MS-100% se sont divisées vers 22-24 h après le traitement. Les mesures de surface cellulaire ayant été réalisées après 24 h de traitement, les cellules dans l'eau se seraient déjà divisées et auraient une taille plus petite, tandis que les cellules dans le milieu MS seraient en cours de division et auraient donc une taille plus grande. Il en est de même dans le milieu sans azote, où les cellules cultivées dans ce milieu, en présence d'auxine, se sont très peu divisées par rapport à celles dans le milieu MS. On constate une fois de plus, qu'en parallèle d'un faible taux de mitoses, la taille et la turgescence des cellules dans le milieu MSN0 sont plus grandes que dans le milieu MS (**Figure 44**).

A l'issue de ce travail plusieurs questions restent posées :

1-Est-ce le fait que les cellules soient en cours de division qui entraîne une diminution de la turgescence ou au contraire, une diminution de la turgescence jusqu'à un certain seuil est-elle nécessaire pour que la division cellulaire puisse être initiée ?

On peut alors supposer, comme A. Jones, un modèle où il y aurait deux voies de signalisation. Une voie, passerait par le récepteur ABP1, qui répondrait à de faibles concentrations d'auxine, et activerait l'expansion cellulaire, alors qu'une autre voie, passant par un autre récepteur (TIR1 ?) serait activée par de fortes concentrations d'auxine et induirait la division cellulaire. Campanoni et ses collaborateurs concluent également que des réponses cellulaires différentes sont observées en fonction de la dose d'auxine exogène, mais où les gammes de concentrations induisant l'une ou l'autre réponse varient en fonction de la nature de l'auxine (AIA, ANA ou 2,4-D).

Toutefois, en 1980, Lloyd et ses collaborateurs constatent que l'ajout de 2,4-D, à une concentration mitogène, dans des suspensions cellulaires de carotte, n'a pas d'effet inhibiteur sur l'expansion cellulaire. Les cellules grandissent jusqu'à un niveau normal (taille rencontrée dans la population en division), seulement quand il y avait suffisamment de 2,4-D pour coupler la croissance à la division cellulaire. Lorsqu'il bloque la synthèse d'ADN avec le FUdR, les cellules ne se divisent plus et grandissent. Cette expérience met en évidence que de fortes concentrations d'auxines n'empêchent pas le grandissement cellulaire.

De plus il remarqua aussi que l'effet mitogène du 2,4-D ne perturbait pas le cytosquelette qui supporte l'élongation cellulaire (microtubules en particulier) (Lloyd et al., 1980).

2-D'autre part, l'auxine agit-elle directement sur la turgescence ou sur la division cellulaire ?

En l'état actuel de nos connaissances, nous savons que l'auxine agit directement sur le relâchement pariétal, au travers notamment, de l'induction de la croissance acide des cellules. Elle semble également agir sur la turgescence efficace pour induire l'élongation cellulaire. En effet plusieurs études réalisées sur les jeunes tiges en élongation (hypocotyle, coléoptile...) ont montré que l'auxine agit à la fois sur le relâchement pariétal et sur le seuil de turgescence minimal pour induire le grandissement cellulaire (Okamoto et al., 1990; Nakahori et al., 1991; Iino et al., 2001). Ainsi la présence de fortes concentrations d'auxine augmenterait ce seuil (en agissant sur les propriétés pariétales et la pression osmotique intracellulaire) ce qui aurait pour conséquence une faible turgescence active, rendant possible la division des cellules. Inversement, la carence ou de faibles concentrations d'auxine en abaissant le seuil de turgescence, augmenterait la turgescence active et favoriserait ainsi le grandissement cellulaire.

En outre nos résultats indiquent que l'auxine agirait sur la turgescence des cellules en augmentant la pression osmotique interne. Nous avons d'ailleurs constaté que l'ajout de faibles concentrations d'AIA favorisent l'accumulation intracellulaire d'osmolites, augmentant alors la différence de pression osmotique de part et d'autre de la paroi, qui se traduit par une pression de turgescence accrue, appliquée sur la paroi. Cette réponse est visible à partir de 24 h de traitement, et précède la réponse "grandissement cellulaire", observée entre 24h et 48 h de traitement.

Les études menées par Stevenson en 1981, vont également dans ce sens : Ils ont observé que lorsque l'auxine induit l'expansion du coléoptile d'avoine, la turgescence des cellules augmentait et cette réponse nécessitait soit du glucose, du saccharose, du NaCl ou du KCl comme source d'osmolites assimilables (Stevenson and Cleland, 1981). Ces analyses *in planta*, appuient le fait que l'auxine module la

croissance cellulaire en parallèle de la turgescence et que ces phénomènes nécessitent la régulation de la pression osmotique intracellulaire.

5.4. Etude de l'ultrastructure des cellules BY-2

Les observations de microscopie électronique réalisées dans le cadre de cette thèse constituent une étude exploratoire, visant à déceler les changements ultrastructuraux des cellules BY-2 placées en carence d'auxine ou induites à la division cellulaire par l'ajout d'auxine. Ces observations sont essentiellement qualitatives et portent sur un nombre limité de cellules. Une étude morphométrique, destinée à pondérer les variations individuelles, aurait été trop lourde à mettre en œuvre à l'échelle de la microscopie électronique. En effet l'hétérogénéité des cellules est élevée et ne peut être moyennée comme dans les expériences physiologiques, sauf à observer individuellement de très nombreuses cellules. D'autre part en raison des grossissements élevés nécessaires pour caractériser les organites, le champ couvert est réduit, ce qui oblige également à multiplier les images.

Notre étude qualitative a toutefois été complétée par un contrôle de la taille des cellules et des organites dans les 7 échantillons analysés. Nous avons pu observer des différences significatives pour la taille des cellules, le nombre de mitochondries et le niveau de vacuolisation.

Pour ces observations nous avons mis en œuvre la technique la plus à même de rendre compte de la réalité de l'organisation ultrastructurale *in vivo* : une congélation ultra-rapide sous haute pression suivie d'une cryosubstitution (Dahl and Staehelin, 1989). Cette technique permet en effet à la fois de figer très rapidement les cellules et d'éviter ainsi les remaniements pouvant se produire dans le cas de fixation "lentes" en milieux aqueux (qui peuvent être très rapides), et de minimiser l'extraction de constituants au cours des étapes de déshydratations et d'inclusion. Il est ainsi possible de conserver des molécules solubles présentes dans les saccules golgiens, dans des vésicules membranaires ou encore dans les vacuoles. Cette technique préserve également les microtubules du cytosquelette, qui sont souvent difficiles à observer après fixation chimique. Elle nous a permis ainsi de mettre en évidence des différences importantes entre les cellules cultivées en présence ou en carence d'auxine, notamment au niveau du système endomembranaire et du compartiment mitochondrial.

Les cellules à **l'état stationnaire** sont métaboliquement actives : l'appareil de Golgi possède de nombreux saccules, le réticulum endoplasmique (RE) est très développé, les mitochondries sont nombreuses. La faible quantité d'amidon présente dans les plastes indique que les cellules s'adaptent à la carence nutritionnelle qui s'est installée après 7 jours de culture en consommant leur amidon. De plus les fibrilles intersaccules très denses indiquent une forte cohésion des saccules entre eux pour stabiliser le système endomembranaire golgien. Ce phénotype a déjà été décrit par Winicur et ses collaborateurs lors d'une carence auxinique de 4 jours (Winicur et al., 1998) (Staehelin et al., 1990). Or les observations que nous avons réalisées sur des cellules carencées en auxine pendant quelques heures ne montrent pas ce phénotype, suggérant que cet effet ne soit pas une réponse rapide à la carence en auxine.

Au cours des 24 h de culture **en présence d'auxine (Planches II, III, et VII)**, nous avons pu constater une synthèse de **cytoplasme**, que l'on visualise notamment par la diminution du volume vacuolaire relatif. Après une carence auxinique supplémentaire de 24 h (vue planche V), l'ajout d'auxine pendant 12 h entraîne une augmentation du volume cytoplasmique, indiquant que la vacuolisation des cellules carencées peut être inversée par l'ajout d'auxine.

Le transfert de ces cellules dans un milieu contenant de l'auxine entraîne au niveau de l'ultrastructure cellulaire des changements considérables notamment au niveau du **système endomembranaire** (RE et Golgi). La réorganisation des saccules golgiens et des travées du RE sous forme de vésicules est très remarquable après 12 h de traitement à l'auxine et implique une réorganisation de tout le système endomembranaire, qui est toujours observée après 24 h de traitement. Ces changements, qui apparaissent très rapidement après l'ajout d'auxine, illustrent la grande capacité des cellules à réagir rapidement aux conditions environnementales. Ce constat est en accord avec nos résultats physiologiques et métaboliques, étant donné que les premières réponses ont été observées entre 12 h et 24 h après l'ajout d'auxine. La situation présentée au travers de la planche II est paroxystique et représente une destructuration très intense du système endomembranaire. La grande hétérogénéité des cellules à ce stade se traduit par des réponses individuelles et graduelles des cellules, avec notamment une destructuration plus ou moins importante du système endomembranaire. Néanmoins l'ultrastructure des cellules cultivées pendant 12 h en présence d'auxine est tellement différente de l'état stationnaire qu'il serait intéressant d'observer des cellules récoltées entre 0 et 12 h afin de suivre les modifications intermédiaires.

En ce qui concerne l'évolution des **plastés** en présence d'auxine, nos observations à 24 h, correspondent à celles faites par Miyazawa et ses collaborateurs en 1999 sur des cellules BY-2 traitées pendant 2 j avec du 2,4-D (Miyazawa et al., 1999). Ces auteurs observent que les plastés restent dans un état indifférencié : ils n'accumulent pas d'amidon, ont un système membranaire développé et un rapport surface d'enveloppe/volume élevé. Ceci indiquerait une grande activité des enzymes qui se trouvent dans le stroma (GS ; GOGAT ; enzymes de synthèse d'amidon), ainsi que d'importants échanges avec le cytoplasme, permettant par exemple un déstockage de l'amidon sous forme de sucres solubles métabolisables par les cellules ou d'importants transferts de polypeptides entre le stroma et le cytosol (Yu et al., 1998).

Par contre nos observations à 12 h montrent que les plastés sont passés d'abord par une phase de synthèse d'amidon et de réduction de leur système membranaire, qui n'a pas été décrite jusqu'ici.

La diversité de la forme des mitochondries et l'aspect des crêtes **mitochondriales**, montrent que l'addition d'auxine stimule leur activité. En outre par rapport aux cellules cultivées pendant 24 h sans auxine (planche V), nous constatons que le rajout d'auxine pendant 12 h (planche VII), provoque une nette augmentation du nombre de mitochondries. Ceci indique notamment que la diminution du nombre de mitochondries est un phénomène réversible par l'ajout d'auxine. Ces observations portent à croire que l'auxine favoriserait une reprise de l'activité métabolique avec notamment une augmentation de l'activité respiratoire (Logan, 2006), ce qui pourrait stimuler le stress oxydatif.

Enfin l'observation à 24 h de quelques cellules se préparant à se diviser (disparition de l'enveloppe nucléaire, apparition de microtubules du fuseau mitotique) peut être mise en relation avec nos mesures d'indice mitotique, indiquant que la majorité (10 %) des cellules se trouvent en mitose après 22 h - 24 h en

présence d'auxine. L'observation de certaines mitochondries en cours de division, nous conforte dans cette idée, puisque ces organites fusionnent puis se divisent juste avant la cytokinèse, afin de redistribuer et d'assurer la continuité du génome mitochondrial dans les cellules filles (Sheahan et al., 2005; Logan, 2006).

En situation de **carence auxinique** (planches IV à VI), nous pouvons tout d'abord constater une vacuolisation importante des cellules qui s'accroît au cours du temps. Dans le cytoplasme, les plastes présentent une forte activité métabolique qui se traduit par une synthèse de grains d'amidon à partir des nutriments provenant du milieu de culture neuf dans lequel les cellules ont été repiquées pendant 12 h à 36 h. Dans les expériences de Miyazawa, les cellules BY-2 carencées en auxine pendant 2 j, présentent aussi de nombreux amyloplast, avec de volumineux grains d'amidon (Miyazawa et al., 1999). Dans notre étude cette réponse ne semble visible qu'à partir de 24 h (pas avant 12 h dans tous les cas). Le fait que l'ajout d'auxine fasse cesser l'accumulation d'amidon montre que c'est un phénomène réversible. L'accumulation d'amidon en carence d'auxine, ne s'accompagne pas d'une augmentation de la teneur intracellulaire en sucres (glucose et fructose) après 24 h de culture, que nous aurions pu déceler lors de nos dosages par HPLC. Il n'y a pas d'accumulation transitoire des sucres solubles dans la cellule mais stockage rapide sous forme d'amidon.

Alors que la variation de la quantité d'amidon est très étudiée, rares sont les données sur les variations du système membranaire interne des plastes, qui est développé dans cette condition de carence auxinique, sans que l'on puisse attribuer une signification fonctionnelle à cette expansion.

Les **mitochondries**, sont moins nombreuses qu'au moment du repiquage, qui pourrait s'expliquer par la fusion des mitochondries entre elles, bien que ce phénomène précède souvent la division mitochondriale lors de la mitose (Logan, 2006). Nous avons également observé que les crêtes mitochondriales étaient de plus en plus développées tout au long de la carence, ce qui permettrait notamment de gérer la production d'ATP en contrôlant la disponibilité en ADP (qui rentre dans le stroma par diffusion au travers de la membrane interne) ainsi que la quantité d'ATP synthétase et de pompes à protons (majoritairement présente au niveau des crêtes) (Logan, 2006). L'augmentation du nombre de crêtes permettrait de répondre à un besoin énergétique des cellules.

Le **compartiment endomembranaire** ne subit pas de réorganisation, contrairement à celui des cellules en présence d'auxine. L'appareil de Golgi semble au repos, avec une activité de maturation protéique, sans qu'il y ait la formation de vésicules de sécrétions. Par contre le RE se développe et se dilate par endroit pour former des vésicules sous la forme de corps multivésiculaires, ou de vésicules de sécrétion. Celles-ci se déversent soit dans l'apoplasme soit dans la vacuole, et ont un contenu dense et fibreux, vraisemblablement de nature protéique. L'appareil de Golgi ne semble pas être impliqué dans ces phénomènes sécrétoires qui ne feraient intervenir que le RE. Une telle observation a déjà été montrée lors de la synthèse de cellulase dans les épicotyles de pois en phase d'élongation en réponse à l'ajout d'auxine (Bal et al., 1976). La formation de vésicules prenant naissance à partir du RE et de manière indépendante de l'appareil de Golgi, sans que leur fonction ne soit clairement définie, ont également été mis en évidence par daSilva et ses collaborateurs (daSilva et al., 2004), dans les cellules de mésophylle de tabac.

Les observations montrant la sécrétion dans la vacuole d'un (ou des) composés de nature protéique, et l'augmentation du volume vacuolaire (Tse et al., 2004), appuient nos résultats physiologiques dans le sens

où nous avons observé que la carence auxinique s'accompagnait d'une augmentation de la turgescence. L'expansion cellulaire, qui peut être observée dans ces conditions, et que nous avons pu mesurer au cours de nos analyses de physiologie cellulaire et à partir des clichés de microscopie électronique, semble se traduire au niveau ultrastructural par l'apport d'un matériel nouveau à la paroi.

Au cours de la carence en auxine nous avons également pu remarquer une diminution progressive de la concentration de ribosomes. Au bout de 36 h de carence, les ribosomes restant assurent l'activité traductionnelle en s'organisant en polyribosomes, concentrés à certains endroits du cytoplasme.

Enfin en condition de carence auxinique, la morphologie du noyau va également changer, avec notamment l'enveloppe nucléaire qui s'invagine pendant toute la période de carence, suggérant d'importants échanges avec le cytoplasme.

5.5. Variabilités expérimentales

La culture cellulaire est un modèle simple, qui répond rapidement aux changements du milieu. Cette plasticité est un avantage, mais peut se révéler être un inconvénient pour la reproductibilité des résultats.

Comme cela a déjà été évoqué précédemment, les cultures cellulaires sont très sensibles à la densité de repiquage. Cette dernière peut être différente d'une expérience à une autre malgré les précautions prises.

Tout d'abord un certain volume de suspension cellulaire (âgée de 7 jours) est prélevé pour le lavage. Cette étape est très importante, car en absence d'auxine les cellules BY-2 ne se divisent pas, excepté si il y a une concentration en auxine résiduelle provenant du milieu de culture précédent. Dans nos expériences les cellules sont lavées pendant 1 h, dans un ballon de 5 L contenant 1L de milieu de culture neuf dépourvu d'hormone. Des expériences préliminaires de mesures de l'indice mitotique au moment du repiquage des cellules ont montré qu'1h était la durée optimale de lavage (30min n'étant pas suffisant et 2 h ne diminuant pas davantage l'indice mitotique). Nous avons également observé que la densité cellulaire dans le ballon de lavage était un facteur à prendre en compte, vu qu'une plus forte concentration de cellules engendrait un lavage de plus faible efficacité (les cellules se divisent davantage malgré l'absence de rajout d'auxine). Ensuite les cellules sont séparées de leur milieu de lavage par deux filtrations successives, enfin, la reprise des cellules et leur repiquage dans les erlens dédiés à l'expérience en elle-même, constituent en tout 5 étapes où des erreurs de prélèvement ou encore des pertes de cellules peuvent survenir.

Les conditions de culture sont également très importantes, telle que l'obscurité et surtout la température. Une chute brutale de la température stimule la division cellulaire puis rapidement entraîne la mort cellulaire. La préparation des milieux de culture est également un élément essentiel dans la culture cellulaire mais qui peut comporter des différences d'une préparation à l'autre. De faibles variations dans la préparation des solutions stocks de micro-, macro-éléments et de Fe-EDTA, sont autant de sources de changements qui peuvent induire des biais dans l'étude à court terme du comportement cellulaire.

Ces petites variations provoquent parfois des différences de réponse des cellules BY-2. Par exemple dans la **figure 35A** on peut voir que pendant les premières 24 h, les cellules carencées en auxine se sont divisées, alors que dans les autres expériences la carence auxinique inhibe la division. Cette réponse transitoire et rapide peut être causée par une sensibilité accrue des cellules à l'auxine résiduelle où à des changements environnementaux évoqués ci-dessus.

Un autre exemple de variations de la réponse cellulaire est la définition d'une concentration seuil minimale pour induire la division cellulaire. Le traitement avec 10 nM d'AIA induit la première entrée mitose (24 h de traitement) pour la majorité des cellules BY-2 (9%), comme le montre la figure 39A, alors que dans l'expérience précédente ce n'était pas le cas (**Figure 38A**). Etant donné que nous avons changé de souches de cellules BY-2 au cours de ce travail, nous pouvons supposer que la concentration seuil d'auxine requise pour induire les divisions cellulaire est différente d'une souche à l'autre, tout en incluant les biais inhérents aux conditions environnementales (effet densité cellulaire et qualité de l'AIA ...).

Cependant la multiplicité et la diversité de nos expériences, présentant des résultats complémentaires et non contradictoires, sont des arguments qui prouvent la validité de nos observations et de nos conclusions.

PARTIE 2 :
Modifications de l'expression de gènes, associées aux effets
cellulaires dépendants de la dose d'auxine
dans les cellules de Tabac

Tableau 5 Conditions expérimentales

Résumé des concentrations d'AIA choisies en fonction des réponses cellulaires induites et de la cinétique de prélèvements des cellules

Concentration en AIA (M)	Principal effet physiologique obtenu	Cinétique (Heure)
0	Expansion cellulaire Augmentation de la turgescence	0
		0,5
		1
1.10 ⁻⁹	Expansion cellulaire Augmentation de la turgescence	1,5
		2
		3
2,5.10 ⁻⁸	Mitose	4
1.10 ⁻⁵	Mitose	5
1;10 ⁻⁴	Retard d'entrée en mitoses	6
		8
		12

Tableau 6 Vérification de l'entrée en division des cellules utilisées pour les cDNA-AFLPs

L'efficacité de la réponse à l'auxine a été testée sur chacun des 5 lots de cellules utilisés pour les cDNA-AFLP. Chaque lot a été préparé un jour donné pour être incubé pendant des temps variant de 0 à 12 h en présence d'une concentration fixée en AIA (0M; 25 nM ou 10 µM d'AIA). Seuls les pics d'IM sont indiqués.

1er lot (0 M)		<i>IM à 24 h</i>	
0 M		0	
25 nM		6,8	
10 µM		7,1	
2ème lot (1 nM)		<i>IM à 24 h</i>	
0 M		0	
25 nM		0,8	
10 µM		8,8	
3ème lot (100 µM)	<i>IM à 22 h</i>	<i>IM à 24 h</i>	
0 M	0	0	
25 nM	5,9	2,9	
10 µM	7,4	4,5	
4ème lot (10 µM)		<i>IM à 24 h</i>	
0 M		0	
25 nM		4,9	
1 µM		7,4	
5ème lot (25 nM)		<i>IM à 24 h</i>	
0 M		0	
25 nM		6,8	
10 µM		8,8	

1. Etude globale du profil transcriptionnel de la réponse à l'auxine

La technique du cDNA-AFLP est basée sur l'amplification par PCR de fragments uniques d'ADNc, coupés par un couple d'enzymes de restriction, dont le choix a été optimisé pour obtenir de petits fragments spécifiques des ADNc générés, appelées des "étiquettes". L'analyse bioinformatique de l'intensité des bandes fournit des données semi quantitatives de l'expression des gènes. Cette technique améliorée à partir des travaux de Bachem et ses collaborateurs (Bachem et al., 1996), a déjà été décrite dans plusieurs articles (Breyne et al., 2002; Breyne et al., 2003).

1.1. Obtention d'étiquettes de gènes différentiellement exprimés selon la durée et la dose du traitement à l'auxine.

Notre étude du comportement physiologique et métabolique des cellules BY-2 a permis de caractériser finement les réponses cellulaires spécifiques obtenues au cours des douze premières heures suivant le repiquage et en fonction de la dose d'AIA ajoutée. Afin de caractériser le programme d'expression génétique intervenant dans la mise en place soit de l'expansion, soit de la division cellulaire, nous avons entrepris l'étude globale du profil transcriptionnel des gènes de réponse à l'auxine. Au cours d'une collaboration avec le laboratoire "Plant System Biology" à Gand (Belgique), nous avons ainsi réalisé une analyse par cDNA-AFLP.

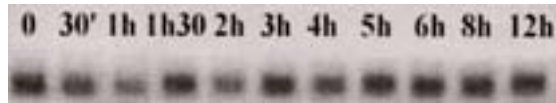
Pour cela, sur la base des réponses cellulaires obtenues, nous avons cultivé les cellules BY-2 en absence d'auxine ou en présence de 1 nM, 25 nM, 10 μ M ou 100 μ M d'AIA. Les cellules ont été récoltées après 30 min, 1 h, 1 h 30, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h et 12 h de culture. La relation entre le phénotype cellulaire et les échantillons utilisés pour les cDNA-AFLPs, est résumée **Tableau 5**. Chaque échantillon utilisant 2 erlens d'1 L ; 22 erlens sont donc utilisées pour chaque cinétique. Nous avons dû par conséquent, réaliser une cinétique par jour, soit une concentration d'auxine par jour.

Afin de contrôler que la réponse des cellules à l'auxine était normale pour chaque lot de cellules utilisé pour le cDNA-AFLP, l'indice mitotique a été mesuré suivant une cinétique entre 12 h et 24 h, pour chaque lot avec des cellules repiquées sans auxine, avec 25 nM ou 10 μ M d'AIA. Seuls les pics d'IM ont été reportés **Tableau 6**. Chaque lot montre le même comportement, avec la majorité des cellules rentrant en mitoses, aux alentours de 24 h : 5 à 7% des cellules traitées avec 25 nM et 7 à 9% des cellules avec 10 μ M d'AIA. Les cellules du deuxième lot de cellules BY-2, traitées avec 25 nM, ne semblent pas répondre autant que les autres et le troisième lot semble être plus sensible à l'auxine et se divise un peu plus tôt. Ces mesures offrent une base pour comparer les échantillons lors de l'analyse transcriptionnelle.

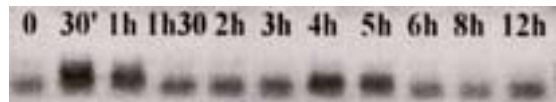
Les principales étapes du cDNA-AFLP (détaillées dans le chapitre Matériel et Méthodes) sont rappelées **figure 82**. La qualité des ARN totaux extraits des cellules BY-2 traitées à l'auxine a été vérifiée sur gels d'agarose. Les ADNc synthétisés par transcription inverse, puis digérés par deux enzymes de restrictions : *Bst*Y I et *Mse* I. Le choix du couple d'enzymes de restriction a été optimisé pour le génome de *Nicotiana tabacum* grâce à des analyses cDNA-AFLP *in silico* ((Rombauts et al., 2003). Des adaptateurs sont ensuite ajoutés de chaque côté de l'ADNc. Une pré-amplification des ADNc est effectuée, en utilisant les amorces correspondant à la séquence des adaptateurs avec une Thymidine ou une Cytosine

Concentrations
d'auxine :

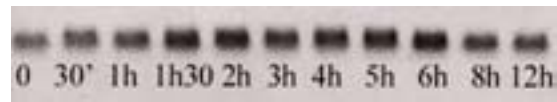
0 nM



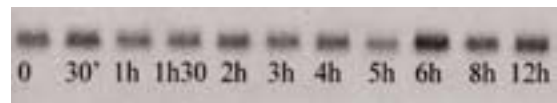
1 nM



25 nM



10 μM



100 μM

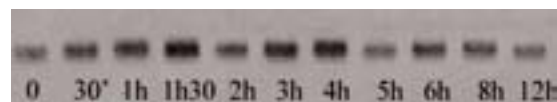


Figure 55. Exemple de la qualité des préamplifications

Vérification des préamplifications (à peine migrés) à partir de l'amorce 5': *Bst*Y I + Cytosine et l'amorce 3': *Mse* I. au travers d'un gel d'agarose à 1,2% dans du TAE 0,5X.

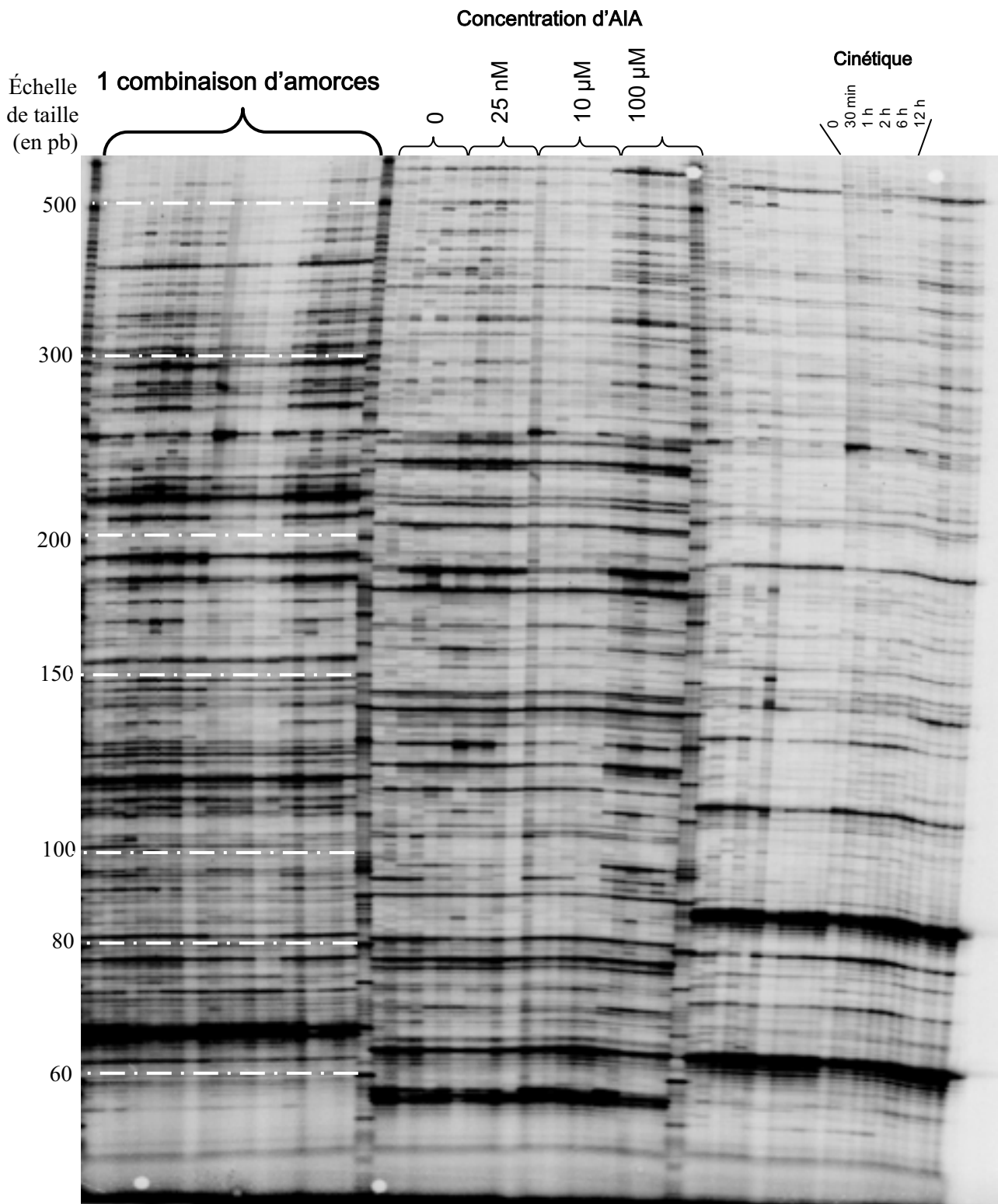


Figure 56. Polymorphisme lié à la taille des fragments d'ADNc amplifiés (cDNA-AFLP).

Ce gel d'acrylamide 'type' montre l'amplification grâce à 3 combinaisons d'amorces différentes, réalisée sur des ADNc de cellules BY-2 traitées avec 4 concentrations en auxine et suivant une cinétique avec 6 points.

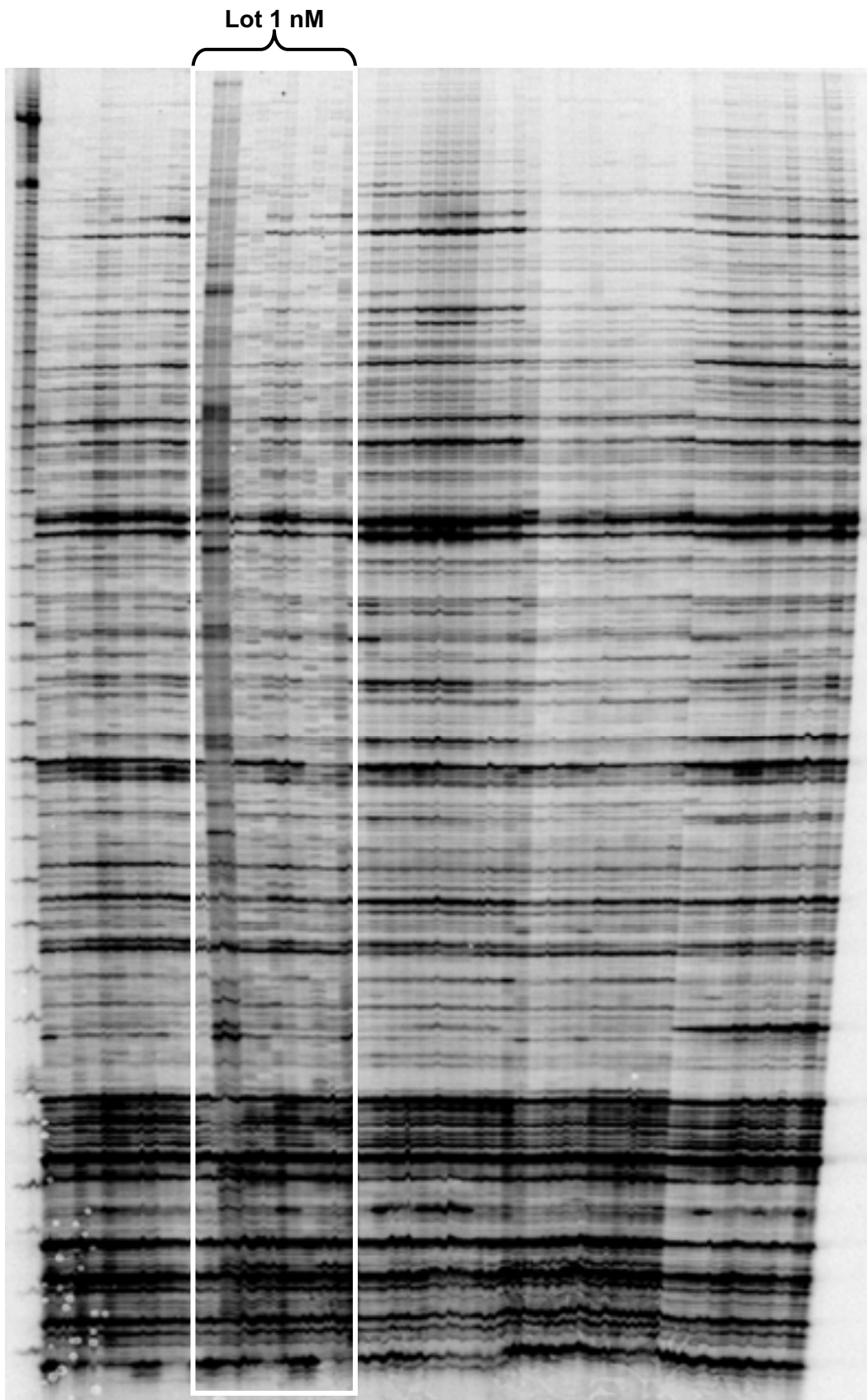


Figure. 57. Gel d'acrylamide montrant un problème d'amplification sélective pour 1 lot de cellules BY-2.

En comparant les lots entre eux, on peut voir que les échantillons composant le lot traité avec 1nM présentent un très grand nombre de bandes, qui correspondent à un très grand nombre de fragments générés, dus apparemment à la qualité des ARNm.

supplémentaire. Cette méthode permet de séparer en deux ensembles les ADNc obtenus. A cette étape, la qualité des pré-amplifications, est vérifiée sur gel d'agarose (**Figure 55**).

Par la suite, des amplifications par PCR sélectives sont réalisées avec une amorce 5' contenant la séquence de BsfYI+T(ou C)+1 nucléotide de sélection. L'amorce 3' correspondant à la séquence de MseI+2 nucléotides de sélection. Ces PCR d'amplifications sélectives +1+2, réduisent le nombre de fragments à amplifier mais permet d'amplifier des messagers peu abondants. L'identification des étiquettes a été définie en fonction de ces amplifications sélectives, le code étant : 1=A ; 2=C ; 3=G et 4=T.

Les 128 combinaisons réalisées lors de cette étude sont résumées Tableau 11. Toutes les combinaisons d'amorces ont été effectuées. Cependant nous avons dû abandonner l'analyse pour 32 des 55 lots de cellules, notamment tous les échantillons à 1.10^{-9} M, ainsi que les temps 1 h 30, 3 h, 4 h, 5 h, et 8 h ainsi que le point 2 h pour les échantillons en absence d'auxine. D'une part à cause de la qualité des ARNm et d'autre part il n'est possible de charger que 72 échantillons par gel d'acrylamide, soit les produits PCR de 3 combinaisons d'amorces différentes.

La **figure 56** montre un gel d'acrylamide type, avec les trois combinaisons d'amorces, comprenant quatre cinétiques correspondant aux quatre concentrations d'auxine testées. Certains lots cellulaires montrent un problème d'amplification ; par exemple sur la **figure 57** le lot de cellules BY-2 traitées avec 1 nM d'auxine. Ces échantillons n'ont pas été utilisés pour les autres amplifications PCR. Le programme de quantification des bandes visibles sur le gel, Quantar Pro, a permis de visualiser et de quantifier 7500 étiquettes. Afin de sélectionner les étiquettes montrant un profil d'expression différentiel significatif, un coefficient de variance (CV) a été calculé pour le profil d'expression de chaque étiquette. Ce CV est calculé en fonction du niveau de variation de l'intensité de l'expression d'une étiquette, dans les différentes conditions données. Le CV minimal pour considérer un profil significativement différentiel en fonction de la concentration en auxine ou du temps a été défini à CV=0,6, pour les cellules BY-2, ce qui a permis de sélectionner entre 25 et 50% des étiquettes, en théorie. De cette manière 617 étiquettes ont été sélectionnées, découpées et ré-amplifiées (voir Matériels et Méthodes) en vue de leur séquençage. Les séquences de bonne qualité ont ainsi pu être obtenues pour 505 étiquettes, soit 80% des étiquettes des gènes différentiellement exprimés.

La recherche d'homologies de séquences a été réalisée grâce aux programmes Blastn, Blastx et tBlastx. Le Blastn permet de comparer une séquence nucléotidique aux banques de données nucléotidiques ; Blastx traduit dans les 6 cadres de lecture une séquence nucléotidique et la compare aux banques de données protéiques ; tBlastx compare une séquence traduite dans les 6 cadres de lecture aux séquences également traduites des banques nucléotidiques.

Parmi les 505 séquences obtenues, aucune annotation fonctionnelle n'a pu être trouvée pour 51% d'entre elles (soit 258 séquences). En effet, parmi ces séquences : 54 d'entre elles n'ont pu donner lieu à une identification précise (les annotations étant sous la forme de "protéines hypothétiques") ; 38 s'alignent avec des séquences d'ESTs, d'ADNc ou d'ADN génomique ; aucune similarité avec les bases de données n'a été trouvée pour les 166 restantes. Cette absence d'indentification correspond soit à l'étiquetage de nouveaux gènes, soit à la conséquence de l'obtention de séquences très courtes (la majorité des séquences étant inférieure à 100 bp), localisées en général dans la partie 3' des transcrits, donc souvent

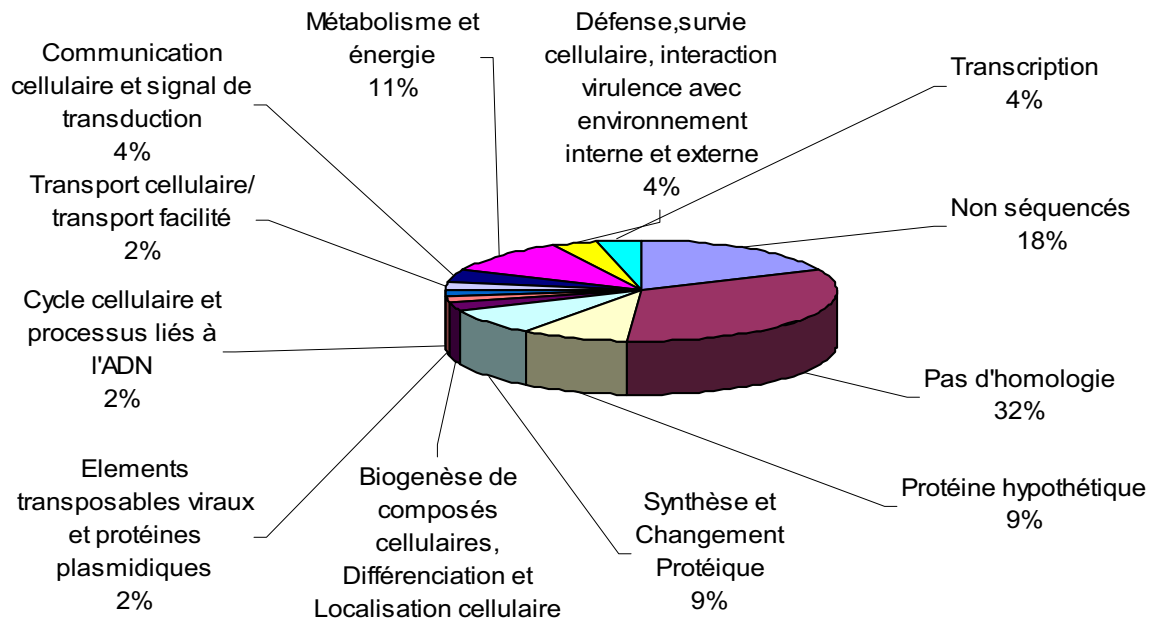


Figure 58. Classification fonctionnelle des étiquettes isolées à partir de cDNA-AFLPs.

Cette analyse des 617 étiquettes repose sur la classification du MIPS.

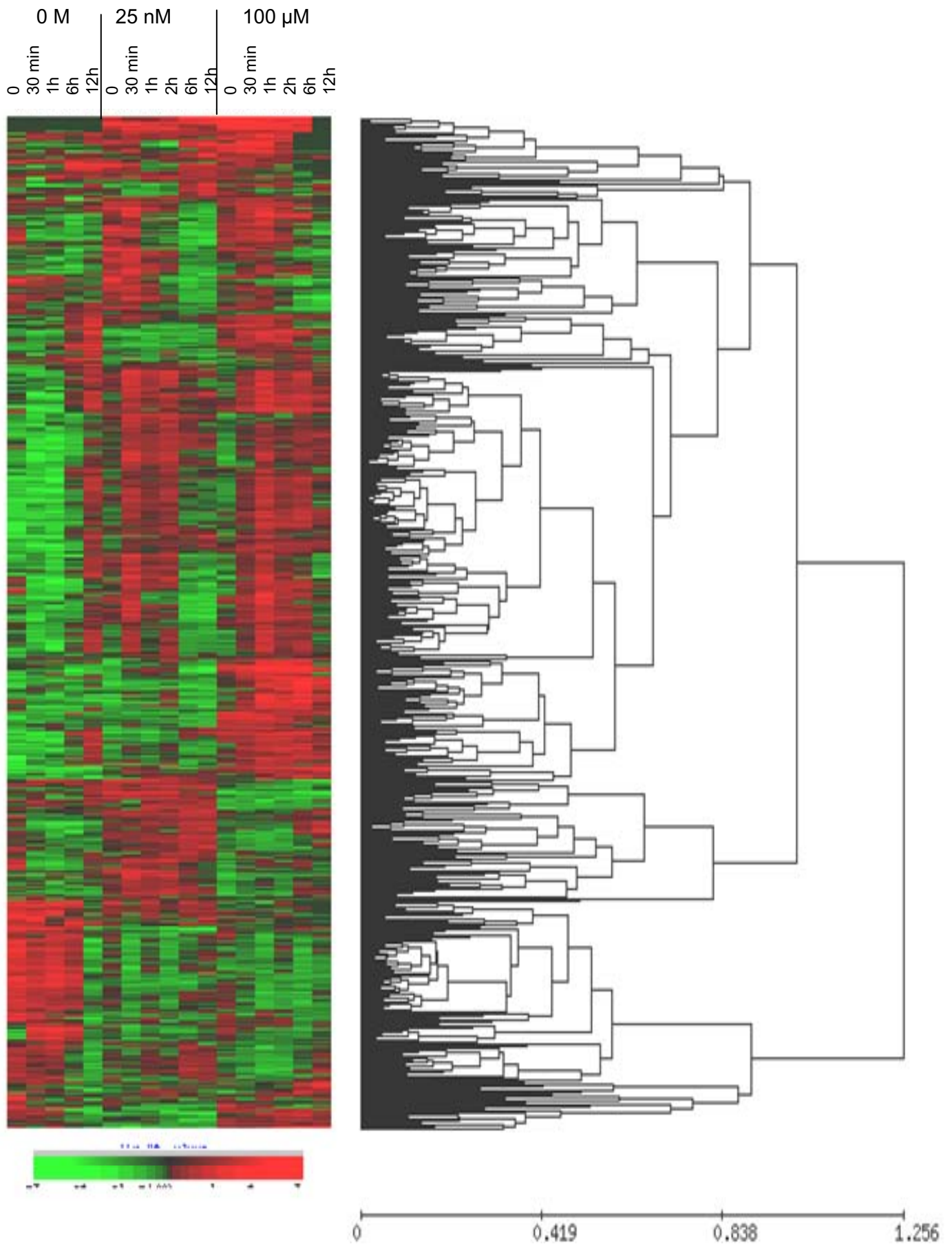


Figure 59. Groupement hiérarchique générale des 505 étiquettes

Chaque gène est représenté par une ligne de boîte de couleurs. Les 17 colonnes représentent les différents échantillons (inscrits au-dessus du cluster). L'induction (ou la repression) sont rapportés par un dégradé du rouge pâle (vert pâle) au rouge foncé (vert foncé). Regroupement réalisé grâce au programme EPCLUST

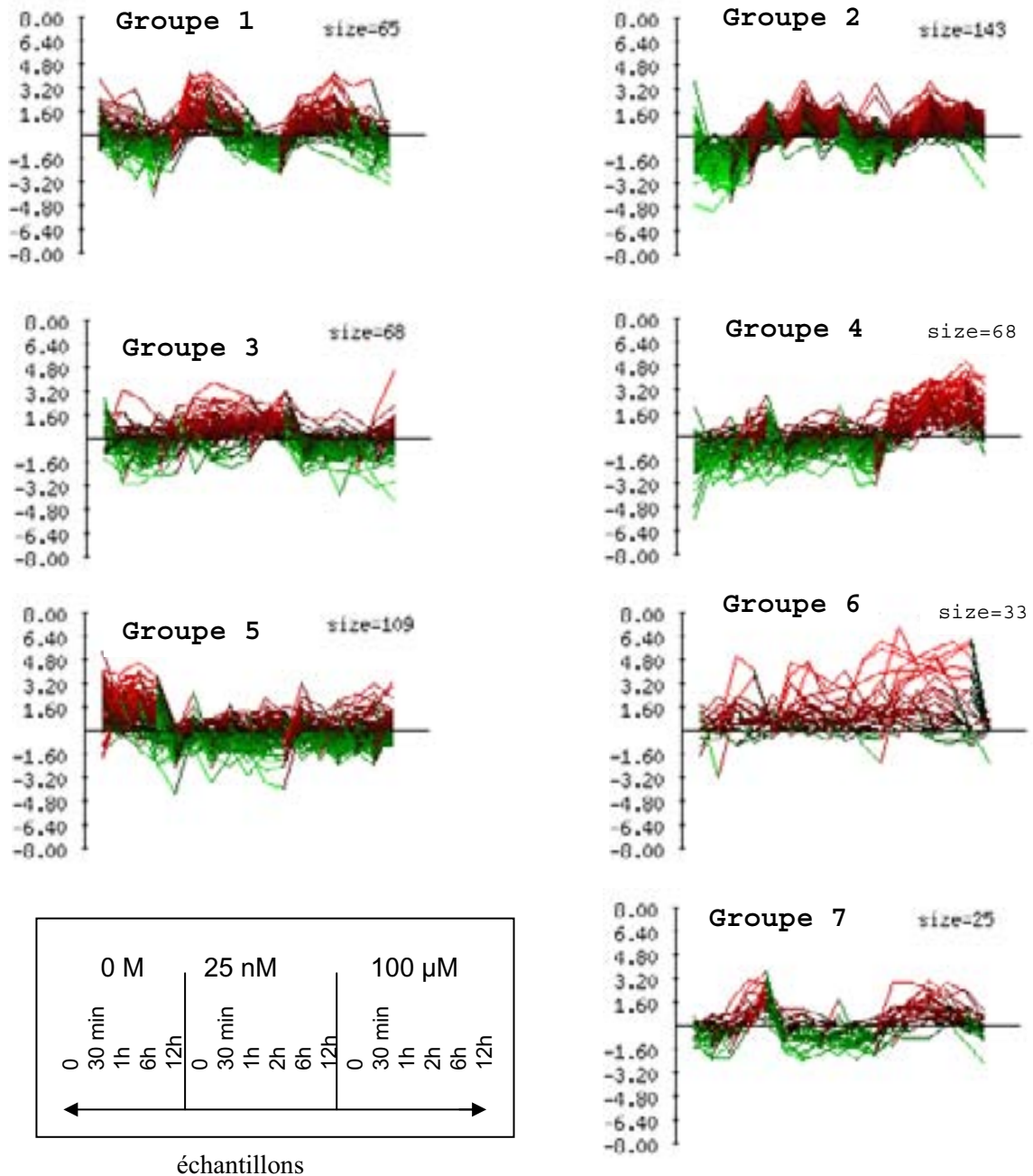


Figure 60. Identification de 7 groupes hiérarchiques.

Le groupement a été réalisé par **EPclust**, par rapport au profil d'expression de chaque étiquette, en fonction du temps et de la concentration en auxine. L'induction (ou la répression) sont rapportés par un dégradé de rouge (vert) pâle au rouge (vert) foncé pour chaque échantillon rappelé dans l'encart et correspondant aux abscisses des graphes. "Size" représente le nombre de transcrits appartenant à chaque groupe.

Le groupe 1 correspond aux gènes induits précocement par 25 nM et 100 μ M d'AIA,

Le groupe 2 aux gènes induits par 25 nM et 100 μ M d'AIA,

Le groupe 3 aux gènes induits uniquement par 25 nM d'AIA,

Le groupe 4 aux gènes induits uniquement par 100 μ M,

Le groupe 5 aux gènes réprimés en présence d'auxine.

Enfin dans le groupe 6 les gènes sont exprimés dans tous les échantillons, alors que dans le groupe 7 les gènes sont exprimés après 6 h de carence en auxine et pendant toute la cinétique en présence de 100 μ M d'AIA.

dans la partie non traduite. La divergence des séquences 3' non traduites empêche souvent de trouver des gènes homologues.

Les noms des 505 étiquettes et leur fonction putative sont indiqués dans les annexes de 3 à 12.

Les 247 séquences pour lesquelles une fonction a été trouvée, ont été classées suivant la classification fonctionnelle MIPS (Munich Information center for Protein Sequences) (**Figure 58**).

Une grande partie des gènes exprimés différemment, (66 étiquettes, soit 11%) interviennent dans le métabolisme et la gestion de l'énergie cellulaire. Ensuite 53 séquences (9%) montrent des homologies avec des gènes impliqués dans la synthèse et les changements protéiques tels que la maturation protéique ou la protéolyse. Les autres classes contiennent chacune entre 2 et 4% des séquences. Nous avons ainsi 26 gènes liés à la communication cellulaire ou à la transduction du signal, 24 gènes intervenant dans la défense et la survie cellulaire et 23 dans la transcription, 17 gènes interviendront dans la différenciation cellulaire, 12 seraient des éléments transposables, 15 auraient une fonction dans le transport et enfin 11 gènes interviendront dans le cycle cellulaire ou les autres processus liés à l'ADN (condensation de la chromatine par exemple).

Après avoir identifié et classé les étiquettes, une analyse bioinformatique de regroupement hiérarchique, c'est à dire en fonction du profil d'expression des 505 gènes, a été réalisée grâce au programme EPclust. Dans un souci de cohérence et d'élimination des biais dus à la technique de cDNA-AFLP, nous avons effectué le regroupement à partir des cinétiques correspondant à 0 M AIA (expansion cellulaire), 25 nM (division cellulaire) et 100 μ M (expansion et délai dans la division cellulaire). La **figure 59** présente le groupement général, à partir duquel nous avons identifié 7 groupes de gènes, indiqués **figure 60**. Le groupe 1 correspondant aux gènes exprimés pendant les deux premières heures en présence d'auxine. Le groupe 2 correspond aux gènes induits par l'auxine tout au long de la cinétique. Le groupe 3 rassemble les gènes dont la transcription est activée en présence de 25 nM d'AIA, tandis que le groupe 4 représente les gènes activés en présence de 100 μ M d'AIA. Le groupe 5 correspond aux gènes inhibés par l'auxine. Le groupe 6 rassemble les gènes exprimés dans toutes les conditions et le groupe 7 ceux induits pendant les six dernières heures de la carence auxinique et pour certains avec 100 μ M d'AIA.

1.2. Validation du profil d'expression de 13 de ces gènes

1.2.1. Sélection de 13 étiquettes et élaboration des amorces

Nous avons entrepris de reprendre les gels et de vérifier à l'œil les profils d'expression de chacune des étiquettes, sélectionnées en fonction du coefficient de variation et séquencées.

Notre analyse plus subjective a permis d'éliminer au maximum les biais dus aux variations d'amplification par échantillon. Dans ce cas, des pistes entières sont moins contrastées par rapport aux autres. Il se peut qu'il y ait aussi sporadiquement une amplification très faible d'une séquence et que la séquence qui suit soit très exprimée. Ces différences n'étant pas reproduites au cours des cinétiques allouées aux différentes concentrations d'AIA, ces étiquettes n'ont pas été retenues par notre étude. Après

Nom de l'étiquette	Taille de l'étiquette (pb)	taille de la séquence	Analyse visuelle du profil transcriptionnel		Fonction	classe MIPS	Groupe hiérarchique	
			30'	6h				
C1M24_4	232	120	+	-	No hit	No hit	1	} Induction précoce par l'auxine
C1M24_8	135	62	+	-	No hit	No hit	1	
C1M43_12	110.5	73	++	-	No hit	No hit	2	
C3M32_5	99	71	+	-	No hit	No hit	1	
C4M14_4	186	150	+	-	Late embryogenesis abundant protein 5.	Unclassified protein	1	
T1M12_3	133	98	+	-	No hit	Protein synthesis and Protein fat	1	
T1M33_3	148	85	+	-	Tnt1 retrotransposable element	Transposable elements viral and plasmid proteins	4	
T1M34_1	342	111	+	-	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 216.	Unclassified protein	1	
T2M12_1	305		++	+	NADP-dependent malic enzyme (Fragment)	Metabolism/Energy	2	
T2M12_3	227	192	+	-	Ribonuclease_T2	Transcription	4	
T2M34_2	233	182	+	-	Ribonuclease_T2	Transcription	4	
T2M34_3	212	178	+	-	Malate oxidoreductase, cytoplasmic (NADP-dependent malic enzyme)	Metabolism/Energy	1	
T4M14_4	122	39	++	-	No hit	No hit	1	
T4M31_1	257	213	+	-	Heat shock protein 82	Protein synthesis and Protein fat	1	
T4M41_3	121	75	++	-	Extensin like protein with Tryp_alpha_amylase inhibitor domain	cell fate	1	
T4M32_2	200	149	+	-	High-affinity nitrate transporter.	Cellular Transport and Transport facilitation	2	
T2M11_2	220	183	+	-	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	Protein synthesis and Protein fat	2	
C1M31_4	185	152	-	+	No hit	No hit	4	} Induction tardive par l'auxine
C1M31_5	149	112	-	++	RNA helicase (RH16).	Transcription	3	
C1M31_1	305	230	+	++	hypothetical protein polyubiquitine at4g02890.	Protein synthesis and Protein fat	2	
T1M21_2	194	163	+	++	Actin 101	Cell fate,Biogenesis of cellular components and Cell localization	2	
C1M34_2	413.3	357	+	+	Endochitinase precursor	Cell rescue, Defense and Virulence	3	
C1M41_13	120	124	-	++	Glutamine synthetase	Metabolism/Energy	7	
C1M42_5	128	170	+	+	No hit	No hit	3	
C2M21_1	338	293	+	++	No hit	No hit	3	
C2M12_4	143	105	+	++	Phospholipid hydroperoxidase glutathione peroxidase	Cell rescue, Defense and Virulence	2	
C2M41_1	261	22	"+"	++	No hit	No hit	4	
C3M12_2	159	106	+	+	No hit	No hit	4	
C3M13_4	108	48	+	++	No hit	No hit	4	
C3M14_3	130	88	+	++	No hit	No hit	4	
C3M34_4	130	80	+	+	No hit	No hit	4	
C4M14_3	202	160	-	+	No hit	No hit	6	
C4M24_1	221	51	-	+	Putative AT-hook DNA-binding protein.	Transcription	4	
C4M41_2	213	166	-	+	No hit	No hit	4	
C4M41_4	128	66	+	++	No hit	No hit	4	
C4M44_9	126	30	-	+	Hypothetical protein.	Unclassified protein	3	
C1M42_2	313.3	228	+	+	Probable phospholipid hydroperoxidase glutathione peroxidase (PHGPx)	Cell rescue, Defense and Virulence	2	
C1M24_11	104	33	-	+	Glutathione S-transferase PARB	Cell rescue, Defense and Virulence	4	
T1M11_2	205	177	+	++	Probable Glutathione S-transferase PARA (Auxin-regulated protein PARA)	Cell rescue, Defense and Virulence	4	
T1M23_1	208	61	-	+	Probable glutathione S-transferase PARA	Cell rescue, Defense and Virulence	4	
T1M23_2	206	134	-	+	Probable glutathione S-transferase PARA	Cell rescue, Defense and Virulence	4	
T1M44_4	148	101	-	+	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP)	Transcription	4	
T2M41_5	153	120	-	+	No hit	No hit	3	
T3M14_5	94	25	-	+	No hit	No hit	6	
T3M34_8	132	115	-	+	alpha-tubulin	Cell fate,Biogenesis of cellular components and Cell localization	4	
T3M42_3	225	164	+	+	No hit	No hit	4	
T3M44_1	313	256	-	+	PDR13 ABC transporter.	Cellular Transport and Transport facilitation	4	
T4M14_3	133	87	+	+	No hit	No hit	3	
T4M34_3	181	143	+	++	Ntalpha-expansin precursor	Cell fate,Biogenesis of cellular components and Cell localization	3	
C4M14_1	248	128	-	+	F15K9.19 putative DNA repair protein	Cell cycle and DNA processing	4	
C2M12_1	229	166	+ à 0nM	+ à 0nM	orf, partial conserved hypothetical protein	Unclassified protein	5	} Répression par l'auxine
T1M13_4	188	158	+ à 0nM	+ à 0nM	Similarity to unknown protein with PRP38 domain	Unclassified protein	6	

Tableau 7 Sélection de 52 étiquettes pour la validation de leur profil transcriptionnel.

