

# THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de Recherche : **Biotechnologies Végétale et Microbienne, Biodiversité et Environnement**

Structure de Recherche : **Biotechnologie et Physiologie végétales**

Discipline : **Biologie**

Spécialité : **Génomique et Biotechnologie Végétale**

Présentée et soutenue le **17 octobre 2020** par :

**Sarah BOUZROUD**

**Etude physiologique et moléculaire de l'implication des Facteurs de Réponse à l'Auxine dans la réponse aux stress salin et hydrique chez la tomate (*Solanum lycopersicum L.*)**

## JURY

<b>Rachida HASSIKOU</b>	PES, Université Mohammed V - Rabat, Faculté des Sciences.	Présidente/Rapporteur
<b>Abdelaziz SMOUNI</b>	PH, Université Mohammed V - Rabat Faculté des Sciences.	Directeur de thèse
<b>Mohamed ZOUINE</b>	Maître des conférences (HDR), INPT-ENSAT de Toulouse	Co-directeur de thèse
<b>Zine El Abidine TRIQUI</b>	PES, Université Mohammed V - Rabat, Faculté des Sciences.	Rapporteur/Examineur
<b>Mohamed NHIRI</b>	PES, Université Abdelmalek Essaïedi, Faculté des Sciences et Techniques de Tanger.	Rapporteur/Examineur
<b>Najib BENDAOU</b>	PES, Université Mohammed V - Rabat, Faculté des Sciences	Examineur
<b>Faouzi BEKKAOU</b>	Directeur général de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Maroc	Invité

Année Universitaire : 2019-2020

### Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont été effectués dans le cadre d'une collaboration entre le Laboratoire de Biotechnologie et Physiologie Végétales de la Faculté des Sciences de Rabat et le Laboratoire de Génomique et Biotechnologie des Fruits de l'Ecole Nationale des Sciences Agronomiques de Toulouse (INP-ENSAT), sous la direction de Monsieur **Abdelaziz SMOUNI**, Professeur Habilité à la Faculté des Sciences de Rabat de l'Université Mohammed V-Rabat et Monsieur **Mohamed ZOUINE**, Maître des conférences (HDR) à l'Ecole Nationale des Sciences Agronomiques de Toulouse (INP-ENSAT). Ce projet a été financé par le programme de partenariat Hubert-Curien -Volubilis (MA / 12 / 280-27105PL) et par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Formation des Cadres du Maroc.

Je présente mes sincères remerciements à mon cher directeur de thèse, Monsieur **Abdelaziz SMOUNI**, Professeur de la Faculté des Sciences de Rabat et Responsable du Laboratoire de Biotechnologie et Physiologie Végétales, de m'avoir confié ce travail de recherche, d'avoir accepté de m'encadrer tout au long de ce projet. Je le remercie chaleureusement pour son encadrement, son accompagnement, son aide et ses conseils précieux, ses orientations pertinentes et pour les directives et les encouragements qu'il n'a cessé de prodiguer tout au long de ce travail. Sans votre aide, je n'aurais jamais dû continuer ma thèse et surtout dans des très bonnes conditions. Qu'il trouve dans cet humble travail l'expression de ma gratitude et mes remerciements.

Je présente mes remerciements les plus sincères à Monsieur **Mohammed ZOUINE**, Professeur à l'Ecole Nationale des Sciences Agronomiques de Toulouse et Vice-directeur du laboratoire de Génomique et Biotechnologie des Fruits de l'école Nationale des Sciences Agronomiques de Toulouse, mon encadrant au Laboratoire de Génomique et Biotechnologie des Fruits de Toulouse, pour sa sympathie, sa disponibilité, ses idées et conseils, ainsi que pour son aide précieuse. Je désire donc vous exprimer toute ma reconnaissance et mes remerciements les plus sincères.

Je remercie Madame **Rachida HASSIKOU**, Professeur de l'Enseignement Supérieur et Vice doyen chargée de la recherche à la Faculté des Sciences de Rabat d'avoir accepté de présider ce jury malgré ses préoccupations. Je lui adresse mes sentiments les plus respectueux. Je la remercie également d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **Mohamed NHIRI**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences et Techniques de Tanger- Université Abdelmalek Essaadi, d'avoir aimablement accepté d'être rapporteur et examinateur de ce travail de thèse et de participer au jury.