Cette sélection est basée sur la détection et la quantification et le regroupement bioinformatique de l'accumulat des transcrits (groupe hiérarchique) couplée à une analyse visuelle des autoradiogrammes de cDNA-AFLPs, où l'évolution profil d'expression est résumé en fonction du temps en considérant uniquement la quantité de transcrits à 30 min (4 ème colonne) et 6 h (5 ème colonne). Le niveau relatif d'expression du gène est représenté par le code suivant: +:induit; ++:très induit; -: non détecté.

la visualisation des 66 gels de cDNA-AFLP une cinquantaine d'étiquettes (sur les 617), dont l'expression variait fortement en fonction du temps ou de la concentration en auxine, ont été sélectionnées.

Le **Tableau 7** résume toutes les informations sur les 52 étiquettes sélectionnées, avec le code de ces étiquettes, leur fonction déterminée par recherche d'homologie de séquence ainsi que leur niveau approximatif et visuel d'expression au bout de 30' et de 6 h de culture. Nous avons ainsi distingué trois catégories de gènes : Ceux qui ont été exprimés précocement, avec une expression plus importante à 30 min qu'à 6 h ; ceux induits plus tardivement, avec une accumulation des transcrits vers 6 h ; enfin, deux gènes ont été retenus comme étant réprimés par l'auxine, c'est-à-dire montrant une expression plus importante au cours de la cinétique sans auxine. Sur le tableau 7, il est également indiqué à quel groupe hiérarchique appartient chaque étiquette. Nous constatons que la majorité des gènes sélectionnés pour leur induction précoce par l'auxine, appartiennent bien au groupe 1, et que les gènes induits plus tard (vers 6 h) appartiennent généralement aux groupes 3 et 4. Parmi les deux gènes réprimés, un seul appartient au groupe 5.

Ainsi parmi les gènes exprimés précocement, on trouve deux étiquettes pour une RNase de type T2, deux étiquettes pour une enzyme malique cytosolique, une heat shock protein, un éliciteur de type Avr9/cf9, une protéine "late embryo abundant prot 5", ainsi que 6 séquences pour lesquelles aucune homologie de séquence n'ont été trouvées. Les gènes de réponse plus tardifs à l'auxine appartiennent au métabolisme du glutathion avec 4 étiquettes de gènes de glutathione-S-transférase *ParA* et *ParB* (connus pour répondre à l'auxine) et 2 glutathione peroxydases. Quelques gènes interviennent dans les processus liés à l'ADN tel que la RNA helicase RH16, une protéine hypothétique se liant à l'ADN (AT-hook DNA binding protein) et une hnRNP putative. Les autres protéines identifiées interviennent dans les mécanismes pariétaux ou dans le cytosquelette : une extensine, un précurseur d'une endochitinase et d'une expansine, ainsi qu'une alpha-tubuline. Il reste une protéine hypothétique et quatorze étiquettes sans identification ni similitude de séquence. Enfin, une protéine hypothétique et une autre avec un domaine PRP38 semblent être réprimées par l'auxine, vu que leur présence n'est détectée qu'en absence d'auxine.

A la suite de cette deuxième sélection d'étiquettes, nous avons entrepris de valider le profil d'expression des transcrits obtenus par cDNA-AFLPs, par des expériences indépendantes de RT - PCR semi-quantitatives. Sur les 52 étiquettes à valider, une grande majorité ne possédait qu'une séquence inférieure à 100 pb. Seul le profil d'expression de 15 étiquettes a pu être vérifié, à cause de la courte séquence d'ADNc disponible pour désigner des couples d'amorces, après avoir exclu celle des adaptateurs *Bst*YI et *Mse*I.

1.2.2. Analyse semi-quantitative de l'accumulation des ARN messagers des 15 gènes retenus

La réplication biologique de l'étude transcriptomique par cDNA-AFLP est rarement réalisée (cDNA-AFLP réalisé sur des échantillons récoltés indépendamment de la première expérimentation), pour des raisons de coût et de temps. La validation a donc été réalisée par RT-PCR sur de nouvelles cultures cellulaires, pour lesquelles l'effet de quatre teneurs en auxine (0 M, 25 nM, 10 µM, 100 µM) a été analysé après 3 temps (0, 30 min et 6 h).

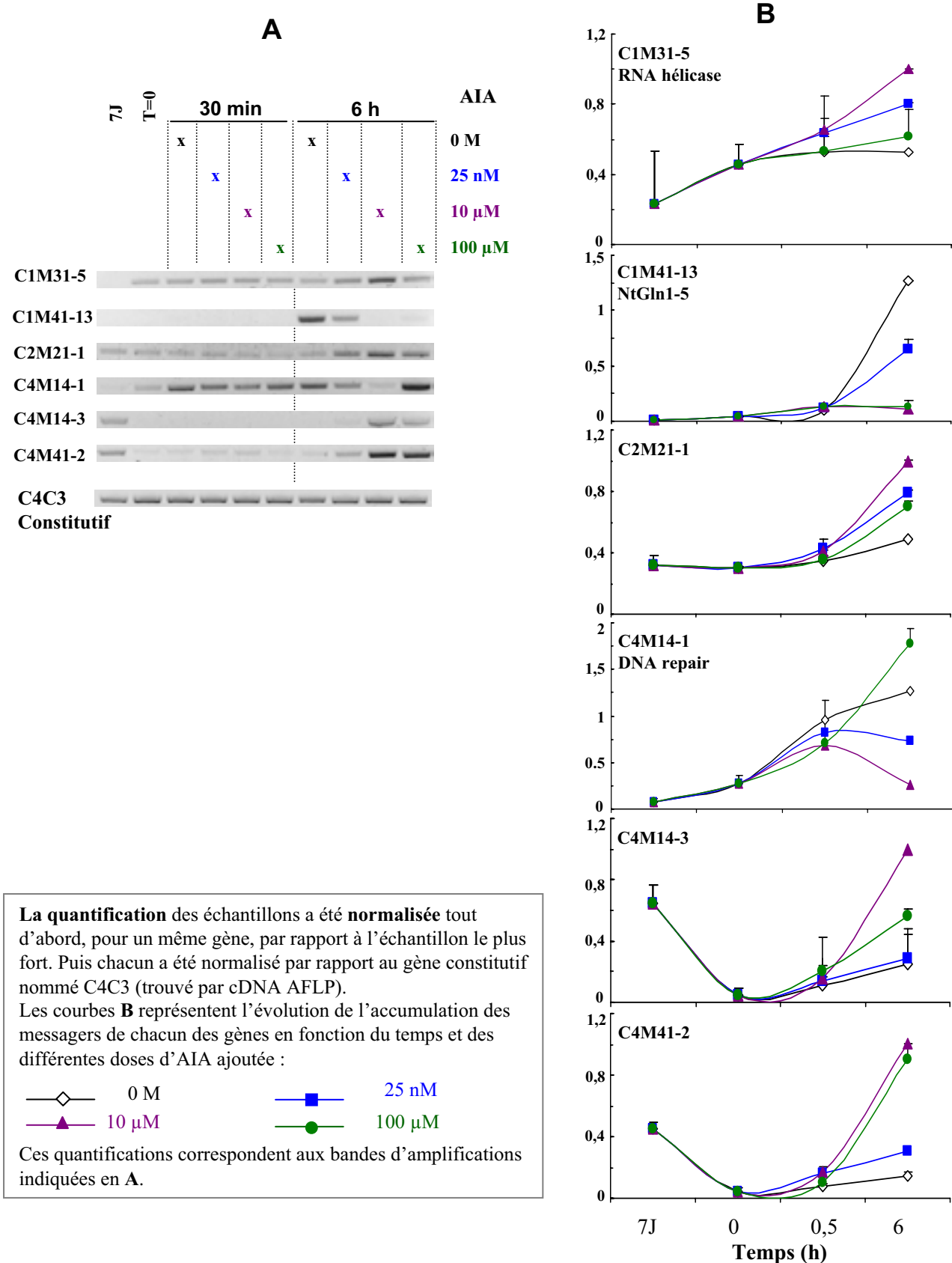
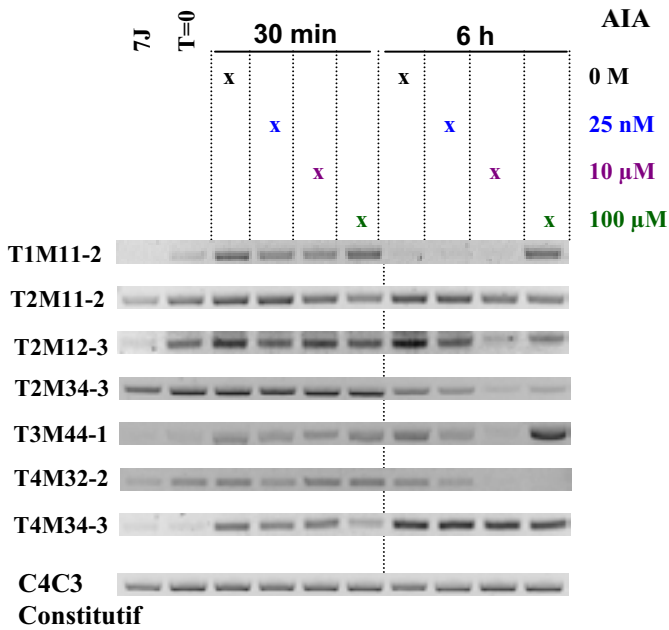


Figure 61. Analyse semi-quantitative de l'accumulation des ARN messagers pendant 6 heures, en fonction de la concentration en auxine.

A partir de la liste des 15 gènes retenus (par vérification des profils d'expression des cDNA-AFLP), 13 ont pu être amplifiés. Nous avons mené une analyse semi-quantitative des amplifications des ADNc, à partir des ARNm extraits des cellules BY-2 récoltées après 30 min ou 6 h de traitement avec 0 M; 25 nM; 10 μM ou 100 μM d'AIA. A- Visualisation de l'accumulation des transcrits des gènes en fonction de la concentration d'auxine. B- La quantification de ces accumulations est représentée en fonction du temps du traitement à l'auxine.

A (suite)



	7J	T=0	0 M	25 nM	10 μM	100 μM
IM (%)	0	0	0	5,5	9	0
Turgescence (bars)	3,5	2,5	7,5	5	3	5,5

Comportement cellulaire après 24 h de traitements des cellules BY-2 ayant subi les mêmes traitements que celles récoltées pour la RT-PCR semi-quantitative.

B (suite)

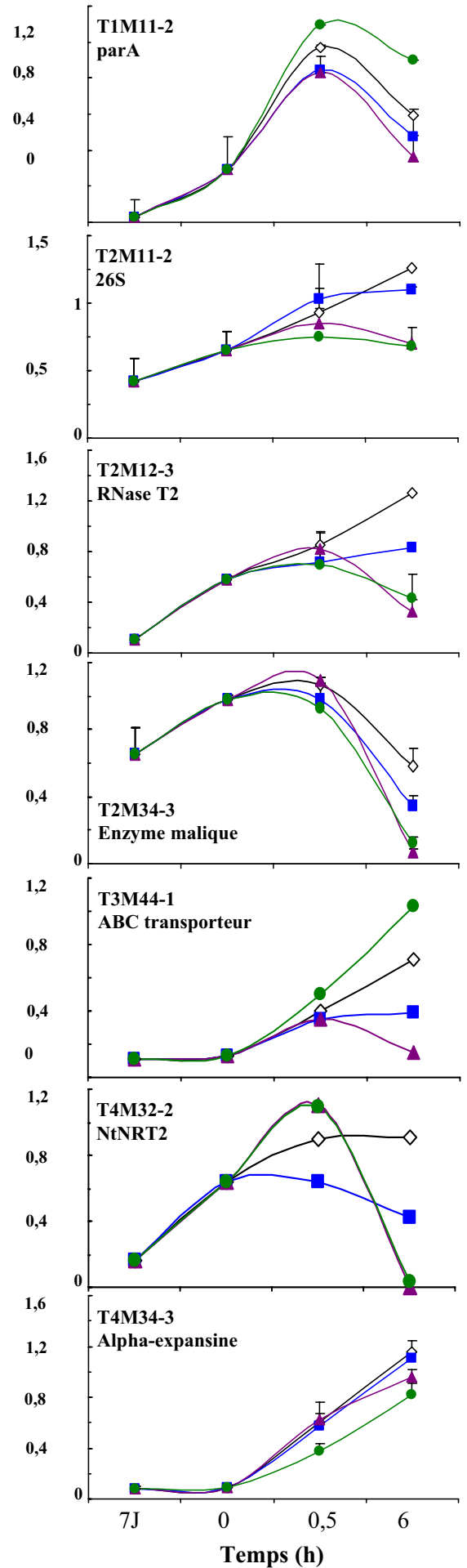


Tableau 8. Validation par transcription inverse, des profils d'expression caractérisés à l'aide du regroupement hiérarchique et de la détection visuelle.

Les résultats de RT-PCR sont confrontés à ceux des profils de transcription issus des cDNA-AFLPs et caractérisés sous la forme de groupements hiérarchiques définis figure 10. La deuxième colonne rappelle le groupe fonctionnel auquel appartient l'étiquette et la troisième colonne la validation ou pas de ce groupement. Ces résultats de RT-PCR sont aussi confrontés à ceux issus de la détection visuelle des gels de cDNA-AFLPs, où l'évolution du profil d'expression est résumé en fonction du temps en considérant uniquement la quantité de transcrits à 30 min et 6 h. La quatrième colonne résume le niveau relatif d'expression du gène (+:induit; ++:très induit; -: non détecté). La cinquième colonne indique si ce profil est vérifié par RT-PCR.

Etiquette	Groupe fonctionnel des cDNA-AFLP	Validation des cDNA-AFLP (oui/non)	Détection visuelle ("30 min"/ "6h")	Validation de la détection visuelle (oui/non)
C1M31-5	groupe 3	oui	+ / ++	oui
C1M41-13	groupe 7	oui	- / ++	oui (pour 25 nM)
C2M21-1	groupe 3	oui	+ / ++	oui
C4M14-1	groupe 4	oui		
C4M14-3	groupe 6	oui mais pas autant induit avec 0 M	- / +	oui
C4M41-2	groupe 4	oui	- / +	oui
T1M11-2	groupe 4	non	+ / ++	non
T2M11-2	groupe 2	oui	+ / -	oui sauf pour 0 M
T2M12-3	groupe 4	non	+ / -	oui
T2M34-3	groupe 1	oui	- / +	oui
T3M44-1	groupe 4	oui	+ / ++	oui
T4M32-2	groupe 2	oui	+ / -	oui
T4M34-3	groupe 3	oui	+ / ++	oui

Dans cette expérience l'entrée en division et la turgescence cellulaire ont été régulées par l'auxine comme vu précédemment (**Figure 61**).

Pour réaliser une amplification semi-quantitative des produits de transcription inverse, il faut un gène de référence. Les gènes d'actine ou d'ubiquitine sont souvent utilisés dans ce but. Cependant l'analyse par cDNA-AFLP suggérait que ce type de gène pouvait aussi être la cible de l'auxine (**Tableau 7**, étiquette C1M31-1 (Breyne et al., 2002) et T1M21-2 (Kandasamy et al., 2001).

Nous avons donc eu recours aux cDNA-AFLPs pour détecter des gènes exprimés constitutivement dans les cellules. Nous avons ainsi détecté "C4M41constitu3" appelé aussi "C4C3".

Globalement, les profils d'expression de 13 gènes ont été confirmés par RT-PCR (**Figure 61**), seules les séquences correspondant aux étiquettes C2M12-1 et T1M13-4 n'ont pu être amplifiées. Cependant, des différences sont constatées soit en fonction du temps soit en fonction de la dose d'auxine. Parmi ces 13 gènes, on distingue quatre profils transcriptionnels. Tout d'abord, les messagers de la RNA hélicase, de l'expansine et des séquences inconnues comme C2M21-1, C4M14-3 et C4M41-2, s'accumulent progressivement pendant les 6 h de traitement à l'auxine. Tandis que ceux de *parA*, de l'enzyme malique et de *NtNRT2* s'accumulent après 30' puis diminuent vers 6h. Enfin, la quantité de transcrits de l'enzyme de réparation de l'ADN, de la troisième sous-unité du protéasome 26S, de la *RNaseT2* et de l'ABC transporteur, croît pendant les 30 premières minutes puis se stabilisent. Quant à *NtGln1-5*, elle n'apparaît qu'après 6 h de culture en absence d'auxine ou avec 25 nM d'AIA.

L'expression de C2M21-1 et de la RNA hélicase est fonction de la concentration d'auxine ajoutée. Cet "effet-dose" comporte typiquement une concentration optimale (10 μ M d'AIA), une infra- et une supra-optimale (25 nM et 100 μ M respectivement). Néanmoins les gènes C4M14-3, C4M41-2 sont induits au maximum avec 100 μ M et 10 μ M. Et la concentration 100 μ M d'AIA est seule optimale pour induire l'expression de *parA*, de l'enzyme de réparation de l'ADN, et de l'ABC transporteur. Quant à la carence en auxine, elle induit une plus forte expression de *NtGln1-5*, *RNase T2*, ainsi que *NtNRT2* après 6 h de culture. L'accumulation des messagers de l'expansine n'est pas dépendante de l'AIA, car elle croît quel que soit le traitement auxinique.

Le **tableau 8**, résume la validation des étiquettes par rapport aux résultats globaux des cDNA-AFLPs et à la détection visuelle. Pour la majorité des gènes, le profil d'expression a bien été vérifié. Nonobstant, les problèmes majeurs rencontrés sont liés, soit à la normalisation des données par les méthodes bioinformatiques (lors de la quantification des bandes des gels d'acrylamide), soit à la technique du regroupement hiérarchique biaisé par des profils transcriptionnels très divers et complexes.

Les ARNm de toutes les étiquettes, s'accumulent dans la cellule différemment en fonction de la concentration en auxine, mise à part l'expansine qui semble être induite suite au repiquage des cellules dans un milieu neuf.

1.2.3. Identification de gènes primaires de réponse à l'auxine parmi les 13 gènes retenus

Notre objectif de départ était de trouver des gènes de réponse à l'auxine et plus particulièrement des gènes primaires. Pour identifier ce type de gènes, nous avons traité les cellules BY-2 au cycloheximide (CHX), qui est un inhibiteur de la synthèse protéique. Après avoir été lavées pendant une heure dans du

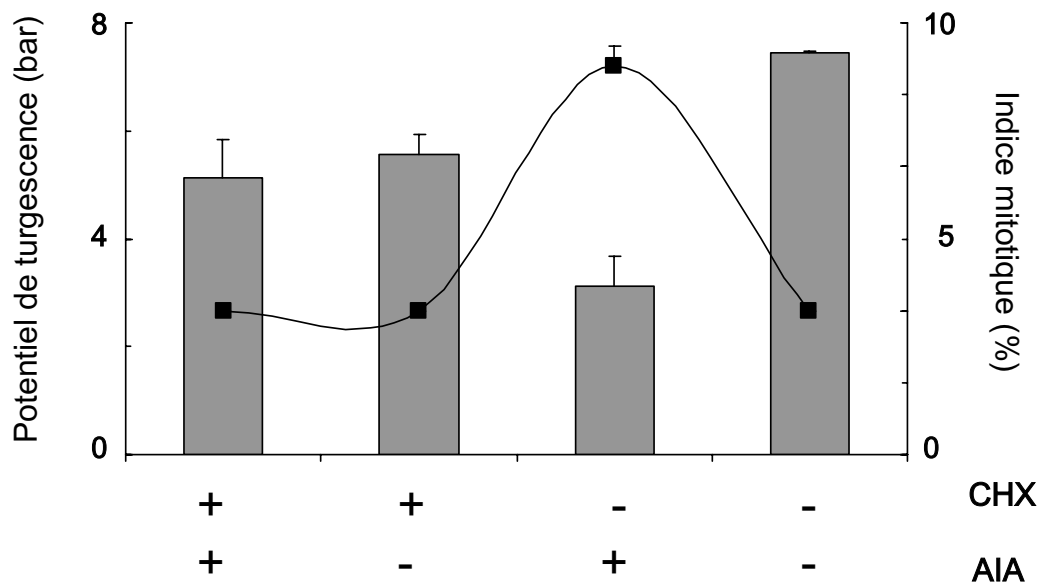


Figure 62. Réponse physiologique des cellules BY-2 à l'auxine et au cycloheximide.

Le potentiel de turgescence (histogramme) et l'indice mitotique (carrés noirs) ont été mesurés après 22 h de cultures en présence de 100 μM de CHX et/ou 10 μM d'AIA, suivant ce qui est indiqué sous le graphique. Les barres d'erreur présentent les écartypes entre deux expériences biologiquement différentes.

milieu de culture dépourvu d'auxine, les cellules BY-2 ont été repiquées avec ou sans 10 μM d'AIA, en présence ou pas de 100 μM de CHX.

Après 22 h de culture, le phénotype des cellules répondant à l'auxine est conforme à ce qui a été précédemment observé (**figure 62**). L'ajout de CHX entraîne l'inhibition de l'entrée en division cellulaire, malgré la présence d'AIA ; et l'augmentation de la turgescence observée en absence d'AIA est diminuée d'environ 40% par la présence de CHX. Celui-ci a donc un effet sur les deux réponses cellulaires à l'auxine, la division cellulaire et sur la turgescence.

L'analyse transcriptionnelle a été réalisée sur des cellules BY-2 récoltées après 30 min, 2 h, 6 h et 12 h de culture en présence ou pas d'auxine et de cycloheximide. Il a également été réalisé un rajout de CHX avec des cellules carencées en auxine pendant 6 h. La **figure 63** montre les profils d'accumulation des transcrits en fonction de la présence de l'AIA et/ou du CHX, sur quelques gènes appartenant aux 13 étiquettes retenues.

Comme cela a été décrit dans l'introduction, les gènes **GH3** et **iaa2.3** de tabac, sont connus pour répondre primordialement à l'auxine, dès les quinze premières minutes après l'ajout de l'hormone. Il a de plus été montré que l'accumulation de leurs transcrits était activée en présence de CHX uniquement. Les profils transcriptionnels des gènes *NtGH3* et *Ntiaa2.3* que nous avons trouvés (**Figure 63**), sont en accord avec ces données. En effet les transcrits sont détectés dès 30 min en présence d'auxine et l'ajout de CHX en plus de l'AIA n'affecte pas la quantité des transcrits. Sur les six premières heures il y aurait même une super-induction. L'effet du CHX seul est interprété par le fait que la présence de CHX entraîne une plus grande accumulation des ARNm, de par l'inhibition de la synthèse protéique. Ceci est l'une des hypothèses avancées depuis une dizaine d'années pour expliquer l'accumulation accrue des transcrits d'une partie des gènes primaires mis en présence de CHX et d'AIA. D'autant qu'il s'agit d'une caractéristique commune aux oncogènes chez les mammifères (Abel and Theologis, 1996).

Parmi l'expression des gènes étudiés, seules les étiquettes **C4M41-2** et **C1M31-5** se comportent comme des gènes primaires. D'une part l'expression de C4M41-2 est induite entre 30 min et 2 h après l'ajout d'auxine, et la quantité d'ARNm reste constante pendant les 12 h de l'expérience. De plus le CHX a une action positive sur la transcription de ce gène, qu'il soit couplé avec l'AIA ou pas (carrés rouges sur la **Figure 63**). Le traitement au CHX de cellules carencées en auxine pendant 6 h montre de façon plus importante l'induction de l'expression de ce gène par l'auxine, qui n'est pas affectée par l'inhibition de la traduction par le CHX (carrés orange).

D'autre part l'expression de l'étiquette C1M31-5, qui correspond à un gène d'ARN hélicase, présente un niveau basal (même en absence d'auxine). Son induction par l'AIA n'est pas affectée par le CHX, jusqu'à 6 h de traitement, mais semble l'être après 12 h. Aucune super-induction n'est visible lors d'un traitement CHX+AIA.

Nous pouvons donc constater que pour 2 de ces gènes : **C4M14-3**, **C2M21-1**, dont l'expression est induite par l'auxine, le traitement au cycloheximide entraîne une accumulation des transcrits moins abondante qu'en présence d'AIA seule. Ceci signifie que la transcription de ces gènes doit être activée par

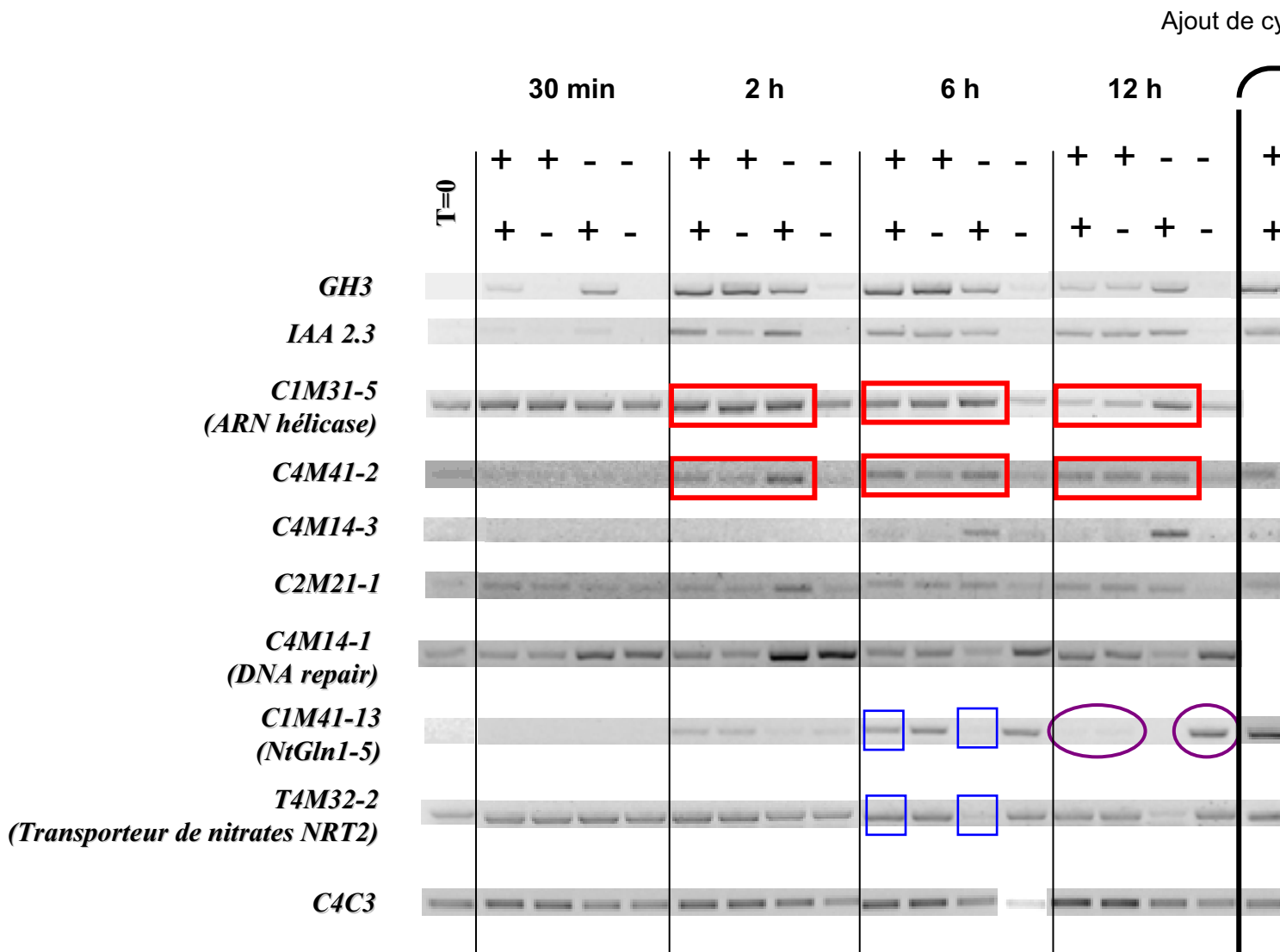


Figure 63. Cinétique d'accumulation des messagers de gènes de réponse à l'auxine en présence de cycloheximide

Après un lavage d'une heure les cellules BY-2 ont été traitées avec 100µM cycloheximide et/ou 10µM d'auxine. Les cellules ont été récoltées après 30 min, 2 h, 6 h et 12 h de traitement, pour étudier l'accumulation des transcrits des gènes. D'autres cultures de cellules ont été carencées en auxine pendant 6 heures au bout desquelles, les mêmes traitements que précédemment ont été récoltées 30 min et 6 h après les traitements pour suivre le profil transcriptionnel de ces mêmes gènes. Le traitement au CHX n'affecte pas l'expression ni de C4M41-2, ni de C1M31-5 (rectangles rouges). La super-induction de C4M14-1 est observée (carrés orange). Le CHX empêche l'inhibition de l'expression de C1M41-13 et de T4M32-2 après 6 h de traitement par l'auxine (carrés verts). Or l'expression de C1M41-13 est inhibée par le CHX seul ou avec de l'AIA (carrés orange).

d'autres protéines, néosynthétisées plus en amont de la voie de transduction de l'auxine, et la synthèse *de novo* de ces protéines est bloquée par le CHX.

D'autre part la **figure 61** montre les transcrits des étiquettes **C1M41-13** et **T4M32-2**, correspondant respectivement à la glutamine synthétase *NtGln1-5* et à un transporteur de nitrates de type NRT2. L'inhibition par l'auxine de l'expression de ces deux gènes a été démontrée précédemment (**Figure 48 et Figure 61**). Une information complémentaire est apportée par le traitement au CHX (**Figure 63**) : la transcription de ces gènes n'est pas inhibée de façon primaire par l'auxine.

En effet le CHX bloque l'effet de l'AIA sur l'accumulation des transcrits de ces deux gènes. Nonobstant l'expression de *NtGLN1-5*, après 12 h de traitement, présente un profil d'expression contradictoire. Ce gène est exprimé en absence d'auxine et réprimé par cette hormone ; or il est également réprimé par le double traitement CHX+AIA. Bien qu'il semble que le CHX n'empêche pas l'inhibition de l'expression de ce gène par l'auxine, l'action inhibitrice du CHX seul montre que ce n'est pas le cas. Le profil transcriptionnel au bout de 12 h indique que d'une part les ARNm de *NtGln1-5* ont une courte durée de vie ($1/2$ vie inférieure à 3 h) et d'autre part que le CHX aurait une action inhibitrice sur l'expression de *NtGln1-5*.

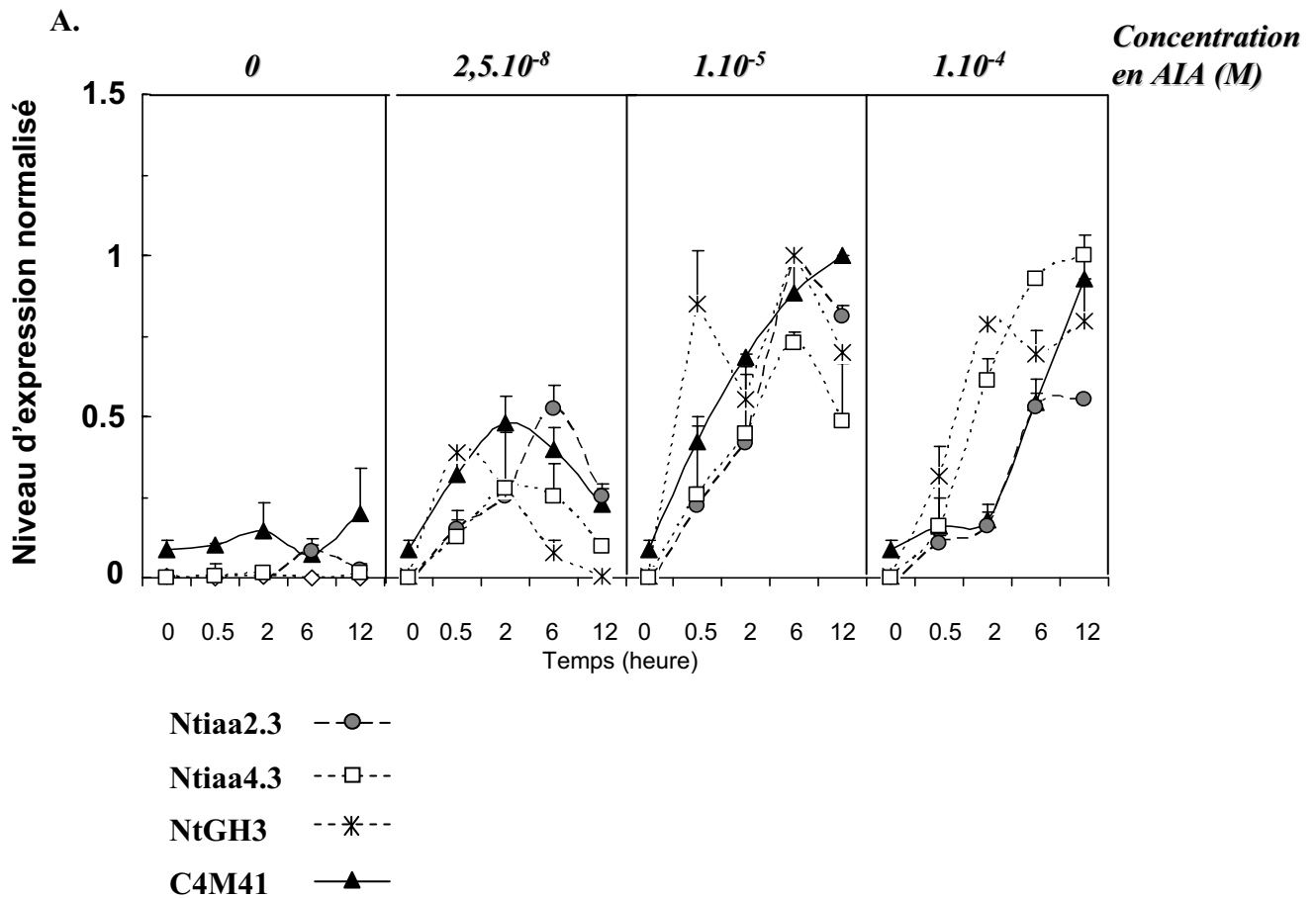
L'action inhibitrice de l'auxine est aussi étudiée au travers du rajout de CHX après 6 h de carence hormonale : pendant lesquelles les cellules ont pu exprimer des gènes induits uniquement en absence d'auxine. Si ce sont des gènes inhibés de façon primaire, le rajout de CHX ne doit pas inhiber leur expression, même en présence d'AIA. Ce qui n'est pas le cas pour l'expression de *NtGln1-5*, dont l'expression diminue par le double traitement CHX/AIA. En outre l'expression de ce gène induit par la carence auxinique ne diminue pas par l'ajout de CHX.

Le profil transcriptionnel du transporteur NRT2 montre une régulation différente. L'accumulation de ses transcrits ne semble pas être affectée par les divers traitements. Une fois induite son expression ne semble pas être inhibée par l'auxine elle-même. Or il est aussi possible que l'inhibition nécessite davantage de temps.

Pour **C4M14-1**, les résultats de la figure 61 et 63 concordent pour montrer une diminution de la quantité d'ARNm en présence de 10 μ M d'AIA, après 6 h de traitement. Cette diminution, n'est pas reproduite en présence de CHX, ce qui signifie qu'il ne s'agit pas d'une action directe de l'auxine, comme pour *NtGln1-5* et NRT2.

2. Caractérisation de l'étiquette C4M41-2

Lors de la recherche de séquences homologues, aucune similarité de séquence n'a été trouvée pour ce gène qui a donc été annoté "sans homologie". Ce gène a retenu notre intérêt dans la mesure où il semblait représenter un nouveau gène de réponse primaire à l'auxine. De plus, l'analyse de ces gènes primaires offre une source pour chercher des gènes régulés en aval.



La normalisation a été réalisée par rapport à la plus forte expression, pour un gène donné, puis ramenée à l'expression du gène constitutivement exprimé dans nos conditions C4C3. Les barres d'erreurs correspondent aux écartypes entre trois amplifications PCR différentes réalisées sur trois lots d'ADNc différents issus de la même extraction d'ARNs.

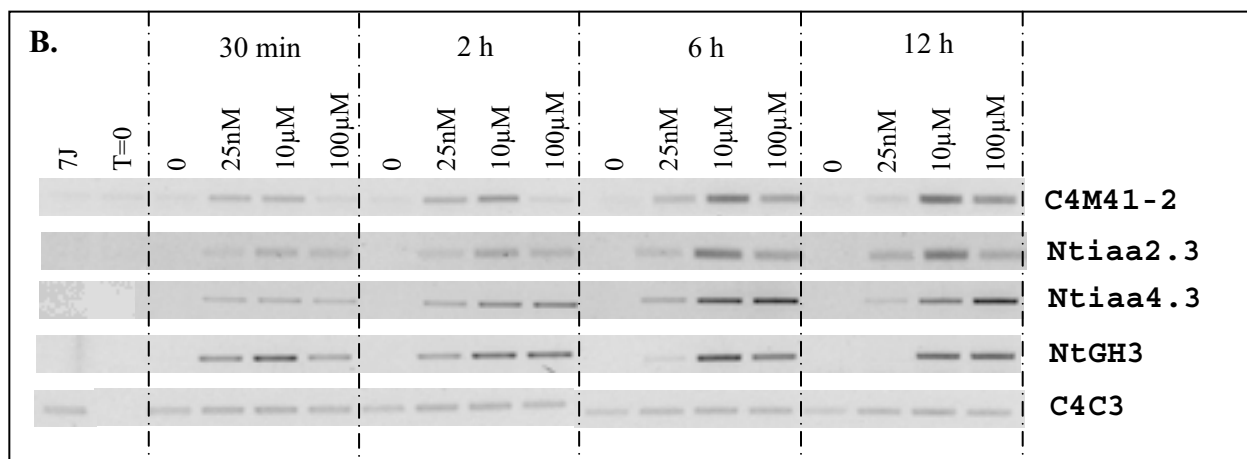


Figure 64. Régulation de l'expression de gènes de réponse à l'auxine et de l'étiquette C4M41

A. Quantification normalisée de l'accumulation des ARN messagers de différents gènes de réponse à l'auxine et de C4M41-2.

B. Photographies d'un des groupes de gels d'agarose sur lesquels ont été réalisées les quantifications, par le programme Quantity One.

Afin d'approfondir l'analyse de ce gène, un suivi plus précis de l'accumulation des ARNm au cours du temps a été entrepris. En parallèle, la recherche de l'ADNc pleine longueur a été engagée dans le but d'avoir une séquence complète rendant possible son identification.

2.1. Analyse cinétique de l'expression du gène de réponse primaire C4M41 en fonction de la teneur d'auxine

Afin de connaître plus précisément le profil d'expression du gène C4M41-2, nous avons cultivé les cellules BY-2 dans les mêmes conditions que précédemment, mais en les récoltant à 30 min, 2 h, 6 h, et 12 h. L'indice mitotique et la pression de turgescence ont été mesurés après 22 h de culture avec les différentes concentrations d'AIA (0 M; 25 nM, 10 μ M ou 100 μ M). Les résultats obtenus sont conformes au comportement attendu (**Figure 39**). Les cellules se divisent davantage avec 10 μ M qu'avec 25 nM, mais pas du tout avec 0 ou 100 μ M. D'autre part le potentiel de turgescence diminue en fonction de la concentration d'auxine ajoutée et remonte un peu pour 100 μ M.

L'accumulation des transcrits de C4M41-2 a été comparée à celle des deux gènes primaires de réponse à l'auxine utilisés lors de l'expérience CHX (**Figure 63**) : NtGH3 et Ntiaa2.3 ; auxquels a été rajouté un autre gène de la famille AUX/IAA : Ntiaa4.3. Les membres de la famille AUX/IAA sont impliqués dans la transduction du signal auxinique et inhibent l'action des facteurs de transcription ARF, avec lesquels ils forment des hétérodimères. Les GH3 interviennent dans la métabolisation de l'AIA en le conjuguant avec des acides aminés.

L'analyse de l'accumulation des messagers de C4M41-2 (**Figure 64**), apporte des indications complémentaires aux résultats précédents. Pendant les six premières heures, l'activation de l'expression de ce gène est optimale pour une concentration de 10 μ M d'AIA. Le fait que les cellules BY-2 carencées en auxine expriment très faiblement ce gène, prouve le maintien d'un niveau basal de transcrits dans ces cellules.

Néanmoins on observe un décalage dans le temps des cinétiques d'inductions de C4M41 selon la dose. L'action de 25 nM d'AIA est optimale après 2 h de traitement, avec une augmentation du nombre de transcrits 5 fois plus importante par rapport au moment du repiquage. Son expression diminue ensuite et arrive à un niveau basal après 12 h de traitement. Au contraire, avec 10 μ M, la transcription est accrue d'un facteur 9, de façon régulière pendant 12 h. La concentration 100 μ M induit l'accumulation d'ARNm de C4M41-2 entre 2 h et 6 h après le traitement auxinique, mais elle croît ensuite rapidement de 7,5 fois en 10 h. De ce fait, la quantité de transcrits après 12 h est équivalente à celle obtenue sous l'action de 10 μ M d'AIA.

La comparaison du profil d'expression de C4M41-2 par rapport à ceux de Ntiaa2.3, Ntiaa4.3 et NtGH3 (représentés par des traits pointillés sur la **Figure 64A**), indique une réponse comparable. L'expression de C4M41-2 ressemble à celle de ces gènes de réponse primaire à l'auxine, autant dans sa réponse en fonction de la concentration en auxine que dans sa cinétique d'induction.

Les transcrits des gènes Ntiaa2.3 et Ntiaa4.3 ne sont pas détectés au moment du repiquage, ni dans les cellules carencées en auxine.

L'expression de Ntiaa2.3 est régulée à la fois dans le temps et en fonction de la concentration en AIA. En effet, son expression est maximale vers 6 h, puis diminue vers 12 h, quel que soit la concentration d'auxine testée. De plus la quantité de transcrits suit une courbe effet-dose classique, avec 10 μM d'AIA qui induit une transcription deux fois plus importante de ce gène à 6 h, que les autres concentrations. Ainsi 25 nM et 100 μM sont respectivement une concentration infra-optimale et supra-optimale pour l'activation de ce gène. En outre la concentration la plus forte d'AIA n'active pas davantage l'expression du gène à 12 h qu'à 6 h.

Le traitement avec 25 nM d'AIA induit une faible expression de Ntiaa4.3. Après 2 h de traitement un pic d'expression correspond seulement à une augmentation de 2,8 fois. Avec 10 μM , l'expression de ce gène est maximale vers 6 h de traitement avec une augmentation de 7,5 fois. Le gène Ntiaa4.3, diffère de Ntiaa2.3, par le fait que son expression est plus fortement induite par 100 μM d'AIA. Cette activation est d'ailleurs réalisée dès 2 h après le traitement, ce qui n'est pas le cas, à cette concentration, ni dans le cas de C4M41-2, ni de Ntiaa2.3.

Pour les plus faibles concentrations d'AIA, le niveau d'expression varie moins significativement au cours du temps que pour les autres gènes. Néanmoins les gels présentés sur la fig 17B, montrent que c'est le gène Ntiaa2.3 qui est le plus faiblement exprimé dans les cellules BY-2.

Les ARNm du gène NtGH3 ne sont présents que suite à un traitement auxinique. Leur accumulation est dépendante de la dose d'hormone ajoutée et plus la concentration d'AIA est grande, plus leur quantité diminue rapidement. De ce fait, 25 nM d'AIA augmente de 4 fois l'expression de NtGH3 en 30 min, mais n'est plus présent après 6 h de culture. Au contraire, 10 μM induit une expression 2 fois plus importante après 30 min et d'un facteur 10 après 6 h de culture. Son expression diminue de 3 fois pendant les 6 h suivantes (figure 64). Après 2 h de traitement avec 100 μM d'AIA, l'expression atteint un maximum qui correspond à une augmentation d'un facteur 5. Contrairement aux autres concentrations, la quantité de transcrits ne diminue pas après 6 h de traitement auxinique. Cet impact sur l'expression de NtGH3 serait lié au fait que les protéines GH3 interviennent dans la conjugaison de l'AIA quand celle-ci est très abondante. L'action de la GH3 serait donc prolongée jusqu'à ce que la teneur intracellulaire d'auxine arrive à un certain seuil.

En conclusion, l'étiquette C4M41-2 possède une séquence qui n'a encore jamais été caractérisée, qui code pour un gène dont l'expression est régulée principalement par l'auxine (expérience avec CHX figure 63). En outre le profil d'accumulation de ses transcrits ressemble à celui des trois gènes primaires de réponse à l'auxine analysés dans nos expériences.

2.2. Recherche de la séquence pleine longueur du messenger correspondant à l'étiquette C4M41-2

La séquence de l'étiquette découpée à partir des gels de cDNA-AFLP, présentée **figure 65**, faisait 146 pb, en ne prenant pas en compte la séquence de l'adaptateur (en italique sur la figure). La recherche

>C4M41-2

TCATTGGCTCTGTTCTGTTCCGAGGTCCGAGCTTTGTTTCGCTATTGTGTTTCGAAAGC

C4M41-2-5' spécifique

AACAAGGCCACACTCTTGTATTGAAGGTCGATTTTTCTAATTTCACTTTGTTACAGTA

C4M41-2-3' spécifique

TTTTGAATCTTGTGTTGTTCACTGCTGAATC TATTACTCAGGACTCATCAA

Figure 65. Séquence du gène étiqueté C4M41-2

La séquençage directe de l'amplification de l'étiquette C4M41-2 a fourni une séquence de 146 pb en excluant la partie qui correspond à l'adaptateur (en italique) ajouté en 3' des ADNc lors de la préparation des cDNA-AFLP. Les amorces spécifiques de cette étiquette correspondent aux régions soulignées.

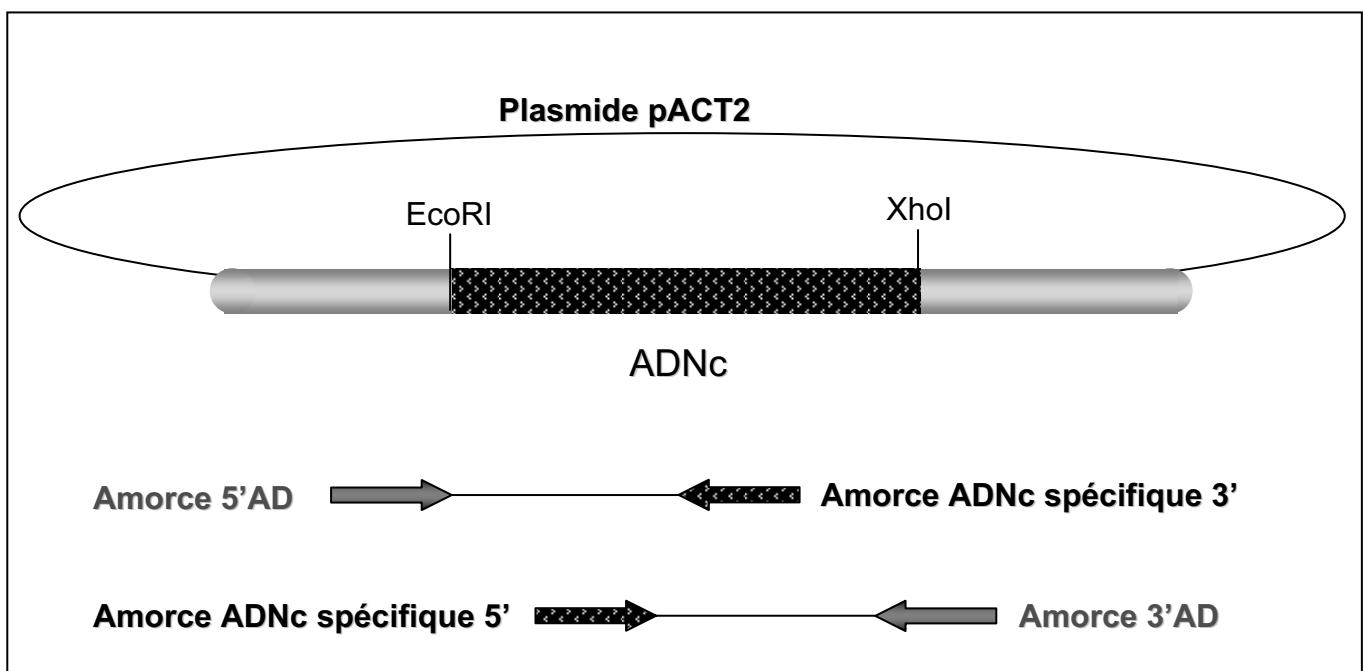


Figure 66. Criblage de la banque 2H d'ADNc de cellules BY-2

Le criblage de la banque a été réalisée par amplification spécifique des ADNc cibles, grâce des couples d'amorces définis dans la zone de polyclonage du plasmide pACT2 et sur l'ADNc cible.

de séquences homologues étant infructueuse, nous avons entrepris de cribler une banque d'ADNc pour obtenir la séquence pleine longueur de ce gène.

2.2.1. Criblage d'une banque d'ADNc de cellules de tabac BY-2 et caractérisation d'un ADNc partiel

Le criblage a été effectué sur la "banque 2H" d'ADNc de cellules BY-2, aimablement fournie par Nathalie GLAB du laboratoire Cycle Cellulaire dans l'Institut de Biotechnologie des Plantes à Orsay (Université Paris-Sud). Les ADNc de cette banque ont été clonés de façon orientée dans le plasmide pACT2 (Clontech), entre le site de restriction *EcoRI* et *XhoI*, de la zone de multiclonage du plasmide.

Le criblage de la banque a été effectué par amplification spécifique à partir de l'ADN total de la banque. Pour cela nous avons utilisé deux amorces de chaque côté du site d'insertion des ADNc, nommées 5'AD et 3'AD, respectivement à gauche et à droite de l'insertion de l'ADNc (**Figure 66**). La méthode employée pour sélectionner la partie 5' et 3' de l'ADNc de C4M41-2 est schématisée **figure 66**. Ainsi la région 5' de l'ADNc a été amplifiée avec l'amorce 5'AD et l'amorce C4M41-2-3', spécifique du gène. Pour la région 3', l'amorce 3'AD et l'amorce C4M41-2-5' ont été utilisées. De cette manière un fragment de 900 pb en 5' et de 400 pb en 3' ont été amplifiés. Les fragments ont été clonés dans le plasmide pGEMTeasy et ont été séquencés (par l'entreprise Genome express). Les résultats du séquençage ont été alignés avec la séquence de l'étiquette C4M41-2, grâce au programme ClustalW, disponible en ligne sur le site d'EBI. Le pourcentage de similitudes étant proche du 99%, nous avons pu compléter la séquence et ainsi obtenir une séquence continue de 845 pb. Cette séquence est présentée **figure 67**, elle contient en 3' un site de reconnaissance pour la polyadénylation, suivi de la queue de polyadénylation, ce qui nous conforte dans l'idée qu'il s'agit bien d'un ARN messager.

Suite au criblage de la banque d'ADNc, nous avons réalisé un northern Blot afin de connaître la taille totale du messager de C4M41-2. Pour cela nous avons synthétisé une sonde radioactive (^{32}P) correspondant à une partie de 616 pb située en 5' de la séquence de 845 pb. Les amorces C4M41-North et C4M41-2-3' ont été utilisées pour amplifier la sonde. Les emplacements des amorces qui ont servi à synthétiser la sonde sont indiqués sur la **figure 67**.

Après avoir vérifié l'état des ARNm (**Figure 68B**), extraits à partir de cellules BY-2 traitées avec de l'auxine, la sonde a été hybridée sur ces ARNm fixés à une membrane de nylon. La révélation (**Figure 68C**) a confirmé que la quantité de transcrits du gène C4M41-2 était dépendante de la dose d'auxine. La sonde s'hybridant juste en dessous des ARN ribosomiques 18S (environ 1,9 kb) (**figure 68B**), nous pouvons supposer que l'ARNm du gène C4M41-2 aurait une taille approximative de 2 kb. Par rapport à ce que nous connaissons de la séquence, ce résultat indique qu'il nous reste à découvrir une séquence d'environ 1,2 kb. Cette partie devant être principalement en 5' puisque nous avons la queue de polyadénylation en 3'.

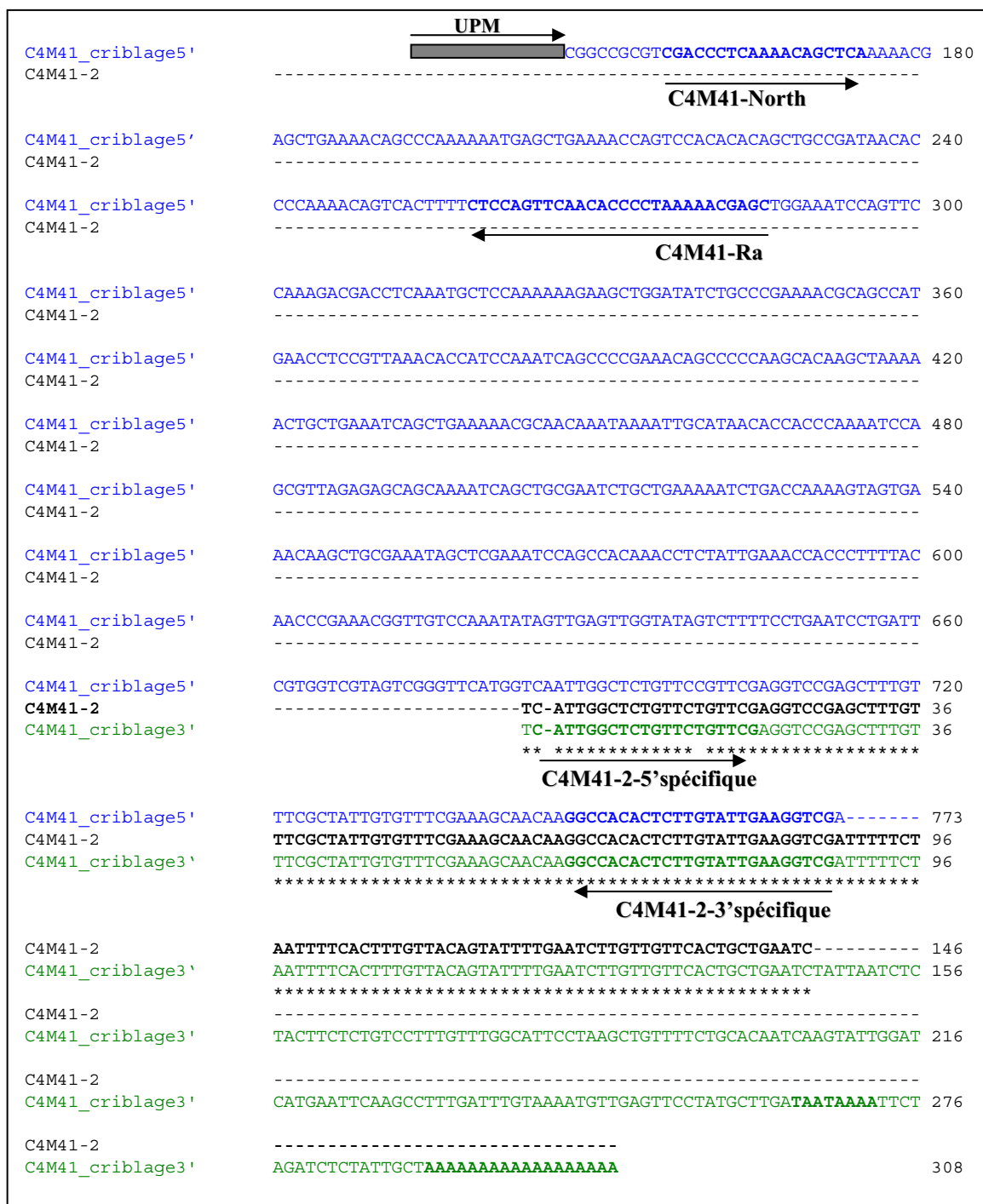


Figure 67. Alignement des séquences obtenues lors du criblage de la banque d'ADNc et de l'étiquette C4M41-2

La séquence de l'étiquette C4M41-2 (gras) est alignée la séquence 5' (bleu) et de la séquence 3' de l'ADNc (vert). Les amorces utilisées pour synthétiser la sonde radioactive pour le northern blot ainsi que celles pour réaliser la 5'RACE, sont également indiquées.

A l'extrémité 5', en gras, sont indiqués le site de reconnaissance pour la poly-adénylation et la queue polyA.

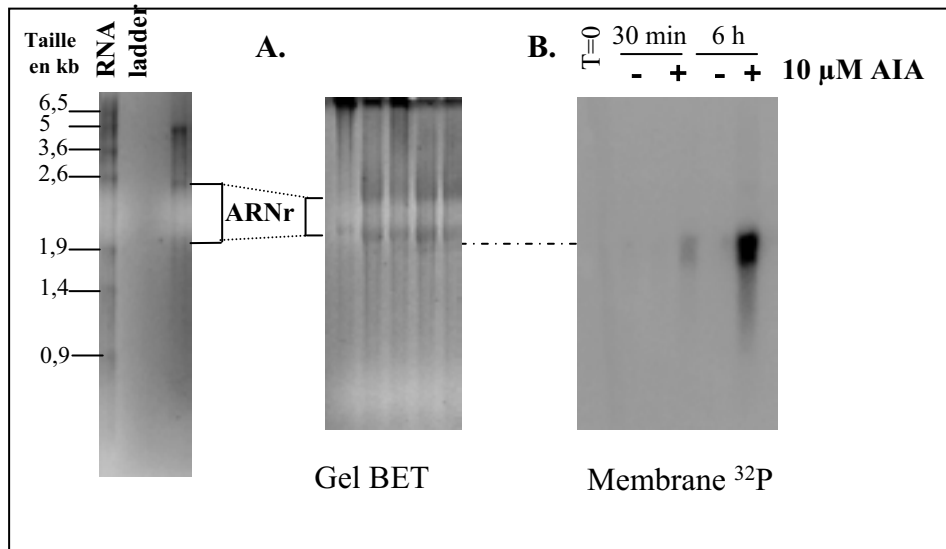
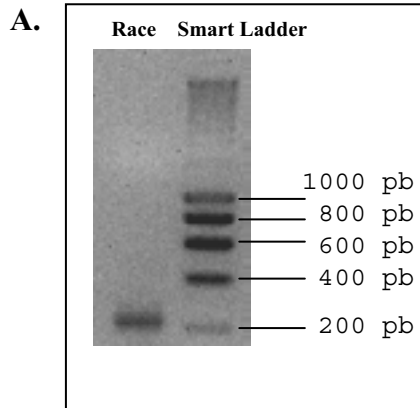


Figure 68. Détection de l'ARNmessenger de C4M41-2 par northern blotting

Une sonde radioactive (³²P) spécifique de la partie 5' de la séquence connue de C4M41-2 a été synthétisée grâce aux amorces C4M41-North et C4M41-2-3' spécifique (Figure 66), identifiée sur la séquence de C4M41 obtenue après le criblage de la banque d'ADNc 2H. **A.** Gel d'agarose dénaturant coloré au BET. Migration de 15 μg d'ARN totaux par piste, extraits à partir de cellules BY-2 traitées avec ou sans 10 μM d'AIA, pendant 30 min ou 6 h. Positionnement des ARN ribosomiques, par rapport à l'échelle de taille (RNA ladder)

B. Hybridation de la sonde sur les ARN totaux extraits

Les deux photographies ont été mises à la même échelle afin de pouvoir les comparer. Nous pouvons ainsi remarquer que l'ARNm de C4M41-2 est situé juste en dessous des ARN ribosomiques 18S d'environ 2,5 kb en gel dénaturant.



B.

Race	ACGTGGGGGAGGATGAATCCAGCCCCAAAAC TCCTCAAACAGCTCAAAAACGAGCTGA	60
C4M41-2_845pb	-----CCCTCAAACAGCTCAAAAACGAGCTGA	40

Race	AAACAGCCCAAAAAATGAGCTGAAAACCAGTCCACACACAGCTGCCGATAACACCCCAA	120
C4M41-2_845pb	AAACAGCCCAAAAAATGAGCTGAAAACCAGTCCACACACAGCTGCCGATAACACCCCAA	100

Race	ACAGTCACTTTTCTCCAGTTCAACACCCTAAAAACGACAAT -----	162
C4M41-2_845pb	ACAGTCACTTTTCTCCAGTTCAACACCCTAAAAACGAGCTGGAAATCCAGTTCCAAAGA	160

Race	-----	
C4M41-2_845pb	CGACCTCAAATGCTCCAAAAAGAAGCTGGATATCTGCCGAAAACGCAGCCATGAACCT	220
Race	-----	
C4M41-2_845pb	CCGTTAACACCATCAAATCAGCCCCGAAACAGCCCCAAGCACAAGCTAAAACTGCT	280

Figure 69. Recherche de la région 5' du gène C4M41-2 par 5' Race

La région 5' est amplifiée à l'aide d'une amorce complémentaire de l'adaptateur et l'amorce C4M41-Ra (Figure 66)

A. Le produit d'amplification a été purifiée sur gel d'agarose 1,5 % et a une taille d'environ 250 pb.

B. La séquence obtenue a été alignée avec la séquence de C4M41-2 issu du criblage de la banque 2H.

La séquence en gras correspond à la partie supplémentaire du gène C4M41-2.

2.2.2. Amplification de l'extension en 5' de l'ADNc de l'étiquette C4M41-2

Afin de connaître davantage la séquence en 5' de C4M41-2, nous avons entrepris une amplification de l'extension en 5' de l'ADNc correspondant (5' RACE). L'amplification de cette région a été réalisée à l'aide d'une amorce complémentaire de l'adaptateur (amorce nommée UPM) et de l'amorce C4M41-Ra (**Figure 67**). Le produit de cette amplification d'environ 200 pb (**Figure 69A**) a été cloné dans le vecteur pGEMTeasy. Le résultat du séquençage indiqué a été aligné avec la séquence de C4M41-2 de 845 pb grâce au programme clustalW (**figure 69B**). La séquence de l'adaptateur de la 5' RACE a été ôtée pour rendre l'alignement plus lisible. L'amplification en 5' nous permet de compléter la séquence de 35 pb supplémentaires. Cependant 12 nucléotides de la séquence issue du criblage de la "banque 2H", ne s'alignent pas avec le résultat de la Race. Ces nucléotides proviendraient d'une erreur lors de la ligation des ADNc dans le vecteur pACT2, cette séquence ne sera donc pas prise en compte. Malgré notre connaissance d'une séquence de 865 pb du messenger du gène C4M41-2, un cadre de lecture ouvert suffisant pour mettre en évidence la traduction de ce messenger n'a pu être identifié.

Notre recherche va désormais se tourner vers des analyses *in silico* afin de trouver des séquences homologues, des domaines conservés ou des cadres de lecture putatifs.

2.3. Analyse *in silico* de la séquence de C4M41-2

2.3.1. Recherche d'un cadre de lecture ouvert et de séquences protéiques homologues.

La séquence de l'ADNc de C4M41-2, obtenue grâce au contig formé à l'aide des résultats du criblage de la banque d'ADNc et de la RACE a été traduite dans les 3 premiers cadres de lecture, puisque la présence de la queue de polyadénylation permet d'orienter le sens de traduction putatif. A partir de cette analyse (**Figure 70**), la présence d'un grand nombre de codons "STOP" dans cette séquence, empêche de mettre en évidence un cadre unique de lecture ouvert (ORF), bien que plusieurs méthionines soient détectées. Entre les différents codons "STOP", 2 courtes séquences polypeptidiques ont été identifiées. La recherche d'homologie de séquences protéiques par le programme Blastp, s'est révélée infructueuse, dans les différentes banques de données (Uniprot, swissprot et pdb).

En parallèle la recherche de protéines homologues a été réalisée par le programme Blastx, qui permet à partir d'une séquence nucléotidique de consulter les banques de données protéiques. Cette analyse n'a montré aucun résultat significatif.

Nous avons également utilisé des programmes de recherche d'ORF ou d'EST putatifs grâce aux programmes FrameD et ESTscan. Ces analyses n'ont pas donné davantage d'informations.

A partir de la séquence protéique, issue de la traduction *in silico* de la séquence nucléotidique de C4M41-2, aucun domaine protéique particulier n'a pu être identifié, ni avec le programme InterProscan, ni avec Prodom, ni par la consultation de la collection de séquences de Pfam (Bateman et al., 2004). Les recherches menées sur le KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) se sont également révélées infructueuses.

>Phase 1 (288 aa)

TWGR**M**NPAPKLPQNSSKTS*KQP**K***AENQSTHSCR*HPKTVTFLQFNTPKNELEIQF
QRRPQ**MLQKRSWISARKRSHEPPLNTIQISPETAPKHKLKTA**EIS*****KTQQIKLHNTT
QNPALESSKISCESA**E**KSDQ**K****NKL**R**NSSKSSHKPLLKPPFYTRNGCPNIVELV***S**FPES
*FVVVVGF**MVNWLC**SVRGPSFV**SLLCFESNKATLLY*******RSIFLIFTLLQYFESCCSLLN
LLISTS LSFV**W**HS*AVFCTIKYW**M**NSSL*F**V**K**C***V**P**MLDNKILDLYC***KKKKK**

>Phase 2 (288 aa)

RGGG*IQPQNSL**K**TAQKRAENSPK**N**ELKTS**P**H**T**AADNT**P**KQSLFSSST**P**L**K**TSW**K**SS**S**K
DDLKCSKKEAGYLPENAA**M**N**L**R***T**PSKSAPKQPP**S**T**S***KLLK**S**AEK**R**N**K*****N**CITPP**K**IQ
R***R**AAK**S**AAN**L**L**K**N**L**T**K**S**S**E**T**S**C**E**I**A**R**N**P**A**T**N**L****Y*****N**H**P**F**T**P**E**T**V**V**Q**I***L**S**W**Y**S**L**F**L**N**P
D**S**W**S*****S**G**S**W**S**I**G**S**V**P**F**E**V**R**A**L**F**R**Y**C**V**S**K**A**T**R**P**H**S**C**I**E**G**R**F**F***F**S**L**C**Y**S**I**L**N**L**V**V**H**C***I****Y*****S**
L**L**L C**P**L**F**G**I**P**K**L**F**S**A**Q**S**S**I**G**S*****I**Q**A**F**D**L***N**V**E**F**L**C**L**I**I**K**F*****I**S**I**A**K****K****K****K****K****K**

>Phase 3 (287 aa)

VGEDESSPK**T**PS**K**QL**K**NEL**K**TAQ**K****M****S*****K**P**V**H**T**Q**L**P**I**T**P**Q**N**S**H**F**S**P**V**Q**H**P***K**R**A**G**N**P**V**P
KT**T**S**N**A**P**K**K**K**L**D**I**C**P**K**T**Q**P*****T**S**V**K**H**H**P**N**Q**P**R**N**S**P**Q**A**Q**A**K**N**C*****N**Q**L**K**N**A**T**N**K**I**A*****H**H**P**K
SS**V**R**E**Q**Q**N**Q**L**R**I**C*****K**I***P**K**V**V**K**Q**A**A**K*****L**E**I**Q**P**Q**T**S**I**E**T**T**L**L**H**P**K**R**L**S**K**Y**S*****V**G**I**V**F**S***I**L**I**R
G**R**S**R**V**H**G**Q**L**A**L**F**R**S**R**S**E**L**C**F**A**I**V**F**R**K**Q**Q**G**H**T**L**V**L**K**V**D**F**S**N**F**H**F**V**T**V**F***I**L**L**F**T**A**E**S**I**N**L****Y**
F**S** V**L**C**L**A**F**L**S**C**F**L**H**N**Q**V**L**D**H**E**F**K**P**L**I**C**K****M**L**S**S**Y**A*****N**S**R**S**L**L**L****K****K****K****K****K**

Figure 70. Traduction de la séquence de C4M41-2 dans les 3 premiers cadres de lecture

Les méthionines et les séquences des polypeptides putatifs sont indiquées en gras. Les étoiles correspondent aux codons "STOP"

2.3.2. Recherche de séquences nucléotidiques homologues

A partir de la séquence de C4M41-2 disponible il apparaît difficile de définir une région codant pour une protéine. Dans le but d'élargir notre recherche, nous avons recherché des séquences nucléotidiques homologues de C4M41-2. Pour cela le programme Blastn a été utilisé pour rechercher des séquences à partir de différentes banques de données.

A partir de la banque du **NCBI** (National Center for Biotechnology Information) plusieurs séquences présentent des homologies avec C4M41-2 (**Figure 71**). Seule la première séquence présente un pourcentage d'identité correcte, de l'ordre de 95% sur une longueur de 105 pb. Cette séquence homologue à C4M41-2 est aussi une étiquette de cDNA-AFLP issue des travaux menés sur les gènes régulés au cours du cycle cellulaire dans les cellules BY-2 (Breyne et al., 2002).

Les résultats suivants ne sont pas suffisamment satisfaisants pour en extraire quelconques informations. Les alignements entre C4M41-2 et les séquences de la banque s'apparient sur une très courte région, ce qui indique que ces gènes ne correspondent pas significativement à C4M41-2 (**figure 71A et B**).

La banque de données **du TIGR** (The Institut for Genomic Research) rassemble un grand nombre de données sur les séquences d'ADNc pleine longueur, les ESTs (Expressed Sequence tags) qui sont des ADNc partiels. Le Blastn effectuée sur cette banque a fait apparaître que plusieurs séquences d'ADNc de tabac possédaient des homologies de séquence avec C4M41-2. La séquence qui s'en rapproche le plus est l'étiquette des cDNA-AFLPs, déjà détectés lors de la recherche sur la banque du NCBI (**Figure 72A**). Le deuxième résultat correspond à une partie du TC 2481. Un TC (Tentative Consensus séquence) est un ensemble d'Est qui ont été mis bout à bout. L'alignement de cette séquence avec celle de C4M41 (**Figure 72B**) montre que sur 680 pb les deux séquences présentent un fort pourcentage d'identité de l'ordre de 64%.

Ce TC a été soumis à plusieurs analyses bioinformatiques réalisées par le TIGR (**Figure 73A**). Ce TC est constitué de 2 EST : BP 530393 et BP 533215 qui tous les deux proviennent d'une banque d'ADNc construite à partir de cellules BY-2 cultivées sous différentes conditions hormonales (**Figure 73B**). Aucun travail sur cette séquence n'a apparemment été publié.

La recherche d'homologies nucléotidiques au sein du génome d'*Arabidopsis thaliana* (disponible sur le site du TAIR : <http://www.arabidopsis.org/>) n'a donné aucune information complémentaire.

L'interrogation des données issues du séquençage du génome de tabac, n'a pas permis d'obtenir les séquences correspondantes.

Néanmoins la recherche de séquences nucléotidiques en réalisant un Blastn à partir de la banque de données du WU (Washington University) a permis d'identifier un gène codant pour un polypeptide contrôlant la prolifération cellulaire chez les plantes (**Figure 74A**). L'identité entre cette séquence et celle de C4M41 s'élève à 95%. Ce gène (1H02) et le polypeptide correspondant font l'objet d'un brevet déposé

A.

N° d'accession	nom de la séquence	e value
gi 47969649 emb AJ717883.1	Nicotiana tabacum cDNA-AFLP-fragment	1,00E-36
gi 32526581 emb AL772237.12	Mouse DNA sequence from clone RP23-14I13 on chromosome 4, complete sequence	0.047
gi 34368607 gb AC103576.8	Rattus norvegicus 12 BAC CH230-63N13 complete sequence	0.74
gi 16418186 gb AC092018.2	Homo sapiens chromosome 1 clone RP11-543G21, complete sequence	0.74
gi 33324693 gb AF511561.1	Pennisetum glaucum mitochondrial gene sequence	2.9
gi 58530788 dbj AP008208.1	Oryza sativa (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome2, complete sequence	2.9

B.

```

1. gi|47969649|emb|AJ717883.1| Nicotiana tabacum cDNA-AFLP-fragment B5T13-4-160, cultivar Bright
review 2
Length=112

Score = 163 bits (82), Expect = 1e-36
Identities = 101/106 (95%), Gaps = 1/106 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 715  ACTTCTCTGTCCTTTGTTTGGCATTCTAAGCTGTTTTCTGCACAATCAAGTATTGGATC 774
          ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||| ||||||| |
Sbjct 107  ACTTCACTGTCCCTTTGTTTGGCATTCTAAGCTGTCTTCTGCACAATCAGGTATTGGAGC 48

Query 775  A-TGAATTC AAGCCTTTGATTTGTAAAATGTTGAGTTCCTATGCTT 819
          | |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 47  AGTGAATTC AAGCCTTTGATTTGTAAAATGTTGAGTTCCTATGCTT 2

2. gi|32526581|emb|AL772237.12| Mouse DNA sequence from clone RP23-14I13 on chromosome 4, complete
sequence
Length=169452

Score = 48.1 bits (24), Expect = 0.047
Identities = 27/28 (96%), Gaps = 0/28 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 778  AATTC AAGCCTTTGATTTGTAAAATGTT 805
          ||||||||||||||||||| |||||
Sbjct 89703  AATTC AAGCCTTTGATTTGTAAAATGTT 89676

3. gi|34368607|gb|AC103576.8| Rattus norvegicus 12 BAC CH230-63N13 (Children's Hospital Oakland
Research Institute) complete sequence
Length=219287

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.74
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 662  CTTTGTTACAGTATTTTGAATC 683
          |||||||||||||||||||
Sbjct 1819  CTTTGTTACAGTATTTTGAATC 1840

```

Figure 71. Résultats de la recherche d'homologie de séquences nucléotidiques sur NCBI

A. Liste des 6 meilleurs scores.

B. Détails de l'alignement de la séquence de C4M41 avec les 3 premiers scores. Le premier correspond à une étiquette de cDNA-AFLP issu du travail engagé sur le suivi du cycle cellulaire des cellules BY-2 (Breyné, 2002). Les résultats suivants montrent une homologie de séquences sur une trop courte partie de plusieurs génomes animaux.

Étiquette cDNA-AFLP
provenant des travaux
sur le cycle cellulaire
dans les cellules BY-2
(Breyne, 2002)

A.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Sum Probability P(N)	M
tobacco BP134990	939	6.7e-32	1
tobacco TC2481	913	2.7e-31	1
tobacco BP530087	562	6.0e-20	1
tobacco BP137361	393	7.4e-12	1
tobacco TC3193	396	3.1e-10	1
tobacco TC3512	359	3.3e-08	1
tobacco BP531268	307	1.7e-07	1
tobacco BP532725	280	2.6e-06	1
tobacco BP526509	279	2.9e-06	1
tobacco BP534192	281	6.4e-05	1
tobacco BP136289	288	6.9e-05	1
tobacco BP135172	275	0.00027	1
tobacco TC2249 similar to UP Q90CV7 (Q90CV7) Histone Hi-1...	272	0.00064	1
tobacco BP530560	267	0.0011	1
tobacco TC2085 homologue to UP Q0LWU9 (Q0LWU9) NADH3 prot...	254	0.0091	1
tobacco TC2200 similar to UP CLDN_MOUSE (Q9D7U6) Claudin-...	237	0.013	1
tobacco BP136186	245	0.019	1
tobacco TC3425	237	0.064	1
tobacco BP534765	225	0.10	1
tobacco BP525553	227	0.11	1

B.

TC2481 C4M41_865bp	-----GCAAAAGAAACAACAACCATTTCTCTTC 29 ACGTGGGGAGGATGAATCCAGCCCCAAAACCTCCCTCAAAACAGCTCAAAAACGAGCTGA 60 * * * * *
TC2481 C4M41_865bp	ACTCTTCTGAAAACCT---CCAATCATAAAACCTCTACTCCCTATATGTAAAAGCTCCAA 86 AAACAGCCCCAAAAATGAGCTGAAAACCCAGTCCACACACAGCTGCCGATAACACCCCCAAA 120 * * * * *
TC2481 C4M41_865bp	AAACCCAG----CTGAAATTC--CGCGCCAAACACCA--TGGAAAACGAGCTCCAAAC- 137 ACAGTCACTTTTCTCCAGTTCAACACCCCTAAAACGAGCTGGAAATCCAGTTCCAAAAGA 180 * * * * *
TC2481 C4M41_865bp	CAGCAAAATATCAACCCCCAACCCAGCTGGA--ATOGACCTATAAAGACCCCCAAAAAAC 196 CGACCTCAAATGCTCCAAAAAAGAGCTGGATATCTGCCCGA--AAAGCAGCCATGAAAC 239 * * * * *
TC2481 C4M41_865bp	ACAGCTCTAAAGCCTTCTCAAAACCTCTCAAAAACAGTCTCTCAAACCTCAA--CAAAAGTCA 255 TCCG--TTAAACACCATCCAAATCAGCCCCGAAACAGCCCCCAAGCACAAGCTAAAACCTG 298 * * * * *
TC2481 C4M41_865bp	CCCAAACCCAGCCCCCAAAACCTGCTCGCAAAAATAGCTCCA--AAGAGCAGCCAAA--CCAG 312 CTGAAATCAGCTG--AAAAACG--CAACAAATAAAATTGCATAACACCACCCAAAATCCAG 355 * * * * *
TC2481 C4M41_865bp	CTGCAAAATTGCTGAAAAACCCAGTTGCAAAAACCCCAAAAAGCTGTGCCAAAATCAGCAC 372 C-GTTAGAGAGCAGCAAAAATCAGCTGCGAATCTGCTGAAAAATCTGACCAAAAAGTAGTGA 414 * * * * *
TC2481 C4M41_865bp	CAAAACCTCGACGAAACACCATCCAAAACCCAGCCACAAAACATCCATCGAAAACGACCCCT 432 AACAAAGCT--GCGAAATAGC--TCGAAATCCAGCCACAAAACCTCTATTGAAACCAACC--TT 470 * * * * *
TC2481 C4M41_865bp	TTACACTCGAAATAGTTGTCAAAATCTAGTTGAGTCGGTATAATTTTTGTCCAGATCTTA 492 TTACACCCGAAACGGTTGTCCAAATATAGTTGAGTTGGTATAGTCTTTTCTGAAATCTCTG 530 *****
TC2481 C4M41_865bp	GTTTGAAGTGGCCGTCGAGGTTATGGTCGATTGGTTCTGTTCCGTTTGAAGGTC----CC 540 ATTGCTGGTGTAGTGGGTTTCATGGTCAATTGGCTCTGTTCCGTTTCGAGGTCGGAGCTT 590 * * * * *
TC2481 C4M41_865bp	TATTTTGTCTCTGGCTTC-----GGTCAAATTGTAGTT-----GCGGATTTT 589 TGTTTCGCTATTGTGTTTCGAAAGCAACAAGCCACACTCTTGTATTGAAGGTCGATTTT 650 * * * * *
TC2481 C4M41_865bp	CTTATATTTTTGCATCGGTAGAGGTTCTTCAATGTAAACGAAGTTTCCAG----TAATAA 645 TCTA--ATTTTCACTTTGTTACAGTATTTTGAATCTTGTGTTCACTGCTGAATCTATTAA 709 * * * * *
TC2481 C4M41_865bp	GGTCCACTCTTACACTTATGTT--ATCTCAAATTGGTCTGCTAGCATAGTGAATGATT 703 TCTCACTTCTCTGCTCTTGTGTTGGCAATTCYAAAGCTGTTTTCTGCACAAATCAAGTATT 769 * * * * *
TC2481 C4M41_865bp	TTGGNG----- 709 GGATCATGAATTCAGCCCTTTGATTTGTAAAATGTTGAGTTCCTATGCTTGATAATAAAA 829

Figure 72. Résultats de Blastn réalisé dans la banque du TIGR
A. Résultats du Blastn. La première séquence correspond à une étiquette issu des cDNA-AFLP réalisés au cours des différentes phases du cycle cellulaire des cellules BY-2 (Breyne, 2002). La deuxième séquence d'ADNc qui s'aligne avec C4M41 est un EST de tabac : N°TC2481, dont l'alignement est présenté en **B.**



Figure 73. A
Caractérisation du
TC2481 dans la banque
du TIGR

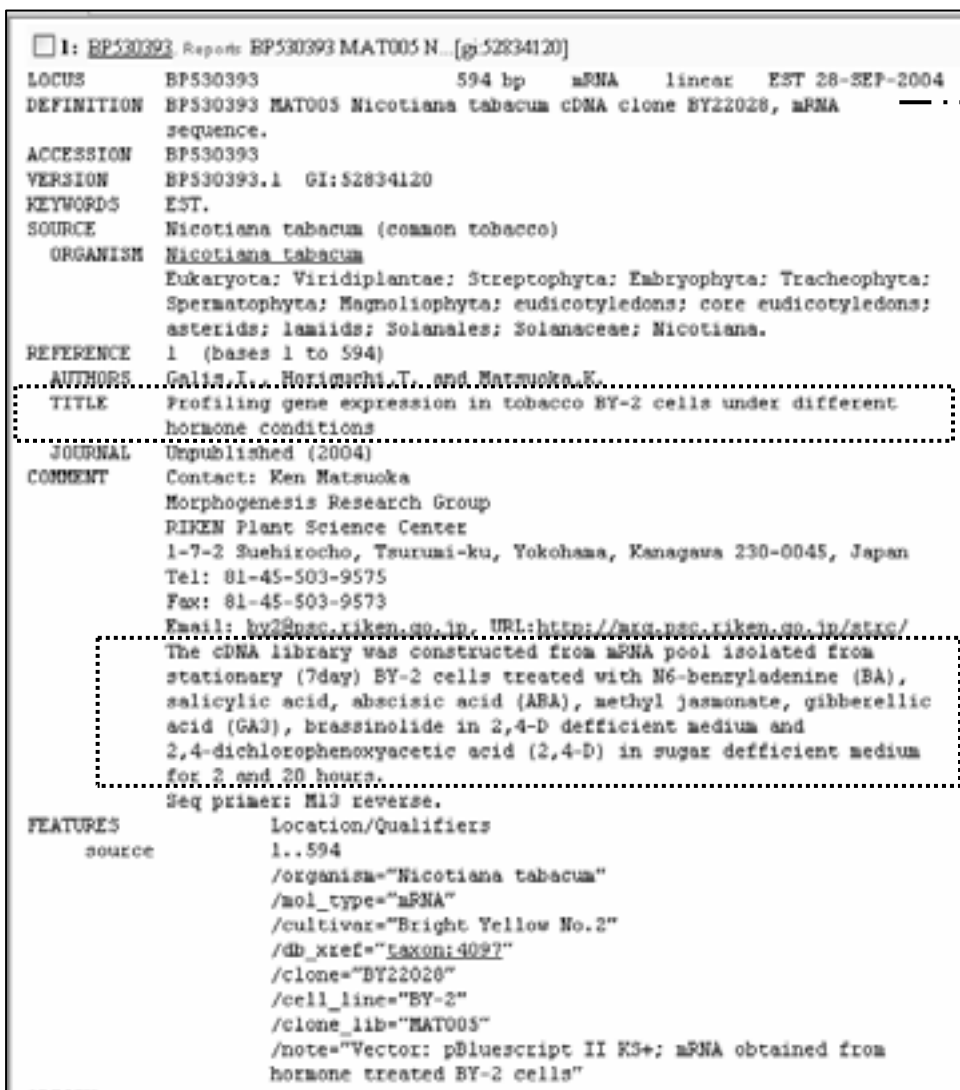


Figure 73. B Rapport
sur la protéine codée
par l'ADNc BP530393,
contenu dans le TC
2481

DB:ID de la source	Source	Longueur de la séquence source	Identité sur la partie qui s'aligne avec C4M41%	evalue
EM_PAT:BD446352	Polypeptide controlled plant cell proliferation and gene coding such polypeptide.	2137	95	1.1e-165
EM_PL:AJ717883	Nicotiana tabacum cDNA-AFLP-fragment BSTT13-4-160, cultivar Bright Yellow 2	112	93	6.6e-14

Information générales:	
Numéro d'Accession primaire	BD446352
Numéro d'Accession	BD446352
Nom	EMBL:BD446352
Type moléculaire	unassigned DNA
Taille de la séquence	2137
Division d'entrée	PLN
Version de la séquence	BD446352.1
Date de création	09-nov-05
Date de modification	09-nov-05
Description	
Description	Polypeptide controlled plant cell proliferation and gene coding such polypeptide.
Organisme	Nicotiana tabacum (common tobacco)
Classification	Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; lamiids; Solanales; Solanaceae; Nicotiana.
Références :	
Ifuku,K.; Sato,F.; Polypeptide controlled plant cell proliferation and gene coding such polypeptide Patent number JP2004097035-A/1 , 02-APR-2004. The head of Kyoto University.	
Position : 1-2137	

Résumé du brevet JP2004097035 sur l'european patent office

PROBLEM TO BE SOLVED: To determine the amino acid sequence of a cell proliferation control factor related to the control of cell proliferation in plant cells and the base sequence of a gene encoding the same, and to provide a method for utilizing the above-described specific cell proliferation control factor and its gene.

SOLUTION: This polypeptide which controls the cell proliferation of a plant comprises a specific amino acid sequence, or the polypeptide which controls the cell proliferation of the plant comprises the amino acid sequence wherein one or more amino acids are replaced, lacked, inserted and/or added. The gene encodes the polypeptide.

COPYRIGHT: (C)2004,JPO

Figure 74. Recherche de séquences homologues à C4M41 dans la banque de données de l'Université de Washington (WU)

A.Résultats du Blastn sur EBI (programme Blast2-WU)

B.Informations sur le gène correspondant au premier résultat du Blast

```

C4M41_865bp -----ACGTGGGGGAGGATGAATCCAGCCCCAAAACCTCCCTCAAAACAGCTCAAA 50
bd446352 GAAACCAGCAAAAAAATGAGCTGCAAAATCCAGCCCCAAAACCTCCCTCAAAACAGCTCAAA 1320
          *
C4M41_865bp AACGAGCTGAAAAACAGCCCAAAAAATGAGCTGAAAACCAGTCCACACACAGCTGCCGATA 110
bd446352 AACGAGCTGAAAAACAGCCCAAAAAATGAGCTGAAAACCAGTCTACACACAGCTGCCGATA 1380
          *****
C4M41_865bp ACACCCCAAAACAGTCACTTTTCTCCAGTTCAACACCCCT-AAAAACGAGCTGGAAATCC 169
bd446352 ACACCTCAAAAGAGTCACTTTTCTCCAGTTCAACACCCCAAAACGAGCTGGAAATCT 1440
          *****
C4M41_865bp AGTTCCAAAGACGACCTCAAATGCTCCAAAAAAGAAGCTGGATATCTGCCGAAAAACGCA 229
bd446352 AGTCCCAAAGACGCTCCTCAAATGCTCCAAAAAAGAAGCTGAAAATCTGCCGAAAAATGCT 1500
          ***
C4M41_865bp GCCATGAACCTCCGTTAAACACCATCCAAATCAGCCCCGAAACAGCCCCCAAGCACAAGC 289
bd446352 GCCATGAACCTCCATTAACACCACCAAATCAGCCCCGAAACAGCCCCCAAGCACAAGC 1560
          *****
C4M41_865bp TAAAAACTGCTGAAATCAGCTGAAAAACGCAACAAATAAAATTGCATAACACCACCCAAA 349
bd446352 TAAAAACTGCTAAAATCAGTTGGAAATGCAAGCAAGCAAGATTGCAAAACACCACCCAAA 1620
          *****
C4M41_865bp ATCCAGCGTTAGAGAGCAGCAAAATCAGCTGCGAATCTGCTGAAAAATCTGACCAAAAGT 409
bd446352 ATTCAGCGTTAGAGAGCAGCAAAATCAGCTGCGAATCTGCTGAAAAATCTGACCAAA-GT 1679
          **
C4M41_865bp AGTGAACAAGCTGCGAAATAGCTCGAAATCCAGCCACAAACCTCTATTGAAACACCCCT 469
bd446352 AGTGAACAAGCTGCGAAATAGCTCGAAATCCAGCCACAA-CCTCTATTGAAACGACCCCT 1738
          *****
C4M41_865bp TTTACACCCGAAACGGTTGTCCAAATATAGTTGAGTTGGTATAGTCTTTTCCTGAATCCT 529
bd446352 TTTACACCCGAAACGGTTGTCCAAATATAGTTGAGTTGGTATAGTCTTTTCCTGAATCCT 1798
          *****
C4M41_865bp GATTTCGTTGCTAGTTCGGGTTTCATGGTCAATTGGCTCTGTTCCGTTTCGAGGTCAGGCT 589
bd446352 GATTTCGTTGCTAGTTCGGGTTTCATGGTCAATTGGCTCTGTTCCGTTTCGAGGTCAGGCT 1858
          *****
C4M41_865bp TTGTTTCGCTATTGTGTTTCGAAAGCAACAAGGCCACACTCTGTATTGAAGGTCGATTT 649
bd446352 TTGTTTCGCTATTGTGTTTCGAAAGCAACAAGGCCACACTCTGTATTGAAGGTCGATTT 1918
          *****
C4M41_865bp TTCTAATTTTCACTTTGTTACAGTATTTGAATCTTGTGTTCACTGCTGAATCTATTAA 709
bd446352 TTCTAATTTTCACTTTTATTACAGTATTTGAATCTTGTGTTCACTGCTGAATCTATTAA 1978
          *****
C4M41_865bp TCTCTACTTCTCTGCTTTGTTTGGCATTCTTAAGCTGTTTCTGCACAATCAAGTATT 769
bd446352 TCTCTACTTCTCTGCTTTGTTTGGCATTCTTAAGCTGTTTCTGCACAATCGGGTATT 2038
          *****
C4M41_865bp GGATCATGAATCAAGCCTTTGATTTGTAAAATGTTGAGTTCCTATGCTTGATAATAAAA 829
bd446352 GGATCATGAATCAAGCCTTTGATTTGTAAAATGTTGAGTTCCTATACTTGATAATAAAA 2098
          *****
C4M41_865bp TTCTAGATCTCTATTGCTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA-- 865
bd446352 TTCTAGATCTCTATTGCAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA 2137
          *****

```

Figure 75. Aligement de la séquence de C4M41 avec la séquence brevetée bd446352

La séquence correspondant au polypeptide identifiée dans le brevet est indiquée en gras.

1^{er} cadre de lecture de C4M41-2

C4M41-2	T	Q	Q	A	K	L	H	N	T	T	Q	N	E	A	L	E	S	S
	ACG	CAA	CAA	ATA	AAA	TTG	CAT	AAC	ACC	ACC	CAA	AAT	CCA	GCG	TTA	GAG	AGC	AGC
1H02	M	Q	Q	T	E	L	Q	N	T	T	Q	N	S	A	L	E	S	S
	ATG	CAA	CAA	ACA	GAA	TTG	CAA	AAC	ACC	ACC	CAA	AAT	TCA	GCG	TTA	GAG	AGC	AGC

C4M41-2	K	I	S	C	E	S	A	E	K	S	D	Q	K	*	*	N	K	L
	AAA	ATC	AGC	TGC	GAA	TCT	GCT	GAA	AAA	TCT	GAC	CAA	AGG	TAG	TGA	AAC	AAG	CTG
1H02	K	I	S	C	E	S	A	E	K	S	D	Q						
	AAA	ATC	AGC	TGC	GAA	TCT	GCT	GAA	AAA	TCT	GAC	CAA	AGT	AGT	GAA	ACA	AGC	TGC

C4M41-2	R	N	S	S	K	S	S	H	K	P	L	L	K	P	P	F	Y	T
	CGA	AAT	AGC	TCG	AAA	TCC	AGC	CAC	AAA	CCT	CTA	TTG	AAA	CCA	CCC	TTT	TAC	ACC
1H02	GAA	ATA	GCT	CGA	AAT	CCA	GCC	ACA	ACC	TCT	ATT	GAA	ACC	ACC	CTT	TTA	CAC	CCG

C4M41-2	R	N	G	C	P	N	I	V	
	CGA	AAC	GGT	TGT	CCA	AAT	ATA	GTT	GA
1H02	AAA	CGG	TTG	TCC	AAA	TAT	AGT	TGA	

2^{ème} cadre de lecture de C4M41-2

C4M41-2	R	N	K	*	N	C	I	T	P	P	K	I	Q	R	*	R	A	A
	CGC	AAC	AAA	TAA	AAT	TGC	ATA	ACA	CCA	CCC	AAA	ATC	CAG	CGT	TAG	AGA	GCA	GCA
1H02	ATG	CAA	CAA	ACA	GAA	TTG	CAA	AAC	ACC	ACC	CAA	AAT	TCA	GCG	TTA	GAG	AGC	AGC

C4M41-2	K	S	A	A	N	L	L	K	N	L	T	K	S	S	E	T	S	C
	AAA	TCA	GCT	GCG	AAT	CTG	CTG	AAA	AAT	CTG	ACC	AAA	AGT	AGT	GAA	ACA	AGC	TGC
1H02	AAA	ATC	AGC	TGC	GAA	TCT	GCT	GAA	AAA	TCT	GAC	CAA	AGT	AGT	GAA	ACA	AGC	TGC

C4M41-2	E	I	A	R	N	P	A	T	N	L	Y	*	N	H	P	F	T	P
	GAA	ATA	GCT	CGA	AAT	CCA	GCC	ACA	AAC	CTC	TAT	TGA	AAC	CAC	CCT	TTT	ACA	CCC
1H02	E	I	A	R	N	P	A	T										
	GAA	ATA	GCT	CGA	AAT	CCA	GCC	ACA	ACC	TCT	ATT	GAA	ACC	ACC	CTT	TTA	CAC	CCG

C4M41-2	E	T	V	V	Q	I	*	L	
	GAA	ACG	GTT	GTC	CAA	ATA	TAG	TTG	A
1H02	AAA	CGG	TTG	TCC	AAA	TAT	AGT	TGA	

3^{ème} cadre de lecture de C4M41-2

C4M41-2	A	T	N	K	I	A	*	H	H	P	K	S	S	V	R	E	Q	Q
	GCA	ACA	AAT	AAA	ATT	GCA	TAA	CAC	CAC	CCA	AAA	TCC	AGC	GTT	AGA	GAG	CAG	CAA
1H02	ATG	CAA	CAA	ACA	GAA	TTG	CAA	AAC	ACC	ACC	CAA	AAT	TCA	GCG	TTA	GAG	AGC	AGC

C4M41-2	N	Q	L	R	I	C	*	K	I	*	P	K	V	V	K	Q	A	A
	AAT	CAG	CTG	CGA	ATC	TGC	TGA	AAA	ATC	TGA	CCA	AAA	GTA	GTG	AAA	CAA	GCT	GCG
1H02	AAA	ATC	AGC	TGC	GAA	TCT	GCT	GAA	AAA	TCT	GAC	CAA	AGT	AGT	GAA	ACA	AGC	TGC

C4M41-2	K	*	L	E	I	Q	P	Q	T	S	I	E	T	T	L	L	H	P
	AAA	TAG	CTC	GAA	ATC	CAG	CCA	CAZ	ACC	TCT	ATT	GAA	ACC	ACC	CTT	TTA	CAC	CCG
1H02	GAA	ATA	GCT	CGA	AAT	CCA	GCC	ACA	ACC	TCT	ATT	GAA	ACC	ACC	CTT	TTA	CAC	CCG

C4M41-2	K	R	L	S	K	Y	S	*
	AAA	CGG	TTG	TCC	AAA	TAT	AGT	TGA
1H02	K	R	L	S	K	Y	S	*
	AAA	CGG	TTG	TCC	AAA	TAT	AGT	TGA

Figure 76. Comparaison de la séquence de C4M41-2 et de 1H02, correspondant à l'ORF codant pour le polypeptide 1h02.

Au début de cette région, 5 bases ont été modifiées (lettres en rouge), dont la première qui permet d'obtenir une méthionine "START". 2 bases ont été délétes dans le brevet, entraînant 2 sauts de cadre de lecture: passage du 1^{er} au 2^{ème} cadre, à cause de la 1^{ère} adénine délétes (barre bleue) et du 2^{ème} au 3^{ème} cadre à cause la 2^{ème} adénine délétes (barre verte).

en avril 2004 et mis dans les bases de données en novembre 2005 (**Figure 74B et C**). Les auteurs présentent une séquence de 2137 pb, ce qui correspond à la taille détectée par northern Blot dans nos expérimentations (**Figure 68**). L'alignement de C4M41-2 avec cette séquence montre qu'elle correspond à la région 3' du gène 1H02 (**Figure 75**). Les auteurs ont isolé cette séquence par la technique de soustraction d'ADNc à partir de suspensions cellulaires de tabac au début de la phase de division cellulaire intense. Selon les auteurs cette séquence n'est pas assez longue pour définir un ORF. Des changements apportés à la séquence nucléotidique leur ont permis d'obtenir une protéine contenant une séquence consensus d'entérotoxine résistante à la chaleur (**figure 79C**). Ce domaine n'a pas été retrouvé lors de nos analyses *in silico* de cette protéine. Les auteurs définissent ce peptide comme un nouveau facteur de croissance qui agirait à la fois sur la division des chloroplastes et des cellules. Les auteurs : Sato F. et Ifuku K. n'ont pas encore publiés de travaux sur ce polypeptide.

Le cadre de lecture ouvert (ORF) de 1H02 fait 183 pb (entre 1587 et 1772 pb) et correspond au polypeptide 1H02 de 61 acides aminés. Si l'on compare la partie de la séquence de C4M41-2 correspondant à cet ORF, on constate 7 changements nucléotidiques (**Figure 76**). Au début de la séquence, 5 changements nucléotidiques entraînent des différences dans la séquence protéique par rapport à celle de C4M41-2. En particulier, la 1^{ère} modification qui fait apparaître un cadre de lecture unique avec une méthionine "START", puis deux sauts de cadre de lecture sont engendrés par la délétion de 2 adénines. La détection de ces différences est en accord avec le brevet, qui indique que 1, 5 ou 7 changements ont été nécessaires pour obtenir le polypeptide.

2.4. Analyse de l'expression de C4M41-2 dans les plantes de tabac par HIS

La distribution tissulaire des transcrits de *C4M41-2* dans les organes végétatifs aériens a été analysée à l'aide de la technique d'hybridation *in situ* (HIS).

Pour détecter les transcrits *in situ*, des sondes ARN antisens ont été obtenues par transcription *in vitro* à partir du fragment de 615 pb de *C4M41-2*. Un contrôle négatif d'hybridation est réalisé en utilisant les sondes ARN sens correspondantes (**Figure 77**).

Cette analyse a été étendue à des bourgeons floraux à des stades précoces de développement. Ces organes se caractérisent notamment par une intense activité de prolifération. Les méristèmes apicaux sont organisés en trois domaines, ou zones (**Figure 77I**). La zone centrale (ZC) occupe le sommet du méristème et contient les cellules souches assurant le maintien du méristème. Cette zone est entourée par la zone périphérique (ZP), où naissent les primordia d'organes. Les cellules de la ZP, sont plus petites, moins vacuolisées et se divisent généralement plus rapidement que celles de la ZC. La formation du futur primordium (P0) débute avec une augmentation de la fréquence des divisions périclines dans l'assise L2. La zone médullaire (ZM) comporte des cellules plus grandes, et produit les tissus internes de la tige.

Expression du gène C4M41-2 dans les boutons floraux de Tabac

A un stade précoce de la formation des primordia floraux, stade floritypique, la distribution du signal paraît homogène et concerne la zone ZP du méristème floral et le primordium de sépale (**Figures 77A, B**).

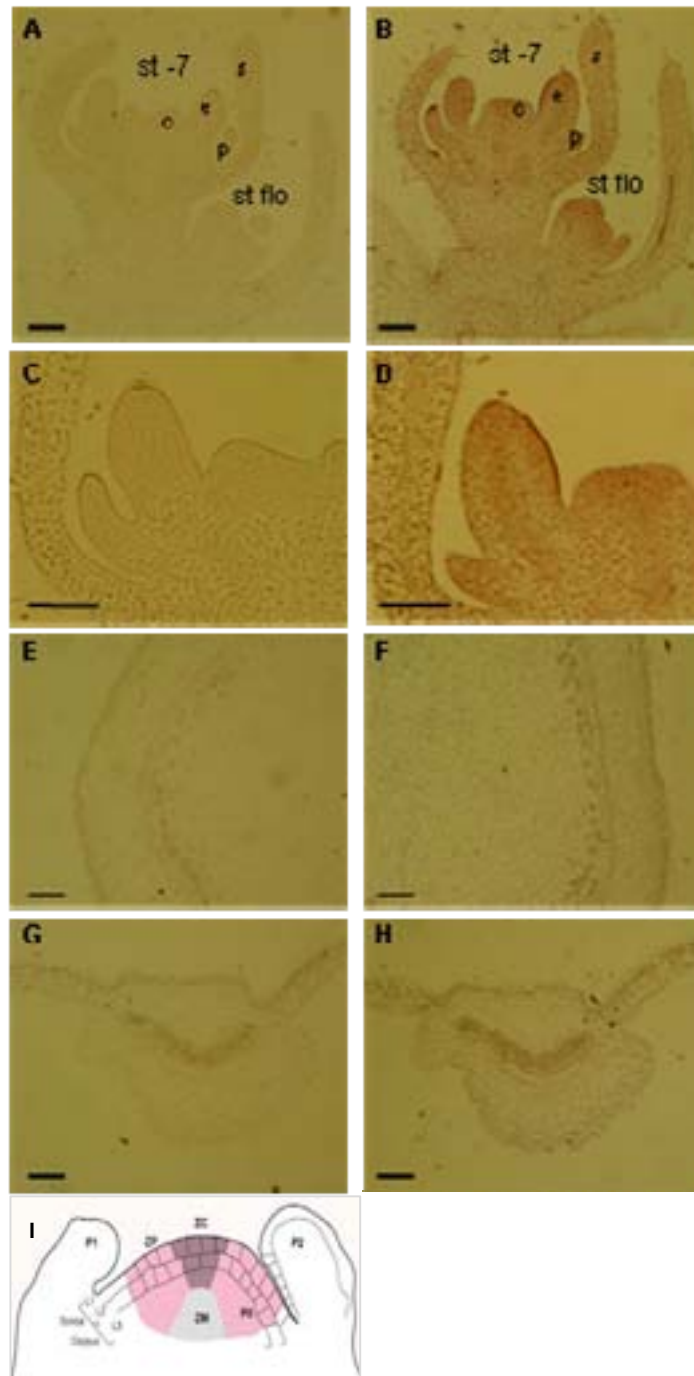


Figure 77 . Analyse, par hybridation *in situ*, de l'expression de *C4M41-2* chez le Tabac

(A, B), boutons floraux aux stades -7 et floritypique (Koltunow et al., 1990) en coupe longitudinale.

s, sépale; p, pétale; e, étamine; c, carpelle; stade -7, st-7; stade floritypique, st flo.

(C, D) grossissement des vues en A et B focalisant sur les primordia d'organes floraux pétales, étamines et carpelles du bouton floral au stade -7.

(E, F) tige en coupe transversale.

(G, H) feuille en coupe transversale

Photographies A, C, E et G, ribosonde *C4M41* sens (contrôle négatif).

Photographies B, D, F et H, ribosonde *C4M41* antisens

Bars = 200 μ m

(I) Description histologique de l'organisation du méristème apical. P1, P2 : primordiums.

Autran et Traas, 2001

Dans un bourgeon floral à un stade un peu plus tardif, stade -7 (7 jours avant anthèse), le signal d'hybridation est fortement localisé au niveau des primordia d'organes en cours de formation notamment des pétales et des étamines avec une prédominance dans la première assise cellulaire de la face adaxiale des organes (**Figures 77A, B, C et D**).

Expression du gène C4M41-2 dans la tige de Tabac

L'hybridation des sondes ARN a été réalisée sur des coupes transversales réalisées au milieu des entre-nœuds de tiges de 3 cm de diamètre, situés en dessous de l'apex caulinaire. Nous constatons une absence de signal dans les tissus de la tige (**Figures 77E et F**).

Expression du gène C4M41-2 dans les feuilles de Tabac.

L'expérience d'hybridation *in situ* réalisée sur la feuille n'a pas permis de révéler la présence de transcrits de C4M41-2 dans les tissus observés (**Figures 77G et H**).

Les expériences d'HIS indiquent que le gène C4M41-2 serait exprimé au sein de la plante de tabac dans les méristèmes, et les zones de formation des primordia d'organes.

2.5. Présence du gène dans le génome de *N. tabacum* et de ses parents

Une amplification à l'aide des amorces C4M41-North et C4M41-R a été réalisée sur l'ADN génomique de *Nicotiana tabacum* et de ses parents : *Nicotiana tomentosiformis* et *Nicotiana sylvestris*. Ce gène ou du moins la région de 615 pb que l'on amplifie chez *N. tabacum* est retrouvé dans le génome de *N. tomentosiformis* mais ne semble pas présent chez *N. sylvestris* (**Figure 77A**). La séquence correspondante chez *N. tomentosiformis* a été clonée et séquencée. La comparaison de cette séquence avec celle de *N. tabacum* montre qu'il s'agit bien du même gène C4M41-2, malgré quelques différences (**Figure 77C**). Or la séquence correspondant à C4M41-2 chez *N. tomentosiformis* ne permet pas de définir un ORF, ni de retrouver le codon "start" défini par Sato et Ifuku dans leur brevet.

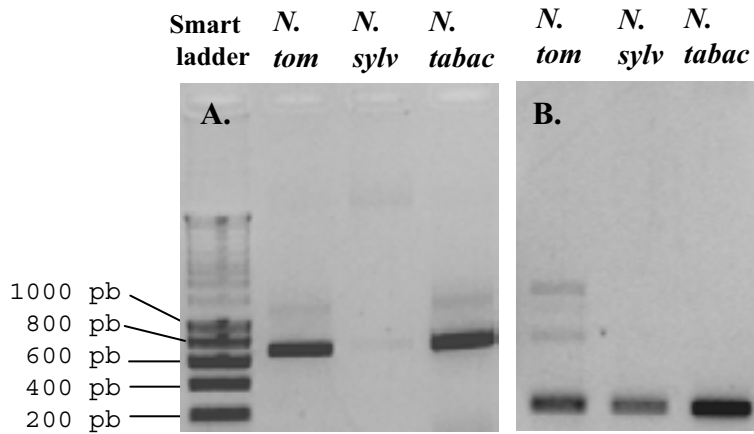


Figure 78. Amplification de C4M41 à partir de 3 génomes de *Nicotiana*
 L'amplification de C4M41 (A) a été réalisée à partir des amorces C4M41-North et C4M41-R sur l'ADN génomique de *Nicotiana tomentosiformis* (*N. tom*) *Nicotiana sylvestris* (*N. sylv*) *Nicotiana tabacum* (*N. tabac*). L'ubiquitine a été utilisée en tant que contrôle (B). La séquence issue de *N. tomentosiformis* a été alignée avec celle de *N. tabacum* (C).

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

C4M41_N. tomentosiformis	--TTCGATTCGACCCTCAAAACAGCTCAAAAACGTAGCTGAAAACAACCC	48
C4M41_N. tabacum	CGGCCGCGTCGACCCTCAAAACAGCTCAAAAACG-AGCTGAAAACAGCCC	49
	** *****	
C4M41_N. tomentosiformis	AAAAACGAGCTGAAAACCAGTCTACACACAGCTGCCGATAACACCTCAA	98
C4M41_N. tabacum	AAAAATGAGCTGAAAACCAGTCCACACACAGCTGCCGATAACACCCCAA	99

C4M41_N. tomentosiformis	AAGAGTCACTTTTCTCCAGTTCAACACCCCCAAAAACGAGCTGGAGATC	148
C4M41_N. tabacum	AACAGTCACTTTTCTCCAGTTCAACACCCCT-AAAAACGAGCTGGAAATC	148
	** *****	
C4M41_N. tomentosiformis	TAGTCCAAAGACGACCTCAAATCTCCAAAAAGAAGCTGAAAATCTGC	198
C4M41_N. tabacum	CAGTTCCAAAGACGACCTCAAATGCTCCAAAAAGAAGCTGGATATCTGC	198
	*** ***** *	
C4M41_N. tomentosiformis	CCGAAATGCGCCATGAACTTCCATTAACACCACCCAAATCAGCCCCG	248
C4M41_N. tabacum	CCGAAACGCGCCATGAACTCCGTTAAACACCATCCAATCAGCCCCG	248

C4M41_N. tomentosiformis	AAACAGCCCCAAGCACAAGCTAAAACTGCTGAAATCAGTTGGAAAATA	298
C4M41_N. tabacum	AAACAGCCCCAAGCACAAGCTAAAACTGCTGAAATCAGCTGAAAACG	298
	***** ** *	
C4M41_N. tomentosiformis	CAGCAAACAGAATTGCAAAACACCACCCAAAATTCAGCGTTAGAGAGCAG	348
C4M41_N. tabacum	CAACAAATAAAATTGCATAACACCACCCAAAATCCAGCGTTAGAGAGCAG	348
	** **** *	
C4M41_N. tomentosiformis	CAAAATCAGCTGCGAATCTGCTGAAAAATCTGACCAAAGCAGTGAACA	398
C4M41_N. tabacum	CAAAAATCAGCTGCGAATCTGCTGAAAAATCTGACCAAAGTAGTGAACA	398

C4M41_N. tomentosiformis	AGCTGCGAAATAGCTCGAAATCCAGCCACAAACCTCTATTGAAACCACCC	448
C4M41_N. tabacum	AGCTGCGAAATAGCTCGAAATCCAGCCACAAACCTCTATTGAAACCACCC	448

C4M41_N. tomentosiformis	TTTTACACCCGAAACGGTTGTCCAAATATAGTCGAGTTGGTATAGTCTTT	498
C4M41_N. tabacum	TTTTACACCCGAAACGGTTGTCCAAATATAGTTGAGTTGGTATAGTCTTT	498

C4M41_N. tomentosiformis	TCCTGGATCCTGATTCGTGGTCGTAGTCGGGTTCAATGGTCAATTGGCTCT	548
C4M41_N. tabacum	TCCTGAATCCTGATTCGTGGTCGTAGTCGGGTTCAATGGTCAATTGGCTCT	548

C4M41_N. tomentosiformis	GTTCCGTTTCGAGGTCAGGCTTTGTTTCGCTATTGTGTTTCGAAAGCAAC	598
C4M41_N. tabacum	GTTCCGTTTCGAGGTCAGGCTTTGTTTCGCTATTGTGTTTCGAAAGCAAC	598

C4M41_N. tomentosiformis	AA-----	600
C4M41_N. tabacum	AAGGCCACACTCTTGTATTGAAGGTCGATTTTCTAATTTTCACTTTGTT	648
	**	

C.