Mes remerciements se dirigent également vers Monsieur **Zine El Abidine TRIQUI**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat –Université Mohammed V, d'avoir aimablement accepté d'être rapporteur et examinateur de ce travail de thèse.

## Remerciements

---

Mes remerciements les plus chaleureux vont à Monsieur **Najib BENDAOU**, Professeur de l'Enseignement Supérieur, pour son attention de tout instant sur mes travaux, pour sa gentillesse remarquable et pour ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. Son énergie et sa confiance ont été des éléments moteurs pour moi. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec lui. Je le remercie vivement d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

J'exprime ma gratitude envers Monsieur **Faouzi BEKKAOUI**, Directeur de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA-Maroc) d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse malgré ses préoccupations.

Je tiens à présenter ma profonde gratitude à Monsieur **Mondher BOUZAYEN**, Directeur du Laboratoire de Génomique et Biotechnologie des Fruits de Toulouse, d'avoir accepté de m'accueillir durant les mois de stage dans son établissement, pour l'attention qu'il a portée à ce sujet et ses conseils et discussions. Je vous exprime ma gratitude et mes respects, Veuillez trouver ici mes remerciements les plus sincères.

J'ai pu travailler dans un cadre particulièrement agréable, grâce à l'ensemble des membres du laboratoire de Génomique et Biotechnologie des Fruits de Toulouse. Je saisis cette occasion pour les remercier pour leur bonne humeur, et leur disponibilité, gages d'un climat de travail de qualité.

J'adresse mes vifs remerciements à tous les membres du Laboratoire de Physiologie et Biotechnologies Végétales de la Faculté des Sciences de Rabat et en particulier à Pr **Mouna FAHR** et Pr **Abdelkarim GUEDIRA** pour leur disponibilité, leurs conseils et encouragements.

Ce travail n'aurait peut-être pas été supportable sans la folie ambiante alimentée par les membres du Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie Végétales de la Faculté des Sciences de Rabat ; plus particulièrement des professeurs, des techniciennes et les étudiants.

Mention spéciale à mes chères amies **Habiba BALAFREJ** et **Houda TAIMOURYA**, qui m'ont supporté tout au long de ma thèse. Très humblement, je voudrais vous dire merci pour votre soutien pendant mes périodes de doutes et pour vos multiples encouragements répétés. Vous avez su mettre en musique les paroles de ma composition scientifique.

## Dédicaces

*Afin d'être reconnaissante envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail de recherche, je dédie ce mémoire à :*

*A mes grands-parents paternels que vos âmes reposent en paix.*

*A Papi, qui ne peut partager avec moi ces moments exceptionnels de ma vie. J'espère que tu es fier de moi*

*A Muma,*

*J'espère que vous trouverez à travers ce mémoire l'expression de mon immense gratitude et mon plus grand respect.*

*A vous mes très chers parents ;*

*Magnifique modèle de labour et de persévérance. Ce travail est le fruit de la rigueur de votre éducation, j'espère que vous y trouverez toute ma reconnaissance et tout mon amour.*

*Mes défunts oncles Aziz et Essaïed pour leurs encouragements et soutien.*

*Mes tantes Nadia, Meryem et Khadija et leurs époux Mohamed Erradi, Si Taieb et Moulay Ismail, pour leur soutien, leur amour aussi pour les rires et les anecdotes autour de « la tomate stressée ».*

*Tonton Fayçal pour son soutien et épaulement.*

*A ma soeur Hasna et son époux Thami qui avec cette question récurrente, « Tu finis quand. ? Alors c'est pour quand cette soutenance ? », bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final.*

*A mon petit frère Bibo, enfin grand maintenant, pour ses encouragements et son omniprésence*

*A mes chers cousins et cousines: Kim, Hazza et Zenouba.*

*Sans oublier la joie qui éclaire ma vie ; mes deux adorables anges Haroune & Med Ali.*

*A ma deuxième Famille, mes chères Biba et Houda en souvenir des beaux et des durs moments passés ensemble.*

### Résumé

La croissance et le développement des plantes sont souvent entravés par une multitude de stress environnementaux. La compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires déployés par les plantes en réponse à ces stress est cruciale pour l'amélioration de la survie et du rendement des plantes. L'auxine joue un rôle prépondérant dans la croissance et le développement des plantes et dans l'interaction des plantes avec leur environnement. Cependant, son implication dans le processus de réponse des plantes aux stress abiotiques reste peu étudiée. Les facteurs de réponse à l'auxine sont des facteurs clés dans la voie de signalisation auxinique. Ces facteurs de transcription assurent l'activation ou la répression des gènes de réponse à l'auxine.