3. DISCUSSION

L'auxine agit différemment selon la nature des tissus et des cellules, ce qui se traduit par des effets pléiotropes au sein de la plante. Cette action s'exerce au travers du contrôle de l'expression de très nombreux gènes. Dans le but d'étudier l'action de l'auxine au niveau moléculaire, nous avons réalisé, en collaboration avec le laboratoire Plant System Biology (PSB) de Gand, une étude systématique des programmes d'expression génétique en fonction du phénotype cellulaire observé et de la concentration d'auxine ajoutée dans le milieu de culture.

3.1. Etude globale du profil d'expression des gènes

3.1.1. Les avantages et les inconvénients de la technique de cDNA-AFLPs

Durant ces dernières années la génétique moléculaire a beaucoup évolué, notamment avec le séquençage des génomes de plantes (l'Arabidopsis et le riz par exemple). Bien que d'importants efforts financiers, matériels et humains soient déployés pour connaître la fonction de chaque gène, l'entreprise reste fastidieuse. L'étude du profil transcriptionnel global est un outil efficace pour l'analyse à grande échelle des fonctions du génome, puisqu'elle permet d'obtenir un grand nombre de gènes candidats qui pourront être le sujet d'analyses de génomique fonctionnelle ultérieures. Parmi les outils permettant l'étude globale du transcriptome, les "puces à ADN" sont maintenant largement utilisées mais requièrent une bonne connaissance du génome ou une grande collection d'ADNc. Dans le cas où les informations ne sont pas disponibles, ce qui est vrai pour la majorité des espèces végétales, l'analyse transcriptionnelle basée sur des fragments de différentes tailles d'ADNc offre un outil plus approprié.

Dans le cadre de notre étude sur les gènes régulés par l'auxine, les résultats obtenus mettent en évidence un ensemble de gènes potentiellement induits ou réprimés selon la concentration en auxine et le temps du traitement (annexes 3 à 12). Néanmoins la technique de cDNA-AFLP présente quelques inconvénients. Tout d'abord le nombre limité d'échantillons par expérience de PCR (94 échantillons) et l'impossibilité de comparer précisément les données obtenues entre 2 expériences de PCR ou entre 2 gels de séparation des fragments d'ADNc générés, oblige à avoir un nombre restreint de conditions expérimentales. D'autre part la sensibilité de cette technique, qui est un énorme avantage, peut être une difficulté dans la mesure où l'on peut révéler des variations biologiques indépendantes du traitement. Dans le cas de nos expériences, la quantité d'ARNm nécessaire pour réaliser les cDNA-AFLPs est assez importante, et requiert par conséquent une grande biomasse cellulaire. Pour répondre à ce besoin, nous avons dû préparer un lot par jour, c'est-à-dire que nous avons récolté, un jour donné, les cellules traitées par une concentration d'auxine, sur l'ensemble des temps choisis entre 0 et 12 h (Tableau 6). Cela pose le problème de l'absolue reproductibilité des comportements cellulaires qui n'existe pas dans la culture établie de cellules végétales. Bien que les cultures fussent régulées et conduites dans les mêmes conditions, elles ne réagissent pas tout à fait de la même manière aux conditions de lavage, aux variations de température, aux densités variables de repiquage (entre 2,5 et 2,8 g/L selon les jours) et aux traitements d'auxine. La

sensibilité des cellules entraîne un effet de la moindre variation de température, de lumière ou toutes autres variations environnementales auxquelles peuvent répondre les cellules. De plus les lots de cellules destinées aux cDNA-AFLPs, ont été préparés à Bordeaux en août 2003 (été caniculaire), avant d'être envoyés à Gand.

La préparation des lots à des jours différents est source potentielle de variabilités interlots. Cette variabilité au sein d'un lot peut donc être attribuée uniquement à une teneur différente en auxine.

Enfin, le cDNA-AFLP requiert une grande qualité et des quantités identiques d'ARNm, qui n'est souvent vérifiable qu'au moment de la séparation des produits d'amplifications par PCR, sur gel d'acrylamide. Par exemple, dans nos expériences le lot de cellules traitées avec 1 nM d'AIA montre un profil anormal, par rapport aux autres lots (**Figure 57**). Ceci pourrait être dû à une qualité contestable des ARNm, qui n'a pourtant pas pu être décelée lors des vérifications précédentes.

En outre des quantités variables d'ARN et d'ADNc préamplifiés ont été utilisées pour réaliser les cDNA-AFLPs (figures 55). Le programme Quantar Pro (Keygene, Wageningen, The Netherlands), permet de quantifier l'expression des bandes, en fonction des différentes conditions, en prenant en compte les variations entre chaque échantillon de la quantité d'ADNc chargée dans le gel d'acrylamide. De ce fait, aucune quantification des ARN par spectrométrie n'a été réalisée au moment de l'extraction. Or lors de nos analyses, le programme n'a pas pu corriger toutes les variations, notamment pour toute la cinétique traitée avec 10 µM d'AIA (Figure 57), ce qui nous a contraint à l'exclure des analyses bioinformatiques pour réaliser le regroupement hiérarchique.

De plus les différences d'intensité générale entre le haut et le bas du gel, ne sont corrigées que partiellement par l'ordinateur. Pour la normalisation, le programme Quantar Pro fait la moyenne des intensités des bandes contenues sur toute la hauteur de la piste, et applique un coefficient à la quantification de toutes les bandes. Or cette méthode ne permet pas de corriger la disparité des contrastes entre le haut du gel (plus clair) et le bas du gel (plus foncé). Ce qui nous a obligé à éviter les fragments d'ADNc situés au-dessus de 500 bp et en-dessous de 80 bp (**Figure 56**).

Malgré ces inconvénients, les cDNA-AFLPs nous ont permis d'avoir accès à un grand nombre d'étiquettes potentiellement régulées par l'auxine, et qui nécessitent d'entreprendre d'ultérieures investigations pour comprendre leur rôle dans la signalisation auxinique.

3.2. Rendement de la production d'étiquettes informatives et séquences inconnues

Les analyses par "cDNA-AFLP *in silico*" (Rombauts et al., 2003) ont montré que les fragments d'ADNc obtenus par la double digestion *Bst*Y I et *Mse* I correspondent à 80% des ARNm présents dans les cellules BY-2 (Breyne and Zabeau, 2001; Breyne et al., 2002; Breyne et al., 2003). Après avoir sélectionné les fragments (étiquettes) différenciellement présents en fonction du temps et des conditions auxiniques, le séquençage direct de ces fragments coupés et amplifiés par PCR donne une information sur 80% de ces fragments. En conclusion, 60% des transcrits potentiellement régulés par l'auxine nous donnent une information de séquence (Breyne et al., 2003; Goossens et al., 2003). Ainsi sur les 617 fragments sélectionnés au départ, 505 séquences ont été obtenues et 204 (32%) d'entre elles n'ont donné aucune

homologie de séquences (**Figure 58**). Ceci révèle un autre inconvénient, car les fragments générés sont le plus souvent très courts (100 à 400 pb), sur lesquels de nouvelles amorces sont difficiles à définir, avec une forte probabilité pour qu'ils correspondent à la partie 3' UTR (non traduite et très variable) (Breyne and Zabeau, 2001), donc rares dans les banques de données, pour les organismes dont le génome n'est pas séquencé.

Sur l'ensemble des étiquettes sélectionnées, comme répondant à l'auxine, 50% donnent une séquence nucléotidique utilisable pour des recherches d'homologies dans les banques. Sur 7500 fragments visualisés sur les gels de cDNA AFLPs, seuls 300 peuvent amener des informations sur l'action moléculaire de l'auxine.

3.3. Fonction des étiquettes obtenues

Les résultats issus des analyses de regroupement fonctionnel des étiquettes obtenues indiquent que 11% d'entre elles correspondent au "Métabolisme et à la gestion de l'Energie" au sein de la cellule. Bien que la majorité de ces gènes interviennent dans le métabolisme primaire (glutamine synthétase, enzyme malique, N-arginine convertase, acyl-coA déshydrogénase ...), un certain nombre de gènes du métabolisme secondaire semblent être aussi régulés par l'AIA (chorismate, tocophérol cyclase, catéchol) (**annexe 3**). Une dizaine d'étiquettes de gènes codant pour des cytochromes P450 monooxygénases sont présents dans notre analyse. Ceci peut être mis en rapport avec le fait qu'il a été montré que l'auxine induit l'expression de quelques cytochromes P450 (Barlier et al., 2000; Hasan, 2002; Zhao et al., 2002; Chaban et al., 2003), qui, souvent, interviennent dans sa métabolisation (Introduction- 1).

Un certain nombre d'étiquettes codant pour des sous-unités de NADH déshydrogénase, suggèrent que l'auxine intervient également dans la production d'énergie en régulant l'oxydo-réduction du NADH.

Le fait que trois étiquettes de gènes codent pour la SAM synthétase, montre l'action de l'AIA sur la synthèse d'éthylène, déjà décrite à plusieurs reprises (White, 2002; Balbi and Lomax, 2003; Voesenek et al., 2003; Woltering et al., 2005), mais aucuns travaux ne relatent l'action de l'auxine sur la SAM synthétase.

La traduction et la régulation du devenir protéique semblent également être régulées par l'auxine, car les gènes associés représentent 9% des étiquettes (sur les 617) (**annexe 4**). Parmi celles-ci, on peut distinguer deux grands groupes: les protéines ribosomiques et les protéines intervenant dans l'ubiquitination, ce qui suggère que l'auxine régule autant la synthèse des protéines, que leur dégradation. Ce système de régulation est très étudié et correspond à l'une des voies de signalisation de l'auxine, qui a été développée dans le chapitre introductif.

Les gènes impliqués dans le processus de transcription, de transduction et de défense cellulaire représentent chacun 4% des étiquettes sélectionnées (**annexe 5, 6, 7**).

La plupart des étiquettes intervenant dans la transcription, ont pour fonction de synthétiser l'ARN et de l'épisser, nous avons également détecté des facteurs de transcriptions (tels que les facteurs BHLH), ce qui indiquerait une reprise de l'activité transcriptionnelle suite à l'ajout d'auxine. D'autres étiquettes

correspondent à des protéines intervenant dans le désenroulement ou la séparation des deux brins d'ADN, ce qui semble montrer que la cellule se prépare à la phase de réplication de son ADN (phase S). En effet, nous avons observé que 10% des cellules étaient en phase de mitose 22 h après l'ajout d'auxine ; si l'on considère que la phase G2 dure 4 h et la phase S 5 h, comme l'a décrit Nagata (Nagata et al., 1992), les cellules sont en début de phase S, 13 h après l'ajout d'auxine. Les gènes jouant un rôle dans ce processus de réplication seraient donc transcrits 6 h auparavant.

Dans nos expériences l'auxine agit également sur les gènes de transduction du signal, en induisant des gènes *ARF* (ADP-ribosylation factor) (Introduction-2) et des protéines G ou des protéines qui leur sont associées.

Les gènes participant à la défense cellulaire sont surtout des Glutathione S-transférases et d'autres gènes impliqués dans le stress oxydatif. Notons que parmi ces gènes *ParA* a déjà été identifié comme un gène primaire de réponse à l'auxine (Introduction, paragraphe 4.2.2).

Les gènes impliqués dans le cycle cellulaire représentent 2% (**annexe 8**) et sont majoritairement des histones ou d'autres régulateurs de la condensation de l'ADN ou de sa réparation, ce qui suggère encore que la cellule prépare la phase de réplication de son ADN (phase S). L'action de l'auxine sur les histones a été rapportée à plusieurs reprises, notamment par Alliotte et ses collaborateurs (1989) pour une protéine proche de l'histone H1 (DBP pour DNA binding protein) (Alliotte et al., 1989). Plus récemment il a été montré que NAC1 (ubiquitine ligase), également induite par l'auxine, régulerait l'expression de cette histone (voir Introduction, paragraphe 5.2.5). En 2002, Himanen et ses collaborateurs, en menant une étude transcriptionnelle systématique de l'action de l'auxine sur l'initiation des racines latérales d'*Arabidopsis*, ont également détecté que l'auxine activait une histone H4 et d'autres gènes impliqués dans la réplication de l'ADN (Himanen et al., 2002). L'objectif de ce travail étant d'étudier les gènes de réponse précoces, voir primaires à l'auxine, nous avons alors défini nos conditions expérimentales afin de voir les gènes impliqués dans l'entrée dans le cycle cellulaire. Nous n'avons donc pas étendue notre analyse à l'ensemble du cycle cellulaire.

Nos analyses révèlent également que l'auxine agirait sur l'expression de quelques éléments transposables type Gag/pol (**annexe9**).

Les protéines impliquées dans les différents types de transport représentent 2% des étiquettes (**annexe10**). Cette classe est constituée de divers transporteurs d'ions, d'acides aminés et de transporteurs ABC. Ces derniers pourraient être impliqués dans le transport de l'auxine, particulièrement dans les petites cellules en division (Introduction-2).

Les gènes intervenant dans le "devenir cellulaire" (biogenèse, différenciation et localisation cellulaire) constituent 3% de nos étiquettes (**annexe 11**) et codent majoritairement pour des protéines impliquées dans la biogenèse membranaire ou les mouvements intracellulaires. Par exemple une alpha-expansine a déjà été rapportée comme régulée par l'auxine chez l'oseille, le pois chiche et la tomate

(Hutchison et al., 1999; Catala et al., 2000; Ji et al., 2003; Voeselek et al., 2003; Sanchez et al., 2004; Vreeburg et al., 2005).

Les gènes codant pour les facteurs de transcription ARFs et les AUX/IAAs n'ont pas été détectés par notre étude. L'analyse cDNA-AFLP *in silico* (Rombauts et al., 2003), à partir des séquences connues de tabac, a montré que les fragments générés par la double digestion *Bst*Y I / *Mse* I, ont une taille supérieure à 500 pb pour les AUX/IAAs et inférieure à 80 pb pour les ARFs. Par rapport à ce qui a été exposé ci-dessus, ces tailles "extrêmes" expliquent pourquoi nous n'avons pas pu identifier ces étiquettes par cDNA-AFLP.

Etant donné que nos cDNA-AFLPs étaient difficilement analysables dans le détail par le programme Quantar-Pro, nous avons réalisé une détection visuelle de leur profil transcriptionnel, basée sur les 617 étiquettes initialement repérées. Cette analyse a permis de sélectionner 52 étiquettes, dont 50 sont induites par l'auxine. Des résultats du même ordre ont été obtenus par Pufky et ses collaborateurs, dans leur analyse des transcrits dépendant de l'auxine dans les plantules étiolées. Dans cette étude, 47 gènes induits par cette hormone ont été détectés (Pufky et al., 2003).

Parmi nos étiquettes, le pourcentage de séquences, ne présentant aucune homologie avec celles des banques de données, est plus grand que pour l'analyse bioinformatique (19/52). Toutes les classes fonctionnelles illustrant l'analyse précédente, sont représentées dans cette détection visuelle. Contrairement aux autres classes, la majorité des étiquettes correspondantes à ParA (Glutathion-S-transférase) ont été sélectionnées car leur expression est fortement induite par l'auxine.

4. Etude de l'expression des gènes issus des cDNA-AFLPs

4.1. Validation des cDNA-AFLPs par RT-PCR

Parmi les 52 étiquettes de gènes différentiellement régulés par l'auxine dans l'expérience de cDNA-AFLPs, seules 15 séquences ont permis de définir un couple d'amorces, en vue de la vérification des profils d'expression par RT-PCR. Ceci souligne une dernière limitation de la technique de cDNA-AFLP, qui est de produire de très petits fragments (souvent inférieurs à 150 pb). L'expression de 13 gènes a pu être analysée par RT-PCR, car les deux gènes sélectionnés comme étant réprimés par l'auxine n'ont donné lieu à aucune amplification par PCR. Mis à part 2 gènes (T1M11-2 et T2M12-3 ; **Tableau 8**), le profil d'expression a généralement vérifié les analyses bio-informatiques et visuelles. Toutefois de légères différences entre les 3 méthodes sont observées soit au cours du temps, soit en fonction de la concentration en auxine. Ces petites différences montrent que les résultats de cDNA-AFLPs sont à considérer comme une information préliminaire, qu'il faut ensuite confirmer pour chaque gène sélectionné.

L'analyse de l'expression des 13 étiquettes par RT-PCR (Figure 13) a permis de vérifier l'induction par l'auxine de l'expression des gènes C1M31-5 (ARN hélicase), et C2M21-1, C4M14-1, C4M41-2, pour lesquels aucune fonction ne peut être déduite de la séquence des étiquettes.

L'expression des gènes T3M44-1 (transporteur ABC) et C4M14-1 (protéine réparatrice de l'ADN) est activée par 100 μM d'AIA. Certains ABC transporteurs sont décrits dans la littérature comme participant à l'efflux de l'auxine. Dans nos analyses, on peut penser qu'une forte dose d'AIA accumulée dans la cellule, peut induire l'expression des systèmes d'efflux pour éviter un effet toxique pour la cellule. De même pour le gène codant pour une protéine réparatrice de l'ADN, qui est aussi exprimé suite au repiquage des cellules dans un milieu MS neuf, puis inhibé par 25 nM et 10 μM d'AIA, qui sont les concentrations compatibles avec la division cellulaire.

L'expression du gène T2M12-3 (l'enzyme RNase T2, protéine qui coupe l'ARN de 3' vers 5') est inhibée par les fortes doses d'auxine, après 6 h de traitement. Il en est de même pour les expressions des gènes C1M41-13 (Glutamine synthétase, Nt-Gln1-5), de T4M34-2 (transporteur de nitrate de type NRT2) et de T2M34-3 (l'enzyme malique). Ces résultats montrent l'importance de l'étude des gènes inhibés par l'auxine, sur lesquels peu de travaux sont rapportés. La fonction de ces gènes a été décrite dans la partie 1.

L'induction de l'expression du gène T1M11-2 (GST, ParA) semble due au repiquage dans un milieu MS neuf, mais ne perdure sur 6 h, uniquement que lorsque les cellules sont traitées avec 100 μM d'AIA. Le fait que ParA soit une GST qui appartienne à la famille HSP26, qui sont des protéines de stress, permet de supposer que le repiquage et les fortes doses d'auxine seraient perçus comme un stress par les cellules.

Enfin l'alpha-expansine (T4M34-3) et la troisième sous-unité du protéasome 26S (T2M11-2) semblent davantage induits par le repiquage dans un milieu de culture neuf que par la dose d'auxine.

Ainsi 11 gènes, sur les 13 vérifiés, sont transcriptionnellement régulés par l'auxine. Cette vérification par RT-PCR permet d'appliquer ce pourcentage (85%) aux 52 gènes détectés visuellement, mais pas à l'ensemble des 617 étiquettes, à cause d'une grande variabilité de réponses induites par d'autres facteurs biologiques que le traitement auxinique.

4.2. Identification de nouveaux gènes de réponse primaire à l'auxine

Parmi les 13 gènes, dont nous avons suivi l'expression par RT-PCR, nous avons étudié l'effet du cycloheximide sur l'accumulation des transcrits des 4 gènes induits par l'auxine (C1M31-5 ; C2M21-1 ; C4M14-1 ; C4M41-2), et 3 gènes inhibés par l'auxine (C4M41-1 (protéine réparatrice de l'ADN), C1M41-13 (GS) et T4M32-2 (NRT2) (**Figure 63**). Le cycloheximide (CHX) bloquant la traduction des protéines, il permet d'identifier si l'expression d'un gène est directement régulée par un stimulus donné (l'auxine par exemple) et ne nécessite pas la synthèse *de novo* de protéines. Toutefois les résultats de cette expérience montrent que le CHX pourrait notamment avoir un effet toxique, que l'on observe au travers de l'expression de GH3, ARN hélicase, et NtGln1-5, mais cette action n'est pas détectée pour les autres gènes. L'intérêt de la caractérisation de gènes primaires à l'auxine est d'avoir accès à un plus grand nombre de gènes secondaires.

A partir de cette étude nous avons pu mettre en évidence que le gène C4M41-2 semblait être un gène de réponse primaire à l'auxine. En effet ce gène est induit par l'auxine et cette induction n'est pas affectée par le CHX, au contraire, il y a une super-induction induite par le double traitement AIA/CHX qui a été détectée après avoir carencé les cellules pendant 6 h.

L'expression du gène codant pour une ARN hélicase (C1M31-5) présente un niveau basal (expression visible en absence d'auxine), et son induction par l'auxine n'est pas affectée non plus par le traitement au CHX. Cette ARN hélicase appartient à une famille de protéines à boîte "DEAD-box helicase", et intervient dans le déroulement de l'ARN de façon dépendante de l'ATP. Cette fonction est notamment nécessaire dans l'épissage ou la dégradation de l'ARN. Ceci montre que l'auxine pourrait réguler la transcription des gènes en agissant directement sur les enzymes impliquées dans ce processus, telle que l'ARN hélicase.

En ce qui concerne les autres gènes, l'AIA ne semble pas réguler directement leur expression. L'expression des gènes C2M21-1 et C4M14-3, induits par l'auxine, est inhibée par la présence de CHX. L'inhibition par l'auxine de l'expression de Nt-Gln1-5 (C1M41-13) et du transporteur de nitrates NRT2 (T4M32-2), est levée par le traitement au CHX, ce qui montre que l'auxine n'inhibe pas directement l'expression de ces deux gènes. On constate qu'après 12 h de culture en présence de CHX, les transcrits de Nt-Gln1-5 ne sont plus présents, tandis que la carence auxinique l'active encore (cercles violets, **Figure 63**). Comme précédemment discuté, cela montre d'une part l'effet indirect de l'auxine sur l'expression de ces deux gènes et l'apparente faible stabilité de leurs messagers.

Ainsi par notre étude d'expression systématique des gènes régulés par l'auxine, basée sur l'approche par cDNA-AFLP, deux gènes répondant primordialement à cette hormone, le gène correspondant à l'étiquette C4M41-2 et une ARN hélicase, ont pu être découverts.

5. Analyse de la séquence du gène C4M41-2

L'expression de l'étiquette du gène C4M41-2 présente une super-induction en présence de CHX et d'AIA. Ce phénomène a souvent été décrit dans la littérature pour certains gènes primaires de réponse à l'auxine (Abel and Theologis, 1996).

Chez *Nicotiana tabacum*, à la fin des années 90, le groupe de C. Perrot-Rechenmann a isolé 6 ADNcs codant pour des AUX/IAA et en particulier *Nt-iaa2.3* et *Nt-iaa4.3* qui ont été utilisés pour notre étude. Leur expression est induite après 10 à 15 minutes de traitement à l'auxine, et de façon dépendante de sa concentration : l'induction maximale est atteinte entre 1 μ M d'ANA (dans le cas de *Nt-iaa2.3*) et 10 μ M (cas de *Nt-iaa4.3*). Leur expression est également induite par le CHX seul, et une super-induction est observée lors du double traitement CHX+AIA (Dargeviciute et al., 1998). Le profil d'expression de C4M41-2 en réponse à l'auxine est très similaire à celui des GH3 et de ces 2 membres de la famille AUX/IAAs de tabac.

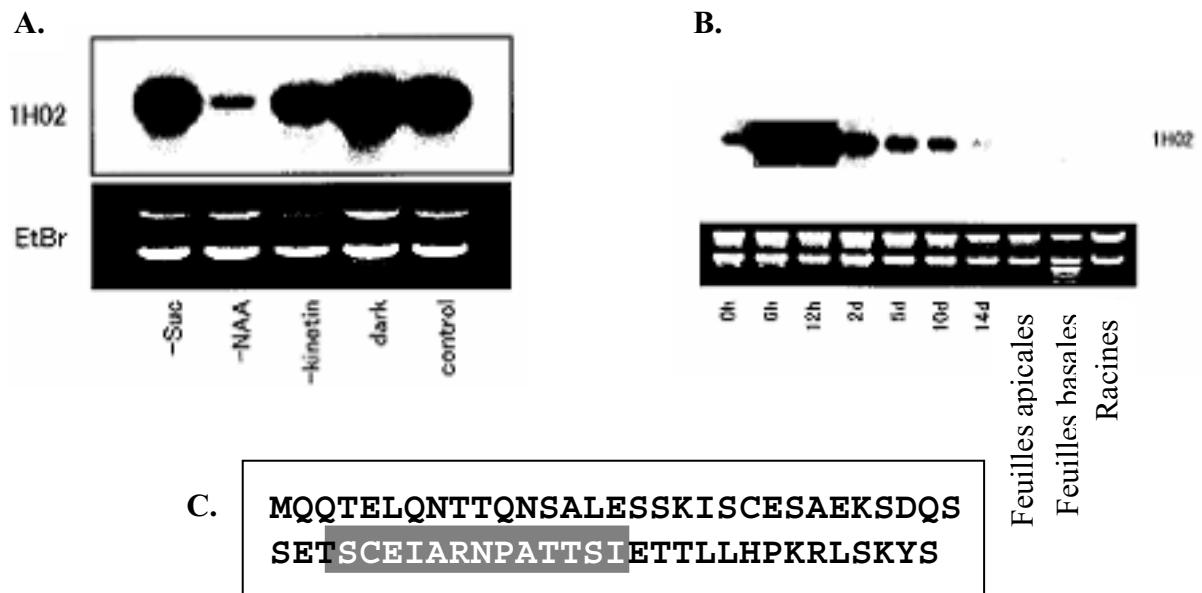


Figure 79. Expression du gène 1H02 et caractérisation de la protéine correspondante

A. Effet de la composition du milieu de culture sur l'induction du gène 1H02 (milieu carencé en saccharose, ANA ou kinétine ou cellules placées à l'obscurité).

B. Expression du gène 1H02 dans les cultures de cellules de tabac de 0 à 14 jours, dans les feuilles apicales et basales et dans les racines de plantes de *N. tabacum*.

C. Séquence du peptide codé par le gène 1H02. La région grisée correspond à une séquence conservée d'entérotoxine résistante à la chaleur.

Sato et Ifuku, 2004

L'induction de l'expression par l'auxine de C4M41-2 a été vérifiée par 3 techniques : cDNA-AFLP, RT-PCR et Northern blot, montrant que ce gène est bien transcrit et répond à l'auxine. Le northern blot suggère notamment que le transcrit complet de C4M41-2 aurait une taille d'environ 2 kb (**Figure 68**).

La séquence de l'étiquette de C4M41-2, issue des cDNA-AFLPs ne correspondait à aucune séquence disponible, ni dans les banques de données nucléotidiques, ni protéiques. Les investigations menées pour rechercher la séquence pleine longueur du transcrit du gène correspondant à l'étiquette C4M41-2, nous ont permis d'identifier 865 pb, mais ne présentant aucun cadre de lecture, à cause du grand nombre de codons "STOP". Les recherches de séquences homologues dans la banque WU (Washington University), ont fait apparaître une forte homologie (95% d'identité sur les 865 pb de C4M41-2) avec le gène codé 1H02 dans un brevet japonais (JP2004097035).

Lors de la découverte de ce brevet nous nous sommes heurté à un problème de langage qui a complexifié l'analyse de ce document, étant donné qu'il n'a été rédigé qu'en japonais. Les informations que nous avons pu en extraire proviennent d'une traduction fastidieuse auprès d'étudiants japonais.

Le but majeur de ce brevet est de **produire** un polypeptide qui induit la prolifération cellulaire, pour cela ils ont criblé des ADNc (à partir d'une banque soustractive d'ADNc) exprimés au début de la phase de prolifération. Plusieurs clones ont été obtenus dont 1H02. Ils ont ensuite recherché l'ADNc pleine longueur, et ont obtenu une séquence de 2137 pb, qui correspond d'ailleurs à la taille du transcrit de C4M41-2, détecté dans notre expérience de northern blot. Le brevet indique que la synthèse du polypeptide a nécessité de réaliser quelques changements (entre 1 et 7 mutations) dans la séquence nucléotidique (remplacement, insertion ou délétion), afin d'utiliser le polypeptide comme un outil d'induction de la prolifération cellulaire. En effet, l'alignement et la comparaison des séquences de C4M41-2 et de 1H02, montre quelques différences (**Figures 75 et 79**), qui entraînent des modifications notables au niveau de la séquence protéique, faisant apparaître une méthionine de début de cadre de lecture et un polypeptide de 61 AA (**Figure 76**) qui n'ont pas été identifiés dans la séquence de C4M41-2. Les travaux sur la séquence de 1H02 étant menés à des fins pharmaceutiques et industriels et non dirigés vers la recherche fondamentale de la fonction d'un nouveau gène, les résultats de séquence présentés dans ce brevet doivent être exploités avec prudence.

L'expression de 1H02 (correspondant à C4M41-2) est spécifique d'une réponse à l'auxine (l'expression de ce gène n'est pas modifiée par la carence en cytokinines, ou en saccharose, ni à l'obscurité) (**Figure 79A**) et n'est détectée que pendant les premiers jours de culture, c'est-à-dire pendant la phase intense de divisions cellulaires (**Figure 79B**). Son expression n'a pas été détectée, par northern blot, ni dans les feuilles, ni dans les racines (**Figure 79B**).

Ces résultats vont dans le même sens que nos observations d'hybridation *in situ* (HIS). Les transcrits de C4M41-2 ne sont détectés par HIS que dans les tissus en phase de prolifération active, telles que la zone périphérique (ZP) des méristèmes floraux, les primordia de sépales, et la première assise cellulaire de la face adaxiale des primordia d'étamines et à l'apex des primordia de pétales (**Figure 77**). Par contre ils ne sont pas détectés ni dans les feuilles, ni dans les tiges (**Figures 77E à H**). Mais il est possible que la quantité de transcrits de C4M41-2 se trouve en dessous du seuil de détection que permet la technique d'HIS. La proportion de structures tissulaires présentant une activité de divisions cellulaires

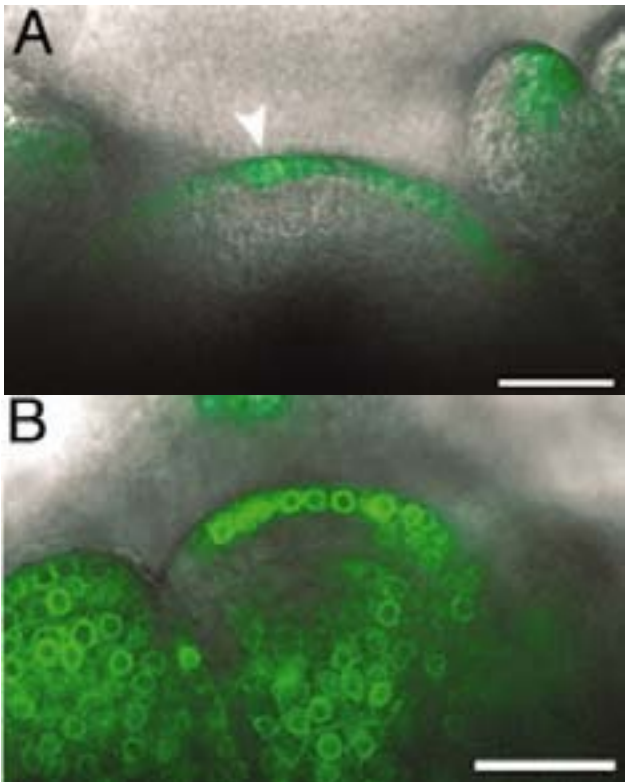


Figure 80. Expression de *DR5::GFP* dans l'apex caulinaire

(A) Section longitudinale de méristème floral exprimant *DR5::GFP*. La flèche indique la surexpression locale de *DR5::GFP* et correspondant à l'initiation d'un primordium. (B) Section longitudinale de méristème floral exprimant *DR5::GFP* traité avec 25 μ M de sirtinol (auxine synthétique qui passerait par les transporteurs) pendant 48 h. Barre d'échelle: 25 μ m
Smith et al., 2006

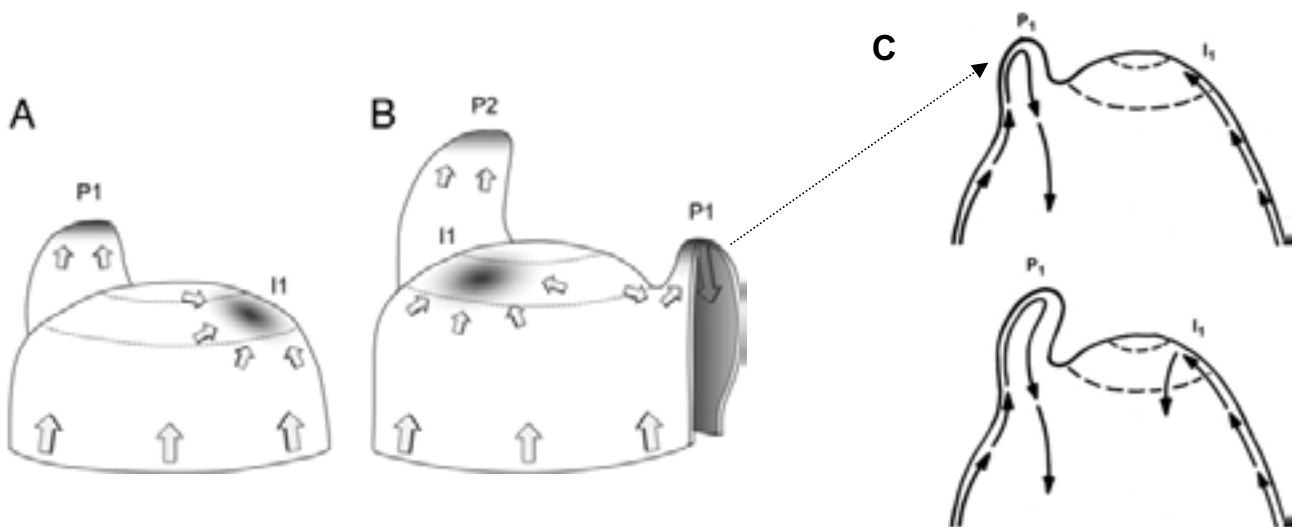


Figure 81. Modèle conceptuel de la régulation de la phyllotaxie par le transport polarisé des flux d'auxine dans le méristème caulinaire.

(A) L'orientation de PIN1 dirige le flux d'auxine (flèches) dans la couche cellulaire L1, entraînant une accumulation d'auxine sur le site d'initiation de primordium, au niveau de la zone périphérique. (I1) et induirait la formation d'un nouvel organe. (B) Ensuite, la polarisation basipétale de PIN1 au centre du primordium P1 conduit l'auxine dans les couches internes, carençant les cellules voisines de la couche cellulaire L1. Par conséquent, une autre zone d'accumulation d'auxine est créée dans la zone périphérique au niveau de la nouvelle position I1. *Smith et al., 2006*

(C) Représentation schématique de l'apex caulinaire au travers d'une section longitudinale du primordium P1 et de l'initial I1 à un stade précoce (en haut) et tardif (en bas) de la formation d'un primordium. Le flux polarisé d'auxine est indiquée par les flèches. En haut le transport acropétale est dévié dans le primordium P1, empêchant l'accumulation d'auxine sur le côté gauche du méristème, alors que l'auxine peut rejoindre le côté droit, et s'accumuler au niveau site d'initiation (I1) du nouveau primordium (en bas) et établir une nouvelle source d'auxine. *Reinhardt et al., 2003*

importantes est très réduite dans la partie de la tige utilisée pour cette étude et dans la feuille, suggérant ainsi que le gène *C4M41-2* n'est pas transcrit dans les organes en différenciation, où il y a peu de divisions cellulaires.

En outre l'expression de *C4M41-2* est détectée dans les zones d'accumulation d'auxine, observées dans les méristèmes floraux d'*Arabidopsis thaliana*, notamment dans les cellules de l'épiderme (couche cellulaire L1) et à l'apex des primordia de sépales (**Figure 80**). Plusieurs études ont montré que l'auxine s'accumulait au niveau de la zone d'initiation du nouveau primordium d'organe (Okada et al., 1991; Hitotsubashi et al., 2002; Stieger et al., 2002; Blakeslee et al., 2005; Reinhardt, 2005; Smith et al., 2006). Le modèle intégrant l'action de l'auxine et l'organogenèse (**Figure 81**), propose tout d'abord que l'auxine soit délivrée uniformément au travers du méristème, puis s'accumule sur le site d'initiation du nouveau primordium, grâce au transport polarisé de l'auxine due à la localisation notamment de PIN1. Le primordium se développe sur le site où le pic d'auxine s'est créé. Dans les primordia, le transport est d'abord acropétal, en passant par la face abaxiale, puis basipétale par le côté adaxiale du primordium (**Figures C**). La face abaxiale est plutôt une zone d'élongation cellulaire et la face adaxiale, une zone de division cellulaire intense (Smith et al., 2006). L'ensemble de ces résultats suggère que *C4M41-2* serait exprimé dans les zones de divisions cellulaires induites par l'auxine présente dans ces zones. Notons cependant que l'action de l'auxine sur l'organogenèse est étudiée principalement dans les méristèmes végétatifs, or nos résultats d'HIS ont été réalisés sur des méristèmes floraux et devront donc être complétés par des expériences sur des méristèmes végétatifs.

Ces résultats corroborent l'analyse de l'accumulation des ARNm de *C4M41-2* par RT-PCR semi-quantitative, dans les suspensions cellulaires de BY-2, où ce gène est exprimé très rapidement (30 min) sous l'action de concentrations d'auxine qui induisent la division cellulaire.

Les études menées sur le contexte du codon d'initiation de la traduction chez les plantes, ont révélé que chez les dicotylédones, la séquence consensus entourant l'ATG, serait : AA/Ca**ATGGC**. Or cet environnement n'est pas retrouvé ni autour des ATG de *C4M41-2*. Toutefois cet environnement n'étant retrouvé que chez 54% des plantes supérieures, il n'est pas exclu que *C4M41-2* soit traduit, et que parmi les deux cadres de lectures putatifs localisés **Figure 70**, il n'y en ai pas au moins un qui permette la production d'un polypeptide.

Etant donné que les régions non codantes constituent 80% du génome d'*Arabidopsis thaliana* et qui semblent orchestrer de nombreux aspects du fonctionnement cellulaire et des organismes, comme le font les miRNA (Jones-Rhoades et al., 2006). Cette constatation permet de supposer que si *C4M41-2* est un ARNm non traduit, il pourrait jouer un nouveau rôle régulateur de la prolifération cellulaire.

L'ensemble de ces résultats montrent d'une part que *C4M41-2* est un gène exprimé dans les cellules végétales (suspensions cellulaire et *in planta*), mais ne permet pas de conclure clairement que ce transcrit est traduit. D'autre part, la comparaison de la séquence de *C4M41-2* avec celle d'*1H02* ne s'effectue que sur 865 pb sur les 2137 pb. Il est possible que les 1272 pb en 5' de la séquence de *1H02* ne correspondent pas à la séquence de *C4M41-2*. L'obtention de la séquence complète du gène permettrait peut être d'identifier un autre ORF que ce lui du brevet ainsi que son promoteur. Mais l'ensemble des

données sur ce messager (brevet japonais et nos travaux) indiquent que cette séquence pourrait coder pour un facteur de croissance, ce qui nous pousse à mener d'ultérieures investigations pour connaître les 1272 pb (ou davantage) en amont de la séquence de *C4M41-2* et de découvrir s'il peut être traduit en un polypeptide actif.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

L'auxine assure l'intégration des stimuli environnementaux et la communication intercellulaire, en régulant à la fois la division, l'expansion et la différenciation cellulaire, dans le but de promouvoir le développement et la croissance de la plante. Son action pléiotrope est l'une des principales difficultés dans l'étude de ses effets. Les modèles simplifiés de cultures cellulaires, en complément des études *in planta*, s'avèrent dans ce cadre un outil précieux. Cependant ce n'est que très récemment que l'analyse fine des réponses cellulaires en fonction de la concentration d'auxine appliquée a été entreprise dans ces systèmes. De plus ces réponses ont souvent été mesurées au minimum après 4 jours de traitement, et souvent de façon indirecte (mesure du nombre de cellules par file cellulaire, pour déterminer l'action de l'auxine sur la division cellulaire, par exemple) (Zazimalova et al., 1995; Chen et al., 2001; Campanoni and Nick, 2005), ce qui semble une mesure relativement indirecte et tardive des effets de l'auxine.

L'objectif du projet de thèse a donc été d'établir des conditions qui permettaient de caractériser des réponses précoces à l'auxine, et de mettre en relation les réponses d'ordre cellulaire avec celles liées à l'expression des gènes, l'ensemble étant observé en fonction des concentrations d'AIA appliquées dans le milieu. Alors que l'expansion et la division cellulaire sont des réponses à l'auxine relativement bien documentées, l'influence de l'auxine sur la turgescence reste peu étudiée au niveau de la plante entière ou dans les cultures cellulaires.

D'après les données disponibles dans la littérature, l'auxine agirait, selon Jones et Campanoni, par l'intermédiaire de deux voies indépendantes (Jones et al., 2004), l'une, induite pour de faibles concentrations d'auxine, conduirait la cellule à grandir, tandis que l'autre, activée par de fortes concentrations d'auxine, la mènerait à se diviser. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'inhibition de l'action de protéines G inhibe la division, alors que son activation induit des divisions cellulaires (Campanoni and Nick, 2005). De plus, la sous-expression du récepteur ABP1 (qui dans le modèle proposé serait activé par de faibles concentrations d'auxine) empêche les cellules de tabac de grandir (Chen et al., 2001), sans affecter apparemment, la division cellulaire. La sur-expression d'*ABP1* entraîne une augmentation de la taille des cellules, une augmentation du contenu intracellulaire en AIA libre, ainsi qu'un début d'endoréplication (Chen et al., 2006). Toutefois les expériences de Lloyd en 1980 montrent que de fortes concentrations d'auxine peuvent aussi s'accompagner d'un grandissement cellulaire pour peu que l'on inhibe la division cellulaire (traitement au FudR, par exemple) (Lloyd et al., 1980). En outre nos résultats montrent que de très faibles concentrations d'auxine peuvent induire les cellules à entrer en division (25 nM d'AIA), avant de sortir du cycle cellulaire et de grandir.

L'action de l'auxine sur la croissance ne semble donc pas si simple que deux voies indépendantes induites par différentes gammes de concentrations en auxine. Ces deux voies pourraient par exemple exercer des contrôles et des rétro-contrôles l'une sur l'autre.

Les résultats obtenus au cours de la thèse montrent que pour de fortes concentrations d'auxine, les cellules qui entrent en division ont une faible pression de turgescence, alors que la carence en auxine s'accompagne d'un grandissement cellulaire et que ces cellules possèdent une forte turgescence. L'auxine pourrait-elle agir sur la division et l'expansion cellulaire en régulant la turgescence ? En d'autres termes, l'un des modes d'action de l'auxine ne pourrait-il pas s'exercer au travers de la régulation de la

turgescence, entraînant alors la cellule vers la voie de la division ou vers celle de l'expansion cellulaire ? Inversement, les effets sur la turgescence ne sont-ils que la conséquence de l'engagement des cellules dans la voie "division" ou la voie "expansion" ?

Afin d'étudier plus précisément la nature des relations entre l'auxine, la turgescence et la division cellulaire, il serait intéressant de bloquer les cellules avant qu'elles ne se divisent, en les traitant avec du FudR, ou de l'aphidicoline (qui empêchent la synthèse d'ADN) ou l'utilisation de colchicine qui empêche la division des cellules en inhibant la dépolymérisation des microtubules. Les travaux de Lloyd et de Campanoni ont montré que l'utilisation de FudR (pour Lloyd) et de la toxine pertussique (PTX) (pour Campanoni), en plus du traitement auxinique, inhibait la division cellulaire, mais qu'en parallèle un grandissement cellulaire était observé. A l'inverse lorsque Campanoni traite les cellules au tétrafluorure d'aluminium, qui active la protéine G, la division cellulaire est activée et en parallèle une diminution de la taille cellulaire est observée. Cette réponse est-elle uniquement due à la division des cellules ? Et qu'en est-il au niveau de l'effet de ces drogues sur la pression de turgescence ?

D'autre part, si l'on tente d'inhiber l'augmentation de la turgescence en bloquant les canaux potassiques avec du TEA (chlorure de tétraéthylammonium) ou en agissant directement sur le grandissement cellulaire en inhibant la polymérisation de l'actine, avec un traitement au cytochalasine D, la division cellulaire serait-elle inhibée ? Ces expériences avaient été programmées pendant la troisième année de thèse, mais n'ont pu être mises en place à cause de problèmes liés à la culture des cellules BY-2.

De même en exerçant sur les cellules un choc hyperosmotique, diminuant transitoirement la turgescence, la division serait-elle induite plus tôt ou plus fort ? Des expériences préliminaires de cultures cellulaires réalisées dans un milieu MS additionné de mannitol à 170 mM, ne montraient apparemment aucun effet sur la division. D'autres expériences sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

Enfin, le fait que nous ayons mis en évidence une relation entre régulation de la turgescence cellulaire et concentration d'auxine, peut permettre de faire un lien avec ce qui se passe au niveau de la régulation de l'expansion et de la division cellulaire dans les différents tissus de la plante entière. Par exemple au sein d'un tissu méristématique il a été montré que les gradients d'auxine étaient indispensables à la définition de nouveaux territoires de primordia d'organes latéraux. On peut alors imaginer que sous un gradient d'auxine les cellules aient différentes pressions de turgescence, et que ce phénomène participe à l'entrée en division cellulaire, à la définition de plans de division suivant les rapports de forces exercés par la turgescence des cellules voisines, ou à l'expansion dans des zones spécifiques.

Le dosage de la teneur intracellulaire des composés solubles a permis de mettre en évidence un mode d'action de l'auxine qui n'avait encore jamais été détecté dans les analyses de régulation hydrique. En effet nous avons montré que la carence en auxine avait pour conséquence une augmentation de la concentration interne de beaucoup de familles de composés organiques (mais pas les sucres) ainsi que de nombreux ions minéraux. Cette accumulation serait due dans un premier temps à une entrée accrue d'ions minéraux dans la cellule, précédant des processus métaboliques complexes qui mèneraient dans un deuxième temps à l'accumulation d'acides organiques et d'acides aminés dans la cellule. On peut supposer que cette accumulation accrue et "peu spécifique" repose pour une part sur l'hyperpolarisation

membranaire produite par l'activation des H⁺-ATPases qui permettent de nombreux co-transports. Ces H⁺-ATPases devraient donc être relativement plus actives dans cette situation de carence relative en auxine. La très forte accumulation de certains composés pourrait être due à l'induction spécifique de systèmes de transport ou de synthèse. Ceci est confirmé par le profil transcriptionnel du transporteur de nitrates qui est activé par l'auxine (et non par la présence de nitrates dans le milieu de culture) et celui de la glutamine synthétase (*NtGln1-5*) qui semble être activée par la carence en auxine mais de façon dépendante de l'entrée de nitrates dans la cellule.

L'autre partie du travail de thèse a été de mener une étude globale de l'expression des gènes en fonction du temps (de 0 à 12 h) et de la concentration d'AIA (0 M_1 nM_25 nM_10 µM_100 µM).

Pour cela nous avons fait appel à la technique de cDNA-AFLP. Sur 7 500 étiquettes détectées, 617 présentaient des intensités d'expression variables en fonction des conditions expérimentales appliquées. Parmi elles une cinquantaine ont été sélectionnés comme les meilleurs candidats. Nous avons pu vérifier le profil transcriptionnel de 11 de ces étiquettes sur 13. Il est désormais nécessaire de redéfinir des amorces sur un nouveau lot d'étiquettes afin de pouvoir valider de façon significative les résultats de cDNA-AFLP, car il est admis que le profil d'expression doit être vérifié sur au moins 10 % des gènes sélectionnés (Breyne et al., 2003; Goossens et al., 2003), c'est-à-dire 62 étiquettes, au minimum.

Les données de cDNA-AFLPs, pourront apporter des données complémentaires sur les voies de signalisation à l'auxine. Parmi les étiquettes isolées, les protéines hypothétiques, notamment, présentent des domaines intéressants, tels que des domaines TIR, des domaines en doigt de zinc, ou des régions riches en leucine...qui caractérisent souvent des protéines aux fonctions régulatrices importantes. En parallèle de ces analyses il est indispensable d'assurer une veille des banques de données afin d'identifier les étiquettes qui pour l'instant ne présentent aucune homologie de séquences avec les données actuelles. En outre il serait intéressant de définir d'autres amorces dirigées sur des étiquettes de gènes impliqués dans le métabolisme, ce qui permettrait de mieux comprendre les différentes régulations transcriptionnelles qui aboutissent à la modulation de la turgescence et la division cellulaire, sous l'action de l'auxine.

A l'issue de notre criblage, nous avons mis en évidence deux gènes répondant de manière primaire à l'auxine, l'un ayant une fonction d'ARN hélicase et l'autre n'ayant pour le moment, aucune fonction et ne correspondant à aucune séquence déjà étudiée, mise à part les travaux brevetés de Sato et Ifuku (2004), mais n'apportant aucune indication sur la fonction native de ce gène. L'absence d'homologies avec les séquences d'autres espèces végétales est surprenante pour un gène de réponse primaire à l'auxine. Néanmoins son expression dans le méristème floral et dans les cultures cellulaires semble spécifique de l'initiation de la prolifération cellulaire, ce qui nous conforte dans l'utilité à continuer nos recherches sur ce gène.

Pour pouvoir caractériser précisément ce gène, une donnée majeure est encore manquante, malgré les différentes investigations menées (moléculaires et bioinformatiques) : un cadre de lecture ouvert permettant de localiser et de définir une protéine putative, correspondant à C4M41-2. Plusieurs expériences restent encore à entreprendre, telles que le criblage d'une banque d'ADN génomique afin d'avoir le gène en entier. En effet, l'expérience de Northern blot a révélé un messenger aux environs de 2 kb et le brevet de Sato et

Ifuku indique que la séquence de 1H02 ferait 2,1 kb, les auteurs n'excluant pas que la séquence du gène ou même du messenger soit plus grande.

Afin d'éviter de se baser sur la séquence du brevet qui a été modifiée à plusieurs reprises par les auteurs, nous allons donc, dans un premier temps, cloner l'ADNc de C4M41-2 issu d'une amplification, utilisant une amorce gauche, définie à l'extrémité 5' de la séquence présentée dans le brevet et une amorce droite, définie sur la séquence de C4M41-2 et proche de la queue de poly-adénylation. Suite à ce travail nous pourrions entreprendre une expérience de transcription-traduction *in vitro* afin d'isoler et d'identifier une ou plusieurs protéines issues de cette séquence. L'activité protéique pourra être testée, notamment en réalisant des expériences de bio-essais directement sur les cultures cellulaires, en appliquant dans le milieu l'extrait protéique néotraduit en observant si cette protéine a le même effet que l'auxine. Cette expérience montrerait que le gène correspondant à C4M41-2 ou 1H02 serait un facteur de croissance sécrétée par les cellules (comme l'alpha-phytosulfokine (Matsubayashi et al., 1999)) et confirmerait alors l'hypothèse de Sato et Ifuku.

De plus, en absence d'ORF et de promoteur, l'analyse fonctionnelle de ce gène ne peut être réalisée que par des transformations anti-sens. Ce travail a été initié à la fois sur les suspensions cellulaires de BY-2 et de plants de tabacs. Suite à plusieurs essais, il s'est avéré impossible de générer des cals de cellules BY-2 transformées avec un vecteur contenant un morceau de 500 pb (situés en 5' de la séquence connue de C4M41-2) dirigés en anti-sens, alors que les contrôles, des cals transformés avec le même vecteur, mais vide, ont pu être obtenus. Il semblerait que ce gène soit indispensable à la prolifération des cellules BY-2, ce qui expliquerait l'absence de transformants anti-sens.

Pour les plants de tabacs (*Nicotiana tabacum*), des transformants ont été obtenus (vecteur vide et construction anti-sens), bien que la génération de cals transformés fût plus lente dans le cas des anti-sens que des contrôles. Etant donné que le gène correspondant à C4M41-2 n'est pas conservé chez *Nicotiana sylvestris*, nous avons également entrepris de transformer cette espèce. L'analyse des transformants T0 n'a pour l'instant montré aucune perturbation phénotypique. L'analyse des générations T1 est en cours.

La découverte du rôle de C4M41-2 ne fait que commencer...

MATERIELS ET METHODES

Tableau 9. Milieu MS :

Elements	Concentration finale
MACROELEMENTS	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,99 mM
KH ₂ PO ₄	2,72 mM
KNO ₃	18,79 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 mM
NH ₄ NO ₃	20,61 mM
MICROELEMENTS	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,11 mM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,1 mM
H ₃ BO ₃	0,1 mM
KI	5 mM
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,1 mM
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,03 mM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	29,91 mM
Fe-EDTA	
Na ₂ EDTA	0,1 mM
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 mM
SACCHAROSE	87 mM

Ajuster le **pH = 5,8** avec du KOH 1N avant autoclavage pour MS solide, ajouter du phytoAGAR à raison de 7 g/L pour milieu solide

après autoclavage :

Eléments	Concentration finale
Thiamine HCl	30 µM
Myoinositol	0,55 mM
2,4-D	0,9 µM soit 0,22 mg/L

Préparer **2,4-D** à 500 µM (12,2 mg/100 mL) dans l'eau et stériliser par filtration 0,22 µm

Pour les expériences avec l'AIA :

Préparer l'AIA (M=175 g/mol) à 20 mM. Dissoudre la poudre dans un petit volume (500 µL) de KOH (0,5 N). Neutraliser en amenant le pH entre 7 et 8 avec du HCl : (attention au saut de pH qui s'accompagne d'une réprécipitation de l'AIA). Ajuster le volume avec de l'eau milliQ, puis stériliser par filtration (0,22 µm).

1. Matériel biologique : la culture cellulaire de tabac (*Nicotiana tabacum*) cv BY-2 (Bright Yellow 2)

La lignée cellulaire de tabac (*Nicotiana tabacum* L.) provient du *cultivar* Bright Yellow 2 (Nagata et al., 1992). Les cellules sont cultivées à l'obscurité, à une température de 27°C +/- 1°C. Une bonne oxygénation est également nécessaire, grâce à une agitation d'environ 130 rpm. Lors du repiquage hebdomadaire, 1,2 mL d'une culture âgée de 7 jours est transféré dans 100 mL de milieu Murashige and Skoog (Murashige and Skoog, 1962) modifié suivant les consignes de Nagata (**tableau 9**). Le milieu est préparé en mélangeant des solutions stocks de macroéléments, microéléments et Fe-EDTA, auxquelles on ajoute 30 g/L de saccharose (Duchefa). Le pH est ajusté à 5,8 avec du KOH 1M. Le milieu est aliquoté à raison de 100 mL par erlen de 500 mL, puis autoclavé. Au moment du repiquage, 0,9 µM d'acide 2,4-D dichlorophenoxyacétique, 30 µM de Thiamine HCl (Sigma) et 0,55 mM de myoinositol (Sigma) sont ajoutés dans le milieu.

Dans les expériences où les cellules sont traitées avec l'auxine naturelle, la solution d'auxine est préparée en faisant dissoudre 70 mg d'acide 3-indole acétique (AIA, Sigma) dans 2 mL de KOH (car c'est un acide faible, pKa=4). Ensuite on neutralise à pH=7-8 avec du HCl, avant d'ajuster le volume à 20 mL et de la stériliser par filtration (pore 0,22 µm).

Lorsque les cellules sont cultivées dans le milieu sans azote, seule la composition de la solution stock de macroéléments a été changée suivant le **tableau 10**.

Tableau 10 Composition des macroéléments dans le milieu MSN0:

Eléments	Concentration finale	
MACROELEMENTS		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,99	mM
KH ₂ PO ₄	2,72	mM
KCl	24	mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5	mM
Na₂SO₄	1,4	mM

2. Procédures expérimentales cellulaires et physiologiques

2.1. Conditions expérimentales lors des traitements à l'auxine

Les cellules âgées de 7 jours sont récoltées et filtrées sur un filtre de nylon (pore : 40 μM), puis elles sont récupérées délicatement avec une spatule et remises en suspension dans un grand volume de milieu de culture neuf (1L de milieu pour un ballon de 6 L) pendant 1 h. Les cellules sont ensuite filtrées à nouveau sur un filtre de nylon propre et resuspendues dans 100 mL de milieu propre (à environ 30 g/L). A partir de cette suspension, les cellules BY-2 sont repiquées dans le milieu de culture contenant la concentration appropriée d'AIA, à raison d'1,5 g /L.

Pour vérifier que l'action directe de l'auxine sur la transcription des gènes les cellules ont été traitées aux cycloheximide (CHX, inhibiteur de la traduction protéique). Les cellules BY-2 alors ont été traitées avec 100 μM (concentration finale) de CHX, préparé dans l'eau ultrapure et stérilisé par filtration (pore 0,22 μm).

2.2. Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité des cellules est mesurée par le double marquage des cellules BY-2 (non fixées) à l'iodure de propidium (IP, Sigma; 600 $\mu\text{g ml}^{-1}$) et au diacétate de fluorescéine (DAF). L'IP, (préparé dans l'eau à 0,2 g/L) est ajouté à la suspension cellulaire à raison de 20 mg/L. L'IP rentre seulement dans les cellules mortes et produit un marquage rouge-orange des noyaux, sous une lumière verte. Le FDA (préparé dans l'acétone à une concentration de 0,2 g/L) est ajouté aux cellules à raison de 1 mg/L final. Le FDA est un marqueur spécifique des cellules vivantes, car ce sont les estérases cytoplasmiques qui hydrolysent le groupement ester, libérant la fluorescéine, et provoquant l'émission d'un marquage jaune-vert, sous une lumière bleue. Les cellules sont incubées 5 min à température ambiante puis examinées par microscopie à épifluorescence.

2.3. Mesure de l'indice mitotique

Pour mesurer l'indice mitotique, les cellules sont fixées au formaldéhyde (37% formalin solution, Sigma) (1:10, v/v) et au triton (1:1000, v:v) (iso-ocylphenoxy-polyethoxyethanol x-100, Plusone, Pharmacia Biotech). Ensuite les cellules sont marquées au DAPI (4',6-diamino-phenylindole, Sigma), et observées sous un éclairage aux UV, par microscopie à épifluorescence (Axiophot, Zeiss). L'indice mitotique a été déterminé en comptant le nombre de cellules en phase de mitose (1000 cellules comptabilisées).

2.4. Mesure de la surface cellulaire

Les cellules BY-2, fixées au formaldéhyde et au triton puis marquées au DAPI, sont observées et photographiées par une caméra numérique disposée sur le microscope à épifluorescence. L'acquisition

numérique des micrographies est traitée par le programme Image-Pro Plus, Version 4.0 (Copyright 1993, 1999 Media Cybernetics, LP) et la surface cellulaire est déterminée pour 150 cellules (grossissement x80) dont le contour a été tracé manuellement avec ce même programme.

2.5. Mesure de la pression osmotique

Après avoir filtré la culture cellulaire sur un entonnoir en verre borosilicaté percé (pore N°2), le milieu de culture et les cellules sont rapidement congelés dans l'azote liquide et stockés à -80 °C. Pour mesurer la pression osmotique, les échantillons sont incubés à 40°C pendant 10 min puis centrifugés à 14 000 rpm pendant 15 min pour éviter les particules dans le surnageant, qui est récupéré délicatement. Le surnageant récupéré à partir des cellules correspond au jus cellulaire et est utilisé pour déterminer la pression osmotique intracellulaire. Le milieu est utilisé pour la mesure de la pression osmotique externe. Une aliquote de 50 µL de chaque échantillon est nécessaire pour la mesure à l'aide d'un microosmomètre automatique (Type 13/13DR-autocal-), dont la mesure est basée sur la détection du point de congélation qui est directement relié à l'osmolarité de l'échantillon.

3. Procédures expérimentales biochimiques

3.1. Dosage des composés solubles

Extraction éthanolique

Les métabolites solubles sont extraits selon la méthode de Stitt et Rees (1978) (Stitt and ap Rees, 1978), à partir d'environ 500 mg de cellules BY-2 fraîchement filtrées. Trois extractions successives de 15 min sont effectuées à 80 °C avec les solutions suivantes :éthanol 80%, éthanol 50 % et eau. A l'issue de la troisième extraction, les différentes fractions solubles sont rassemblées et l'extrait est évaporé à sec, sous vide pendant une nuit (par speed vacuum). L'extrait sec est repris dans 1 mL d'eau pure.

3.2. Dosage des métabolites solubles par RMN ¹H

Les cellules BY-2, ont été filtrées sur verre fritté, stockées à -80°C et ont subi une extraction éthanolique comme précisé précédemment, excepté que l'extrait a été lyophilisé, puis repris dans un tampon phosphate (pH=6, 400 mM dans D₂O). Afin d'éviter les interférences, les ions paramagnétiques (Mn²⁺) sont éliminés en passant les extraits sur une résine Chelex 100 (Biorad). Ensuite, le pH des effluents est vérifié et réajusté à 6 avec une solution de KOH (1 M, dans D₂O). Les extraits sont ensuite transférés dans l'eau deutérée à 4 °C pendant une nuit, afin d'éliminer toute trace d'eau légère. Les échantillons sont ensuite lyophilisés et repris dans de l'eau deutérée. Les spectres de RMN du ¹H sont réalisés sur un spectromètre Bruker Avance 500 MHz équipé d'une cry-sonde de 5 mm. Les acquisitions RMN sont réalisées avec une fenêtre spectrale de 12 ppm, 32K points, un angle de pulse de 90°, un temps d'acquisition de 2,73 s, un délai de relaxation de 15s, et 64 scans, ce qui correspond à 19 minutes

d'acquisition. La comparaison des spectres avec des spectres de composés de référence a permis d'identifier les composés majeurs présents dans les différents extraits puis de les quantifier.

L'acquisition et le traitement des données ont été réalisés sur le plateau technique "Métabolome-Fluxome" de l'IFR 103, en suivant un protocole déjà décrit dans la littérature (Moing et al., 2004). La concentration des métabolites rapportés dans ce manuscrit, correspond à l'intégration des aires de résonances choisies du spectre, réalisée à l'aide du logiciel AMIX.

3.3. Dosage des métabolites solubles par HPLC

Suite à l'extraction éthanolique, les composés hydrosolubles sont fractionnés en passant l'extrait sur deux résines échangeuses d'ions. Pour cela l'extrait original est dilué au 1/10^{ème} (100 µL, dans 1 mL). La fraction cationique est purifiée sur la première résine (échangeuse de cations, AG 50 W-X8, forme H+), sur laquelle s'accroche les acides aminés, alors que la fraction non retenue est mise de côté. L'élution des acides aminés se fait dans 4 volumes d'une solution contenant du NH₄OH à 1,4 N. La fraction non retenue est déposée sur une deuxième résine, échangeuse d'anions (AG 1-X8, forme formate, Biorad), qui purifie les acides organiques alors que l'effluent correspond à la fraction neutre, c'est à dire notamment les sucres. L'élution des acides organiques se fait dans 4 volumes d'acide formique 4 M. Chaque fraction de l'extrait est lyophilisée une nuit sous vide, puis reprise dans 1 mL d'eau pure.

3.3.1. Dosage des acides aminés par HPLC

Le dosage par HPLC en phase inverse des acides aminés a été réalisé après dérivation selon la méthode AccQTag (Cohen S. A. and Michaud D. P., 1993). La fraction cationique est mise en présence du réactif de dérivation, l'AQC (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate). Les dérivés d'acides aminés sont des molécules stables qui fluorescent fortement à 395 nm, suite à une excitation à 250 nm. L'excès de réactif est décomposé en milieu aqueux en un produit qui ne fluoresce pas (NHS+CO₂) et l'AMQ qui fluoresce. La quantification de ce dernier permet de vérifier que le réactif est en excès. La dérivation se fait dans 100 µL : 10 µL d'échantillon (fraction cationique diluée 20 fois) + 70 µL de tampon de dérivation + 10 µL d'AccQ. Un volume de 20 µL de la dérivation diluée 5 fois est injecté sur la colonne. La colonne utilisée est une colonne Nova-Pack C18 (AccQ Tag Waters (4µm)). L'élution se fait à 37 °C, par un gradient à deux solvants. Le solvant A est un tampon d'acétate de Sodium 140 mM et le solvant B est à base d'acétonitrile 60 %.

La détection est réalisée en UV à 254 nm grâce à un détecteur fluorimétrique TSP-fl 3000. La quantification est effectuée grâce au logiciel MILLENIUM version 2010 (Waters), en se référant à une solution standard d'acides aminés (AA-S18, Sigma).

Tampon de dérivation : borate saturé 0,2 M pH 8,8, EDTA dissodique 5mM

3.3.2. Dosage des acides organiques

Le dosage des acides organiques par HPLC, est réalisée par une détection conductimétrique, basée sur la mobilité des ions dans un champs électrique appliqué entre les deux électrodes, de la charge électrique et de la concentration de la molécule. Cette mesure est exprimée en μ Siemens. Pour cette analyse, 20 μ L de l'extrait dilué au vingtième ont été injectés dans une colonne Ion Pac AS11 (Dionex, 4X250 mm) thermostatée à 25 °C. L'élution des acides organiques se fait progressivement par un gradient croissant de soude (de 0,5 mM à 37,5 mM), sous un flux de 2 mL/min. Les résultats sont transformés et exploités par le logiciel MILLENIUM version 2010 (Waters).

3.3.3. Dosages des sucres

Les sucres solubles sont analysés en HPLC par une détection en réfractométrie. Les différents sucres sont séparés sur une colonne AminexHPX-87C (résine de polystyrène divinylbenzène, 7,8x300 mm, taille particules : 9 μ m,) (BioRad). L'analyse a été effectuée à partir d'un volume d'injection de 50 μ L d'extrait neutre, non dilué. L'élution se fait à 80 °C, en condition isocratique avec un flux d'eau de 0,5 mL/min. Les sucres sont détectés par un réfractomètre ERMA ERC-7515 et la quantification des sucres est réalisée à partir de l'aire du pic après une standardisation externe grâce au logiciel MILLENIUM version 2010 (Waters).

3.4. Dosage des ions minéraux

Le dosage des ions minéraux a été réalisé par le service U.S.R.A.V.E. (Unité de Service et de Recherche en Analyses Végétales) du Centre de Recherche INRA de Bordeaux. Au minimum, 2 g de cellules BY-2 filtrés et stockés à -80 °C ont été fournies à l'USRAVE pour réaliser les dosages. La minéralisation des échantillons consiste à les sécher à 103 °C +/- 2 °C, la teneur en humidité est alors calculée, afin de ramener la quantité d'ions dosés à la masse fraîche des échantillons.

Une aliquote d'échantillon est pesée et mise en solution dans 100 mL d' HNO_3 5%, pour doser les ions potassium, calcium, et magnésium à l'ICP radial (Inductibly Coupled Plasma). Cette technique est basée sur la spectrométrie d'émission atomique. La dissociation des molécules en atomes libres est effectuée par des décharges électriques, dénommés plasmas, et l'ICP est une technique d'atomisation de plasma inductible.

Une autre aliquote est reprise dans 20 mL d'eau distillée pour doser les ions chlorures, nitrates, sulfates et phosphates par chromatographie ionique.

3.5. Normalisation des données

Les données obtenues à partir des dosages des composés solubles (HPLC, ICP et chromatographie ionique) ont été normalisées, en considérant d'une part que dans le volume de cellules récoltées après

filtration, 15% correspondent au milieu de culture restant dans les espaces intercellulaires (DRACUP and GREENWAY, 1988). Toutes les valeurs ont donc été divisées par 85%.

D'autre part, pour les expériences menées dans l'eau et dans le milieu MS (Figure 43), nous avons pris en compte, pour la teneur en ions, que le lavage a été réalisé pour toutes les cellules dans le milieu MS et que nous avons ensuite repiqué les cellules dans des erlens contenant les différents milieux. De telle sorte que pour les teneurs d'ions minéraux des cellules repiquées dans l'eau, nous avons appliqué la formule suivante :

$$C - ([Cms \times 9/800] \times 15\%) / 85\%$$

Où **C** : concentration de l'ion mesurée ; **Cms** : Concentration de l'ion dans le milieu MS ; **9/800** : 9 mL de milieu MS inoculé au moment du repiquage dans 800 mL d'eau.

Quand le repiquage s'est effectué dans le milieu MS, nous avons appliqué cette formule pour tous les ions :

$$C - ("Cms" \times 15\%) / 85\%$$

C : concentration de l'ion mesurée ; **Cms** : Concentration de l'ion dans le milieu MS

Les annexes 1 et 2 présentent les résultats normalisés.

4. Procédures expérimentales de microscopie

4.1. Hybridation *in situ*

4.1.1. Marquage à la digoxigénine des sondes ARN sens et antisens.

La synthèse des sondes ARN sens et antisens est réalisée à l'aide des polymérases des bactériophages T7 et SP6 dont les promoteurs sont présents de part et d'autre du multisite de clonage du pGEM-T (vecteur de clonage du fragment *C4M41-2*). Ce vecteur est préalablement linéarisé à l'aide d'une enzyme de restriction adéquate. Ainsi, concernant le plasmide pGEM-T, la linéarisation par *NcoI* permet la synthèse du transcrite sens (contrôle de l'expérimentation) à partir du promoteur SP6 et la linéarisation par *SaI* permet la synthèse du transcrite antisens à partir du promoteur T7. Le plasmide linéarisé est purifié par une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1, v/v/v), une extraction au chloroforme/alcool isoamylique (24:1, v/v) et une extraction à l'éther. Les échantillons sont finalement précipités par 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et 3 volumes d'éthanol 100%. Le culot est repris dans 20 µL d'eau DEPC. Le marquage des sondes est réalisé dans un mélange réactionnel de 20 µL composé de 1 µg d'ADN plasmidique linéarisé, de Tris-HCl 40 mM pH=8, de MgCl₂ 6 mM, de DTT 10 mM, de spermidine 2 mM, d'ATP, CTP, GTP (1 mM chacun), d'UTP 0,65 mM, de Dig-11-UTP 0,35 mM et de 40 U des ARN polymérases correspondantes. L'incubation est effectuée dans un thermocycleur (PTC-100; MJResearch) durant 4 h à 37°C. La réaction est stoppée par addition de 5 µL d'EDTA 0,2 M pH=8. Les ARN synthétisés sont précipités en présence de 2,5 µL de LiCl 4 M et de 3 volumes d'éthanol absolu pendant 45 min à -80°C, lavés à l'éthanol 70%, séchés à température ambiante puis repris dans 20 µL d'eau DEPC. Les concentrations d'ARN synthétisés sont déterminées par comparaison à une gamme étalon d'ARN témoin.

4.1.2. *Traitement du matériel : lames et lamelles.*

Les lames de verre sont dégraissées dans un mélange alcool/éther (1:1), trempées dans une solution 2% (v/v) APES (SIGMA) dans l'acétone, puis dans une solution d'acétone et enfin rincées 2 fois dans de l'eau DEPC. Les lames sont séchées pendant une nuit dans une étuve à 60 °C. Les lamelles sont siliconées par trempage dans une solution de Sigmacote (SIGMA), rincées 3 fois dans de l'eau distillée puis traitées pendant 2 h à 200°C, dans un four Pasteur.

4.1.3. *Fixation et traitement du matériel biologique.*

Les solutions de fixation et celles nécessaires au traitement des coupes (hormis les solutions d'alcool, d'Histosol Plus (CML) et de paraffine (ParaplastPlus, SIGMA)) sont préparées extemporanément.

Le matériel végétal est plongé dans une solution de fixateur FAA (formaldéhyde 4% (p/v), éthanol 50% (v/v), acide acétique 5% (v/v)). La fixation se déroule à température ambiante pendant 4 h. La solution est renouvelée toutes les heures et à chaque fois le matériel est soumis au vide pendant 15 min. Les étapes qui suivent jusqu'à l'inclusion sont réalisées à l'aide de l'automate Citadel 1000 (Shandon) : déshydratation dans des bains d'alcool de concentration croissante de 50 à 100%, imprégnation par un solvant de la paraffine (Histosol Plus) puis par la paraffine à 65 °C selon le protocole décrit par Gabe (Gabe, 1968). Les blocs de paraffine sont réalisés à l'aide d'un appareil à inclusion (Shandon), débités en rubans de 8 µm à l'aide d'un microtome (Shandon) et déposés sur des lames de verre préalablement traitées comme décrit dans le paragraphe précédent. Les préparations sont ensuite séchées dans une étuve à 45 °C pendant 24 h.

4.1.4. *Déparaffinage et réhydratation des coupes.*

Les lames sont tout d'abord déparaffinées par 3 bains successifs d'Histosol Plus pendant 10 min, puis rincées dans 2 bains d'alcool 100% pendant 10 min. Les opérations de réhydratation sont réalisées dans des bains d'alcool 95, 70, 50 et 30% pendant 1 min chacun. Les lames sont ensuite placées dans 3 bains successifs de PBS 1X pendant 5 min chaque fois, et enfin dans un bain de SSPE 2X pendant 10 min.

4.1.5. *Préhybridation et hybridation.*

Une solution de préhybridation est déposée sur les coupes à raison de 150 µL par lame. La préhybridation se déroule pendant 1 h, dans une chambre humide, à température ambiante. Les préparations sont ensuite rincées dans un bain de SSPE 2X. Cent µL de la solution de préhybridation contenant maintenant 50 ng de sonde marquée sont déposés sur chaque lame. Les lames sont recouvertes d'une lamelle siliconée puis placées dans un incubateur (modèle SM30, Merck Eurolab) à 45°C, en atmosphère humide, pendant une nuit.

4.1.6. Lavages et détection immunologique.

Afin d'éliminer l'excès de sonde ARN non hybridé, les lames sont rincées 4 fois pendant 15 min dans une solution de SSPE 2X, puis 1 fois pendant 30 min dans un bain de SSPE 1X. L'ARN fixé de manière aspécifique sur les préparations est éliminé par des lavages de stringences variées consistant à réduire la concentration en SSPE et à augmenter la température. Les conditions optimales sont déterminées expérimentalement. Pour la sonde C4M41-2, une température de 65°C et une concentration de 0,1X SSPE est sélectionnée. Ces lavages sont effectués pendant 30 min. Suite à ce lavage stringent, les lames sont soumises à un dernier lavage en SSPE 0,5X pendant 30 min, à température ambiante. L'étape de détection immunologique à l'aide d'anticorps anti-digoxygénine (Roche Biochemical) nécessite des traitements préalables des lames. Elles sont immergées 2 fois 5 min dans du tampon 1 à température ambiante, et 1 fois 30 min dans une solution de BSA [Triton X-100 0,3% (v/v), BSA 2% (p/v)] préparée dans du tampon 1, à température ambiante. Cent cinquante µL de la solution d'anticorps dilués au 1/500 dans du tampon BSA sont déposés sur chaque lame. L'incubation dure une nuit à 4°C. L'excès d'anticorps est éliminé dans deux bains successifs de 15 min dans 200 mL de tampon 1 suivis de 2 rinçages de 5 min en tampon 3, à température ambiante sous agitation douce. Cent cinquante µL de la solution de NBT/BCIP (Roche Biochemical) (respectivement 450 µg.mL⁻¹ et 175 µg.mL⁻¹ dilués dans du tampon 3) sont déposés sur les coupes qui sont alors placées à l'obscurité. La réaction de coloration, se traduisant par l'apparition d'une coloration rouge-violet est arrêtée par rinçage dans un bain d'eau distillée. Les lames sont mises à sécher une nuit à température ambiante et les préparations sont recouvertes d'une lamelle montée à l'aide d'une solution d'Entellan (Merck). Les observations sont effectuées à l'aide d'un microscope optique Zeiss Axiophot et les photographies sont obtenues avec une caméra numérique SONY DKCCM 30.

SOLUTIONS :

20x SSPE : NaCl 3M ; NaH₂PO₄.EAU 180 mM ; Na₂-EDTA 20 mM.

Solution de préhybridation : formamide 50% (v/v), SSPE 4X, Dextran sulfate 10% (p/v) Denhardt's 1X, ARNt 250 µg.mL⁻¹, ADN de sperme de saumon soniqué 250 µg.mL⁻¹

Tampon 1 : Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M

Tampon 3 : Tris-HCl 100 mM pH=9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM

4.2. Etude de l'ultrastructure cellulaire par microscopie électronique

Pour observer l'organisation des cellules dans son état quasi natif, il est nécessaire de la stabiliser dans des délais aussi brefs que possible. La cryofixation ultra-rapide est actuellement l'une des techniques les plus performantes pour répondre à ces exigences, car elle permet de figer presque instantanément les structures cellulaires par vitrification de l'eau intracellulaire. Les méthodes de cryofixation classiques ne permettent d'obtenir une bonne préservation de la structure que sur une faible profondeur d'échantillon (de

l'ordre de 15 μm) car des cristaux de glace de plus en plus gros se forment au cours de la congélation, dus au ralentissement de la pénétration du front de froid. L'application d'une haute pression, au cours de la congélation, s'oppose à la formation de ces cristaux et permet ainsi de préserver les tissus sur une épaisseur plus importante (jusqu'à 150 μm). L'eau intracellulaire est alors congelée sous une forme vitrifiée (glace amorphe). Dans le cas de cellules riches en eau, comme les cellules BY-2 en suspension, il s'est avéré indispensable d'introduire au préalable une étape de cryoprotection des échantillons. Une étude préliminaire a permis de sélectionner le tréhalose.

4.2.1. Préparation des échantillons et cryoprotection

Les cellules sont récoltées à différents moments de la culture (12 h 24 h ou 36 h après le repiquage) en présence ou non de 10 μM d'AIA. Les cellules sont centrifugées avec un rotor "swinging" (Jouan, rotorT4) pendant 10 min à 65 xg à température ambiante. Le surnageant est en partie éliminé et les cellules sont resuspendues dans les 5 mL restant, auxquels on ajoute 5 mL de milieu de culture contenant 10 % de tréhalose (Sigma). Les cellules sont agitées doucement à la main pendant 5 min puis laissées à sédimenter 5 min et enfin centrifugées à 82 xg pendant 10 min.

4.2.2. Cryofixation

Pour la cryofixation quelques microlitres de suspension cellulaire sont déposés doucement dans des cupules métalliques à fond percé, posés sur du papier whatman qui absorbe l'excès de liquide. Ces cupules sont ensuite placées dans l'appareil à cryofixer sous haute pression EM-PACT (Leica). La cryofixation des échantillons est effectuée par un jet d'azote liquide (-196 °C) et sous une pression d'environ 2000 bar.

4.2.3. Cryosubstitution

La cryosubstitution comporte deux étapes : une étape de déshydratation à -90 °C pendant laquelle l'eau est remplacée par un solvant, puis une étape de remontée progressive en température au cours de laquelle peut être réalisée une stabilisation des constituants cellulaires par des fixateurs chimiques, en milieu anhydre.

Les échantillons cryofixés (dans les cupules) sont transférés dans des cryotubes (1,5 mL) contenant le milieu de cryosubstitution, composé d'acétone anhydre additionné de 2% de tétraoxyde d'osmium. La cryosubstitution est effectuée à -90 °C pendant 28 h, dans un automate de cryosubstitution ou AFS (Automatic Freeze Substitution). Puis la température remonte de 4 °C/h, avec des paliers de 8 h à -60 °C et -30 °C, jusqu'à 0 °C. Ensuite les échantillons sont rincés 3 fois à l'acétone RP, puis fixés dans l'acide tannique 1 % dans l'acétone pendant 1 h et rincés une nouvelle fois dans l'acétone. Ils sont enfin déposés à température ambiante, sous la hotte, pour être rincés deux fois de plus. Lors du dernier rinçage, les échantillons sont détachés de leurs cupules et placés dans des piluliers en verre.

4.2.4. Imprégnation et inclusion

L'imprégnation des échantillons a pour but de remplacer progressivement l'acétone par la résine époxy, ici l'Epon. Ce type de résine présente une grande résistance mécanique, appréciable lors de la confection de coupes ultra-fines, et elle est stable sous le faisceau d'électrons émis par le microscope.

L'imprégnation des échantillons est réalisée de façon progressive très graduelle avec un mélange Epon + acétone contenant un pourcentage croissant d'Epon :

Epon 5 % pendant 1 h 15	!	Epon 80 % pendant 5 h
Epon 10% pendant 1 h	!	Epon 100 % pendant 3 h à température ambiante,
Epon 20 % pendant 1 h 30	!	puis une nuit à 4 °C et enfin 4 h à température
Epon 40 % pendant 2 h	!	ambiante. Cette longue période est nécessaire pour
Epon 60 % pendant 19 h	!	assurer une imprégnation correcte de l'ensemble
	!	des structures cellulaires, notamment les parois.

Les échantillons sont ensuite pipetés délicatement avec un peu d'Epon et placés dans des gélules de gélatine. Les gélules sont ensuite retournées sur des lames de verre. La polymérisation de la résine est thermique, elle s'effectue donc dans une étuve à 60 °C pendant 48 h. Enfin, les gélules sont décollées de leur support en passant délicatement les lames sur un bec Bunsen.

4.2.5. Confection des coupes et observations microscopiques

Les coupes semi-fines de 1 à 2 µm d'épaisseur sont réalisées sur un microtome rotatif Reichert, à l'aide de couteaux de verre et colorées au bleu de toluidine 0,04 % boraté. Elles sont ensuite observées au microscope optique (Zeiss Axiophot) pour estimer l'état de la fixation et repérer les zones où sont situées les cellules et sur lesquelles peuvent être effectuées les observations en microscopie électronique.

Les coupes fines sont réalisées au couteau de diamant sur un ultramicrotome Ultracut S (Leica). Deux épaisseurs de coupes sont réalisées. Les coupes de 50 nm d'épaisseur, déposées sur des grilles de 600 mesh nues en cuivre, sont destinées aux observations à fort grossissement. Les coupes de 80 nm, déposées sur des grilles de 200 mesh filmées par du parlodion (concentration de 2 % dans l'acétate d'isoamyle Mallinckrodt), sont destinées aux vues d'ensemble.

Les coupes sont contrastées, à température ambiante, par deux traitements successifs par des métaux lourds : l'acétate d'uranyle 7 % (dans l'alcool 50 %) pendant 15 min à température ambiante, et le citrate de plomb (1 % dans l'eau) pendant 5 min. Dans le cas des grilles filmées, on a utilisé une solution aqueuse d'acétate d'uranyle à 2 %, pour ne pas fragiliser le film de parlodion.

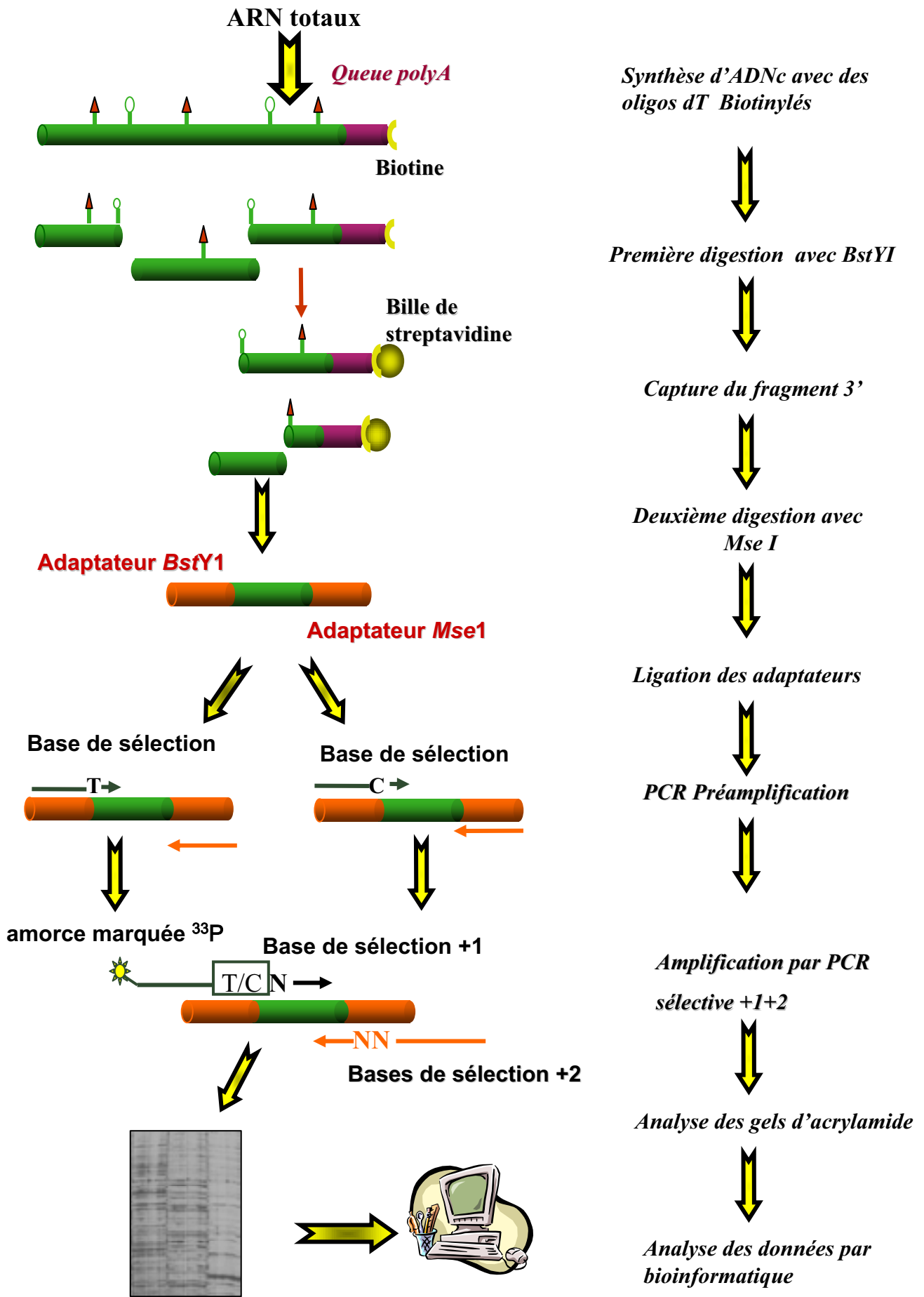


Figure 82. Etude globale du profil d'expression des gènes par cDNA-AFLP

L'observation des coupes est réalisée au microscope électronique à transmission (Philips CM10) sous une tension de 80 Kv. Les micrographies numériques sont acquises en format TIFF, à l'aide d'une caméra latérale (AMT) équipée d'un capteur 2K x 2K.

SOLUTIONS :

Acétate d'uranyl 7 % : diluer deux fois l'acétate d'uranyl à 14 % avec de l'alcool 100 °.

Citrate de plomb (50 mL) : 1,33 g de nitrate de plomb (Merck), 1,76 g de citrate trisodique (Merck). Ajouter 30 mL d'eau distillée, mélanger, puis ajuster le pH à 12 avec de la soude à 1 N, compléter jusqu'à 50 mL avec de l'eau distillée. Conserver à 4 °C.

5. Procédures expérimentales de biologie moléculaire

5.1. Technique de cDNA-AFLP

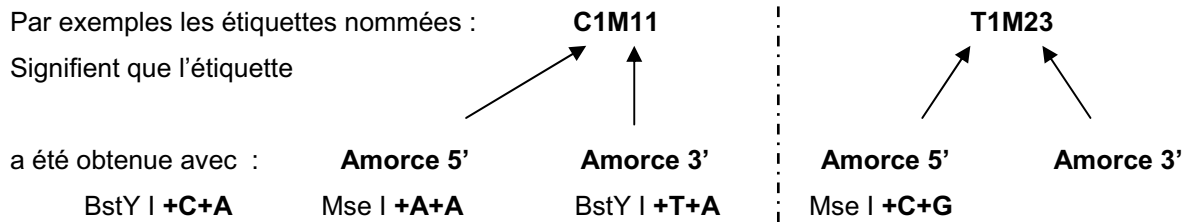
La technique de cDNA-AFLP est basée sur l'amplification par PCR de fragments uniques d'ADNc, coupés par un couple d'enzymes, dont le choix a été optimisé pour obtenir des étiquettes spécifiques des ADNc générés. L'analyse bioinformatique de l'intensité des bandes fournit des données semi quantitatives de l'expression des gènes. Cette technique améliorée à partir des travaux de Bachem et ses collaborateurs (Bachem et al., 1996), a déjà été décrite dans plusieurs articles (Breyne and Zabeau, 2001; Breyne et al., 2002; Breyne et al., 2003). En pratique une étude complète nécessite 160 réactions de PCR (**Tableau 11**) et le séquençage d'un millier d'étiquettes. Cependant les séquences étant très courtes, il faut souvent avoir recours à la recherche d'ADNc pleine longueur pour identifier le gène correspondant.

Les principales étapes du cDNA-AFLP sont rappelées **figure 82**. Les ADNc synthétisés par transcription inverse sont tout d'abord digérés par une première enzyme de restriction : *BstY I*. Ensuite seule la partie 3' de l'ADNc est conservée et digérée par une seconde enzyme de restriction : *Mse I*. Le choix du couple d'enzymes de restriction a été optimisé pour le génome de *Nicotiana tabacum* grâce à des analyses cDNA-AFLP in silico (Rombauts et al., 2003). Des adaptateurs sont ensuite ajoutés de chaque côté de l'ADNc doublement digéré. La ligation des adaptateurs est orientée puisque spécifique des sites de restriction *BstY I* en 5' et de *MseI* en 3'. L'enzyme *BstYI* reconnaissant le site : "PurineGATCPyrimidine" une pré-amplification des ADNc est effectuée, en utilisant les amorces correspondant à cette séquence avec une **T** ou une **C** comme Pyrimidine. L'amorce 3' correspond à la séquence du site *MseI*. Cette méthode permet de séparer en deux ensembles les ADNc obtenus. Par la suite, des amplifications par PCR sélectives sont réalisées avec une amorce 5' contenant la séquence de *BstYI*+T(ou C)+1 nucléotide de sélection. L'amorce 3' correspondant à la séquence de *MseI*+2 nucléotides de sélection. Ces PCR d'amplifications sélectives +1+2, réduisent le nombre de fragments à amplifier mais permettent d'amplifier des messagers peu abondants. L'identification des étiquettes a été définie en fonction de ces amplifications sélectives, le code étant : 1 =A ; 2=C ; 3=G et 4=T.

<i>N° gels</i>	Mse 11	Mse 12	Mse 13	Mse 14	Mse 21	Mse 22	Mse 23	Mse 24	Mse 31	Mse 32	Mse 33	Mse 34
<i>BstC1</i>	pilote				18	18	18	23	24	24	24	27
<i>BstC2</i>	30	30	30	37	35	35	35	37	65	65	65	68
<i>BstC3</i>	40	40	40	48	41	41	41	48	42	42	42	48
<i>BstC4</i>	55	55	55	61	56	56	56	61	57	57	57	61
<i>BstT1</i>	19	19	16	19	20	20	20	26	21	21	21	26
<i>BstT2</i>	31	31	31	58					33	33	33	36
<i>BstT3</i>	43	43	43	49	44	44	44	49	46	46	46	49
<i>BstT4</i>	51	58	51	60				60	53	53	53	60

Tableau 11. Récapitulatif des 128 combinaisons d’amorces nécessaires pour les cDNA-AFLPs

Les premières expériences pilotes ont été menées avec les quatre premières combinaisons d’amorces sur les 55 lots analysés, nous avons sélectionné 23 lots de cellules (voir texte), sur lesquels nous avons effectué les amplifications des combinaisons restantes. Les cases grisées correspondent aux combinaisons qui n’ont pas donné d’amplification correcte aux numéros des gels d’acrylamide.



5.1.1. Préparation des cellules et procédure expérimentale

Les cellules BY-2 âgées de 7 jours ont préalablement été lavées. Pour cela, 60 mL de suspension cellulaire ont été dilués dans 100 mL de milieu de culture neuf, puis filtrés sur un filtre de nylon (pore : 40µM) stérile. A l'aide d'une spatule, les cellules sont récupérées et resuspendues dans un ballon de 10 L contenant 2 L de milieu de culture + 30 µM de Thiamine HCl + 0,55 mM myoinosito et mises en agitation pendant 1 h à 150 rpm.

Les cellules sont à nouveau filtrées sur un filtre de nylon, et récupérées dans 96 mL de milieu de culture. Enfin 5 mL de suspension cellulaire sont repiqués dans les erlens de 1 L, contenant 200 mL de milieu de culture additionnés de vitamines et d'auxine dans les concentrations voulues (0 M, 1 nM, 25 nM, 10 µM, 100 µM). Les cellules sont récoltées tout de suite après le repiquage, et après 30 min, 1 h, 1 h 30, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h et 12 h de culture.

5.1.2. Isolation des ARN totaux

A partir de 100 mg de poudre, issus du broyage des cellules BY-2 à l'azote, les ARN totaux ont été extraits avec le Concert™ Plant RNA Reagent d'Invitrogen, suivant le protocole d'isolation d'ARN à partir d'une petite quantité.

La qualité des ARN totaux est vérifiée en faisant migrer 1 µL d'échantillon, dans un gel d'agarose 2 % (avec du tampon TBE 0,5x).

La présence d'ADN peut être vérifiée par amplification directe par PCR sur les ARN extraits. La PCR ne fonctionnant qu'à partir d'une matrice double brin, l'amplification ne pourra être due qu'à la contamination de l'échantillon par de l'ADN. Dans ce cas, il faut traiter les échantillons avec une DNase RQ1 (Promega) (1U/µl) à raison d'1 U pour 1 µg d'ADN, puis faire une extraction phénol:chloroforme et reprécipité l'ARN pure avec de l'éthanol absolu stocké au -20°C et suivre les deux dernières étapes du protocole ci-dessus. La quantification des ARN peut alors être réalisée par spectrophotométrie à la longueur de 260 nm.

5.1.3. Synthèse de l'ADNc double brin

La synthèse du premier brin d'ADNc à partir des ARN extraits, est réalisée avec les produits du kit "Superscript™ II First strand Synthesis System" d'Invitrogen et à partir de 2 µg d'ARN total et 700 ng d'oligo-dT-biotynilé.

On incube les échantillons pendant 2 h à 42 °C (à l'aide d'un thermocycleur).

Le deuxième brin d'ADNc est synthétisé grâce au mélange enzymatique d'une ligase et d'une polymérase d'*E. coli*.

On ajoute :

+40 µL du mélange réactionnel précédent (premier brin d'ADNc)	+6 µL de DTT à 0,1 M
+1,6 µL de co-facteur NAD	+15 unités de ligase (Gibco-BRL)
+16 µL de "10 x second strand buffer" (tampon fournit avec la ligase d' <i>E. coli</i>)	+50 unités de polymérase I (Pharmacia)
+3 µL de dNTPs 10 mM	+1,6 unités de RNase-H (Pharmacia)
	+ eau ultra pure traitée au DEPC jusqu'à un volume réactionnel de 160 µL.

On incube à 12 °C pendant 1 h puis à 22 °C pendant 1h (dans un thermocycleur).

Les ADNc ainsi obtenus sont purifiés à l'aide d'un kit de purification de produit PCR (Qiaquick PCR purification kit de qiagen ou Nucleospin® Extract de Macherey-Nagel). Le volume de récupération étant de 30 µL, on en utilise 8 µL, pour vérifier l'état des ADNc sur gel d'agarose 1 % avec du tampon TAE 0,5x.

5.1.4. Préparation de la matrice pour les AFLP

La préparation des AFLPs consiste à digérer les ADNc par deux enzymes, dont le choix a été optimisé par analyse *in silico* de leur fréquence de coupure dans le génome. Dans le cas des cellules BY-2, le génome de *Nicotiana tabacum* présente de nombreux sites de coupure avec la combinaison de *BsfYI* et *MseI*. Ensuite des adaptateurs sont ajoutés aux extrémités des fragments d'ADNc ayant subi la double digestion (**Figure 82**).

*première digestion

Pour réaliser la première digestion, 500 ng d'ADNc (20 µL) sont mélangés avec 10 unités de *BsfYI* et 4 µL de tampon RL (10 x) et de l'eau ultra pure jusqu'à un volume final de 40 µL.

Les échantillons sont incubés pendant 2 h à 60 °C.

*préparation des billes de streptavidine

Les fragments possédant leur partie 3' biotinilée sont séparés des autres fragments (la partie 5' des ADNc) en les fixant aux billes de streptavidine (Dynabeads M-280 Streptavidin-Dynal).

Dix µL de billes sont lavés avec 100 µL 2x STEX, puis le surnageant est enlevé (centrifugation ou aimant) et les billes sont resuspendues avec un volume de 2X STEX équivalent à celui des ADNc. Dans notre cas, nous avons ajouté 40 µL de tampon aux 40 µL d'ADNc digérés.

Le mélange est incubé pendant 30 min à température ambiante sous une agitation de 1 000 rpm. Ensuite les billes sont collectées au fond du tube grâce au portoir aimanté, qui permet de les laver avec 100 µL d'1X STEX en évitant de les pipeter. L'ensemble est ensuite prélevé et mis dans un tube propre (disposé dans le portoir aimanté). Le surnageant est prélevé et 4 autres lavages sont effectués avec le même tampon. Enfin on resuspend les billes dans 30 µL de tampon TE (10 :0,1), que l'on transfère dans un tube propre.

*Deuxième digestion

Pour réaliser la digestion des ADNc avec la deuxième enzyme, on ajoute aux 30 µL de suspension de billes (où les ADNc sont accrochées par leur extrémité 3'), 10 unités d'enzyme *Mse* I, 4 µL de 10 x de tampon RL et de l'eau jusqu'à un volume final de 40 µL.

Les échantillons sont incubés pendant 2 h à 37 °C, sous une agitation douce de 1 000 rpm. Enfin, les billes sont collectées au fond du tube (en utilisant le portoir aimanté). Le surnageant contenant les fragments digérés est récupéré et transféré dans un tube propre.

*Ligation des adaptateurs

Des adaptateurs sont ligués de chaque côté des fragments d'ADNc. L'adaptateur *Bst*YI s'accrochant à l'extrémité de l'ADNc coupé par l'enzyme *Bst*YI et l'adaptateur *Mse*I s'accroche à l'autre extrémité, coupée par l'enzyme de restriction *Mse*I. Ces adaptateurs sont des oligonucléotides non phosphorylés.

L'adaptateur *Bst*YI correspond au mélange de deux oligos *Bst*YI-F et *Bst*YI-R à une concentration finale de 5 pmol/µL:

Nom de l'oligo	Séquence en 5'-3'
<i>Bst</i> YI-F	CTCGTAGACTGCGTAGT
<i>Bst</i> YI-R	GATCACTACGCAGTCTAC

Pour préparer 50 µL d'adaptateur à 5 pmol/µL, 2,5 µL de chaque oligo (stock à 100 µM) sont mélangés dans 45 µL d'eau ultra pure.

L'adaptateur *Mse*I, correspond au mélange des oligos *Mse*I-F et *Mse*I-R à une concentration finale de 50 pmol/µL.

Nom de l'oligo	Séquence en 5'-3'
<i>Mse</i> I-F	GACGATGAGTCCTGAG
<i>Mse</i> I-R	TACTCAGGACTCAT

Pour préparer 50 µL d'adaptateur à 50 pmol/µL, 25 µL de chaque oligo (stock à 100 µM) sont mélangés.

Pour la ligation des adaptateurs avec les fragments d'ADNc digérés, on mélange :

40 µL d'ADNc digéré
 1 µL d'adaptateur BstYI (=5 pmol)
 1 µL d'adaptateur MseI (=50 pmol)
 1 µL de 10 mM ATP (*Pharmacia*)
 1 µL tampon RL 10 x
 1 unité de T4 DNA ligase
 10 unités d'enzyme BstYI
 eau ultra pure jusqu'à un volume finale de 10 µL.

La ligation des adaptateurs est réalisée pendant 4 h à 37 °C ;

Les fragments d'ADNc sont prêts à être amplifiés.

5.1.5. Préamplification avec des amorces non-sélectives

Les ADNc sont d'abord pré-amplifiés de façon non sélective avec les amorces correspondant aux adaptateurs. L'enzyme *BstYI* reconnaît la séquence *Pu GATC Py* (*Pu* =purine et *Py*=pyrimidine) et après la digestion et la ligation des adaptateurs, la pré-amplification est effectuée en utilisant une amorce correspondant à la séquence de *BstYI* à laquelle est ajoutée en 3' l'une des pyrimidine (une T ou une C). Ainsi l'ensemble des fragments est divisé en deux, ce qui facilite et optimise l'amplification sélective, réalisée par la suite.

Le produit de la ligation est d'abord dilué deux fois avec du tampon TE (T₁₀-E_{0,1}). 5 µL de de cette dilution sont utilisés pour la pré-amplification avec le couple d'amorce *BstYI* et *MseI*.

Nom de l'amorce	Séquence en 5'-3'
<i>BstYIT+0</i>	GACTGCGTAGTGATCT
<i>BstYIC+0</i>	GACTGCGTAGTGATCC
<i>MseI+0</i>	GATGAGTCCTGAGTAA

Deux pré-amplifications doivent donc être réalisées pour avoir l'ensemble des ADNc pré-amplifiés, l'une avec les amorces *BstYIT0-MseI0* et l'autre avec *BstYIC0-MseI0*.

BstYIT+0-MseI+0	BstYIC+0-MseI+0
5 µL du produit de ligation dilué	5 µL du produit de ligation dilué
1,5 µL d'amorce <i>BstYIT+0</i>	1,5 µL d'amorce <i>BstYIC+0</i>
1,5 µL d'amorce <i>MseI+0</i>	1,5 µL d'amorce <i>MseI+0</i>
2 µL de dNTPs à 5 mM	2 µL de dNTPs à 5 mM
1 unité de Taq polymérase	1 unité de Taq polymérase
5 µL de tampon 10X pour PCR	5 µL de tampon 10X pour PCR
eau ultra QSP 50 µL	

eau ultra pure QSP 50 µL

La préamplification est effectuée par une PCR suivant le programme suivant :

20 cycles : 30 sec à 94 °C
 60 sec à 56 °C
 60 sec à 72°C.

La préamplification est vérifiée en faisant migrer 10 µL du produit PCR dans un gel d'agarose entre 1,2 et 1,5 % (tampon TAE).

Taq polymérase = (ampliTaq, Perkin-Elmer, 5 U/µL)

5.1.6. Amplification sélective

L'amplification sélective est réalisée avec un couple d'amorce, dont l'une est marquée au ³³P.

*marquage de l'amorce

Pour une réaction d'amplification du fragment d'ADNc (préamplifié), 5 ng d'amorce marqués sont nécessaires.

On ajoute : 0,1 µL de d'amorce à 50 ng/µL
 0,1 µL ³³P-γ-ATP (=2000 Ci/mmol = 50 pmol)
 0,05 µL tampon T4 10x
 0,2 unités de kinase T4
 eau ultrapure QSP 0,5 µL

Le mélange est incubé à 37 °C pendant 45 min, puis 10 min à 80 °C (pour inactiver la kinase).

L'amorce ainsi marquée est à une concentration finale de 10 ng/µL et peut être conservée pendant 1 semaine à -20 °C.

*réaction PCR

Pour chaque amplification, 5 µL de la préamplification **diluée 600 fois** sont utilisés.

Un mélange pour l'amplification sélective comprend :

5 µL de produit de préamplification (diluée 600 fois)
0,5 µL d'amorce BstYI+N-amorce marquée³²P à 10 ng/µL
5 µL d'amorce MseI non marquée à 6 ng/µL
0,8 µL de dNTPs à 5 mM
2 µL de tampon PCR 10x
0,12 µL d'Amplitaq "Gold" polymérase (5 U/µL ; Applied Biosystem)
eau ultrapure QSP 20 µL.

Le programme d'amplification est :

HOT START de 10 min à 94 °C
13 cycles : 30 sec 94 °C
 30 sec 65 °C **qui diminue de 0,7 °C par cycle**
 60 sec 72 °C
23 cycles : 30 sec 94 °C
 30 sec 56 °C
 60 sec 72 °C

5.1.7. Migration des produits amplifiés

Après l'amplification, 5 µL de tampon de charge "formamide" sont ajoutés aux 20 µL de produit PCR. Les échantillons sont ensuite dénaturés à 94 °C pendant 3 min, puis placés rapidement dans la glace jusqu'au moment du chargement dans le gel. Ils peuvent également être stockés sous cette forme, à -20 °C.

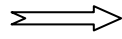
3 à 4 µL de produit PCR dénaturés sont chargés dans les puits (peigne 72 puits). Les échantillons migrent au travers d'un gel de polyacrylamide 5 %, en utilisant le système Sequigel (Biorad). Au moment de la polymérisation, ajouter à 100 mL de solution pour gel, 500 µL d'APS 10 % et 100 µL TEMED. La solution pour le gel est ensuite injectée dans le système Sequigel. La polymérisation nécessite entre 45 et 60 min. L'électrophorèse se déroule pendant 3 h.

A la fin de la migration, le gel est séché par un vacuum-sécheur sur du papier whatmann. Le gel sec est ensuite placé dans une cassette contenant un écran par le phosphore ³³P, pendant une nuit. Il est ensuite scanné dans le phosphor-imager. Le gel est enfin exposé sur un autoradiogramme (Kodak) pendant 2 jours. Enfin, le gel est stocké dans un endroit hermétique, en attendant que l'émission de radioactivité diminue et qu'on puisse l'utiliser pour découper les étiquettes sélectionnées.

5.1.8. Amplification et séquençage directe

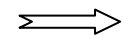
Après avoir déposé sur le gel correspondant le film autoradiographique (sur lequel les bandes à séquencer ont été repérées), l'ensemble est découpé très précisément au niveau de la bande. Le morceau de gel est placé dans un tube contenant 100 µL d'eau ultrapure. L'ADN emprisonné dans les mailles d'acrylamide se dissout dans l'eau à température ambiante pendant 10 à 15 min. Le mélange est ensuite vortexé et laissé 2 h supplémentaires à 4 °C. Une centrifugation de 5 min à vitesse maximale permet de laisser au fond du tube le papier et les particules de gels. Le surnageant contenant l'ADN est récupéré dans un tube propre et 2,5 µL sont utilisés comme matrice pour réaliser une amplification par PCR. Les amorces utilisées sont Mse0 (correspond à l'adaptateur Msel, sans nucléotide de sélection) et BstC0 ou BstT0, selon l'étiquette (donc du couple d'amorces utilisé lors de l'amplification sélective). Le séquençage automatique (réalisé au PSB) est enfin effectué directement sur ces produits PCR purifiés (QIAquick PCR purification kit, Quiagen).

Scan avec le
Phospho-imager



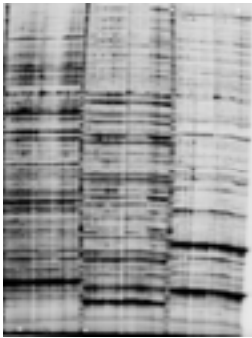
QuantarPro

- *Quantification du signal radioactif
- *Première normalisation :

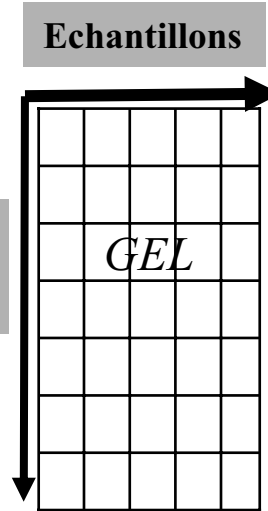


Programme Acc

- 1-Normalisation avec 25%
 - 2-Calcul du Coefficient Y
 - 3-Sélection des étiquettes
- Exemple:



ETIQUETTES
de
GENeS



CV>0.6 ———

CV<0.2 ———

Figure 83. Normalisation des données

5.1.9. Traitement bioinformatique des résultats

L'image prise au phosphor-imager est analysée par le programme AFLP Quantar™ Pro. Le programme va alors réaliser un premier niveau de normalisation (**Figure 83**) en détectant les variations d'intensité moyenne des bandes de haut en bas et entre les différentes pistes (échantillons). Les analyses statistiques des données générées par Quantar Pro sont réalisées par un programme type Access élaboré par le service informatique du laboratoire PSB (Plant System Biology) de Gand. Ce programme normalise les données en considérant 25 % des bandes comme des gènes constitutifs et définit un coefficient de variation (niveau de variation, pour un même gène, entre les différentes conditions testées). Les étiquettes qui ont été sélectionnées présentent un coefficient supérieur ou égal à 0,6 (**Figure 83**).

Le groupement hiérarchique (en fonction du profil d'expression de chaque étiquette) a été réalisé avec l'expression normalisée (par le programme access) des étiquettes, grâce au logiciel EPCLUST (<http://ep.ebi.ac.uk/EP/EPCLUST/>). Le groupement est basé sur la corrélation entre la distance entre les étiquettes et les profils d'expression moyens similaires.

Le groupement par catégories fonctionnelles a été attribué suivant la caractérisation du MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences : <http://mips.gsf.de/>).

SOLUTIONS :

10X tampon RL : 100 mM Tris-HAc (pH 7,5), 100 mM MgAc, 500 mM KAc, 50 mM DTT, 50 ng/μL BSA

1X STEX : 1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (0,5 M), 0,1 % Triton X-100

Tampon 10x PCR : 100 mM Tris-HCl pH=8,3, 25 mM MgCl₂, 500 mM KCl.

T₁₀-E_{0,1} : 10 mM Tris-HCl pH=8, 0,1 mM EDTA

Tampon T4 10x : 250 mM Tris-HCl pH=7,5, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 5 mM spermidine (3HCl-form ; Sigma).

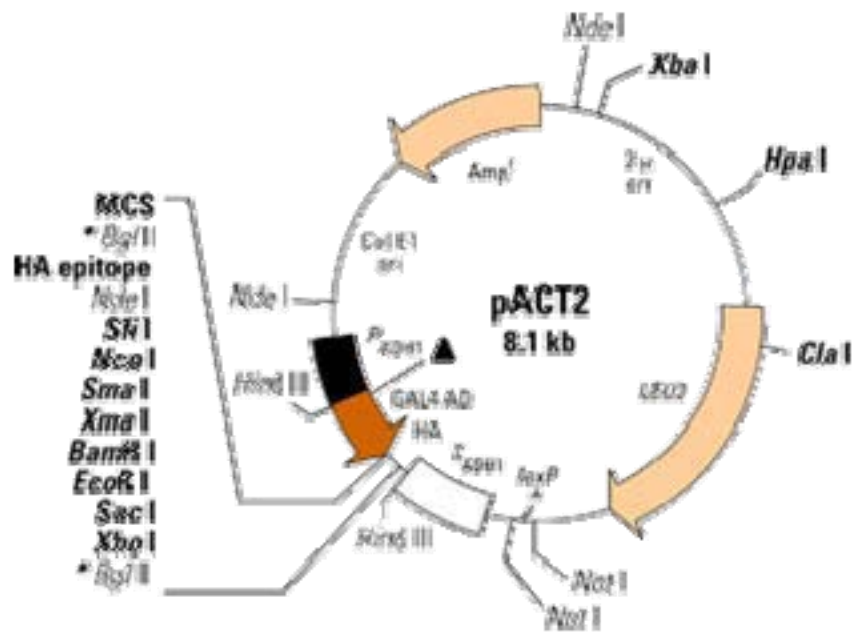
Tampon de charge formamide : 2 mL EDTA 0,5 M pH=8, 98 mL formamide, 0,06 g de bleu de bromophénol

Solution pour gel d'acrylamide 5 % (1L) : 450 g d'urée, 125 μL de polyacrylamide stock (40 %, 19 :1), 900 μL eau ultrapure, une petite cuillère d'amberlite (échangeur d'ions). Chauffer un peu (pas haut delà de 60 °C) jusqu'à la dilution totale de l'urée. Filtrer la solution (0,2 μm). Ajouter 100 mL du TBE 10X et 4 mL EDTA à 0,5 M pH=8. Ajouter de l'eau ultrapure jusqu'à 1L.

5.2. Criblage de la banque 2H d'ADNc BY-2

Afin de rechercher l'ADNc pleine longueur correspondant aux étiquettes des gènes différentiellement exprimés en fonction des conditions auxiniques, nous avons criblé par amplification PCR

A.



B.

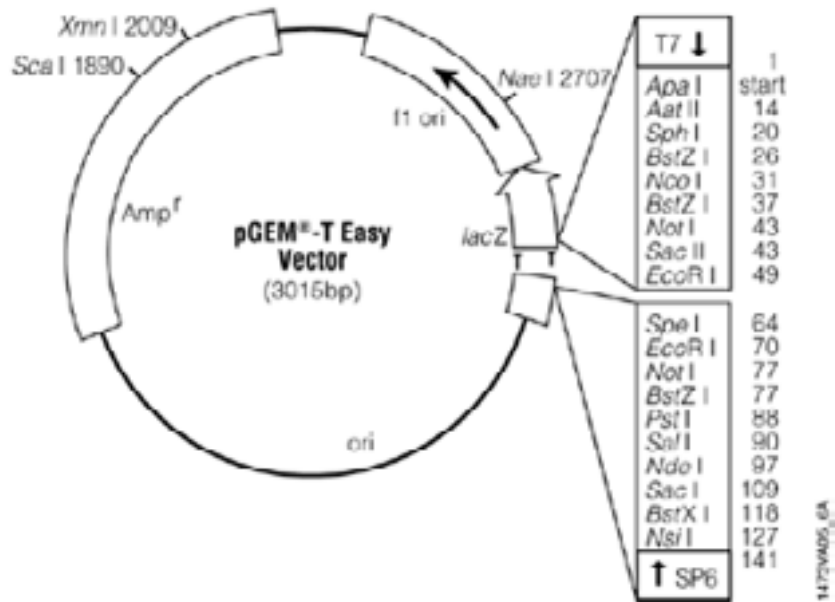


Figure 84. Les plasmides

A. Plasmide pACT2, dans lequel est cloné les fragments d'ADNc pleine longueur

B. Plasmide pGEM-Teasy, utilisé pour le clonage de fragments

une banque d'ADNc, réalisée à partir d'ARN extraits de cellules BY-2. Les ADNc ont été clonés dans le vecteur pACT2 (Clontech) (**Figure 84.A**) entre les sites *EcoR* I et *Xho* I du multisite de clonage.

La méthode employée pour sélectionner la partie 5' et 3' de l'ADNc de *C4M41-2* est schématisé **Figure 66**. Ainsi la région 5' de l'ADNc a été amplifiée avec l'amorce 5'AD et l'amorce C4M41-3'spécifique, (spécifique du gène) et pour la région 3', l'amorce 3'AD et l'amorce C4M41-5'spécifique ont été utilisées.

Amorce	Séquence
5'AD	CTATTCGATGATGAAGATAC
3'AD	GTGAACTTGCGGGGTTTTTC

De cette manière un fragment de 900 pb en 5' et de 400 pb en 3' ont été amplifiés. Ces amplifications ont été purifiées sur gel d'agarose 1,5 %, puis sur billes de silice grâce au kit QuiaexII (Quiagen). Les fragments ont été clonés dans le plasmide pGEMTeasy (**Figure 84.B**), avec un rapport insert : plasmide de 3 :1.

Les bactéries électrocompétentes XL1-Blue ont été transformées avec ces plasmides et sélectionnées sur milieu LB contenant 100 µg/mL finale d'ampicilline (résistance apportée par le plasmide pGEMT-easy). Trois clones pour la partie 5' et pour la partie 3' ont été envoyés pour être séquencés automatiquement par l'entreprise Genome express. Le séquençage a été réalisé avec les amorces universelles T7 et SP6, qui sont complémentaires d'une partie du plasmide pGEMTeasy, et situées respectivement à gauche et à droite de l'insert.

5.3. Analyse de l'expression des gènes par RT-PCR semi-quantitative

5.3.1. Extraction et dosage des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux à partir de poudre de cellules BY-2 (préalablement filtrées et congelées à -80 °C) est réalisée en utilisant la méthode du **phénol chaud**. Il est nécessaire pour cette technique de prendre toutes les précautions suivant les règles d'hygiène et sécurité, notamment l'utilisation d'une double paire de gants passées au dessus de la blouse et la manipulation sous une sorbonne.

Pour 400 mg de poudre de cellules BY-2, 4 mL de tampon d'extraction chaud (80 °C) ont été ajoutés. L'homogénéisation est réalisée à l'aide d'un polytron, pendant 1 min. Les échantillons sont maintenus à 80 °C en les mettant dans un bain-marie pendant 1 min, puis repolytronés pendant 1 min. Les échantillons sont ensuite placés dans la glace. Les éléments non solubles sont enlevés par centrifugation de 10 000 rpm pendant 15 min à 4 °C. La phase aqueuse contenant les acides nucléiques est placée dans des tubes propres, auquel est ajouté un volume équivalent de chloroforme/alcool isoamylique (24:1, v/v). L'ensemble est vortexé à fond pendant 1 min puis centrifugé à 10 000 rpm pendant 15' à 4 °C. Le surnageant est prélevé et mis dans un tube propre, auquel on ajoute 1/3 du volume avec du LiCl 8M (préalablement traité au DEPC) pour précipiter les acides nucléiques, pendant une nuit à 4 °C. Le lendemain, une centrifugation de 15 min à 10000 rpm à 4 °C permet d'obtenir un culot d'acides nucléiques. Le surnageant est enlevé, les culots séchés sous sorbonne pendant 5 min, puis repris avec 40 µL d'eau ultrapure traitée au DEPC.

Un traitement à la DNase RQ1 (Promega) permet de digérer l'ADN et d'obtenir des ARN totaux purs selon les recommandations du fournisseur.

La purification des ARN totaux (permet notamment d'extraire la DNase) est réalisée par un traitement phénol/chloroforme. Pour cela, 350 µL d'eau ultrapure traitée DEPC sont ajoutés au 50 µL de mélange réactionnelle précédent. A ces 400 µL on ajoute le même volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1). Les échantillons sont vortexés pendant 1 min, puis centrifugés pendant 5 min à 14 000 rpm. Le surnageant est prélevé et placé dans un tube propre. Un traitement avec 400 µL de chloroforme/alcool isoamylique (24:1), permet d'enlever les traces de phénol. Après un vortexage d'1 min, les tubes sont centrifugés pendant 5 min à 14000 rpm. Le surnageant est prélevé et placé à nouveau dans un tube propre. Les ARN totaux sont précipité par 2,5 volume d'éthanol absolu (1000 µL) (stocké à -20 °C) et 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2 (100 µL). La précipitation peut être réalisée pendant 2 h à -80 °C ou toute la nuit à -20 °C. Le lendemain, la centrifugation à 19000 rpm à 4 °C pendant 30 min permet de récupérer un culot d'ARN, qui est lavé avec 1 mL d'éthanol 70 % (sans décoller le culot). Après avoir recentrifugé à 19 000 rpm à 4 °C pendant 5 min, le surnageant est prélevé et le culot est séché sous sorbonne pendant 10 min. Les ARN totaux sont repris dans 50 µL d'eau ultrapure traitée au DEPC.

L'extraction des ARN totaux à partir de 100-150 mg de poudre de différents organes de tabac congelés a été réalisée en utilisant la méthode du **Tri-reagent** (Invitrogen, Molecular Research Center Inc.) et suivant les directives du fournisseur. Dans le cas des pointes de racines de tabac, des billes, composées de zirconium et de silice (zirconia/silica, 0,5 mm, Biospec products), traitées à l'eau DEPC puis autoclavées, ont été ajoutées aux échantillons avant d'être congelés dans l'azote liquide. Au moment de l'extraction 1 mL de Tri-reagent a été ajouté et les échantillons ont été placés dans un ribolyser pour casser les cellules.

Les ARN totaux sont dosés par spectrophotométrie à 260 nm, l'absorbance à 280 et 230 nm est aussi mesurée pour évaluer les contaminations, respectivement en protéines et en sucres. L'intégrité des différentes sous-unités des ARN ribosomiques est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (1,2 %, p/v) contenant de bromure d'ethidium (BET). Cette vérification par électrophorèse permet aussi de vérifier le dosage spectrophotométrique.

5.3.2. *Transcription inverse*

La transcription inverse (RT) a été réalisée à partir d'1 µg d'ARN totaux avec la reverse transcriptase : "IMPromII reverse transcriptase" (Promega) suivant les recommandations du fournisseur. Les ARN totaux sont mis en présence de l'amorce oligodT (20 mM) dans un volume total de 5 µL (complété avec de l'eau ultrapure traitée au DEPC). Le mélange est dénaturé pendant 5 min à 70 °C, puis placé rapidement dans la glace pour éviter la renaturation. Le volume réactionnel contient 7 µL d'eau traitée DEPC, 4 µL de tampon 5X ImPromII™, 2,4 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de dNTPs (10 mM chacun), 1 µL de RNasin (Promega; 1 U/µL), 1 µL de RT ImPromII™. Après avoir mélangé doucement, on ajoute ce mélange aux ARN dénaturés. Le volume réactionnel atteint alors 20 µL. Après avoir vortexé doucement, le mélange est incubé 5 min à 25 °C, puis 1 h à 42 °C. Enfin, l'enzyme est dénaturée à 70 °C pendant 15 min. Les ADNc sont prêts à être amplifiés.

Tableau 12. Sélection de 15 couples d'amorces pour vérification par RT-PCR et les amorces pour les gènes de contrôle

Nom de l'étiquette	Amorce 5'	Amorce 3'	taille amplifiée (pb)
C1M31_5	AGATTGTGAAGCTTGCCAGAG	CCTTCCCTTTGATCCTTTGC	72
C1M41_13	ACGACTACACACTCAAGGCTCGT	CATACGTCGTGACTTCCATGA	66
C2M12_1	AGACCGAAGTCCGTGCTG	ATCCTGGCTCAGATTGAACG	72
C2M21_2	ACCTAAGATGTGGCGCAAAG	GGAGAAAATGAAGCCAACCA	116
C4M14_1	AGTGCATCTTGACGAGGAGAA	TTTATCATGTCCGCTCCTAGC	107
C4M14_3	TGCTGAGCTGAGAAAGATGC	GCCACTGCCCAAGATAACAAT	89
C4M41_2	CATTGGCTCTGTTCTGTTCCG	CGACCTTCAATACAAGAGTGTGG	87
T1M11_2	TGGACTCAGCACAGCTTGG	AGGGACGAAGGACATGATTG	80
T1M13_4	ACAGCAGCACTGAGGAGGTT	CATGCAGGATGCAACATAACC	72
T2M11_2	CCTGTTGCTGATGCTGAGAG	CCCAGTCTCCTTCGATACCA	105
T2M12_3	TCGAGCATTGAGTTCCCAAC	TGCTCCAAAGAAGGCATAGC	133
T2M34_3	GTCTCCCTCGACCTGCAAA	CATACAAGATCACCGCCTGT	109
T3M44_1	GGAGCTGAATGGGATGCTTA	CCCAAGAAAGGCTGCTACTG	93
T4M32_2	GCAAAGCAGAAACCCTTCC	GACACGAAAGGGATGACACC	133
T4M34-3	GGATTTGTAGGCCACTTGGA	TCGCCCAATTCTGCTTA	77
C4C3	GAGCTGCATTCCGTTTCGTAG	GCGAATATCCCAATATGTGAAG	157
Nttaa2.3 (AF123504)	ATGCTTGTTGGTGATGTTCC	CACTTCAAACCTTCGCCTGTG	135
Nttaa4.3 (NP917226)	AAGACTCAGCCCCAGCAC	CAGATCAAAGTCCTCAGC	546
NtGH3 (AF123503)	GAACCTGTACGTGCCTGGAT	AGACCGCAGAGCATTGAGT	234

5.3.3. Amplification par PCR

Les amorces utilisées pour la RT-PCR semi-quantitative sont résumées dans le **tableau 12**. Les amorces utilisées pour l'étude de C4M41-2 sont présentées **figure 85**. Les réactions PCR sont réalisées dans le tampon 10 x pour PCR. Chaque réaction PCR est réalisée dans un volume final de 25 μ L et contient 10 picomol de chaque amorce (1 μ L d'amorce stocké à 1 μ M), 10 mM de dNTPs et 1 unité de Taq polymérase.

Les ADNc sont dilués au dixième et 2 μ L sont utilisés comme matrice pour l'amplification.

L'amplification est réalisée suivant le programme PCR suivant :

Dénaturation à 94 °C pendant 3 min

Dénaturation à 94 °C pendant 30 sec

Hybridation entre 55 et 61 °C selon les amorces pendant 45 sec

Elongation à 72 °C pendant 30 sec (voire davantage, à raison d'1 min/kb à amplifier)

Hybridation finale à 72 °C pendant 5 min.

} x 27 cycles

5.3.4. Electrophorèse des acides nucléiques en gel d'agarose

Les acides nucléiques sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose (1,5 d'agarose p/v, mais peut monter à 3 % dans le cas de très petits produits d'amplification (70 bp, par exemple), contenant du bromure d'éthidium (0,1 % v/v) dans du tampon TAE 1X. Les échantillons sont additionnés de 0,2 volume de tampon de charge 6x. Les fragments d'ADN sont visualisés sous lumière UV et photographiés (Geldoc 2000, Biorad).

5.3.5. Analyse semi-quantitative

La quantification de l'accumulation des transcrits est analysée grâce au logiciel Quantity One® (Biorad). La normalisation des données a été normalisée en deux temps. Tout d'abord pour chaque gène, les transcrits de chaque échantillon, ont été normalisés par rapport à l'échantillon le plus fortement exprimé. Notons que ce type de normalisation permet de mettre en évidence les variations d'expression entre les échantillons, mais ne permet pas de comparer les niveaux d'expression entre différents gènes. Enfin, ce rapport a été normalisé par rapport au gène constitutif C4C3.

SOLUTIONS :

Tampon 10 x pour PCR : 500 mM Tris-HCl pH 8,3, 5 mg/mL BSA, 5 % Ficoll (p/v), 10 % saccharose (p/v), 300 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 10 mM tartrazine, et de l'eau ultrapure jusqu'à 200 μ L.

Tampon TAE 1x : Tris-HCl 40 mM pH=8, EDTA 1 mM, acétate de sodium 5 mM

Tampon de charge 6x : Glycérol 30 % (v/v), bleu de bromophénol 0,25 % (p/v), xylène cyanol 0,25 % (p/v)

Figure 85. Représentation et séquences des amorces désignées sur l'étiquette



Nom de l'étiquette	séquence
C4M41-2North	CGACCCTCAAACAGCTCA
C4M41-2Ra	CTCCAGTTCAACACCCCTAAAAACGAGC
C4M41_2 5'	CAATTGGCTCTGTTCCGTTTCG
C4M41_2 3'	CGACCTTCAATACAAGAGTGTGG

5.4. Clonage d'un fragment d'ADN

5.4.1. Préparation de l'insert et ligation

Le fragment obtenu par PCR est purifié sur gel d'agarose 1,5 %, puis isolé sur billes de silice grâce au kit QuiaexII (Quiagen). Pour les clonages, le kit pGEMTeasy Vector System (Promega) a été utilisé (**Figure 84.B**). Le mélange réactionnel est réalisé selon les consignes du fournisseur et la ligation dure toute la nuit à 4 °C.

5.4.2. Préparation des bactéries électro-compétentes

Les bactéries *E.coli* XL1-blue sont étalées sur un milieu LB solide supplémenté en tétracycline 25 µg.mL⁻¹ et incubées pendant une nuit à 37 °C. Une colonie est alors prélevée et utilisée pour ensemercer 25 mL de milieu LB. La préculture est soumise à une agitation (150 rpm) pendant une nuit à 37 °C. Un litre de milieu LB est ensemercé avec 10 mL de préculture, et placé sous agitation à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une absorbance à 600 nm de 0,5. Toutes les étapes ultérieures sont réalisées à 4 °C afin d'éviter les chocs thermiques. Elles consistent en une suite de centrifugations-resuspensions du culot de bactéries (à la main, pas avec une pipette, pour éviter de casser les bactéries) dans une solution de glycérol de 10 % (v/v) avec des volumes décroissants : 250 mL, 125 mL, 10 mL et enfin 2 mL. Les bactéries concentrées sont finalement aliquotées et immédiatement congelées dans l'azote liquide. Les bactéries sont conservées à -80 °C.

5.4.3. Transformation des bactéries par électroporation

Afin d'éviter la formation d'arc électrique lors de l'électroporation, le mélange de ligation est purifiée par dialyse sur une membrane de nitrocellulose ("contains nitrocellulose", Millipore). Le disque de nitrocellulose est placé à la surface de l'eau ultrapure contenu dans une boîte de Pétri. Le mélange de ligation est déposé délicatement dessus. La dialyse dure entre 30 et 45 min. La ligation est récupérée et transférée dans un tube propre.

Les bactéries électrocompétentes (*E. coli* XL1-Blue) sont utilisées pour la transformation. L'électroporation est effectuée à 1800 V. Pour 40 µL de suspension bactérienne, 5 µL du mélange de ligation sont utilisés. La durée moyenne de l'électroporation est de 4 msec. 900 µL de milieu LB froid sont ensuite rajoutés. La solution est alors transférée dans un tube de culture et les bactéries sont laissées pendant une heure à 37 °C. Une centrifugation courte (1 min à 3500 rpm) permet d'obtenir un culot bactérien qui est ensuite étalé sur le milieu sélectif (LB agar 1,5 % (p/v), ampicilline à 100 µg/mL, X-Gal 8 µg/mL, IPTG 40 µg/mL) puis laissé pendant 1 nuit à 37 °C (durée d'incubation inférieure à 20 h).

Les clones résistants à l'ampicilline (résistance apportée par le plasmide *p-GEMTeasy*) se développent et l'identification des bactéries contenant le plasmide recombinant se fait grâce à l'α-complémentation par le système de sélection blanc-bleu.

Les clones blancs sont analysés par amplification directe sur colonie par PCR, en utilisant les amorces spécifique de l'insert et les amorces universelles T7 et SP6, complémentaires d'une partie du plasmide pGEMTeasy, et situées respectivement à gauche et à droite de l'insert. Un clone positif est sélectionné par l'extraction d'ADN plasmidique.

5.4.4. Préparation d'ADN plasmidique

Le clone possédant l'insert désiré est mis en culture sous agitation pendant une nuit à 37 °C dans 3 mL de LB liquide contenant de l'ampicilline à 100 µg/mL. Les plasmides sont extraits par lyse alcaline en utilisant le kit Qiaprep Miniprep (Quiagen) et les acides nucléiques sont dosés au spectrophotomètre à 260 nm. Le plasmide ainsi obtenu est envoyé à séquencer à une société de services de séquençage automatique GENOME express.

Solutions : Milieu LB : 10 g/L Tryptone, 5 g/L Yeast extract, 10 g/L NaCl

5.5. Analyses in silico

Afin de rechercher des homologues de séquences nucléotidiques, Les séquences issues du séquençage automatique ont été soumises à la base de données du EMBL, grâce aux logiciels développés à l'université de Washington, (WU-BLAST version 2.0) : WU-Blastn et WU-tBlastx, disponibles sur le site d'E.B.I. (European Bioinformatic Institute) <http://www.ebi.ac.uk/blast2/index.html>. La base de données d'ESTs (Expression Sequence Tag) du TIGR accessible par <http://tigrblast.tigr.org/tgi/> a également été consultée.

En parallèle la recherche de protéines homologues a été réalisée en comparant les séquences contre les bases de données protéiques Uniprot, swissprot et pdb, à l'aide du programme WU-BlastX (disponible sur le site d'EBI).

Nous avons également utilisé des programmes de recherche d'ORF ou d'EST putatifs grâce aux programmes FrameD et ESTscan disponibles en ligne sur internet (<http://genopole.toulouse.inra.fr/bioinfo/FrameD/FD>; <http://www.ch.embnet.org/software/ESTScan2.html>).

A partir des séquences protéiques, issues de la traduction in silico des séquences nucléotidiques réalisées sur le site d'Infobiogen : http://www.infobiogen.fr/services/analyseseq/cgi-bin/traduc_in.pl, des domaines protéiques peuvent être identifiés. Pour cela, nous avons utilisé les programmes : **InterProscan** (site EBI : <http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>), **Prodom** (disponible sur le site de l'INRA de toulous : <http://protein.toulouse.inra.fr/prodom/current/html/home.php>) et la collection de séquences de **Pfam** (Protein family) basée sur le model des motifs cachés de Markov (Bateman et al., 2004) disponible sur le site du SANGER Institute <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>.

Enfin nous avons également menées nos recherches d'homologies via le **KEGG** (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

5.6. Northern blot

5.6.1. Préparation de la sonde

Une sonde de 616 pb a été générée par amplification par PCR de la région 5' de l'étiquette C4M41-2 (cloné dans le vecteur pGEMT-easy), grâce aux amorces C4M41-North et C4M41-2-3'. Le produit d'amplification a ensuite été purifié sur une colonne S400 (MicroSpin Columns, Amersham). La qualité de la sonde a été vérifiée par migration dans un gel d'agarose (1,2 %), au cours de laquelle, elle a également été quantifiée par comparaison avec l'échelle de taille, MassRuler DNA ladder, Mix Ready to use (Fermentas), à raison de 15 ng/ μ L. Environ 100 ng de sonde sont dénaturés pendant 5 min à 100 °C, en présence d'eau DEPC (QSP=33 μ L). Le marquage a été réalisé par la technique d'amorçage aléatoire à l'aide du kit "Rediprime II Random Prime Labelling System" (Amersham). Selon les recommandations du fournisseur, la sonde est mélangée avec 5 μ L de labelling buffer 10x, 2 μ L de dATP, de dGTP, et de dTTP, 1 μ L de fragment Klenow et 5 μ L de dCTP marqué au 32 P. L'ensemble est mis à incuber au bain-marie à 37 °C pendant 1 h. La réaction est ensuite arrêtée par l'ajout de 2 μ L d'EDTA à 0,5 M. La sonde marquée est purifiée sur colonne S300 (MicroSpin Columns, Amersham). La radioactivité incorporée est évaluée sur une fraction d'1 μ L en présence de liquide de scintillation, à environ 5.10⁶ cpm, grâce au compteur à scintillation "Tri-Carb Liquid Scintillation Analyser 2000 CA" (Packard).

5.6.2. Préparation des échantillons d'ARNs

Les ARNs sont migrés dans un gel d'agarose dénaturant (1,5 % p/v). L'agarose est amené à ébullition dans 72 mL d'eau DEPC, puis laissé refroidir jusqu'à environ 50 °C et complété avec 10 mL de tampon FRB 10 X 18 mL de Formaldéhyde 12,3 M (soit 2,2 M final). Une fois polymérisé, le gel est déposé dans une cuve d'électrophorèse, et recouvert de tampon FRB 1X.

Avant d'être déposés sur gel, 15 μ g d'ARNs totaux sont dénaturés pendant 10 min à 70 °C en présence de : 2 μ L de tampon FRB 10X, 3,5 μ L de formaldéhyde, 10 μ L formamide et 2 μ L de tampon de charge dénaturant.

Pendant cette dénaturation, une pré-électrophorèse du gel d'agarose est réalisée à 40 v (pendant 5 à 10 min). Ensuite les échantillons sont placés directement dans la glace pendant 2 à 5 min, puis chargés dans le gel. L'électrophorèse est effectuée pendant 4 à 5 h à 40 v, en faisant circuler le tampon de migration doucement et régulièrement (une fois par heure).

5.6.3. Transfert des ARNs sur membrane de nylon

Suite à l'électrophorèse, le gel est d'abord lavé dans un bain d'eau DEPC pendant 15 min, pour éliminer l'excédant de tampon, puis deux fois dans un bain de SSC 10X pendant 15 min. Le transfert sur membrane de nylon N (neutre, Hybond -N, RPN303N, Amersham) est réalisé par capillarité pendant une nuit dans une solution de SSC 10X. Après le transfert, la membrane est séchée pendant 5 min sur un

papier whatman et les acides nucléiques sont fixés à la membrane pendant 2 h dans un sécheur sous vide à 80 °C.

5.6.4. Hybridation et Révélation

5.6.4.1. Préhybridation :

La préhybridation de la membrane est réalisée pendant 3 h dans un four à hybridation à 65 °C, avec une solution de sperme de saumon. La membrane est placée dans un biberon contenant 20 mL d'hybridation (préchauffé à 65 °C), auquel le sperme de saumon (100 µg/mL final) est ajouté (préalablement dénaturé au bain marie 100 °C pendant 5 min et mis en attente dans la glace) afin de saturer la membrane et éviter l'hybridation aspécifique de la sonde.

5.6.4.2. Hybridation :

Après avoir dénaturé la sonde radiomarquée pendant 5 min dans un bain-marie à 100 °C, elle est ajoutée dans le biberon, sans changer le tampon. L'hybridation s'effectue sur la nuit à 65 °C dans le four.

5.6.4.3. Lavage :

Le lendemain, la membrane est lavée une première fois avec du tampon d'hybridation préchauffé à 65 °C, puis trois fois avec le tampon de lavage¹ pendant 20 min et enfin un dernier lavage pendant 20 min avec le tampon d'hybridation².

5.6.4.4. Révélation :

La membrane séchée sur papier Whatman pendant 10 min, puis entourée d'un film de Saran, est exposée sur un écran sensible au ³²P (Imaging Screen K, Biorad) pendant 24 h. La révélation s'effectue grâce au phosphorimager (Biorad) et les résultats sont analysés grâce au logiciel Quantity One® (Biorad).

SOLUTIONS :

Tampon FRB 10X : MOPS 0,02 M (dissoudre le MOPS dans l'eau DEPC), acetate de sodium 8 mM (préalablement traité au DEPC), EDTA 1 mM (préalablement traité au DEPC). Stériliser soit par filtration (0,45 µm) ou autoclaver et stocker à température ambiante, avec du papier d'aluminium autour de la bouteille, pour éviter la dégradation par la lumière.

Tampon de charge dénaturant pour ARN : formamide déionisé 95 % (v/v), bleu de bromophénol 0,25 % (p/v), xylène cyanol FF 0,25 % (p/v), SDS 0,025 %, EDTA 5 mM (pH=8)

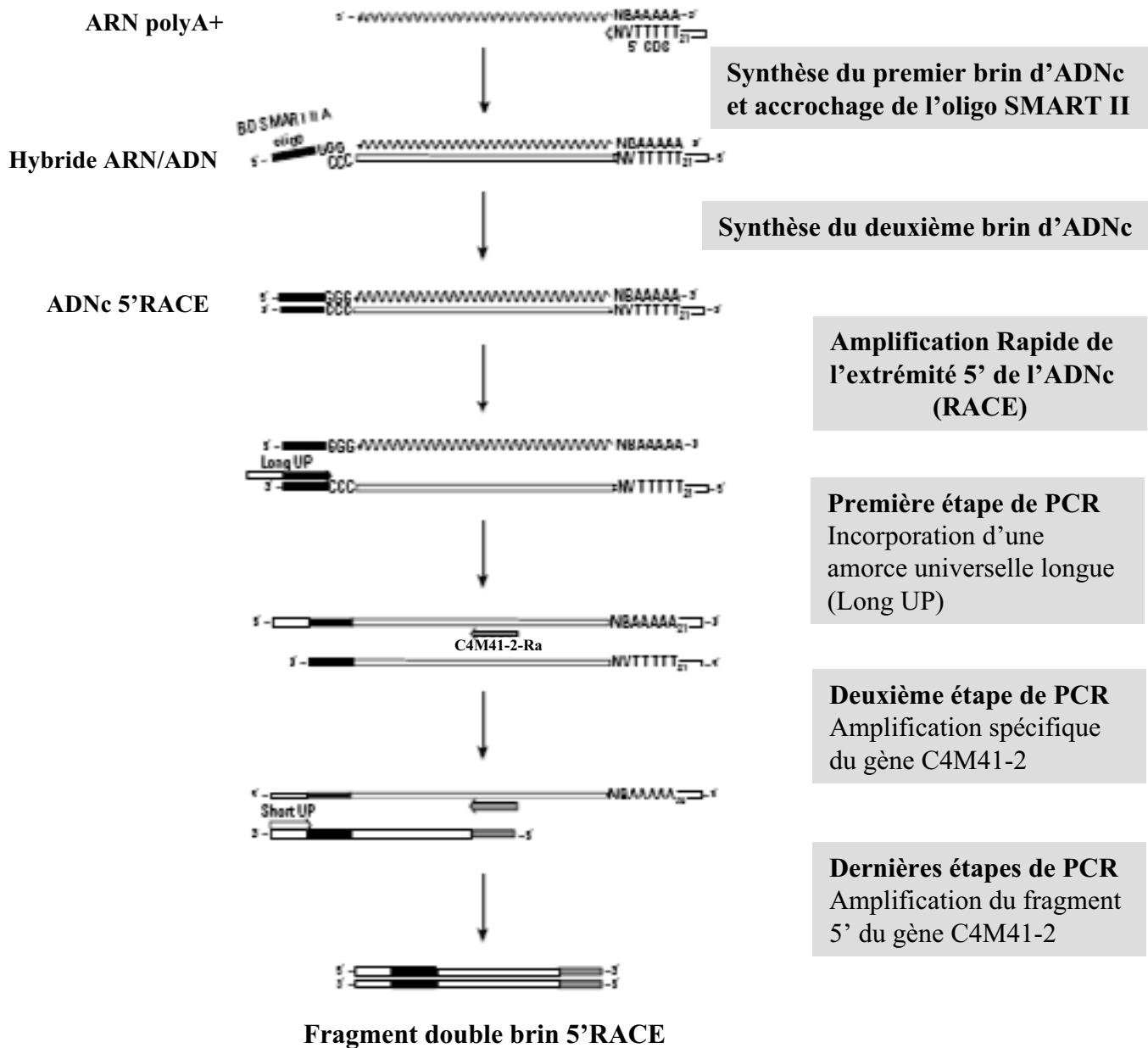


Figure 86. Détails des mécanismes de réactions de 5' RACE

Tampon SSC 20x (stock) : NaCl 3 M, 300 mM citrate de sodium. Ajuster pH à 7 avec HCl. Autoclaver, il n'est pas nécessaire de traité au DEPC.

Denhardt's reagent 50X : Ficoll 400 1 % (p/v), polyvinylpyrrolidone 1 % (p/v), sérum albumine bovine 1 % (p/v) (Sigma, Fraction V).

Tampon d'hybridation : SSC 5X, Denhardt's reagent 5X, SDS 0,5 %

5.7. RACE

Afin d'obtenir des informations sur l'extrémité 5' de l'ADNc de C4M41-2, une 5' RACE (Rapid Amplification cDNA Ends). Les ARNs ont été extraits par phénol chaud à partir de cellules BY-2 traitées pendant 6 h avec de l'AIA. Tout d'abord, 1 µg d'ARN est linéarisé par un traitement au MMH (Hydroxy méthyl mercurate) à 0,1 M, dilué au 1/8 final. La RACE a été réalisée avec le Kit "SMART™ RACE cDNA Amplification" (Clontech), suivant les recommandations du fournisseur et selon les mécanismes décrits dans la **Figure 86**. Les ADNc ont été synthétisés avec des oligodT, à partir d'ARN totaux extraits de cellules BY-2 traitées avec 10 µM d'AIA pendant 12 h. Lors de la transcription inverse, un adaptateur est ajouté à l'extrémité 5' des ADNc, apportant une matrice de séquence connue pour l'amplification de la séquence de l'ADNc adjacente. L'amplification de la région 5' spécifique a ensuite été réalisée à l'aide d'une amorce complémentaire de l'adaptateur (amorce nommée UPM) et de l'amorce C4M41-Ra, dont la séquence et son positionnement sont indiqués **Figure 67**.

Le fragment 5' obtenu a été cloné dans le vecteur pGEMTeasy et envoyé à séquencer par la société de services de séquençage automatique GENOME express.

BIBLIOGRAPHIE

- Abel S, Nguyen MD, Chow W, Theologis A** (1995) ASC4, a Primary Indoleacetic Acid-responsive Gene Encoding 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate Synthase in *Arabidopsis thaliana* 10.1074/jbc.270.32.19093. *J. Biol. Chem.* **270**: 19093-19099
- Abel S, Theologis A** (1996) Early Genes and Auxin Action. *Plant Physiol.* **111**: 9-17
- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh Y-S, Amasino R, Scheres B** (2004) The PLETHORA Genes Mediate Patterning of the *Arabidopsis* Root Stem Cell Niche. *Cell* **119**: 109-120
- Alliotte T, Tire C, Engler G, Peleman J, Caplan A, Van Montagu M, Inze D** (1989) An Auxin-Regulated Gene of *Arabidopsis thaliana* Encodes a DNA-Binding Protein *Plant Physiol.* **89**: 743-752
- Aslam M, Travis R, Huffaker R** (1993) Comparative induction of nitrate and nitrite uptake and reduction systems by ambient nitrate and nitrite in intact roots of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiol.* **102**: 811-819
- Bachem CWB, van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RGF** (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant Journal* **9**: 745-753
- Bal A, Verma D, Byrne H, Maclachlan G** (1976) Subcellular localization of cellulases in auxin-treated pea 10.1083/jcb.69.1.97. *J. Cell Biol.* **69**: 97-105
- Balbi V, Lomax TL** (2003) Regulation of early tomato fruit development by the diageotropica gene. *Plant Physiol* **131**: 186-197.
- Barlier I, Kowalczyk M, Marchant A, Ljung K, Bhalerao R, Bennett M, Sandberg G, Bellini C** (2000) The SUR2 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. *PNAS* **97**: 14819-14824
- Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer ELL, Studholme DJ, Yeats C, Eddy SR** (2004) The Pfam protein families database 10.1093/nar/gkh121. *Nucl. Acids Res.* **32**: D138-141
- Bauly JM, Sealy IM, Macdonald H, Brearley J, Droge S, Hillmer S, Robinson DG, Venis MA, Blatt MR, Lazarus CM, Napier RM** (2000) Overexpression of Auxin-Binding Protein Enhances the Sensitivity of Guard Cells to Auxin 10.1104/pp.124.3.1229. *Plant Physiol.* **124**: 1229-1238
- Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schulz B, KA. F** (1996) *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**: 948-950
- Bergounioux C, Perennes C, Brown SC, Gadal P** (1988) Cytometric analysis of growth-regulator-dependent transcription and cell-cycle progression in *Petunia* protoplast cultures. *Planta* **175**: 500-505
- Bhalerao RP, Eklof J, Ljung K, Marchant A, Bennett M, Sandberg G** (2002) Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* **29**: 325-332.
- Blakeslee JJ, Peer WA, Murphy AS** (2005) Auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology* Cell signalling and gene regulation **8**: 494-500
- Bleecker AB, Kende H** (2000) ETHYLENE: A Gaseous Signal Molecule in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**: 1-18

- Blilou I, Frugier F, Folmer S, Serralbo O, Willemsen V, Wolkenfelt H, Eloy NB, Ferreira PCG, Weisbeek P, Scheres B** (2002) The Arabidopsis HOBBIT gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation 10.1101/gad.237302. *Genes Dev.* **16**: 2566-2575
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B** (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *PNAS* **102**: 39-44
- Boerjan W, Cervera MT, Delarue M, Beeckman T, Dewitte W, Bellini C, Caboche M, Onckelen HV, Montagu MV, Inze D** (1995) superroot, a Recessive Mutation in Arabidopsis, Confers Auxin Overproduction 10.1105/tpc.7.9.1405. *Plant Cell* **7**: 1405-1419
- Bonifacino JS, Jackson CL** (2003) Endosome-specific localization and function of the ARF activator GNOM. *Cell* **112**: 141-142.
- Bostick M, Lochhead SR, Honda A, Palmer S, Callis J** (2004) Related to Ubiquitin 1 and 2 Are Redundant and Essential and Regulate Vegetative Growth, Auxin Signaling, and Ethylene Production in Arabidopsis 10.1105/tpc.104.024943. *Plant Cell* **16**: 2418-2432
- Breyne P, Dreesen R, Cannoot B, Rombaut D, Vandepoele K, Rombauts S, Vanderhaeghen R, Inzé D, Zabeau M** (2003) Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Molecular Genetics and Genomics* **269**: 173-179
- Breyne P, Dreesen R, Vandepoele K, De Veylder L, Van Breusegem F, Callewaert L, Rombauts S, Raes J, Cannoot B, Engler G, Inze D, Zabeau M** (2002) Transcriptome analysis during cell division in plants. *PNAS* **99**: 14825-14830
- Breyne P, Zabeau M** (2001) Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 136-142
- Brown J, Jones A** (1994) Mapping the auxin-binding site of auxin-binding protein 1. *J. Biol. Chem.* **269**: 21136-21140
- Brugiere N, Dubois F, Limami AM, Lelandais M, Roux Y, Sangwan RS, Hirel B** (1999) Glutamine Synthetase in the Phloem Plays a Major Role in Controlling Proline Production. *Plant Cell* **11**: 1995-2012
- Campanoni P, Nick P** (2005) Auxin-Dependent Cell Division and Cell Elongation. 1-Naphthaleneacetic Acid and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Activate Different Pathways. *Plant Physiol.* **137**: 939-948
- Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ** (2003) Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci* **8**: 165-171.
- Catala C, Rose JKC, Bennett AB** (2000) Auxin-Regulated Genes Encoding Cell Wall-Modifying Proteins Are Expressed during Early Tomato Fruit Growth 10.1104/pp.122.2.527. *Plant Physiol.* **122**: 527-534
- Cazale A-C, Rouet-Mayer M-A, Barbier-Brygoo H, Mathieu Y, Lauriere C** (1998) Oxidative Burst and Hypoosmotic Stress in Tobacco Cell Suspensions 10.1104/pp.116.2.659. *Plant Physiol.* **116**: 659-669
- Chaban C, Waller F, Furuya M, Nick P** (2003) Auxin Responsiveness of a Novel Cytochrome P450 in Rice Coleoptiles. *Plant Physiol.* **133**: 2000-2009

- Chen, Ullah, Young, Sussman, Jones** (2001) ABP1 is required for organized cell elongation and division in Arabidopsis embryogenesis. *Genes Dev* **15**: 902-911
- Chen J-G, Shimomura S, Sitbon F, Sandberg G, Jones AM** (2001) The role of auxin-binding protein 1 in the expansion of tobacco leaf cells. *The Plant Journal* **28**: 607-617
- Chen J-G, Wang S, Lazarus C, Napier R, Jones A** (2006) Altered Expression of Auxin-binding Protein 1 Affects Cell Expansion and Auxin Pool Size in Tobacco Cells. *Journal of Plant Growth Regulation* **25**: 69-78
- Chen J-G, Willard FS, Huang J, Liang J, Chasse SA, Jones AM, Siderovski DP** (2003) A Seven-Transmembrane RGS Protein That Modulates Plant Cell Proliferation 10.1126/science.1087790. *Science* **301**: 1728-1731
- Chen R, Hilson P, Sedbrook J, Rosen E, Caspar T, Masson PH** (1998) The Arabidopsis thaliana AGRVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *PNAS* **95**: 15112-15117
- Chen W, Chao G, Singh KB** (1996) The promoter of a H₂O₂-inducible, Arabidopsis glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *The Plant Journal* **10**: 955-966
- Cheng Y, Dai X, Zhao Y** (2004) AtCAND1, A HEAT-Repeat Protein That Participates in Auxin Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **135**: 1020-1026
- Christian M, Steffens B, Schenck D, Luthen H** (2003) The diageotropica mutation of tomato disrupts a signalling chain using extracellular auxin binding protein 1 as a receptor. *Planta* **218**: 309-314
- Coenen C, Bierfreund N, Luthen H, Neuhaus G** (2002) Developmental regulation of H⁺-ATPase-dependent auxin responses in the diageotropica mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Physiol Plant* **114**: 461-471.
- Cohen S. A., Michaud D. P.** (1993) Synthesis of a Fluorescent Derivatizing Reagent, 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate, and Its Application for the Analysis of Hydrolysate Amino Acids via High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry* **211**: 279-287
- Colon-Carmona A, Chen DL, Yeh K-C, Abel S** (2000) Aux/IAA Proteins Are Phosphorylated by Phytochrome in Vitro. *Plant Physiol.* **124**: 1728-1738
- Cooke TJ, Poli D, Szein AE, Cohen JD** (2002) Evolutionary patterns in auxin action. *Plant Mol Biol* **49**: 319-338.
- Cooney TP, Nonhebel HM** (1991) Biosynthesis of indole-3-acetic acid in tomato shoots: Measurement, mass-spectral identification and incorporation of ²H from ²H₂O into indole-3-acetic acid, d- and l-tryptophan, indole-3-pyruvate and tryptamine. *Planta* **184**: 368-376
- Cosgrove DJ** (1993) How Do Plant Cell Walls Extend? *Plant Physiol.* **102**: 1-6
- Cosgrove DJ** (2000) Loosening of plant cell walls by expansins. *Plant Physiol.* **124**: 321-326
- Criqui MC, Parmentier Y, Derevier A, Shen W-H, Dong A, Genschik P** (2000) Cell cycle-dependent proteolysis and ectopic overexpression of cyclin B1 in tobacco BY2 cells. *The Plant Journal* **24**: 763-773

- Criqui MC, Weingartner M, Capron A, Parmentier Y, Shen W-H, Heberle-Bors E, Bogre L, Genschik P** (2001) Sub-cellular localisation of GFP-tagged tobacco mitotic cyclins during the cell cycle and after spindle checkpoint activation. *The Plant Journal* **28**: 569-581
- Dahl R, Staehelin L** (1989) High-pressure freezing for the preservation of biological structure: theory and practice. *J Electron Microsc Tech* **13**: 165-174
- Dargeviciute A, Roux C, Decreux A, Sitbon F, Perrot-Rechenmann C** (1998) Molecular Cloning and Expression of The Early Auxin-Responsive Aux/IAA Gene Family in *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Physiol.* **39**: 993-1002
- daSilva LLP, Snapp EL, Denecke J, Lippincott-Schwartz J, Hawes C, Brandizzi F** (2004) Endoplasmic Reticulum Export Sites and Golgi Bodies Behave as Single Mobile Secretory Units in Plant Cells 10.1105/tpc.022673. *Plant Cell* **16**: 1753-1771
- David K, Carnero-Diaz E, Leblanc N, Monestiez M, Grosclaude J, Perrot-Rechenmann C** (2001) Conformational dynamics underlie the activity of the auxin-binding protein, Nt-abp1. *J Biol Chem* **276**: 34517-34523.
- del Pozo JC, Dharmasiri S, Hellmann H, Walker L, Gray WM, Estelle M** (2002) AXR1-ECR1-dependent conjugation of RUB1 to the Arabidopsis Cullin AtCUL1 is required for auxin response. *Plant Cell* **14**: 421-433.
- Dewitte W, Murray JAH** (2003) THE PLANT CELL CYCLE. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 235-264
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M** (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. **435**: 441-445
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Jones AM, Estelle M** (2003) Auxin Action in a Cell-Free System. *Current Biology* **13**: 1418-1422
- Dharmasiri N, Estelle M** (2004) Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends in Plant Science* **9**: 302-308
- Dharmasiri S, Estelle M** (2002) The role of regulated protein degradation in auxin response. *Plant Mol Biol* **49**: 401-409.
- Dracup M, Greenway H** (1988) Regulation of Turgor Pressure by Suspension-Cultured Tobacco Cells 10.1093/jxb/39.11.1591. *J. Exp. Bot.* **39**: 1591-1603
- Dubois Fdr, Brugière N, Sangwan RS, Hirel B** (1996) Localization of tobacco cytosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts shows organ- and cell-specific patterns of protein synthesis and gene expression. *Plant Molecular Biology* **31**: 803-817
- Everett N, Wang T, Gould A, Street H** (1981) Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells. *Protoplasma* **106**: 15-22
- Felix G, Regenass M, Boller T** (2000) Sensing of Osmotic Pressure Changes in Tomato Cells. *Plant Physiol.* **124**: 1169-1180
- Foucher F, Kondorosi E** (2000) Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology* **43**: 773-786
- Franco A, Gee M, Guilfoyle T** (1990) Induction and superinduction of auxin-responsive mRNAs with auxin and protein synthesis inhibitors. *J. Biol. Chem.* **265**: 15845-15849
- Frey M, Stettner C, Pare PW, Schmelz EA, Tumlinson JH, Gierl A** (2000) An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize 10.1073/pnas.260499897. *PNAS* **97**: 14801-14806

- Frias I, Caldeira MT, Perez-Castineira JR, Navarro-Avino JP, Culianez-Macia FA, Kuppinger O, Stransky H, Pages M, Hager A, Serrano R** (1996) A Major Isoform of the Maize Plasma Membrane H⁺-ATPase: Characterization and Induction by Auxin in Coleoptiles 10.1105/tpc.8.9.1533. *Plant Cell* **8**: 1533-1544
- Friml J** (2003) Auxin transport - shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 7-12.
- Friml J, Benkova E, Blilou I, Wisniewska J, Hamann T, Ljung K, Woody S, Sandberg G, Scheres B, Jurgens G, Palme K** (2002) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **108**: 661-673.
- Friml J, Yang X, Michniewicz M, Weijers D, Quint A, Tietz O, Benjamins R, Ouwerkerk PBF, Ljung K, Sandberg G, Hooykaas PJJ, Palme K, Offringa R** (2004) A PINOID-Dependent Binary Switch in Apical-Basal PIN Polar Targeting Directs Auxin Efflux 10.1126/science.1100618. *Science* **306**: 862-865
- Gabe M** (1968) Histologic contributions on the endocrine pancreas of *Ichthyophis glutinosus* (L.) (gymnophione batrachian). *Arch Anat Histol Embryol* **51**: 231-246
- Gee MA, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1991) Tissue-Specific and Organ-Specific Expression of Soybean Auxin-Responsive Transcripts GH3 and SAURs 10.1105/tpc.3.4.419. *Plant Cell* **3**: 419-430
- Geelen DNV, Inze DG** (2001) A Bright Future for the Bright Yellow-2 Cell Culture 10.1104/pp.010708. *Plant Physiol.* **127**: 1375-1379
- Geisler M, Blakeslee JJ, Bouchard R, Lee OR, Vincenzetti V, Bandyopadhyay A, Titapiwatanakun B, Peer WA, Bailly A, Richards EL, Ejendal KFK, Smith AP, Baroux C, Grossniklaus U, Muller A, Hrycyna CA, Dudler R, Murphy AS, Martinoia E** (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. *The Plant Journal* **44**: 179-194
- Geisler M, Murphy AS** (2006) The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Letters* **580**: 1094-1102
- Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A, Jurgens G** (2003) The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* **112**: 219-230.
- Goossens A, Hakkinen ST, Laakso I, Seppanen-Laakso T, Biondi S, De Sutter V, Lammertyn F, Nuutila AM, Soderlund H, Zabeau M, Inze D, Oksman-Caldentey K-M** (2003) A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *PNAS* **100**: 8595-8600
- Granger CL, Cyr RJ** (2000) Microtubule reorganization in tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-MBD. *Planta* **210**: 502-509
- Gray WM** (2004) Hormonal Regulation of Plant Growth and Development. *PLoS Biology* **2**: e311
- Gray WM, del Pozo JC, Walker L, Hobbie L, Risseeuw E, Banks T, Crosby WL, Yang M, Ma H, Estelle M** (1999) Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **13**: 1678-1691
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M** (2001) Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *414*: 271-276
- Grebe M** (2005) Growth by Auxin: When a Weed Needs Acid. *Science* **310**: 60-61

- Grossmann K** (2000) Mode of action of auxin herbicides: a new ending to a long, drawn out story. *Trends in Plant Science* **5**: 506-508
- Guilfoyle TJ, Hagen G** (2001) Auxin Response Factors. *In* *Journal of Plant Growth Regulation*, Vol 20, pp 281-291
- Guo F-Q, Wang R, Chen M, Crawford NM** (2001) The Arabidopsis Dual-Affinity Nitrate Transporter Gene AtNRT1.1 (CHL1) Is Activated and Functions in Nascent Organ Development during Vegetative and Reproductive Growth 10.1105/tpc.13.8.1761. *Plant Cell* **13**: 1761-1777
- Guo FQ, Wang R, Crawford NM** (2002) The Arabidopsis dual-affinity nitrate transporter gene AtNRT1.1 (CHL1) is regulated by auxin in both shoots and roots. *J Exp Bot* **53**: 835-844.
- Guo F-Q, Young J, Crawford NM** (2003) The Nitrate Transporter AtNRT1.1 (CHL1) Functions in Stomatal Opening and Contributes to Drought Susceptibility in Arabidopsis 10.1105/tpc.006312. *Plant Cell* **15**: 107-117
- Guo Y, Chen F, Zhang F, Mi G** (2005) Auxin transport from shoot to root is involved in the response of lateral root growth to localized supply of nitrate in maize. *Plant Science* **169**: 894-900
- Hagen G, Guilfoyle T** (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol* **49**: 373-385.
- Hagen G, Guilfoyle TJ** (1985) Rapid induction of selective transcription by auxins. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 1197-1203
- Hager A** (2003) Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *Journal of Plant Research* **116**: 483-505
- Hager A, Debus G, Edel HG, Stransky H, Serrano R** (1991) Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta* **185**: 527-537
- Hager A, Menzel H, Krauss A** (1971) Experiments and hypothesis concerning the primary action of auxin in elongation growth. *Planta* **100**: 47-75
- Han M-H, Goud S, Song L, Fedoroff N** (2004) The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation 10.1073/pnas.0307969100. *PNAS* **101**: 1093-1098
- Hasan HA** (2002) Gibberellin and auxin-indole production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. *Acta Microbiol Immunol Hung* **49**: 105-118
- Heisler MG, Ohno C, Das P, Sieber P, Reddy GV, Long JA, Meyerowitz EM** (2005) Patterns of Auxin Transport and Gene Expression during Primordium Development Revealed by Live Imaging of the Arabidopsis Inflorescence Meristem. *Current Biology* **15**: 1899-1911
- Henderson J, Baulry JM, Ashford DA, Oliver SC, Hawes CR, Lazarus CM, Venis MA, Napier RM** (1997) Retention of maize auxin-binding protein in the endoplasmic reticulum: quantifying escape and the role of auxin. *Planta* **202**: 313-323
- Heyser JW, Nabors MW** (1981) Osmotic Adjustment of Cultured Tobacco Cells (*Nicotiana tabacum* var. Samsun) Grown on Sodium Chloride *Plant Physiol.* **67**: 720-727
- Himanen K, Boucheron E, Vanneste S, de Almeida Engler J, Inze D, Beeckman T** (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* **14**: 2339-2351.

- Hitotsubashi R, Miyamoto K, Ueda J** (2002) [Expression of PIN and AUX1 genes encoding carrier proteins for auxin polar transport in higher plants under simulated microgravity conditions on a three-dimensional clinostat]. *Biol Sci Space* **16**: 183-184.
- Hsieh H-L, Okamoto H, Wang M, Ang L-H, Matsui M, Goodman H, Deng XW** (2000) FIN219, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of Arabidopsis development. *Genes Dev.* **14**: 1958-1970
- Hu Y, Xie Q, Chua N-H** (2003) The Arabidopsis Auxin-Inducible Gene ARGOS Controls Lateral Organ Size 10.1105/tpc.013557. *Plant Cell* **15**: 1951-1961
- Hutchison KW, Singer PB, McInnis S, Diaz-Sala C, Greenwood MS** (1999) Expansins Are Conserved in Conifers and Expressed in Hypocotyls in Response to Exogenous Auxin. *Plant Physiol.* **120**: 827-832
- Iino M, Long C, Wang X** (2001) Auxin- and Abscisic Acid-Dependent Osmoregulation in Protoplasts of *Phaseolus vulgaris* Pulvini. *Plant Cell Physiol.* **42**: 1219-1227
- Ikoma S, Okamoto H** (1988) The Quantitative and Chronological Relationship between IAA-Induced H⁺-Pump Activation and Elongation Growth Studied by means of Xylem Perfusion. *Plant Cell Physiol.* **29**: 261-267
- Inukai Y, Sakamoto T, Ueguchi-Tanaka M, Shibata Y, Gomi K, Umemura I, Hasegawa Y, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M** (2005) Crown rootless1, Which Is Essential for Crown Root Formation in Rice, Is a Target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in Auxin Signaling 10.1105/tpc.105.030981. *Plant Cell* **17**: 1387-1396
- Ishida S, Takahashi Y, Nagata T** (1993) Isolation of cDNA of an Auxin-Regulated Gene Encoding a G Protein {beta} Subunit-Like Protein from Tobacco BY-2 Cells. *PNAS* **90**: 11152-11156
- Ishida S, Takahashi Y, Nagata T** (1996) The Mode of Expression and Promoter Analysis of the *arca* Gene, an Auxin-Regulated Gene in Tobacco BY-2 Cells. *Plant Cell Physiol.* **37**: 439-448
- Jackson RG, Kowalczyk M, Li Y, Higgins G, Ross J, Sandberg G, Bowles DJ** (2002) Over-expression of an Arabidopsis gene encoding a glucosyltransferase of indole-3-acetic acid: phenotypic characterisation of transgenic lines. *The Plant Journal* **32**: 573-583
- Ji SJ, Lu YC, Feng JX, Wei G, Li J, Shi YH, Fu Q, Liu D, Luo JC, Zhu YX** (2003) Isolation and analyses of genes preferentially expressed during early cotton fiber development by subtractive PCR and cDNA array. *Nucleic Acids Res* **31**: 2534-2543.
- Jones AM, Hemayet U, Chen J-G** (2004) Dual pathways for auxin regulation of cell division and expansion. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer edition. **53. Tobacco BY-2 cells:** 181-191
- Jones AM, Im KH, Savka MA, Wu MJ, DeWitt NG, Shillito R, Binns AN** (1998) Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1. *Science* **282**: 1114-1117.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B** (2006) MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **57**
- Joo JH, Yoo HJ, Hwang I, Lee JS, Nam KH, Bae YS** (2005) Auxin-induced reactive oxygen species production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *FEBS Letters* **579**: 1243-1248

- Kandasamy MK, Gilliland LU, McKinney EC, Meagher RB** (2001) One Plant Actin Isovariant, ACT7, Is Induced by Auxin and Required for Normal Callus Formation 10.1105/tpc.13.7.1541. *Plant Cell* **13**: 1541-1554
- Kawakami T, Chiba T, Suzuki T, Kazuhiro I, Koji Y, Nagahiro M, Hiroshi S, Shimbara N, Hidaka Y, Osaka F, Omata M, Tanaka K** (2001) NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3 ligase. *EMBO J* **20**: 4003-4012
- Kepinski S, Leyser O** (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. **435**: 446-451
- Kim D-S, Jeon S-E, Park K-C** (2004) Oxidation of indole-3-acetic acid by horseradish peroxidase induces apoptosis in G361 human melanoma cells. *Cellular Signalling* **16**: 81-88
- Kim J, Harter K, Theologis A** (1997) Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins 10.1073/pnas.94.22.11786. *PNAS* **94**: 11786-11791
- Kim JH, Kim WT, Kang BG** (2001) IAA and N6-Benzyladenine Inhibit Ethylene-Regulated Expression of ACC Oxidase and ACC Synthase Genes in Mungbean Hypocotyls 10.1093/pcp/pce133. *Plant Cell Physiol.* **42**: 1056-1061
- Kim Y-S, Min J-K, Kim D, Jung J** (2001) A Soluble Auxin-binding Protein, ABP57. Purification with anti-bovine serum albumin antibody and characterisation of its mechanistic role in the auxin effect on plant plasma membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **276**: 10730-10736
- Koens KB, Nicoloso FT, Harteveld M, Libbenga KR, Kijne JW** (1995) Auxin starvation results in G2-arrest in suspension-cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology* **147**
- Koshiba T, Ballas N, Wong L-M, Theologis A** (1995) Transcriptional Regulation of PS-IAA4/5 and PS-IAA6 Early Gene Expression by Indoleacetic Acid and Protein Synthesis Inhibitors in Pea (*Pisum sativum*). *Journal of Molecular Biology* **253**: 396-413
- Kovtun Y, Chiu W-L, Tena G, Sheen J** (2000) From the Cover: Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants 10.1073/pnas.97.6.2940. *PNAS* **97**: 2940-2945
- Kovtun Y, Chiu W-L, Zeng W, Sheen J** (1998) Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature* **395**: 716-720
- Kramer EM** (2004) PIN and AUX/LAX proteins: their role in auxin accumulation. *Trends in Plant Science* **9**: 578-582
- Kurkdjian A, Guern J** (1981) Vacuolar pH Measurement in Higher Plant Cells I. EVALUATION OF THE METHYLAMINE METHOD. *Plant Physiol.* **67**: 953-957
- Kusaba M, Takahashi Y, Nagata T** (1996) A Multiple-Stimuli-Responsive as-1-Related Element of parA Gene Confers Responsiveness to Cadmium but Not to Copper. *Plant Physiol.* **111**: 1161-1167
- Lai WS, Kennington EA, Blackshear PJ** (2002) Interactions of CCCH Zinc Finger Proteins with mRNA. non-binding TRISTETRAPROLIN mutants exert an inhibitory effect on degradation of AU-rich element-containing mRNAs. 10.1074/jbc.M110395200. *J. Biol. Chem.* **277**: 9606-9613
- Laskowski MJ, Dreher KA, Gehring MA, Abel S, Gensler AL, Sussex IM** (2002) FQR1, a novel primary auxin-response gene, encodes a flavin mononucleotide-binding quinone reductase. *Plant Physiol* **128**: 578-590.

- Leblanc N, David K, Grosclaude J, Pradier J-M, Barbier-Brygoo H, Labiau S, Perrot-Rechenmann C** (1999) A Novel Immunological Approach Establishes That the Auxin-binding Protein, Nt-abp1, Is an Element Involved in Auxin Signaling at the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* **274**: 28314-28320
- Leblanc N, Perrot-Rechenmann C, Barbier-Brygoo H** (1999) The auxin-binding protein Nt-ERabp1 alone activates an auxin-like transduction pathway. *FEBS Lett* **449**: 57-60.
- Leblanc N, Roux C, Pradier J-M, Perrot-Rechenmann* C** (1997) Characterization of two cDNAs encoding auxin-binding proteins in *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology* **33**: 679-689
- LeClere S, Tellez R, Rampey RA, Matsuda SPT, Bartel B** (2002) Characterization of a Family of IAA-Amino Acid Conjugate Hydrolases from *Arabidopsis* 10.1074/jbc.M111955200. *J. Biol. Chem.* **277**: 20446-20452
- Leguay J, Guern J** (1977) Quantitative effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on growth of suspension-cultured *Acer pseudoplatanus* cells. *Plant Physiology* **60**: 265-270
- Leyser O** (2002) Molecular genetics of auxin signaling. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 377-398
- Li J, Yang H, Ann Peer W, Richter G, Blakeslee J, Bandyopadhyay A, Titapiwantakun B, Undurraga S, Khodakovskaya M, Richards EL, Krizek B, Murphy AS, Gilroy S, Gaxiola R** (2005) *Arabidopsis* H⁺-PPase AVP1 Regulates Auxin-Mediated Organ Development. *Science* **310**: 121-125
- Li Y, Liu ZB, Shi X, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1994) An Auxin-Inducible Element in Soybean SAUR Promoters. *Plant Physiol.* **106**: 37-43
- Link BM, Cosgrove DJ** (1998) Acid-growth response and alpha-expansins in suspension cultures of bright yellow 2 tobacco. *Plant Physiol* **118**: 907-916.
- Lintilhac PM, Vesecky TB** (1984) Stress-induced alignment of division plane in plant tissues grown in vitro. *Nature* **307**: 363-364
- Liscum E, Reed JW** (2002) Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Molecular Biology* **49**: 387-400
- Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G** (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal* **28**: 465-474
- Ljung K, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J, Sandberg G** (2005) Sites and Regulation of Auxin Biosynthesis in *Arabidopsis* Roots. *Plant Cell* **17**: 1090-1104
- Ljung K, Hull AK, Kowalczyk M, Marchant A, Celenza J, Cohen JD, Sandberg Gr** (2002) Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **49**: 249-272
- Lloyd C** (2006) PLANT SCIENCE: Enhanced: Microtubules Make Tracks for Cellulose 10.1126/science.1128903. *Science* **312**: 1482-1483
- Lloyd CW, Lowe SB, Peace GW** (1980) The mode of action of 2,4-D in counteracting the elongation of carrot cells grown in culture. *J Cell Sci* **45**: 257-268.
- Lobler M, Klambt D** (1985) Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.). II. Localization of a putative auxin receptor *J. Biol. Chem.* **260**: 9854-9859
- Logan DC** (2006) The mitochondrial compartment. *J. Exp. Bot.* **57**: 1225-1243

- Lopez N, Juana I, Acosta M, Sanchez-Bravo J** (2004) Role of basipetal auxin transport and lateral auxin movement in rooting and growth of etiolated lupin hypocotyls. *Physiologia Plantarum* **121**: 294-304
- Ludwig-Muller J, Cohen JD** (2002) Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *Physiol Plant* **115**: 320-329.
- Luschnig C** (2002) Auxin transport: ABC proteins join the club. *Trends Plant Sci* **7**: 329-332.
- Magyar Z, De Veylder L, Atanassova A, Bako L, Inze D, Bogre L** (2005) The Role of the Arabidopsis E2FB Transcription Factor in Regulating Auxin-Dependent Cell Division. *Plant Cell* **17**: 2527-2541
- Mallory AC, Bartel DP, Bartel B** (2005) MicroRNA-Directed Regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 Is Essential for Proper Development and Modulates Expression of Early Auxin Response Genes 10.1105/tpc.105.031716. *Plant Cell* **17**: 1360-1375
- Marchant A, Bhalerao R, Casimiro I, Eklof J, Casero PJ, Bennett M, Sandberg G** (2002) AUX1 Promotes Lateral Root Formation by Facilitating Indole-3-Acetic Acid Distribution between Sink and Source Tissues in the Arabidopsis Seedling. *Plant Cell* **14**: 589-597
- Marchant A, Kargul J, May ST, Muller P, Delbarre A, Perrot-Rechenmann C, MJ B** (1999) AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *Embo J* **18**: 2066-2073
- Maruyama S, Boyer JS** (1994) Auxin action on growth in intact plants: threshold turgor is regulated. *Planta* **193**: 44-50
- Matsubayashi Y, Morita A, Matsunaga E, Furuya A, Hanai N, Sakagami Y** (1999) Physiological relationships between auxin, cytokinin, and a peptide growth factor, phytosulfokine- α , in stimulation of asparagus cell proliferation. *Planta* **207**
- Matsumoto T, Sakai F, Hayashi T** (1997) A Xyloglucan-Specific Endo-1,4-[beta]-Glucanase Isolated from Auxin-Treated Pea Stems. *Plant Physiol.* **114**: 661-667
- McClure BA, Guilfoyle T** (1987) Characterization of a class of small auxin-inducible soybean polyadenylated RNAs. *Plant Molecular Biology* **9**: 611-623
- McClure BA, Hagen G, Brown CS, Gee MA, Guilfoyle TJ** (1989) Transcription, Organization, and Sequence of an Auxin-Regulated Gene Cluster in Soybean 10.1105/tpc.1.2.229. *Plant Cell* **1**: 229-239
- McCutcheon S, Hemsley RJ, Jopson MF, Lloyd CW** (2001) 'Caged cytoskeletons': a rapid method for the isolation of microtubule-associated proteins from synchronized plant suspension cells. *The Plant Journal* **28**: 117-122
- Miyazawa Y, Sakai A, Miyagishima S-y, Takano H, Kawano S, Kuroiwa T** (1999) Auxin and Cytokinin Have Opposite Effects on Amyloplast Development and the Expression of Starch Synthesis Genes in Cultured Bright Yellow-2 Tobacco Cells. *Plant Physiol.* **121**: 461-470
- Mizoguchi T, Gotoh Y, Nishida E, Yamaguchi-Shinozaki K, Hayashida N, Iwasaki T, Kamada H, Shinozaki K** (1994) Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in Arabidopsis thaliana and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *The Plant Journal* **5**: 111-122
- Mizuno A, Katou K** (1992) Effect of cations on IAA-induced proton excretion in the xylem of *Vigna unguiculata*. *Physiologia Plantarum* **85**: 411-416

- Mockaitis K, Howell SH** (2000) Auxin induces mitogenic activated protein kinase (MAPK) activation in roots of Arabidopsis seedlings. *The Plant Journal* **24**: 785-796
- Moing A, Maucourt M, Renaud C, Gaudillère M, Brouquisse R, Lebouteiller B, Gousset-Dupont A, Vidal J, Granot D, Denoyes-Rothan B, Lerceteau-Köhler E, Rolin D** (2004) Quantitative metabolic profiling by 1-dimensional ¹H-NMR analyses: application to plant genetics and functional genomics. *In Functional Plant Biology*, Vol 31, pp 889-902
- Morgan KE, Zarembinski TI, Theologis A, Abel S** (1999) Biochemical characterization of recombinant polypeptides corresponding to the predicted [beta][alpha][alpha] fold in Aux/IAA proteins. *FEBS Letters* **454**: 283-287
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues culture. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497
- Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S** (1992) Tobacco BY-2 cell line as the "Hela" cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **132**: 1-30
- Nagata T, Sakamoto K, Shimizu T** (2004) Tobacco BY-2 cells: the present and beyond. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **40**
- Nakahori K, Katou K, Okamoto H** (1991) Auxin Changes Both the Extensibility and the Yield Threshold of the Cell Wall of Vigna Hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* **32**: 121-129
- Napier R** (2004) Plant Hormone Binding Sites. *Ann Bot* **93**: 227-233
- Napier RM, David KM, Perrot-Rechenmann C** (2002) A short history of auxin-binding proteins. *Plant Mol Biol* **49**: 339-348.
- Niggeweg R, Thurow C, Kegler C, Gatz C** (2000) Tobacco Transcription Factor TGA2.2 Is the Main Component of as-1-binding Factor ASF-1 and Is Involved in Salicylic Acid- and Auxin-inducible Expression of as-1-containing Target Promoters 10.1074/jbc.M909267199. *J. Biol. Chem.* **275**: 19897-19905
- Nishi A, Kato K, Takahashi M, Yoshida R** (1977) Partial Synchronisation of carrot cell culture by auxin deprivation. *Physiol Plant* **39**: 9-12
- Noh B, Murphy AS, Spalding EP** (2001) Multidrug resistance-like genes of Arabidopsis required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell* **13**: 2441-2454
- Oeller PW, Theologis A** (1995) Induction kinetics of the nuclear proteins encoded by the early indoleacetic acid-inducible genes, PS-IAA4/5 and PS-IAA6, in pea (*Pisum sativum* L.). *The Plant Journal* **7**: 37-48
- Oh K, Ivanchenko M, White T, Lomax T** (2006) The *diageotropica* gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. *Planta*: 1-12
- Okada K, Ueda J, Komaki MK, Bell CJ, Shimura Y** (1991) Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of Arabidopsis Floral Bud Formation 10.1105/tpc.3.7.677. *Plant Cell* **3**: 677-684
- Okamoto H, Miwa C, Masuda T, Nakahori K, Katou K** (1990) Effects of Auxin and Anoxia on the Cell Wall Yield Threshold Determined by Negative Pressure Jumps in Segments of Cowpea Hypocotyl. *Plant Cell Physiol.* **31**: 783-788

- Okamoto-Nakazato A, Takahashi K, Katoh-Semba R, Katou K** (2001) Distribution of Yieldin, a Regulatory Protein of the Cell Wall Yield Threshold, in Etiolated Cowpea Seedlings. *Plant Cell Physiol.* **42**: 952-958
- Okamoto-Nakazato A, Takahashi K, Kido N, Owaribe K, Katou K** (2000) Molecular cloning of yieldins regulating the yield threshold of cowpea cell walls: cDNA cloning and characterization of recombinant yieldin. *Plant, Cell and Environment* **23**: 155-164
- Okushima Y, Overvoorde PJ, Arima K, Alonso JM, Chan A, Chang C, Ecker JR, Hughes B, Lui A, Nguyen D, Onodera C, Quach H, Smith A, Yu G, Theologis A** (2005) Functional Genomic Analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR Gene Family Members in *Arabidopsis thaliana*: Unique and Overlapping Functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell* **17**: 444-463
- Oliver SC, Venis MA, Freedman RB, Napier RM** (1995) Regulation of synthesis and turnover of maize auxin-binding protein and observations on its passage to the plasma membrane: comparisons to maize immunoglobulin-binding protein cognate. *Planta* **197**: 465-474
- Ostin A, Kowalczyk M, Bhalerao RP, Sandberg G** (1998) Metabolism of Indole-3-Acetic Acid in *Arabidopsis* 10.1104/pp.118.1.285. *Plant Physiol.* **118**: 285-296
- Ottenschlager I, Wolff P, Wolverton C, Bhalerao RP, Sandberg G, Ishikawa H, Evans M, Palme K** (2003) Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 2987-2991.
- Overvoorde PJ, Okushima Y, Alonso JM, Chan A, Chang C, Ecker JR, Hughes B, Liu A, Onodera C, Quach H, Smith A, Yu G, Theologis A** (2005) Functional Genomic Analysis of the auxin/indole-3-acetic acid Gene Family Members in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **17**: 3282-3300
- Pabo CO, Sauer RT** (1992) Transcription Factors: Structural Families and Principles of DNA Recognition. *Annual Review of Biochemistry* **61**: 1053-1095
- Paciorek T, Friml J** (2006) Auxin signaling. *J Cell Sci* **119**: 1199-1202
- Paponov IA, Teale WD, Trebar M, Blilou I, Palme K** (2005) The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends in Plant Science* **10**: 170-177
- Pasternak T, Potters G, Caubergs R, Jansen MAK** (2005) Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level 10.1093/jxb/eri196. *J. Exp. Bot.* **56**: 1991-2001
- Peltier J-B, Rossignol M** (1996) Auxin-Induced Differential Sensitivity of the H⁺-ATPase in Plasma Membrane Subfractions from Tobacco Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **219**: 492-496
- Pennarum A-M, Maillot C** (1988) Cl⁻ flux responding to a turgor drop in cells of *acer pseudoplatanus*. *Plant Physiol. Biochem.* **26**: 117-124
- Petrasek J, Cerna A, Schwarzerova K, Elckner M, Morris DA, Zazimalova E** (2003) Do phytohormones inhibit auxin efflux by impairing vesicle traffic? *Plant Physiol* **131**: 254-263.
- Petrasek J, Elckner M, Morris DA, Zazimalova E** (2002) Auxin efflux carrier activity and auxin accumulation regulate cell division and polarity in tobacco cells. *Planta* **216**: 302-308.

- Philippar K, Fuchs I, Luthen H, Hoth S, Bauer CS, Haga K, Thiel G, Ljung K, Sandberg G, Bottger M, Becker D, Hedrich R** (1999) Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *PNAS* **96**: 12186-12191
- Polit JT, Maszewski J, Kazmierczak A** (2003) Effect of BAP and IAA on the expression of G1 and G2 control points and G1-S and G2-M transitions in root meristem cells of *Vicia faba*. *Cell Biology International* **27**
- Pollmann S, Muller A, Piotrowski M, Weiler E** (2002) Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**: 155-161
- Porceddu A, Stals H, Reichheld J-P, Segers G, De Veylder L, de Pinho Barroco R, Casteels P, Van Montagu M, Inze D, Mironov V** (2001) A Plant-specific Cyclin-dependent Kinase Is Involved in the Control of G2/M Progression in Plants 10.1074/jbc.M011060200. *J. Biol. Chem.* **276**: 36354-36360
- Pufky J, Qiu Y, Rao M, Hurban P, Jones A** (2003) The auxin-induced transcriptome for etiolated *Arabidopsis* seedlings using a structure/function approach. *Functional & Integrative Genomics* **3**: 135-143
- Ramos JA, Zenser N, Leyser O, Callis J** (2001) Rapid Degradation of Auxin/Indoleacetic Acid Proteins Requires Conserved Amino Acids of Domain II and Is Proteasome Dependent. *Plant Cell* **13**: 2349-2360
- Raven J** (1975) Transport of indoleacetic acid in plant cells in relation to pH and electric potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New phytol.* **74**: 163-172
- Read MA, Brownell JE, Gladysheva TB, Hottelet M, Parent LA, Coggins MB, Pierce JW, Podust VN, Luo R-S, Chau V, Palombella VJ** (2000) Nedd8 Modification of Cul-1 Activates SCFbeta TrCP-Dependent Ubiquitination of I kappa Balpha. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 2326-2333
- Redig P, Shaul O, Inze D, Van Montagu M, Van Onckelen H** (1996) Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. *FEBS Letters* **391**: 175-180
- Reed JW** (2001) Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* **6**: 420-425
- Reinhardt D** (2005) Phyllotaxis -- a new chapter in an old tale about beauty and magic numbers. *Current Opinion in Plant Biology Cell signalling and gene regulation* **8**: 487-493
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP** (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* **16**: 1616-1626
- Ren S, Johnston JS, Shippen DE, McKnight TD** (2004) TELOMERASE ACTIVATOR1 Induces Telomerase Activity and Potentiates Responses to Auxin in *Arabidopsis* 10.1105/tpc.104.025072. *Plant Cell* **16**: 2910-2922
- Renaudin J-P** (2004) Growth and physiology of suspension-cultured plant cells : the contribution of tobacco BY-2 cells to the study of auxin action. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer edition. **53. Tobacco BY-2 cells**: 160-177
- Richard, Lescot, Inze D, De Veylder L** (2002) Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ culture* **69**: 167-176

- Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JMS, Murray JAH** (2000) Sugar Control of the Plant Cell Cycle: Differential Regulation of Arabidopsis D-Type Cyclin Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 4513-4521
- Rober-Kleber N, Albrechtova JT, Fleig S, Huck N, Michalke W, Wagner E, Speth V, Neuhaus G, Fischer-Iglesias C** (2003) Plasma Membrane H(+)-ATPase Is Involved in Auxin-Mediated Cell Elongation during Wheat Embryo Development. *Plant Physiol* **131**: 1302-1312.
- Roef L, Van Onckelen H** (2004) Hormonal control of the plant cell cycle. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer edition. **53. Tobacco BY-2 cells**: 132-148
- Rogg LE, Lasswell J, Bartel B** (2001) A Gain-of-Function Mutation in IAA28 Suppresses Lateral Root Development 10.1105/tpc.13.3.465. *Plant Cell* **13**: 465-480
- Rombauts S, Van de Peer Y, Rouze P** (2003) AFLP in Silico, simulating AFLP fingerprints 10.1093/bioinformatics/btg090. *Bioinformatics* **19**: 776-777
- Roudier F, Fedorova E, Lebris M, Lecomte P, Gyorgyey J, Vaubert D, Horvath G, Abad P, Kondorosi A, Kondorosi E** (2003) The Medicago Species A2-Type Cyclin Is Auxin Regulated and Involved in Meristem Formation But Dispensable for Endoreduplication-Associated Developmental Programs. *Plant Physiol.* **131**: 1091-1103
- Rubery P, Sheldrake A** (1974) Carrier-mediated auxin transport. *planta* **188**: 101-121
- Ruegger M, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J, Estelle M** (1998) The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p 10.1101/gad.12.2.198. *Genes Dev.* **12**: 198-207
- Ruegger M, Dewey E, Hobbie L, Brown D, Bernasconi P, Turner J, Muday G, Estelle M** (1997) Reduced Naphthylphthalamic Acid Binding in the tir3 Mutant of Arabidopsis Is Associated with a Reduction in Polar Auxin Transport and Diverse Morphological Defects 10.1105/tpc.9.5.745. *Plant Cell* **9**: 745-757
- Sanchez MA, Mateos I, Labrador E, Dopico B** (2004) Brassinolides and IAA induce the transcription of four [alpha]-expansin genes related to development in *Cicer arietinum*. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 709-716
- Sano T, Shimizu T, Sakamoto K, Nagata T** (2004) Block points in the cell cycle progression of plant cells : deduced lessons from BY-2 cells. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer edition. **53. Tobacco BY-2 cells**: 149-159
- Santoni V, Vansuyt G, Rossignol M** (1993) Indoleacetic acid pretreatment of tobacco plants in vivo increases the in vitro sensitivity to auxin of the plasma membrane H+-ATPase from leaves and modifies the polypeptide composition of the membrane. *FEBS Letters* **326**: 17-20
- Sawa S, Ohgishi M, Goda H, Higuchi K, Shimada Y, Yoshida S, Koshiba T** (2002) The HAT2 gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in Arabidopsis. *Plant J* **32**: 1011-1022.
- Scherer GF** (2002) Secondary messengers and phospholipase A2 in auxin signal transduction. *Plant Mol Biol* **49**: 357-372.

- Schnittger A, Weini C, Bouyer D, Schobinger U, Hulskamp M** (2003) Misexpression of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor ICK1/KRP1 in Single-Celled Arabidopsis Trichomes Reduces Endoreduplication and Cell Size and Induces Cell Death
10.1105/tpc.008342. *Plant Cell* **15**: 303-315
- Schwechheimer C, Serino G, Callis J, Crosby WL, Lyapina S, Deshaies RJ, Gray WM, Estelle M, Deng X-W** (2001) Interactions of the COP9 Signalosome with the E3 Ubiquitin Ligase SCFTIR1 in Mediating Auxin Response
10.1126/science.1059776. *Science* **292**: 1379-1382
- Seo M, Akaba S, Oritani T, Delarue M, Bellini C, Caboche M, Koshiba T** (1998) Higher Activity of an Aldehyde Oxidase in the Auxin-Overproducing superroot1 Mutant of Arabidopsis thaliana
10.1104/pp.116.2.687. *Plant Physiol.* **116**: 687-693
- Sheahan MB, McCurdy DW, Rose RJ** (2005) Mitochondria as a connected population: ensuring continuity of the mitochondrial genome during plant cell dedifferentiation through massive mitochondrial fusion. *The Plant Journal* **44**: 744-755
- Sieberer T, Seifert GJ, Hauser M-T, Grisafi P, Fink GR, Luschnig C** (2000) Post-transcriptional control of the Arabidopsis auxin efflux carrier EIR1 requires AXR1. *Current Biology* **10**: 1595-1598
- Smith PMC, Atkins CA** (2002) Purine Biosynthesis. Big in Cell Division, Even Bigger in Nitrogen Assimilation
10.1104/pp.010912. *Plant Physiol.* **128**: 793-802
- Smith RS, Guyomarc'h S, Mandel T, Reinhardt D, Kuhlemeier C, Prusinkiewicz P** (2006) A plausible model of phyllotaxis
10.1073/pnas.0510457103. *PNAS* **103**: 1301-1306
- Son O, Cho H-Y, Kim M-R, Lee H, Lee M-S, Song E, Park JH, Nam KH, Chun J-Y, Kim H-J** (2004) Induction of a homeodomain-leucine zipper gene by auxin is inhibited by cytokinin in Arabidopsis roots. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **326**: 203-209
- Staelin LA, Giddings TH, Kiss JZ, Sack FD** (1990) Macromolecular differentiation of Golgi stacks in root tips of *Arabidopsis* and *Nicotiana* seedlings as visualized in high pressure frozen and freeze-substituted samples. *Protoplasma* **157**: 75-91
- Stals H, Inze D** (2001) When plant cells decide to divide. *Trends in Plant Science* **6**: 359-364
- Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W** (2005) Characterization of an Arabidopsis Enzyme Family That Conjugates Amino Acids to Indole-3-Acetic Acid
10.1105/tpc.104.026690. *Plant Cell* **17**: 616-627
- Staswick PE, Tiryaki I, Rowe ML** (2002) Jasmonate Response Locus JAR1 and Several Related Arabidopsis Genes Encode Enzymes of the Firefly Luciferase Superfamily That Show Activity on Jasmonic, Salicylic, and Indole-3-Acetic Acids in an Assay for Adenylation
10.1105/tpc.000885. *Plant Cell* **14**: 1405-1415
- Steffens B, Feckler C, Palme K, Christian M, Bottger M, Luthen H** (2001) The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. *The Plant Journal* **27**: 591-599

- Stevenson TT, Cleland RE** (1981) Osmoregulation in the Avena Coleoptile in Relation to Auxin and Growth Plant Physiol. **67**: 749-753
- Stieger PA, Reinhardt D, Kuhlemeier C** (2002) The auxin influx carrier is essential for correct leaf positioning. Plant J **32**: 509-517.
- Stiles K, McClintick A, Volkenburgh E** (2003) A developmental gradient in the mechanism of K⁺ uptake during light-stimulated leaf growth in *Nicotiana tabacum* L. Planta **217**: 587-596
- Stitt M, ap Rees T** (1978) Pathways carbohydrate oxidation in leaves of pismus sativum and triticum aestivum. Phytochemistry **17**: 1251-1256
- Swarup R, Friml J, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, Palme K, Bennett M** (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. Genes Dev. **15**: 2648-2653
- Swarup R, Kargul J, Marchant A, Zadik D, Rahman A, Mills R, Yemm A, May S, Williams L, Millner P, Tsurumi S, Moore I, Napier R, Kerr ID, Bennett MJ** (2004) Structure-Function Analysis of the Presumptive Arabidopsis Auxin Permease AUX1
10.1105/tpc.104.024737. Plant Cell **16**: 3069-3083
- Takahashi Y, Hasezawa S, Kusaba M, Nagata T** (1995) Expression of the auxin-regulated *parA* gene in transgenic tobacco and nuclear localization of its gene products. Planta **196**: 111-117
- Takahashi Y, Kuroda H, Tanaka T, Machida Y, Takebe I, Nagata T** (1989) Isolation of an Auxin-Regulated Gene cDNA Expressed during the Transition from G0 to S Phase in Tobacco Mesophyll Protoplasts. PNAS **86**: 9279-9283
- Takahashi Y, Nagata T** (1992) Differential Expression of an Auxin-Regulated Gene, *parC*, and a Novel Related Gene, *C-7*, from Tobacco Mesophyll Protoplasts in Response to External Stimuli and in Plant Tissues. Plant Cell Physiol. **33**: 779-787
- Takahashi Y, Nagata T** (1992) *parB*: An Auxin-Regulated Gene Encoding Glutathione S-Transferase. PNAS **89**: 56-59
- Takahashi Y, Sakai T, Ishida S, Nagata T** (1995) Identification of Auxin-Responsive Elements of *parB* and Their Expression in Apices of Shoot and Root. PNAS **92**: 6359-6363
- Takase T, Nakazawa M, Ishikawa A, Manabe K, Matsui M** (2003) DFL2, a New Member of the Arabidopsis GH3 Gene Family, is Involved in Red Light-Specific Hypocotyl Elongation
10.1093/pcp/pcg130. Plant Cell Physiol. **44**: 1071-1080
- Tam YY, Epstein E, Normanly J** (2000) Characterization of Auxin Conjugates in Arabidopsis. Low Steady-State Levels of Indole-3-Acetyl-Aspartate, Indole-3-Acetyl-Glutamate, and Indole-3-Acetyl-Glucose
10.1104/pp.123.2.589. Plant Physiol. **123**: 589-596
- Tamura K, Liu H, Takahashi H** (1999) Auxin Induction of Cell Cycle Regulated Activity of Tobacco Telomerase. J. Biol. Chem. **274**: 20997-21002
- Tanaka S, Nakamura S, Mochizuki N, Nagatani A** (2002) Phytochrome in cotyledons regulates the expression of genes in the hypocotyl through auxin-dependent and -independent pathways. Plant Cell Physiol **43**: 1171-1181.
- Tanaka S-i, Mochizuki N, Nagatani A** (2002) Expression of the AtGH3a Gene, an Arabidopsis Homologue of the Soybean GH3 Gene, is Regulated by Phytochrome B

- 10.1093/pcp/pcf033. *Plant Cell Physiol.* **43**: 281-289
- Tao LZ, Cheung AY, Wu HM** (2002) Plant Rac-like GTPases are activated by auxin and mediate auxin-responsive gene expression. *Plant Cell* **14**: 2745-2760.
- Tena G, Renaudin J-P** (1998) Cytosolic acidification but not auxin at physiological concentration is an activator of MAP kinases in tobacco cells. *The Plant Journal* **16**: 173-182
- Thomas Cm, Meyer D, Wolff M, Himber C, Alioua M, Steinmetz A** (2003) Molecular characterization and spatial expression of the sunflower *ABP1* gene. *Plant Molecular Biology* **52**: 1025-1036
- Tian H, Klämbt D, Jones AM** (1995) Auxin-binding Protein 1 Does Not Bind Auxin within the Endoplasmic Reticulum Despite This Being the Predominant Subcellular Location for This Hormone Receptor 10.1074/jbc.270.45.26962. *J. Biol. Chem.* **270**: 26962-26969
- Tian Q, Uhlir NJ, Reed JW** (2002) Arabidopsis SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* **14**: 301-319.
- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle T** (2003) The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* **15**: 533-543.
- Tode K, Luthen H** (2001) Fusicoccin- and IAA-induced elongation growth share the same pattern of K⁺ dependence. *J. Exp. Bot.* **52**: 251-255
- Touraine B, Daniel-Vedele F, Forde B** (2001) Nitrate uptake and its regulation. *Plant nitrogen*. Lea PJ, Morot-Gaudry J-F, eds. Berlin, Heidelberg: INRA-Editions and Springer-Verlag: 1-36
- Tse YC, Mo B, Hillmer S, Zhao M, Lo SW, Robinson DG, Jiang L** (2004) Identification of Multivesicular Bodies as Prevacuolar Compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 Cells. *Plant Cell* **16**: 672-693
- Tsuchisaka A, Theologis A** (2004) Unique and Overlapping Expression Patterns among the Arabidopsis 1-Amino-Cyclopropane-1-Carboxylate Synthase Gene Family Members 10.1104/pp.104.049999. *Plant Physiol.* **136**: 2982-3000
- Uemukai K, Iwakawa H, Kosugi S, de Uemukai S, Kato K, Kondorosi E, Murray JA, Ito M, Shinmyo A, Sekine M** (2005) Transcriptional activation of tobacco E2F is repressed by co-transfection with the retinoblastoma-related protein: cyclin D expression overcomes this repressor activity. *Plant Molecular Biology* **57**: 83-100
- Ullah H, Chen J-G, Temple B, Boyes DC, Alonso JM, Davis KR, Ecker JR, Jones AM** (2003) The {beta}-Subunit of the Arabidopsis G Protein Negatively Regulates Auxin-Induced Cell Division and Affects Multiple Developmental Processes. *Plant Cell* **15**: 393-409
- Ullah H, Chen J-G, Young JC, Im K-H, Sussman MR, Jones AM** (2001) Modulation of Cell Proliferation by Heterotrimeric G Protein in Arabidopsis. *Science* **292**: 2066-2069
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T** (1994) The ocs element in the soybean GH2/4 promoter is activated by both active and inactive auxin and salicylic acid analogues. *Plant Molecular Biology* **26**: 1055-1064
- Ulmasov T, Liu ZB, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1995) Composite Structure of Auxin Response Elements. *Plant Cell* **7**: 1611-1623
- van der Zaal BJ, Droog F, Pieterse FJ, Hooykaas P** (1996) Auxin-Sensitive Elements from Promoters of Tobacco GST Genes and a Consensus as-1-Like Element Differ Only in Relative Strength. *Plant Physiol.* **110**: 79-88

- van der Zaal EJ, Memelink J, Mennes AM, Quint A, Libbenga KR** (1987) Auxin-induced mRNA species in tobacco cell cultures. *Plant Molecular Biology* **10**: 145-157
- Vanneste S, Maes L, Smet Id, Himanen K, Naudts M, Inze D, Beeckman T** (2005) Auxin regulation of cell cycle and its role during lateral root initiation. *Physiologia Plantarum* **123**
- Verslues PE, Bray EA** (2006) Role of abscisic acid (ABA) and Arabidopsis thaliana ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation 10.1093/jxb/erj026. *J. Exp. Bot.* **57**: 201-212
- Vesper MJ, Kuss CL** (1990) Physiological evidence that the primary site of auxin action in maize coleoptiles is an intracellular site. *Planta*: 486-491
- Veylder LD, Joubes J, Inze D** (2003) Plant cell cycle transitions. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 536-543
- Voesenek LA, Benschop JJ, Bou J, Cox MC, Groeneveld HW, Millenaar FF, Vreeburg RA, Peeters AJ** (2003) Interactions between plant hormones regulate submergence-induced shoot elongation in the flooding-tolerant dicot *Rumex palustris*. *Ann Bot (Lond)* **91 Spec No**: 205-211.
- Vranova E, Inze D, Van Breusegem F** (2002) Signal transduction during oxidative stress 10.1093/jexbot/53.372.1227. *J. Exp. Bot.* **53**: 1227-1236
- Vreeburg RAM, Benschop JJ, Peeters AJM, Colmer TD, Ammerlaan AHM, Staal M, Elzenga TM, Staals RHJ, Darley CP, McQueen-Mason SJ, Voesenek LACJ** (2005) Ethylene regulates fast apoplastic acidification and expansin A transcription during submergence-induced petiole elongation in *Rumex palustris*. *Plant Journal* **43**
- Waller F, Furuya M, Nick P** (2002) OsARF1, an auxin response factor from rice, is auxin-regulated and classifies as a primary auxin responsive gene. *Plant Mol Biol* **50**: 415-425.
- Wang H, Jones B, Li Z, Frasse P, Delalande C, Regad F, Chaabouni S, Latche A, Pech J-C, Bouzayen M** (2005) The Tomato Aux/IAA Transcription Factor IAA9 Is Involved in Fruit Development and Leaf Morphogenesis 10.1105/tpc.105.033415. *Plant Cell* **17**: 2676-2692
- Warwicker J** (2001) Modelling of auxin-binding protein 1 suggests that its C-terminus and auxin could compete for a binding site that incorporates a metal ion and tryptophan residue 44. *Planta* **212**: 343-347
- Watanabe S, Shimomura S** (1998) Cloning and expression of two genes encoding auxin-binding proteins from tobacco. *Plant Mol Biol* **36**: 63-74.
- Weijers D, Schlereth A, Ehrismann JS, Schwank G, Kientz M, Jurgens G** (2006) Auxin Triggers Transient Local Signaling for Cell Specification in Arabidopsis Embryogenesis. *Developmental Cell* **10**: 265-270
- White PJ** (2002) Recent advances in fruit development and ripening: an overview. *J. Exp. Bot.* **53**: 1995-2000
- Winicur ZM, Feng Zhang G, Andrew Staehelin L** (1998) Auxin Deprivation Induces Synchronous Golgi Differentiation in Suspension-Cultured Tobacco BY-2 Cells. *Plant Physiol.* **117**: 501-513
- Woltering EJ, Balk PA, Nijenhuis-deVries MA, Faivre M, Ruys G, Somhorst D, Philosoph-Hadas S, Friedman H** (2005) An auxin-responsive 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase is

- responsible for differential ethylene production in gravistimulated *Antirrhinum majus* L. flower stems. *Planta* **220**: 403-413
- Woo EJ, Marshall J, Baulry J, Chen JG, Venis M, Napier RM, Pickersgill RW** (2002) Crystal structure of auxin-binding protein 1 in complex with auxin. *Embo J* **21**: 2877-2885.
- Woo E-J, Marshall J, Baulry J, Chen J-G, Venis M, Napier RM, Pickersgill RW** (2002) Crystal structure of auxin-binding protein 1 in complex with auxin. *EMBO J.* **21**: 2877-2885
- Woodward AW, BARTEL B** (2005) Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Ann Bot* **95**: 707-735
- Xie Q, Frugis G, Colgan D, Chua N-H** (2000) Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev.* **14**: 3024-3036
- Xie Q, Guo HS, Dallman G, Fang S, Weissman AM, Chua NH** (2002) SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. *Nature* **419**: 167-170.
- Xu J, Scheres B** (2005) Cell polarity: ROPing the ends together. *Current Opinion in Plant Biology* Cell biology - edited by Patricia C Zambryski and Karl J Oparka **8**: 613-618
- Yamagami T, Tsuchisaka A, Yamada K, Haddon WF, Harden LA, Theologis A** (2003) Biochemical Diversity among the 1-Amino-cyclopropane-1-Carboxylate Synthase Isozymes Encoded by the Arabidopsis Gene Family 10.1074/jbc.M308297200. *J. Biol. Chem.* **278**: 49102-49112
- Yamamoto KT** (1994) Further characterization of auxin-regulated mRNAs in hypocotyl sections of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]: Sequence homology to genes for fatty-acid desaturases and atypical late-embryogenesis-abundant protein, and the mode of expression of the mRNAs. *Planta* **192**: 359-364
- Yamamoto KT, Mori H, Imaseki H** (1992) Novel mRNA Sequences Induced by Indole-3-Acetic Acid in Sections of Elongating Hypocotyls of Mung Bean (*Vigna radiata*). *Plant Cell Physiol.* **33**: 13-20
- Yang SW, Jin E, Chung IK, Kim WT** (2002) Cell cycle-dependent regulation of telomerase activity by auxin, abscisic acid and protein phosphorylation in tobacco BY-2 suspension culture cells. *The Plant Journal* **29**: 617-626
- Yang T, Poovaiah BW** (2000) Molecular and Biochemical Evidence for the Involvement of Calcium/Calmodulin in Auxin Action. *J. Biol. Chem.* **275**: 3137-3143
- Yu Y, He Mu H, Mu-Forster C, Wasserman BP** (1998) Polypeptides of the Maize Amyloplast Stroma . Stromal Localization of Starch-Biosynthetic Enzymes and Identification of an 81-Kilodalton Amyloplast Stromal Heat-Shock Cognate 10.1104/pp.116.4.1451. *Plant Physiol.* **116**: 1451-1460
- Zazimalova E, Brezinova A, Holik J, Opatrny Z** (1996) Partial auxin deprivation affects endogenous cytokinins in an auxin-dependent, cytokinin-independent tobacco cell strain. *Plant Cell Reports*: 76-79
- Zazimalova E, Opatrny Z, Brezinova A, Eder J** (1995) The effect of auxin starvation on growth of auxin-dependent tobacco cell culture : dynamics of auxin-binding activity and endogenous free IAA content. *Journal of Experimental Botany* **46**: 1205-1213
- Zenser N, Ellsmore A, Leasure C, Callis J** (2001) Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *PNAS* **98**: 11795-11800

- ZHANG BH, PAN XP, WANG QL, COBB GP, A AT** (2005) Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. **15**: 336-360
- Zhao Y, Christensen SK, Fankhauser C, Cashman JR, Cohen JD, Weigel D, Chory J** (2001) A Role for Flavin Monooxygenase-Like Enzymes in Auxin Biosynthesis. *Science* **291**: 306-309
- Zhao Y, Dai X, Blackwell HE, Schreiber SL, Chory J** (2003) SIR1, an Upstream Component in Auxin Signaling Identified by Chemical Genetics 10.1126/science.1084161. *Science* **301**: 1107-1110
- Zhao Y, Hull AK, Gupta NR, Goss KA, Alonso J, Ecker JR, Normanly J, Chory J, Celenza JL** (2002) Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev* **16**: 3100-3112.
- Zimmermann U** (1978) Physics of turgor-and osmoregulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**: 121-148
- Zolman BK, Silva ID, Bartel B** (2001) The Arabidopsis pxa1 Mutant Is Defective in an ATP-Binding Cassette Transporter-Like Protein Required for Peroxisomal Fatty Acid beta -Oxidation 10.1104/pp.010550. *Plant Physiol.* **127**: 1266-1278
- Zubieta C, Ross JR, Koscheski P, Yang Y, Pichersky E, Noel JP** (2003) Structural Basis for Substrate Recognition in the Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase Family 10.1105/tpc.014548. *Plant Cell* **15**: 1704-1716

ANNEXES

Annexe 1: Dosage des composés solubles intracellulaires en fonction de la concentration d'auxine et de la dilution du milieu de culture, après 24 h de culture

A0: pas d'auxine; **A25:** 25nM d'AIA; **A10:** 10 µM d'AIA

MS 2%: repiquage dans l'eau; **MS 100%:** repiquage dans milieu MS

MOYENNE		T=0	A0_MS2%	A25_MS2%	A10_MS2%	A0_MS100%	A25_MS100%	A10_MS100%
Somme AA	mM	43,668	33,135	16,196	5,547	58,193	42,170	15,6
Somme AO	mM	53,109	28,722	32,071	22,896	48,241	32,188	22,3
Somme sucres	mM	0,999	2,710	2,595	1,714	4,268	5,219	3,70
Somme anions	mM	58,688	50,694	41,910	43,059	147,067	68,973	55,6
Somme cations	mM	125,231	96,979	81,407	65,334	149,903	88,777	82,0
Somme totale	mM	281,696	180,058	150,824	124,114	407,672	237,327	179,4
Pression osmotique interne	mOsmol	353	296	204	168	540	412	24
Sérine	mM	2,526	1,301	1,204	0,333	2,689	2,219	1,02
Phénylalanine	mM	0,978	0,732	0,040	0,000	0,627	0,029	0,02
Tyrosine	mM	0,786	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00
Glycine	mM	2,874	0,382	0,408	0,180	0,857	0,699	0,36
Cystéine	mM	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00
Alanine	mM	1,576	1,396	1,845	0,632	5,109	6,397	3,10
Valine	mM	4,099	1,157	0,537	0,180	2,401	1,501	0,49
Leucine	mM	2,447	1,174	0,386	0,072	2,001	0,965	0,2
Glutamate	mM	1,914	1,949	2,358	0,804	1,780	3,356	2,1
Glutamine	mM	8,212	19,287	4,221	0,744	34,377	18,336	2,5
Histidine	mM	0,637	0,340	0,063	0,000	0,651	0,372	0,07
Arginine	mM	0,477	0,000	0,000	0,000	0,115	0,000	0,17
Proline	mM	5,351	1,523	2,405	1,894	2,069	3,321	2,69
Aspartate	mM	1,567	0,751	0,978	0,302	0,861	1,076	0,89
Asparagine	mM	4,003	1,896	0,862	0,161	2,637	1,964	0,84
Thréonine	mM	3,142	1,036	0,811	0,243	1,747	1,685	0,92
Méthionine	mM	0,182	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00
Isoleucine	mM	2,053	0,210	0,078	0,000	0,272	0,250	0,04
Lysine	mM	0,846	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00
malate	mM	13,625	5,425	7,133	4,998	13,523	5,619	2,36
quininate	mM	1,400	2,417	0,712	0,506	6,986	3,933	0,68
citrate	mM	14,335	4,241	5,468	4,694	8,759	5,536	3,97
oxalate	mM	6,775	4,501	5,183	3,844	4,418	4,210	4,58
acétate	mM	16,970	12,138	13,575	8,853	14,554	12,890	10,7
nitrate	mM	13,209	29,152	14,332	7,848	86,524	34,660	16,6
chlorures	mM	21,639	6,883	11,386	12,494	10,298	3,036	8,8
sulfates	mM	2,600	1,189	4,093	5,666	8,572	4,112	4,97
phosphates	mM	21,200	13,470	12,099	17,051	41,634	27,126	25,1
magnesium	mM	9,075	7,080	8,600	8,330	33,706	17,725	11,4
potassium	mM	111,890	86,684	68,886	53,803	112,343	66,491	67,9
calcium	mM	4,270	3,215	3,921	3,200	3,855	4,561	2,60
Turgescence	mOsmol	154	293	190	163	344	213	45

Annexe 1: Dosage des composés solubles intracellulaires en fonction de la concentration d'auxine et de la dilution du milieu de culture, après 24 h de culture

A0: pas d'auxine; **A25:** 25nM d'AIA; **A10:** 10 µM d'AIA

MS 2%: repiquage dans l'eau; **MS 100%:** repiquage dans milieu MS

ECARTYPE		T=0	A0_MS2%	A25_MS2%	A10_MS2%	A0_MS100%	A25_MS100%
Somme AA	mM	6,084	4,725	4,669	0,919	3,330	0,039
Somme AO	mM	12,642	1,907	4,125	1,571	1,018	0,440
Somme sucres	mM	0,255	0,694	0,196	0,699	0,541	3,325
Somme anions	mM	2,444	7,967	4,225	0,346	3,848	4,162
Somme cations	mM	1,327	2,797	9,032	2,382	6,671	8,490
Somme totale	mM	10,585	26,152	16,689	17,273	15,408	8,848
Pression osmotique interne	mOsmol	0,666	9,172	2,475	0,853	39,432	25,123
Sérine	mM	0,705	0,081	0,340	0,015	0,252	0,036
Phénylalanine	mM	0,463	0,956	0,056	0,000	0,886	0,041
Tyrosine	mM	0,258	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Glycine	mM	2,481	0,012	0,143	0,002	0,047	0,024
Cystéine	mM	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Alanine	mM	0,096	0,115	1,121	0,177	1,881	1,898
Valine	mM	0,736	0,138	0,210	0,052	0,570	0,346
Leucine	mM	0,448	0,187	0,189	0,102	0,540	0,206
Glutamate	mM	0,340	0,640	0,563	0,029	0,082	0,221
Glutamine	mM	0,509	3,923	2,374	0,150	5,494	0,736
Histidine	mM	0,182	0,040	0,090	0,000	0,128	0,079
Arginine	mM	0,071	0,000	0,000	0,000	0,034	0,000
Proline	mM	2,092	0,794	0,809	1,060	2,513	0,722
Aspartate	mM	0,304	0,043	0,263	0,324	0,047	0,429
Asparagine	mM	1,811	0,161	0,261	0,031	0,151	0,373
Thréonine	mM	0,630	0,035	0,284	0,027	0,046	0,006
Méthionine	mM	0,257	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Isoleucine	mM	0,546	0,009	0,110	0,000	0,007	0,002
Lysine	mM	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
malate	mM	0,018	0,667	0,490	1,520	4,389	2,567
quinate	mM	1,047	1,181	0,520	0,127	2,432	1,381
citrate	mM	0,870	0,166	0,574	0,018	0,651	1,878
oxalate	mM	2,058	0,393	0,862	0,858	0,482	0,339
acétate	mM	8,655	1,165	2,659	2,123	3,143	3,164
nitrate	mM	0,323	3,496	0,140	3,175	2,769	1,147
chlorures	mM	1,206	3,720	3,777	2,829	1,895	1,950
sulfates	mM	0,849	0,733	2,077	0,254	0,900	1,297
phosphates	mM	1,768	0,018	1,489	0,254	2,074	2,061
magnesium	mM	0,728	0,173	0,797	0,901	2,496	3,536
potassium	mM	0,640	3,200	7,466	3,200	8,959	6,826
calcium	mM	0,042	0,229	0,769	0,083	0,208	1,872
Turgescence	mOsmol	19,163	8,465	2,475	2,267	36,603	44,922

Annexe 2 : Dosage des composés solubles intracellulaires en fonction de la concentration d'auxine et de la présence d'azote après 24 h de culture.

A0: pas d'auxine

A10: 10 μ M d'AIA

MSN0: milieu MS sans azote

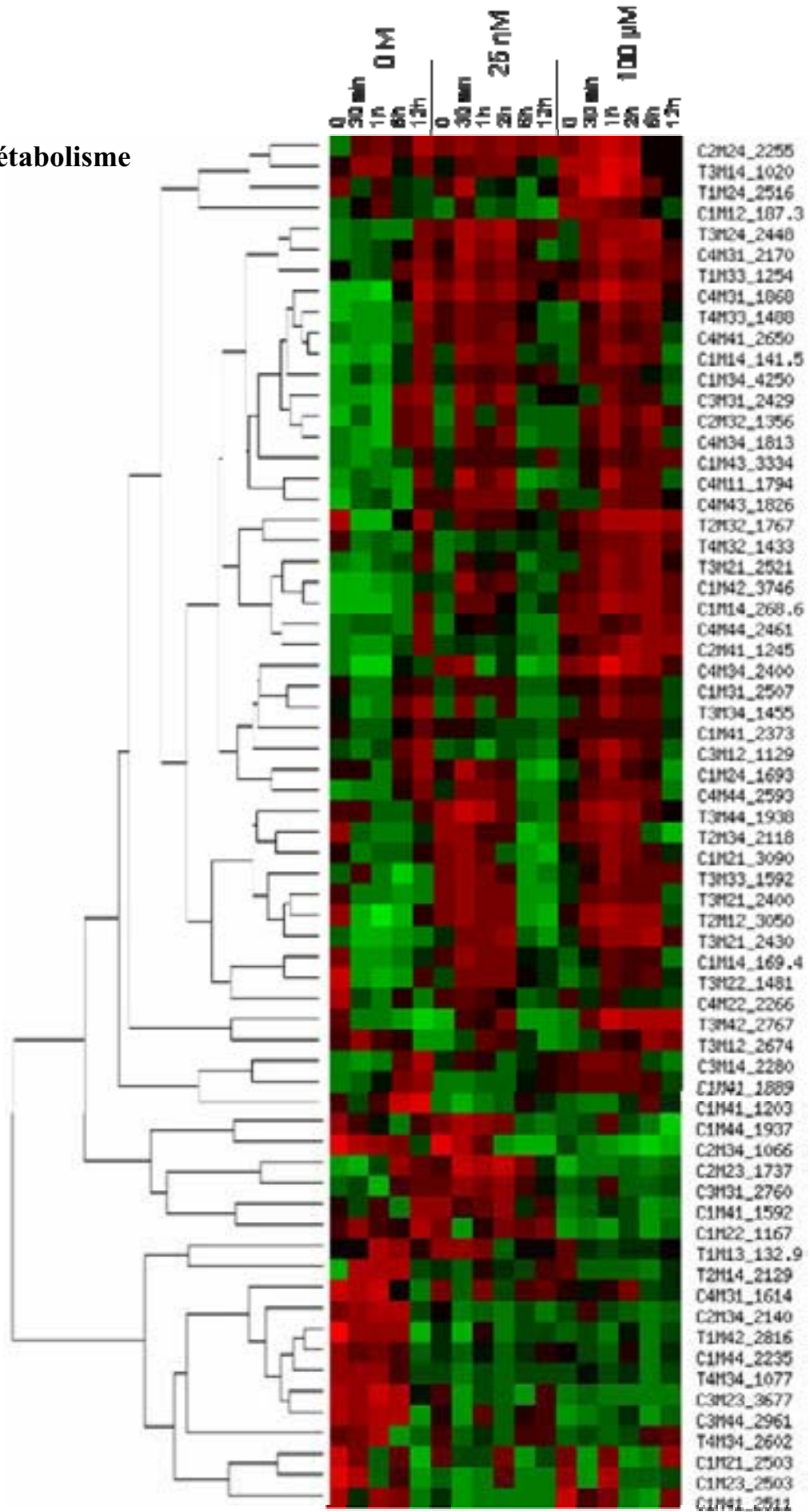
MS: milieu MS

MOYENNE

		T=0	A0_MSN0	A10_MSN0	A0_MS	A10_MS
Somme AA	mM	34,919	10,335	14,003	91,574	32,609
Somme anions	mM	25,560	121,835	60,229	128,882	73,117
Somme cations	mM	117,273	144,525	131,031	106,426	104,202
Pression osmotique interne	mOsmol	316	525	442	493	382
surface cellulaire	μ m ²	1626,575	3322,922	2497,249	3117,924	1842,555
Aspartate	mM	0,861	0,118	0,000	0,867	1,377
Glutamate	mM	0,881	0,355	0,162	1,310	2,454
Sérine	mM	1,776	0,961	0,222	2,513	1,276
Asparagine	mM	2,046	0,000	0,191	3,039	1,240
Cystéine	mM	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Glycine	mM	1,941	0,201	0,360	0,719	0,619
Glutamine	mM	6,063	0,108	0,441	67,921	15,144
Histidine	mM	0,243	0,036	0,040	0,779	0,106
Thréonine	mM	3,836	2,168	3,083	3,286	3,654
Arginine	mM	0,859	0,132	0,000	0,114	1,823
Alanine	mM	0,119	0,097	0,061	0,977	0,081
Proline	mM	10,888	4,435	7,145	4,370	3,111
Tyrosine	mM	0,412	0,000	0,000	0,083	0,000
Valine	mM	1,742	0,147	0,177	1,931	0,574
Méthionine	mM	0,671	0,367	0,410	0,358	0,352
Isoleucine	mM	0,627	0,064	0,045	0,171	0,098
Leucine	mM	0,991	0,079	0,044	2,420	0,224
Lysine	mM	0,239	0,000	0,000	0,149	0,000
Phénylalanine	mM	0,133	0,978	1,527	0,069	0,023
nitrates	mM	0,390	0,162	0,027	41,826	22,449
chlorures	mM	1,390	53,082	8,717	13,425	2,449
sulfates	mM	0,060	10,930	3,165	11,629	2,582
phosphates	mM	23,720	57,661	48,320	62,002	45,637
magnesium	mM	9,359	17,524	11,606	18,771	13,818
potassium	mM	95,101	119,365	112,965	81,077	87,689
calcium	mM	12,813	7,637	6,460	6,578	2,695
Turgescence	mOsmol	147	350	269	286	176

Annexe 3

Groupe Métabolisme



Note: Pour l'identification des étiquettes se reporter aux tableaux suivants, où elles sont ordonnées suivant leur numéro et non suivant le regroupement hiérarchique, comme dans les groupes précédents.

Annexe 3 (suite)**Métabolisme 1/3**

Code étiquette	Taille	Annotation
C1M12_5	187.3	Cytochrome P450 cyp76b7
C1M14_2	268.6	S-adenosylmethionine synthetase 2 (EC 2.5.1.6) (Methionine adenosyltransferase 2) (AdoMet synthetase 2)
C1M14_6	169.4	Putative N-arginine dibasic convertase
C1M14_7	141.7	6-phosphofructokinase, pyrophosphate dependent beta subunit (EC 2.7.1.90)
C1M21_1	309,0	cytochromeP450monooxygenase
C1M22_5	116.7	cytochrome b5 like protein_Alpha/beta hydrolase fold (At1g26340)
C1M23_3	250.3	Cytochrome P450 monooxygenase (Fragment)
C1M24_7	169.3	Catechol O-methyltransferase
C1M31_6	250.7	Cytochrome P450 monooxygenase (Fragment).
C1M34_1	425,0	S-adenosylmethionine synthetase 1 (Methionine adenosyltransferase 1) (AdoMet synthetase 1).
C1M41_5	251.1	Cytochrome P450 like_TBP
C1M41_6	237.3	Diacylglycerol kinase
C1M41_8	188.9	Vacuolar ATP synthase subunit G 2 (V-ATPase G subunit 2) (Vacuolar proton pump G subunit 2).
C1M41_10	159.2	cytochrome b5 like protein At1g26340
C1M41_13	120.3	Glutamine synthetase (Glutamate--ammonia ligase)
C1M42_1	374.6	Cationic peroxidase isozyme 40K precursor.
C1M43_A	333.4	B-lactamase
C1M44_2	223.5	NADH dehydrogenase subunit B (Fragment)
C1M44_4	193.7	4-coumarate--CoA ligase 2 (4CL 2) (4-coumaroyl-CoA synthase 2).
C2M23_3	173,7	cytochrome P450 like_TBP
C2M24_5	225,5	ATP synthase D chain, mitochondrial
C2M32_4	135,6	methylthioribose kinase OSJNBa0043A12.24 protein.
C2M34_3	250	Putative N-arginine dibasic convertase.

Annexe 3 (suite)

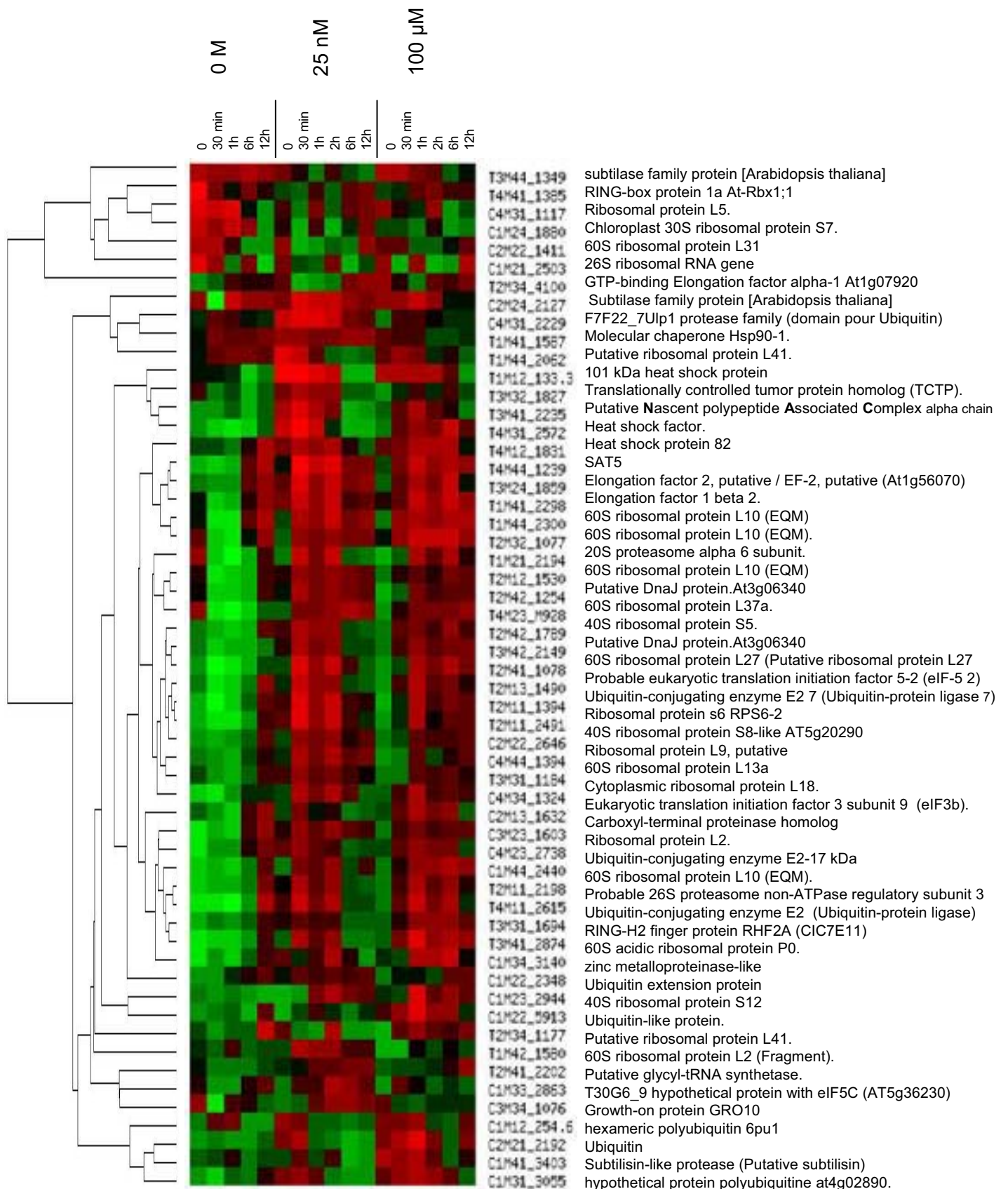
Métabolisme 2/3

Code étiquette	Taille	Annotation
C2M34_4	214,0	Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransférase beta subunit (=6-phosphofruktokinase, pyrophosphate dependent)
C2M34_8	106,6	Transketolase 1.
C2M41_4	124,5	4,5-DOPA dioxygénase extradiol.
C3M12_5	112,9	Beta-1,3-glucanase, putative
C3M14_2	228,0	Putative glycerophosphodiester phosphodiesterase
C3M23_1	367,7	Probable orotidine 5'-phosphate decarboxylase.
C3M31_1	276,0	Putative polyketide synthase.
C3M31_3	242,9	D-isomer specific 2 hydroxyacid dehydrogénase protein, NAD binding domain (involved in L-serine biosynthesis)
C3M44_5	296,1	NADH dehydrogénase 18kD subunit.
C4M11_1	179,4	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (AdoMetDC) (SamDC)
C4M22_1	226,6	Cytochrome P450 like_TBP
C4M31_2	217,0	Putative acyl-CoA dehydrogénase G6P (ATG6) (At3g51840/AtG6) (Acyl-CoA dehydrogénase).
C4M31_4	186,8	Transaldolase ToTAL2.
C4M31_5	161,4	NADH dehydrogénase (Fragment).
C4M34_1	240,0	Esterase/lipase/thioesterase_CarbesteraseB B1065G12.16 protein.
C4M34_3	181,3	Cinnamyl alcohol dehydrogénase.
C4M41_8	265,0	Tocopherol cyclase.
C4M43_1	182,6	Soluble inorganique pyrophosphatase
C4M44_1	259,3	S-adenosylmethionine synthase
C4M44_2	246,1	Steroid 22-alpha-hydroxylase, putative.
T1M13_5	132,9	2-oxoglutarate-dépendant dioxygénase, putative At1g06620
T1M24_1	251,6	CIG1 = proline dehydrogénase
T1M33_5	125,4	Putative proline synthetase associated protein At1g11930
T1M42_1	281,6	PSII 10kD phpsphoprotein.

Code étiquette	Taille	Annotation
T2M12_1	305,0	NADP-dependent malic enzyme (Fragment)
T2M14_3	212,9	probable cytochrome P450 monooxygenase
T2M32_1	176,7	Beta-ureidopropionase (N-carbamyl-beta-alanine amidohydrolase) (At5g64370).
T2M34_3	211,8	Malate oxidoreductase, cytoplasmic (Malic enzyme) (ME) (NADP-dependent malic enzyme)
T3M12_1	267,4	ornithine decarboxylase
T3M14_4	102,0	Cytosolic cysteine synthase.
T3M21_2	252,1	Enolase (2-phosphoglycerate dehydratase) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase).
T3M21_3	243,0	Glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein MFP-a
T3M21_4	240,0	Glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein MFP-a
T3M22_2	148,1	Probable pantothenate kinase 1 (Pantothenic acid kinase 1).
T3M24_1	244,8	Chorismate synthase 1, chloroplast precursor (5- enolpyruvylshikimate-3-phosphate phospholyase 1).
T3M33_1	159,2	UDP-Glc-4-epimerase [Solanum tuberosum]
T3M34_7	145,5	Galactose dehydrogenase.
T3M42_2	276,7	Putative dioxygenase OG-FEII domain (OSJNBa0022H21.12)
T3M44_3	193,8	4-coumarate--CoA ligase 1 (EC 6.2.1.12)(4-coumaroyl-CoA synthase 1).
T4M32_3	143,3	NADH-ubiquinone oxidoreductase
T4M33_3	148,8	sulfate adenylyltransferase [Solanum tuberosum]
T4M34_1	260,2	sulfate adenylyltransferase [Solanum tuberosum]
T4M34_6	107,7	PetN or cytochrome b6/f complex subunit VIII [Nicotiana tabacum]

Annexe 4

Groupe Synthèse et devenir protéique



Annexe 4 (suite)

Synthèse et devenir protéique 1/2

Code étiquette	Taille	Annotation
T3M44_5	134,9	subtilase family protein [Arabidopsis thaliana]
T4M41_2	138,5	RING-box protein 1a At-Rbx1;1
C4M31_7	111,7	Ribosomal protein L5.
C1M24_6	188,0	Chloroplast 30S ribosomal protein S7.
C2M22_4	141,1	60S ribosomal protein L31
C1M21	250,0	26S ribosomal RNA gene
T2M34_1	410,0	GTP-binding Elongation factor alpha-1 At1g07920
C2M24_6	212,7	F7F22_7Ulp1 protease family C-terminal catalytic domain with CYS-His-Asn (domain pour Ubiquitin)
C4M31_1	222,9	Molecular chaperone Hsp90-1.
T1M41_4	158,7	Putative ribosomal protein L41.
T1M44_3	206,2	101 kDa heat shock protein
T1M12_3	133,3	Translationally controlled tumor protein homolog (TCTP).
T3M32_4	182,7	Putative nascent polypeptide associated complex alpha chain.(NAC)
T3M41_2	223,5	Heat shock factor.
T4M31_1	257,2	Heat shock protein 82
T4M12_3	183,1	SAT5
T4M44_2	123,9	elongation factor 2, putative / EF-2, putative (At1g56070)
T3M24_2	185,9	elongation factor 1 beta 2.
T1M41_1	229,8	60S ribosomal protein L10 (EQM)
T1M44_1	230,0	60S ribosomal protein L10 (EQM).
T2M32_3	107,7	20S proteasome alpha 6 subunit.
T1M21_1	219,4	60S ribosomal protein L10 (EQM)
T2M12_4	153,0	Putative DnaJ protein.At3g06340
T2M42_3	125,4	60S ribosomal protein L37a.
T4M23_1	92,8	40S ribosomal protein S5.
T2M42_2	178,9	Putative DnaJ protein.At3g06340
T3M42_4	214,8	60S ribosomal protein L27 (Putative ribosomal protein L27)
C1M21_3	250,0	26S ribosomal RNA gene

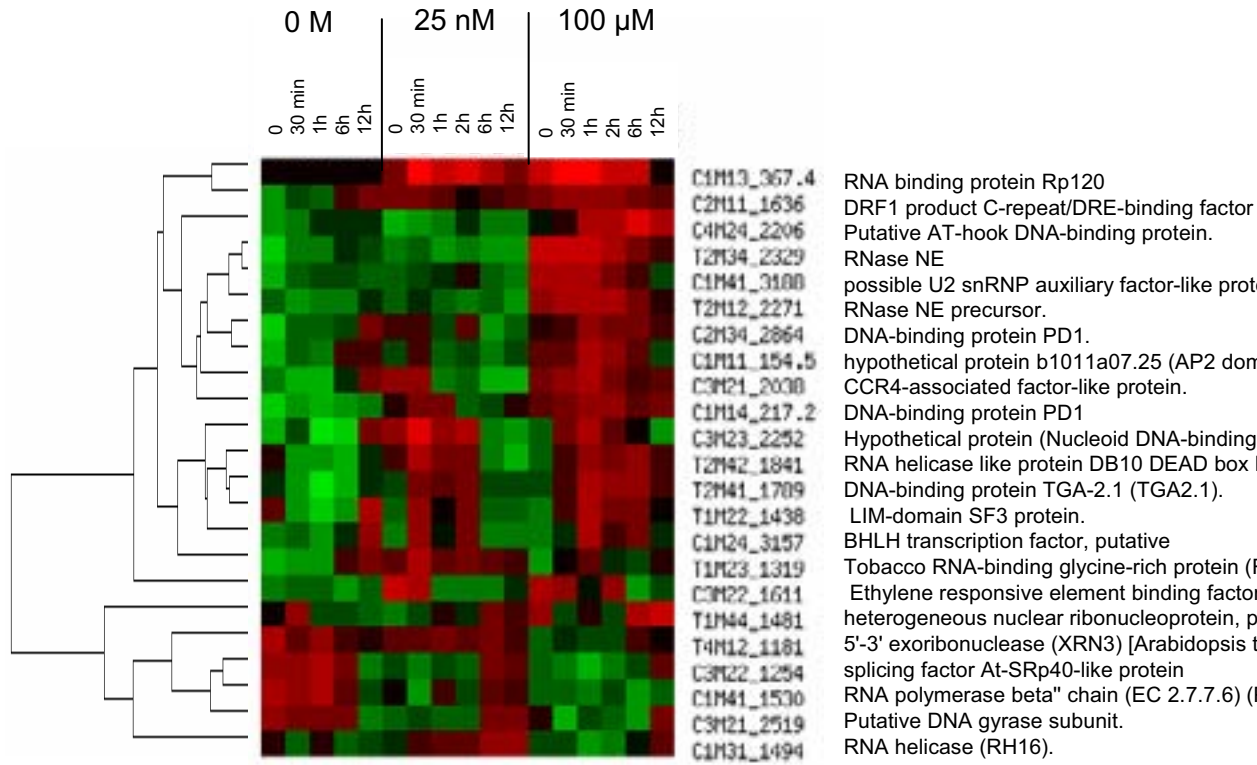
Annexe 4 (suite)

Synthèse et devenir protéique 2/2

Code étiquette	Taille	Annotation
T2M41_10	107,8	Probable eukaryotic translation initiation factor 5-2 (eIF-5 2)
T2M13_4	149,0	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 7 (EC 6.3.2.19) (Ubiquitin-protein ligase 7)
T2M11_5	139,4	Ribosomal protein s6 RPS6-2
T2M11_1	249,1	40S ribosomal protein S8-like AT5g20290
C2M22_1	264,6	Ribosomal protein L9, putative
C4M44_7	139,4	60S ribosomal protein L13a
T3M31_6	118,4	Cytoplasmic ribosomal protein L18.
C4M34_5	132,4	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 9 (eIF-3 eta) (eIF3 p110) (eIF3b).
C2M13_3	163,2	Carboxyl-terminal proteinase homolog (Carboxyl-terminal proteinase like protein).
C3M23_5	160,3	Ribosomal protein L2.
C4M23_1	273,8	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa (EC 6.3.2.19) (Ubiquitin- protein ligase)
C1M44_1	244,0	60S ribosomal protein L10 (EQM).
T2M11_2	219,8	Probable 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 (26S proteasome subunit S3)
T4M11_1	261,5	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 (EC 6.3.2.19) (Ubiquitin-protein ligase)
T3M31_4	169,4	RING-H2 finger protein RHF2A (C1C7E11)
T3M41_1	287,4	60S acidic ribosomal protein P0.
C1M34_3	314,0	zinc metalloproteinase-like
C1M22_2	234,8	Ubiquitin extension protein
C1M23_2	294,4	40S ribosomal protein S12
C1M22_9	591,3	Ubiquitin-like protein.
T2M34_6	117,7	Putative ribosomal protein L41.
T1M42_4	158,0	60S ribosomal protein L2 (Fragment).
T2M41_2	220,2	Putative glycyl-tRNA synthetase.
C1M33_1	286,3	T30G6_9 hypothetical protein with eIF5C (AT5g36230)
C3M34_5	107,6	Growth-on protein GRO10
C1M12_2	254,6	hexameric polyubiquitin 6pu1
C2M21_3	219,2	Ubiquitin
C1M41_3	340,3	Subtilisin-like protease (Putative subtilisin)
C1M31_1	305,5	hypothetical protein polyubiquitine at4g02890.

Annexe 5

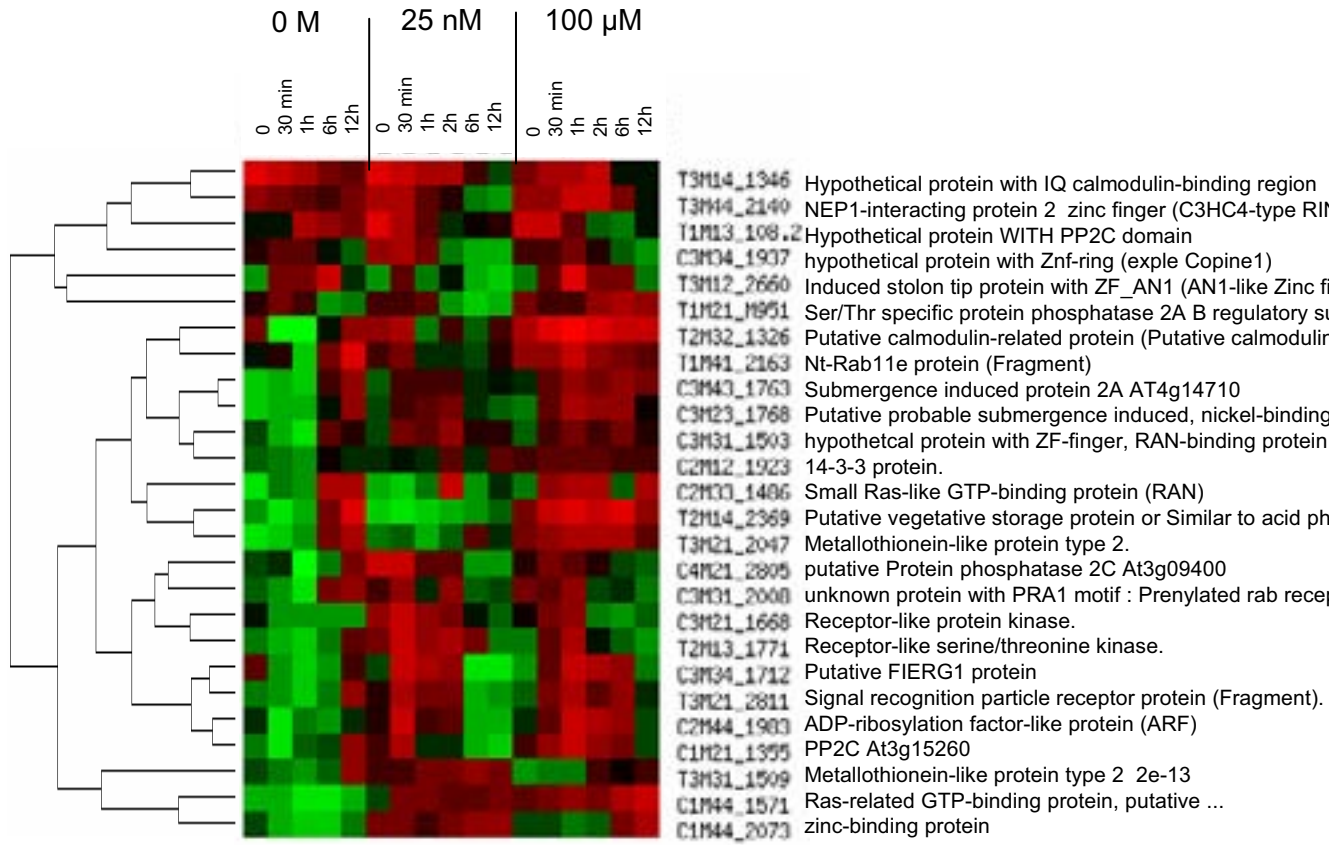
Transcription



Annexe 5 (suite)

Transcription

Code étiquette	Taille	Annotation	
C1M13_1	367,4	RNA binding protein Rp120	spt:Q7
C2M11_6	163,6	DRF1 product C-repeat/DRE-binding factor	AAP40
C4M24_1	220,6	Putative AT-hook DNA-binding protein.	sptn:B
T2M34_2	232,9	RNase NE	spt:Q9
C1M41_4	318,8	possible U2 snRNP auxiliary factor-like protein	dbj BA
T2M12_3	227,1	RNase NE precursor.	spt:Q9
C2M34_2	286,4	DNA-binding protein PD1.	spt:O0
C1M11_10	154,5	hypothetical protein b1011a07.25 (AP2 domain)	spt:Q8
C3M21_3	203,8	CCR4-associated factor-like protein.	spt:Q9
C1M14_4	217,2	DNA-binding protein PD1	emb:C
C3M23_3	225,2	Hypothetical protein (Nucleoid DNA-binding-like protein with peptidase A1, pepsin site and lipase_SER domain)) at1g09750	spt:O0
T2M42_1	184,1	RNA helicase like protein DB10 DEAD box RNA helicase (DRH1) At3g01540	protein
T2M41_3	178,9	DNA-binding protein TGA-2.1 (TGA2.1).	sp:O2
T1M22_1	143,8	LIM-domain SF3 protein.	spt:P9
C1M24_2	315,7	BHLH transcription factor, putative	spt:Q9
T1M23_5	131,9	Tobacco RNA-binding glycine-rich protein (RGP-1c) with RRM motif	embl:C
C3M22_3	161,1	Ethylene responsive element binding factor 1 (AtERF1) (EREBP-2 protein) at4g17500	spt:Q7
T1M44_4	148,1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, putative / hnRNP, putative (At5g66010)	ref NP
T4M12_5	118,1	5'-3' exoribonuclease (XRN3) [Arabidopsis thaliana]	gi 184
C3M22_4	125,4	splicing factor At-SRp40-like protein	gb AA
C1M41_11	153,0	RNA polymerase beta" chain (EC 2.7.7.6) (PEP)	sp:Q8
C3M21_1	251,9	Putative DNA gyrase subunit.	spt:Q7
C1M31_5	149,4	RNA helicase (RH16)	emb:B



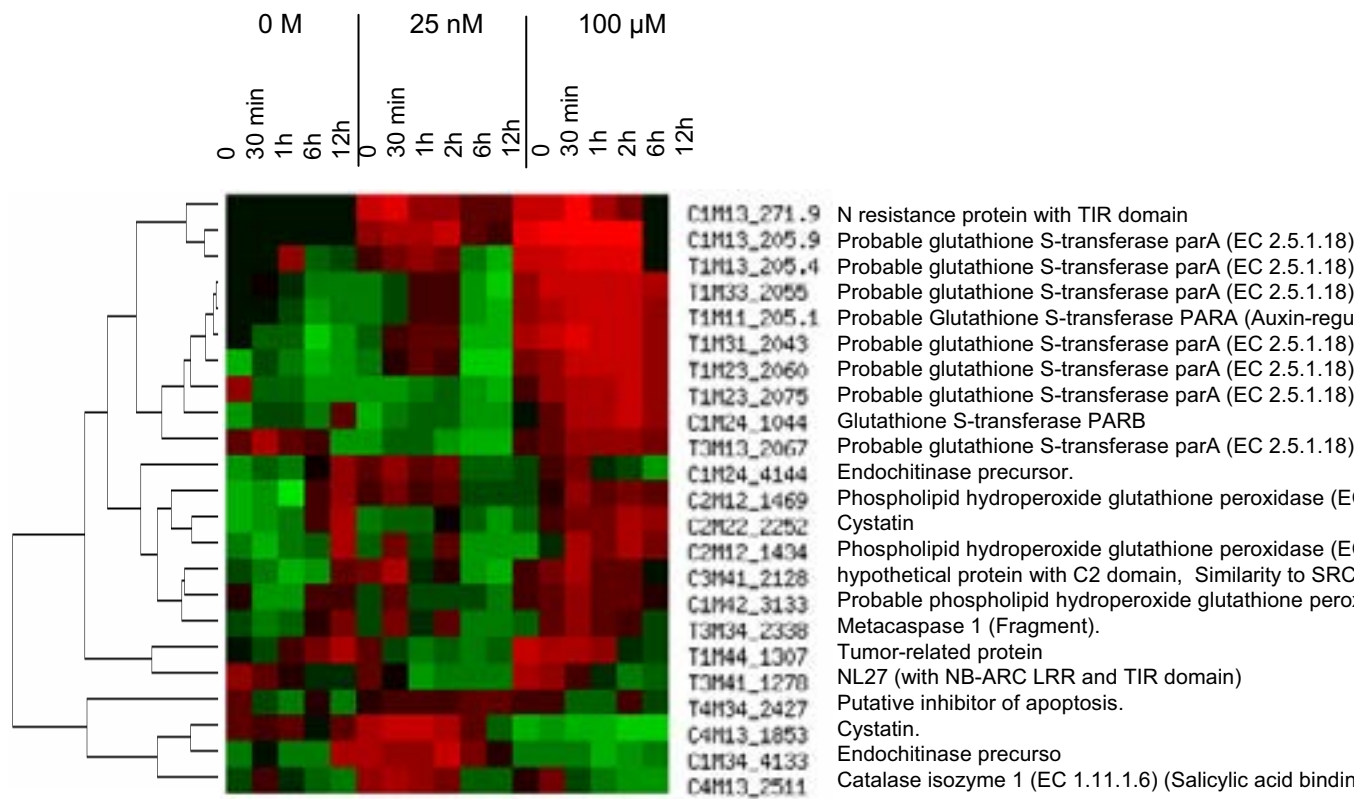
Annexe 6 (suite)

Communication cellulaire et Transduction

Code étiquette	Taille	Annotation	
T3M14_3	134,6	Hypothetical protein with IQ calmodulin-binding region	spt:Q9M
T3M44_2	214,0	NEP1-interacting protein 2 zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein [Arabidopsis thaliana]	gi 2752
T1M13_6	108,2	Hypothetical protein WITH PP2C domain	spt:Q8L
C3M34_1	193,7	hypothetical protein with Znf-ring (exple Copine1)	spt:Q8F
T3M12_2	266,0	Induced stolon tip protein with ZF_AN1 (AN1-like Zinc finger) motif)	sptn:AA
T1M21_5	95,1	Ser/Thr specific protein phosphatase 2A B regulatory subunit beta isoform	gi 1109
T2M32_2	132,6	Putative calmodulin-related protein (Putative calmodulin protein)	spt:Q9C
T1M41_2	216,3	Nt-Rab11e protein (Fragment)	spt:Q4C
C3M43_3	176,3	Submergence induced protein 2A AT4g14710	spt:Q8V
C3M23_4	176,8	Putative probable submergence induced, nickel-binding protein 2A.	spt:Q8H
C3M31_6	150,3	hypothetical protein with ZF-finger, RAN-binding protein	spt:Q9S
C2M13_2	192,3	14-3-3 protein.	sptn:BA
C2M33_3	148,6	Small Ras-like GTP-binding protein (RAN)	sptn:AA
T2M14_2	236,9	Putative vegetative storage protein or Similar to acid phosphatase At1g04040	spt:Q9Z
T3M21_5	204,7	Metallothionein-like protein type 2.	sp:Q4
C4M21_2	280,5	putative Protein phosphatase 2C At3g09400	spt:Q9S
C3M31_4	200,8	unknown protein with PRA1 motif : Prenylated rab receptor At2g40380	sptn:AA
C3M21_5	166,8	Receptor-like protein kinase.	spt:Q8L
T2M13_3	177,1	Receptor-like serine/threonine kinase.	spt:Q9F
C3M34_3	171,2	Putative FIERG1 protein	spt:Q8S
T3M21_1	281,1	Signal recognition particle receptor protein (Fragment).	sptn:A
C2M44_2	198,3	ADP-ribosylation factor-like protein (ARF)	spt:Q8V
C1M21_4	135,5	PP2C At3g15260	spt:Q9L
T3M31_5	150,9	Metallothionein-like protein type 2 2e-13	emb CA
C1M44_6	157,1	Ras-related GTP-binding protein, putative ...	ref NP_
C1M44_3	207,3	zinc-binding protein	dbj BA

Annexe 7

Défense cellulaire



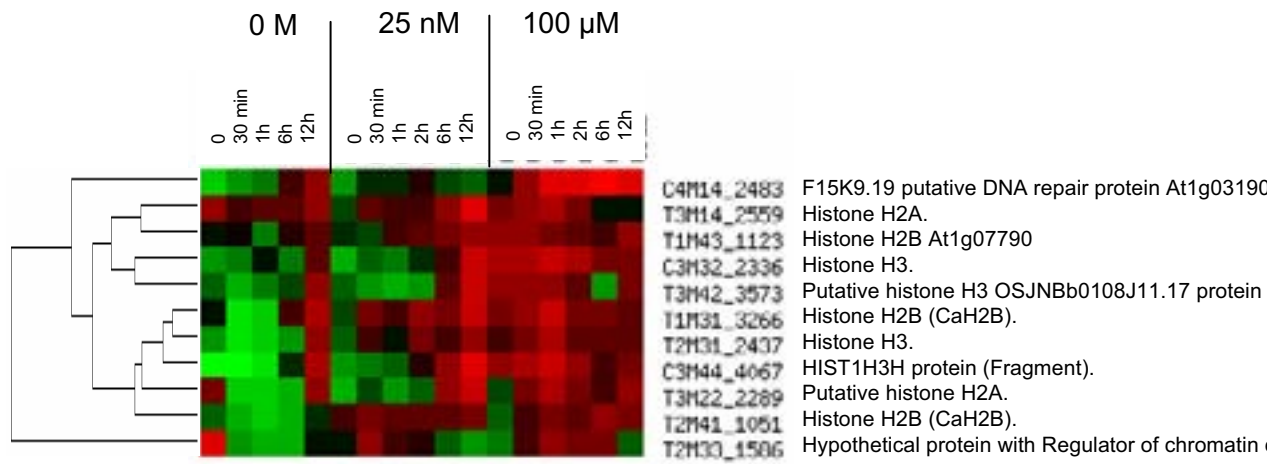
Annexe 7 (suite)

Défense cellulaire

Code étiquette	Taille	Annotation
C1M13_3	271,9	N resistance protein with TIR domain
C1M13_5	205,9	Probable glutathione S-transferase parA (EC 2.5.1.18) (Auxin-regulated protein parA)
T1M13_2	205,4	Probable glutathione S-transferase parA (EC 2.5.1.18) (Auxin-regulated protein parA)
T1M33_2	205,5	Probable glutathione S-transferase parA (EC 2.5.1.18) (Auxin-regulated protein parA)
T1M11_2	205,1	Probable Glutathione S-transferase PARA (Auxin-regulated protein PARA) (STR246C protein).
T1M31_1	204,3	Probable glutathione S-transferase parA (EC 2.5.1.18) (Auxin-regulated protein parA)
T1M23_2	206,0	Probable glutathione S-transferase parA (EC 2.5.1.18) (Auxin-regulated protein parA)
T1M23_1	207,5	Probable glutathione S-transferase parA (EC 2.5.1.18) (Auxin-regulated protein parA)
C1M24_11	104,4	Glutathione S-transferase PARB
T3M13_1	206,7	Probable glutathione S-transferase parA (EC 2.5.1.18) (Auxin-regulated protein parA)
C1M24_1	414,4	Endochitinase precursor.
C2M12_3	146,9	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9)
C2M22_2	225,2	Cystatin
C2M12_4	143,4	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9)
C3M41_1	212,8	hypothetical protein with C2 domain, Similarity to SRC2 protein At3g16510.
C1M42_2	313,3	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) (PHGPx) (Nt-SubC08).
T3M34_4	233,8	Metacaspase 1 (Fragment).
T1M44_5	130,7	Tumor-related protein
T3M41_5	127,8	NL27 (with NB-ARC LRR and TIR domain)
T4M34_2	242,7	Putative inhibitor of apoptosis.
C4M13_2	251,1	Cystatin.
C1M34_2	413,3	Endochitinase precursor
C4M13_4	185,3	Catalase isozyme 1 (EC 1.11.1.6) (Salicylic acid binding protein) (SABP).
T4M41_3	120,8	P-rich protein NtEIG-C29 [Nicotiana tabacum]

Annexe 8

Cycle cellulaire

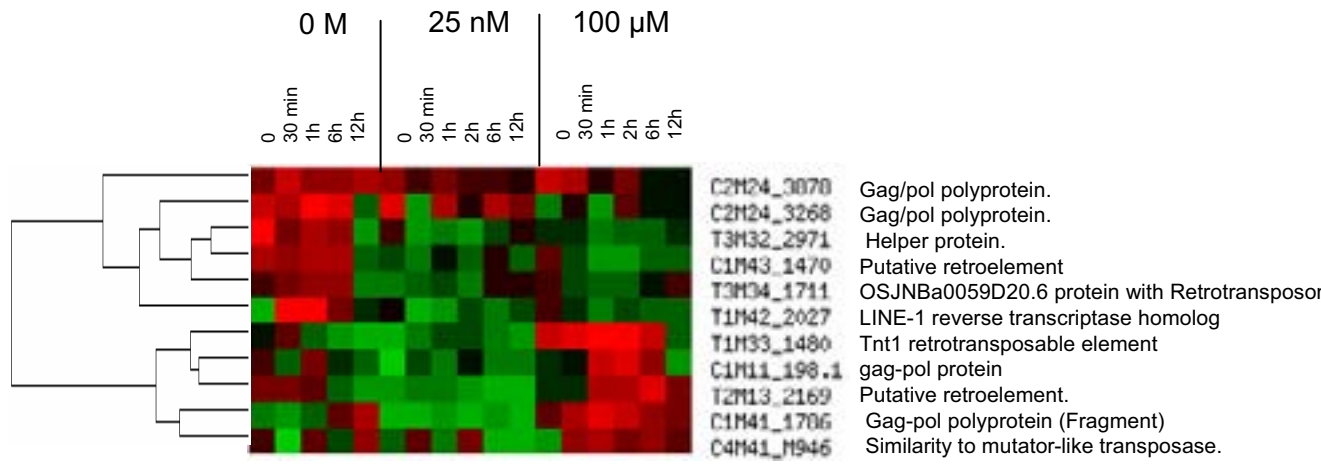


Annexe 8 (suite)**Cycle cellulaire**

Code étiquette	Taille	Annotation
C4M14_1	248,3	F15K9.19 putative DNA repair protein At1g03190
T3M14_1	255,9	Histone H2A.
T1M43_5	112,3	Histone H2B At1g07790
C3M32_1	233,6	Histone H3.
T3M42_1	357,3	Putative histone H3 OSJNBb0108J11.17 protein
T1M31_6	326,0	Histone H2B (CaH2B).
C3M44_4	406,7	Histone H3.
T3M22_1	228,9	HIST1H3H protein (Fragment).
T2M41_11	105,1	Putative histone H2A.
T2M31_1	243,7	Histone H2B (CaH2B).
T2M33_1	158,1	Hypothetical protein with Regulator of chromatin condensation signature 2 : RCC1-2 motif

Annexe 9

Transposons

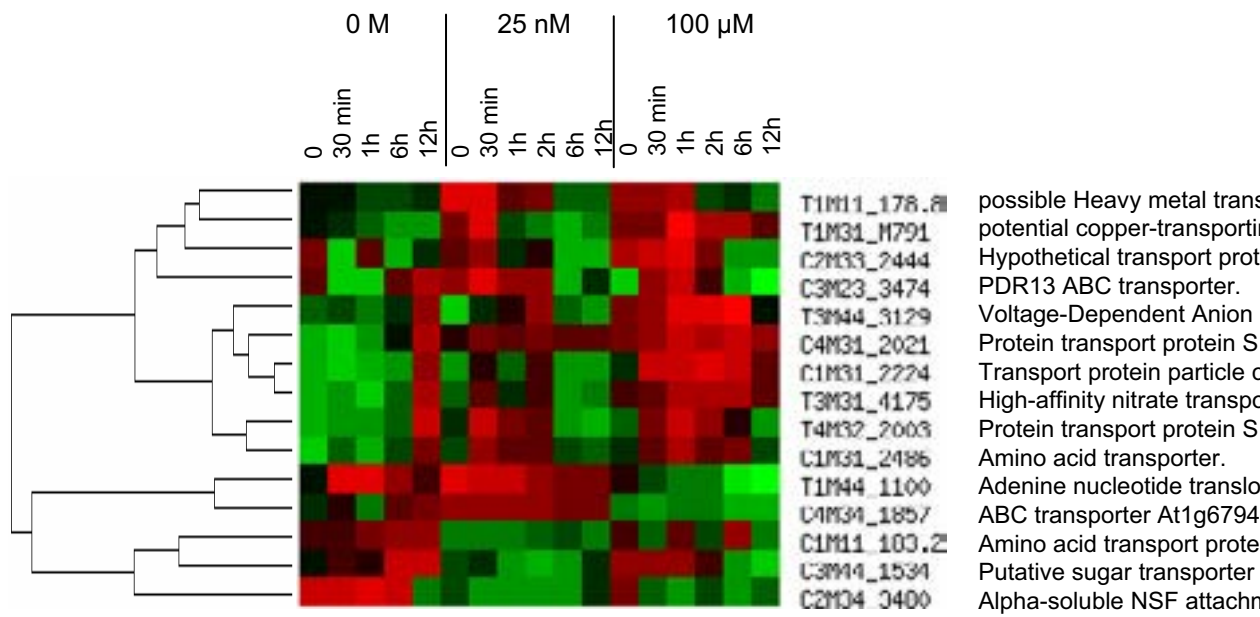


Annexe 9 (suite)**Transposons**

Code étiquette	Taille	Annotation
C2M24_1	387,8	Gag/pol polyprotein.
C2M24_2	326,8	Gag/pol polyprotein.
T3M32_1	297,1	Helper protein.
C1M43_9	147,0	Putative retroelement
T3M34_6	171,1	OSJNBa0059D20.6 protein with Retrotransposon gag protein and Reverse transcriptase
T1M42_2	202,7	LINE-1 reverse transcriptase homolog
T1M33_3	148,0	Tnt1 retrotransposable element
C1M11_7	198,0	gag-pol protein
T2M13_2	216,9	Putative retroelement.
C1M41_9	178,6	Gag-pol polyprotein (Fragment)
C4M41_6	94,6	Similarity to mutator-like transposase.
T1M11_7		Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon TNT 1-94 [Contains: Protease; Reverse transcriptase; Endonuclease].

Annexe 10

Transport cellulaire et transport facilité



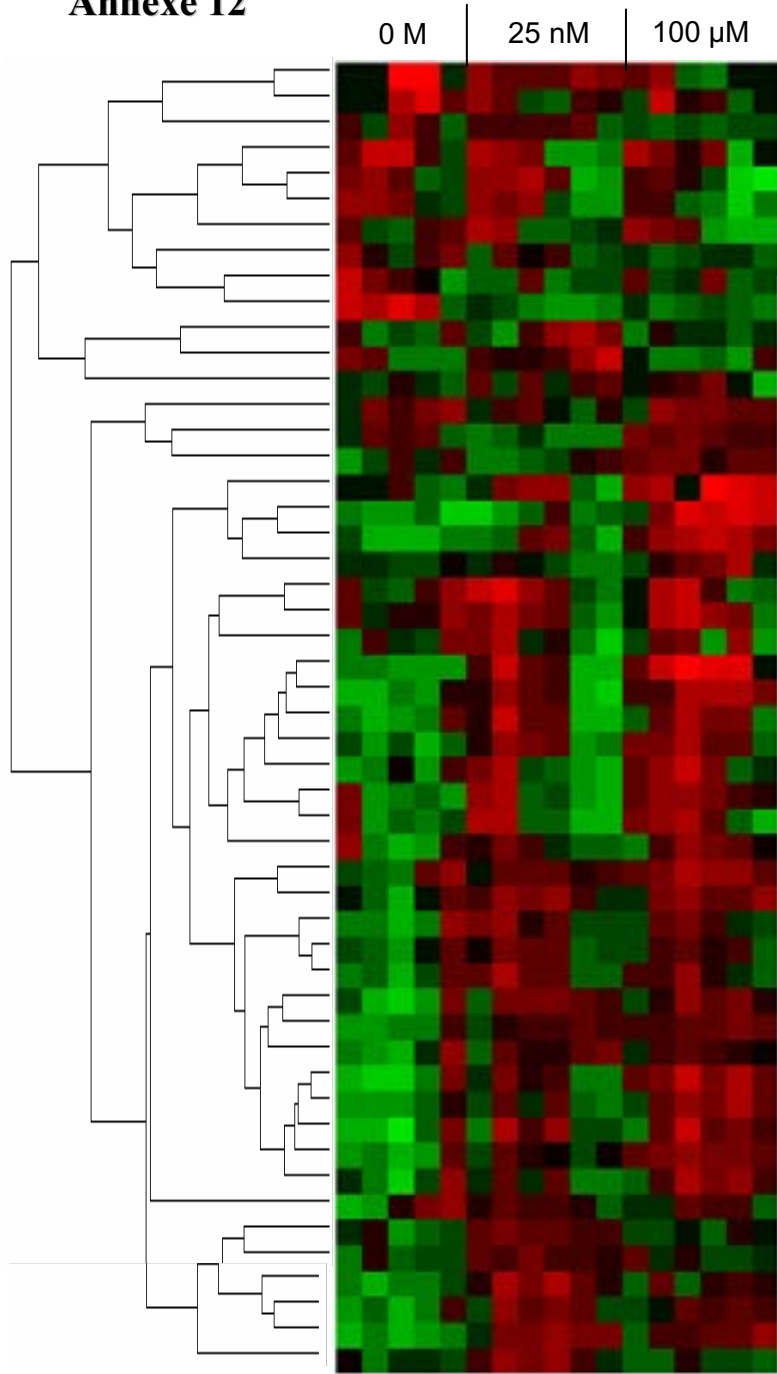
Annexe 10 (suite)**Transport cellulaire et transport facilité**

Code étiquette	Taille	Annotation
T1M11_4	178,8	possible Heavy metal transport/detoxification protein (OSJNBa0016O02.17 protein)
T1M31_5	79,1	Potential copper-transporting ATPase PAA1 (EC 3.6.3.4)
C2M33_2	244,4	Hypothetical transport protein
T3M44_1	312,9	PDR13 ABC transporter.
C4M31_3	202,1	Voltage-Dependent Anion Channel Porins (VDAC2.1.)
C1M31_3	222,4	Protein transport protein SEC61 gamma-1 subunit.
T3M31_1	417,5	Transport protein particle component Bet3p-like protein (AT5g54750/MBG8_1).
T4M32_2	200,3	High-affinity nitrate transporter.
C1M31_2	248,6	Protein transport protein SEC61 gamma-1 subunit.
T1M44_6	110,0	Amino acid transporter.
C4M34_2	185,7	Adenine nucleotide translocator.
C1M11_9	183,2	ABC transporter At1g67940
C3M23_2	347,4	Amino acid transport protein AAT1 (Cationic amino acid transporter).
C3M44_1	153,4	Putative sugar transporter At5g18840
C2M34_1	348,0	Alpha-soluble NSF attachment protein (N-ethylmaleimide- sensitive factor attachment protein alpha)

Annexe 11 (suite)**Devenir cellulaire**

Code étiquette	Taille	Annotation
T1M14_3	127,0	Putative transmembrane protein(TPA regulated locus protein).
T4M41_3	120,8	extensin like protein with Tryp_alpha_amylase inhibitor domain
C2M11_2	309,7	Pectin methyl-esterase (EC 3.1.1.11).
C1M43_5	207,5	MinE
T1M21_2	194,0	Actin 101
C3M21_4	180,5	Putative Nonclathrin coat protein gamma-like protein.
T3M41_3	219,4	Arabinogalactan-protein precursor.
T2M14_1	294,4	Hypothetical protein (Arabinogalactan protein)AT5g11740
T2M33_2	122,0	Fasciclin-like arabinogalactan protein 7 precursor fas1 domain
T3M34_8	131,7	alpha-tubulin [Gossypium hirsutum]
C1M34_4	180,0	Chloroplast outer envelope protein OEP86 precursor (GTP-binding protein IAP86) AT4g02510
T4M34_3	181,4	alpha-expansin precursor [Nicotiana tabacum]
T4M34_5	117,5	alpha-expansin precursor [Nicotiana tabacum]
C2M34_6	132,3	Pectin methylesterase (EC 3.1.1.11) (Pectinesterase) (Fragment).
C3M43_1	214,0	Hypothetical transmembrane protein RSp0119.
C1M41_1	512,3	Ycf1 protein
C4M34_4	147,0	Putative movement protein.
C4M41_3	148,0	Ycf2 protein.

Annexe 12



Protéine hypothétique

T1M13_188.4 Similarity to unknown protein with PRP38 domain
T1M13_277.9 Hypothetical protein orf111-b.
C3M21_2268 hypothetical protein with VHS domain and GAT
T1M34_1322 Hypothetical protein. With Aspartic acid-rich region
C1M43_1859 hypothetical protein with Lys and Asp Rich region
C1M41_1301 hypothetical protein At4g24275
C1M11_206.2 Hairy root 4.
T1M42_1781 ORF87 with YMF19 hypothetical plant mitochondrial
C4M32_2724 orf, partial conserved hypothetical protein
C2M12_2258 GAMM1-like protein [Oryza sativa (japonica cultivar
T4M33_1510 Hypothetical protein.
C4M44_1263 hypothetical protein 154 - common tobacco chloroplast
C1M14_312.9 Expressed protein with MYB domain
C2M11_2690 hypothetical protein with Lys rich, Asn rich and
T3M42_1639 Elicitor-responsive gene-3 (RPP16) OSJNBa00
C1M24_2916 Hypothetical protein (At5g37370)
T1M14_204.0 unknown protein At2g47270
C4M24_1312 NT7
T2M41_1393 Hypothetical protein.
T4M14_1014 Late embryogenesis abundant protein 5.
C4M14_1858 Plant protein of unknown function DUF247 At2g
C4M14_1624 hypothetical protein At4g26550
C1M11_202.6 Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 216.
T1M34_3424 Embryo-abundant protein EMB (At2g41380)
C1M21_2666 Hypothetical protein with Leucine Rich Repeat
T3M32_2662 Hypothetical protein At2g15780 (Curedoxin & F
C1M11_311.6 Hypothetical protein At2g03441
C1M33_2254 Hypothetical protein.DUF567 (At3g56180)
T3M34_2610 ORF_with NLS-BP region
C3M11_3938 Hypothetical protein with zf-C3HC4; 1 motif At2g
T2M42_1171 NBD like protein ATP/GTP binding site motif A
T4M44_2043 hypothetical protein with DUF760 domain (At1g
T1M31_1401 Hypothetical protein. At1g52780
T2M34_1996 hypothetical protein (DUF341)s
C1M44_1490 unknown protein with VQ motif AT5g53830
C3M43_1858 Hypothetical protein At3g29034
T2M41_2313 Hypothetical protein.
C2M31_1426 dehydration-responsive protein-related [Arabidopsis
C1M42_1703 Hypothetical protein (At2g38000 protein).
T3M31_3154 Putative Vip1 protein (Hypothetical protein with
T3M21_1230 hypothetical protein with RVE and RVT domain
C3M13_1695 Hypothetical protein DUF231 domain
C4M41_2329 Hypothetical protein with Glutaredoxin-related
T3M41_1723 Nii interacting factor phosphatase domain At1g
C2M22_1332 hypothetical protein with FAR1 and Fnf_PMZ d
C1M44_1429 Probable disease resistance protein CC-NBS-L
C1M43_1735 Hypothetical protein with MA3 domain AT3g483
C4M13_2587 Hypothetical protein with (NLS_BP) Bipartite nu
C4M44_2429 P0019D06.23 protein with MAM33 domain
C4M32_2079 Hypothetical protein with Glycosyl transferase,
C3M11_2221 Hypothetical protein with Brix domain : unknow

Annexe 12 (suite)

Protéine hypothétique 1/2

Code étiquette	Taille	Annotation	
T1M13_4	188,4	Similarity to unknown protein with PRP38 domain	spt:G
T1M13_3	277,9	Hypothetical protein orf1111-b.	sptn:
C3M21_2	226,8	hypothetical protein with VHS domain and GAT domain (At3g08790)	spt:G
C1M43_6	185,9	Hypothetical protein. With Aspartic acid-rich region profile and Lysine-rich region profile.	spt:G
C1M41_12	130,1	hypothetical protein with Lys and Asp Rich regions	spt:G
C1M11_5	206,0	hypothetical protein At4g24275	spt:G
T1M42_3	178,1	Hairy root 4.	spt:G
C4M32_1	272,4	ORF87 with YMF19 hypothetical plant mitochondrial protein	spt:G
C2M12_1	229,8	orf, partial conserved hypothetical protein	spt:G
T4M33_2	151,0	GAMM1-like protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	gi 41
C4M44_9	126,3	Hypothetical protein.	spt:G
C1M14_1	312,0	hypothetical protein 154 - common tobacco chloroplast	pir A
C2M11_3	269,8	Expressed protein with MYB domain	sptn:
T3M42_6	163,9	hypothetical protein with Lys rich, Asn rich and NLS region (F4B14.210)	gi 74
C1M24_3	291,6	Elicitor-responsive gene-3 (RPP16) OSJNBa0081C01.14	sptn:
T1M14_2	204,8	Hypothetical protein (At5g37370)	spt:G
C4M24_2	131,2	unknown protein At2g47270	pir E
T2M41_6	139,3	NT7	prote
T4M14_2	181,4	Hypothetical protein.	spt:G
C4M14_4	185,8	Late embryogenesis abundant protein 5.	spt:G
C4M14_5	162,4	Plant protein of unknown function DUF247 At2g44930	pir T
C1M11_6	202,0	hypothetical protein At4g26550	
T1M34_1	342,4	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 216.	spt:G
C1M21_2	266,0	Embryo-abundant protein EMB (At2g41380)	spt:G
C3M11_3	222,1	Hypothetical protein with Brix domain (found in Peterpan like protein) At1g52930	spt:G

Annexe 12 (suite)

Protéine hypothétique 2/2

Code étiquette	Taille	Annotation	
T3M32_2	266,2	Hypothetical protein with Leucine Rich Repeat and Protein kinase domain (At1g14390)	spt:Q
C1M11_2	311,6	Hypothetical protein At2g15780 (Curedoxin & Plcyanin-like motif (ARF30?))	spt:Q
C1M33_2	225,4	Hypothetical protein At2g03441	spt:Q
T3M34_3	261,8	Hypothetical protein.DUF567 (At3g56180)	spt:Q
C3M11_1	393,8	ORF_with NLS-BP region	spt:P
T2M42_4	117,1	Hypothetical protein with zf-C3HC4; 1 motif At2g21560	spt:Q
T4M44_1	284,3	NBD like protein ATP/GTP binding site motif A (P-loop) with ABC transporter domain	spt:Q
T1M31_2	140,1	hypothetical protein with DUF760 domain (At1g48450)	spt:Q
T2M34_4	199,6	Hypothetical protein. At1g52780	spt:Q
C1M44_7	149,0	hypothetical protein (DUF341)s	pt:Q9
C3M43_2	185,8	unknown protein with VQ motif AT5g53830	spt:Q
T2M41_1	231,3	Hypothetical protein At3g29034	spt:Q
C2M31_2	142,6	Hypothetical protein.	spt:Q
C1M42_4	170,3	dehydration-responsive protein-related [Arabidopsis thaliana] putative ankyrin protein	ref N
T3M31_2	315,4	Hypothetical protein (At2g38000 protein).	spt:Q
T3M21_7	123,0	Putative Vip1 protein (Hypothetical protein with RRM; 1 motif) at1g14340	spt:Q
C3M13_2	169,5	hypothetical protein with RVE and RVT domains osjnba0068106.9.	spt:Q
C4M41_1	232,9	Hypothetical protein DUF231 domain	spt:Q
T3M41_4	172,3	Hypothetical protein with Glutaredoxin-related domain osjnba0015n08.14.	spt:Q
C2M22_5	133,2	Nli interacting factor phosphatase domain At1g29770	spt:Q
C1M44_8	142,9	hypothetical protein with FAR1 and Fnf_PMZ domains	spt:Q
C1M43_7	173,5	Probable disease resistance protein CC-NBS-LRR class), At5g66900	ref N
C4M13_1	258,7	Hypothetical protein with MA3 domain AT3g48390	spt:Q
C4M44_3	242,9	Hypothetical protein with (NLS_BP) Bipartite nuclear localization signal. At1g36320	spt:Q
C4M32_6	207,9	P0019D06.23 protein with MAM33 domain	spt:Q
C4M44_8		Hypothetical protein with Glycosyl transferase, family 2 motif	spt:Q

L'auxine est l'une des principales phytohormones qui assure la croissance de la plante en modulant la coordination et l'enchaînement précis de la division, de l'expansion et de la différenciation cellulaire. Malgré sa découverte ancienne, les voies de signalisation de l'auxine restent encore mal connues et peu de données sont disponibles sur la relation entre les gènes de réponse primaire et les mécanismes cellulaires induits par cette hormone. L'action de l'auxine se traduit par l'induction très rapide de réponses cellulaires et moléculaires, dépendantes de sa concentration et montrant une courbe effet-dose spécifique pour chacune d'elles. Sur la base de ces constats notre étude a eu pour objectif d'étudier les premières étapes du mode d'action de l'auxine à l'échelle cellulaire et moléculaire, afin de comprendre comment cette hormone induit autant d'effets pléiotropes. Ce travail a été mené sur les suspensions cellulaires de tabac BY-2, permettant d'enregistrer de manière précoce, en 24 h, des réponses cellulaires spécifiques aux concentrations d'auxine appliquées dans le milieu. Au cours de la première partie du travail, nous avons ainsi mis en évidence l'influence quantitative sur la turgescence et le grandissement cellulaire de faibles concentrations en auxine ainsi que l'effet des concentrations plus élevées sur la division cellulaire. Cette étude a été complétée par l'analyse du profil métabolique des composés solubles ainsi que par le suivi des modifications ultrastructurales des cellules BY-2 dans ces différentes conditions.

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ces comportements cellulaires, la deuxième partie du travail a consisté à comparer, par cDNA-AFLP l'expression des gènes des cellules BY-2 répondant aux différentes conditions auxiniques appliquées. Cette étude, menée en collaboration avec le Laboratoire "Plant System Biology" à l'Université de Gand, a révélé une cinquantaine d'étiquettes de gènes différentiellement exprimés dans les 6 premières heures après l'ajout d'auxine. Parmi celles-ci l'expression de 11 gènes a été validée par RT-PCR semi-quantitative et des expériences en présence de cycloheximide ont permis d'identifier au moins 2 gènes de réponse primaire à l'auxine. Une attention particulière a été portée sur l'un d'eux, C4M41-2, dont l'importance dans la régulation de la prolifération cellulaire induite par l'auxine est discutée.

Mots clés : auxine, cellules BY-2, division cellulaire, turgescence, gènes de réponse primaire.

Auxin is a major phytohormone which promotes plant development by coordinating cell division, cell expansion and cell differentiation. Although auxin was discovered long time ago, its signaling pathways are not well known and few data are available on the relationship between auxin primary responsive genes and cellular behaviour. Auxin triggers rapid cellular and molecular responses which depend on its concentration and follow a dose-response curve specific to each of them. Based on these observations, the aim of our project was to study of the early auxin-modulated cellular and molecular responses, in order to understand how this hormone could trigger so many pleiotropic effects. BY-2 cells were used as a cellular model enabling the record of early cellular responses, within 24 hours, according to auxin concentrations in culture medium. During the first part of this work we showed to the fore the quantitative influence of low auxin concentrations on turgor and cell expansion, and of higher concentrations on cell division. Moreover we carried out a metabolic profiling of soluble cellular components and we observed the ultrastructural modifications of BY-2 cells under these hormonal conditions.

To understand the molecular mechanisms involved in these cell behaviours, the second part of this work was devoted to a genome-wide cDNA-AFLP based transcriptome analysis of tobacco BY-2 cells, submitted to various auxin treatments. This study was performed in collaboration with the "Plant System Biology" laboratory of Ghent and has revealed about fifty gene tags displaying auxin-dependent differential expression pattern for the first 6 hours after auxin treatment. The validation by RT-PCR was done on 11 of these gene tags. Furthermore, cycloheximide experiments allowed to identify 2 primary auxin responsive genes and particularly C4M41-2, whose importance in the regulation of cell proliferation is discussed with respect to auxin action.

Key words: auxin, BY-2 cells, cell division, turgor, primary response genes.