Afin de mieux comprendre l'implication de l'auxine dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques, une analyse d'expression des ARFs en réponse aux stress a été réalisée chez la tomate. L'analyse *in silico* des données RNAseq extraites de la plate-forme « TomExpress » a montré que l'expression de plusieurs ARFs est régulée en réponse à une infection de type bactérienne ou virale. L'analyse *in silico* des promoteurs des 22 ARFs a révélé que ces régions présentent plusieurs éléments *cis*-régulateurs spécifiques à la réponse aux stress biotiques et abiotiques. Par ailleurs, l'analyse par PCR quantitative de l'expression des ARFs en conditions de stress salin, hydrique et d'hypoxie a révélé que la majorité de ces gènes s'expriment de manière différentielle dans les tissus foliaires et racinaires.

Une analyse fonctionnelle du gène *SIARF4* a été réalisée en vue d'évaluer son implication dans la réponse aux stress hydrique et salin. Cette étude a montré que la sous-expression de *SIARF4* résulte en un meilleur développement racinaire, une accumulation importante des sucres solubles et une teneur élevée en chlorophylle en conditions de stress. Les plantes transgéniques sous exprimant le gène *SIARF4* (*ARF4-as*) présentent un enroulement des feuilles, une faible conductance stomatique associée à une nette augmentation de la teneur relative en eau et à une hausse de la teneur en ABA. Chez ce mutant, l'augmentation de la teneur en ABA est positivement corrélée avec l'activation des gènes de biosynthèse et la répression des gènes de catabolisme de cette hormone. Par ailleurs, l'expression des gènes codant pour les antioxydants est induite de manière significative chez les plantes *ARF4-as*. Ainsi, les données présentées dans ce travail suggèrent fortement l'implication de l'auxine dans la réponse aux stress abiotiques et soulignent l'implication de l'*ARF4* en tant qu'acteur clé dans l'acquisition de la tolérance au stress salin et hydrique.

**Mot-clés:** Auxine, Facteurs de réponse à l'auxine, *ARF4*, stress salin, stress hydrique, *Solanum lycopersicum*, tolérance.

### Abstract

Survival biomass production and crop yield are heavily constrained by a wide range of environmental stresses. Understanding physiological and molecular basis of plant response and tolerance to environmental stresses is important to improve plant survival, crop yield and quality. Auxin plays an important role in plant growth, development and interaction with encountering environment. By contrast, its role in stress responses remains so far poorly studied. Auxin Response Factors play a key role in auxin signaling pathway by ensuring the transcriptional activation or repression of auxin-responsive genes.

As a mean to gain more insight on auxin involvement in a set of biotic and abiotic stress responses in tomato, the present study uncovers the expression pattern of *SIARF* genes in tomato plants subjected to biotic and abiotic stresses. *In silico* mining of the RNAseq data available through the public TomExpress web platform, identified several *SIARFs* as responsive to various pathogen infections induced by bacteria and viruses. Accordingly, sequence analysis of the 5' regulatory region of these *SIARFs* revealed the presence of several *cis*-acting elements associated with biotic and abiotic stress response. Moreover, quantitative qPCR expression analysis revealed that many *SIARFs* were differentially expressed in tomato leaves and roots under salt, drought and flooding stress conditions.

Functional analysis of *SIARF4* gene was performed in order to evaluate its involvement in plant response to salt and drought stresses. Our results showed that the down-regulation of this gene improves tomato tolerance to salt and drought stress by promoting root development and density, increasing soluble sugars content and maintaining chlorophyll content at high levels in stress conditions. Besides that, transgenic plants underexpressing *SIARF4* displayed a leaf curl phenotype, a low stomatal conductance coupled with an increase in leaf relative water content and ABA content under normal and stressful conditions. This increase in ABA content was correlated with the activation of ABA biosynthesis genes and the repression of ABA catabolism genes. *cat1*, *Cu/ZnSOD* and *mdhar* genes were upregulated in *ARF4*-as plants suggesting that *ARF4*-as mutant is more tolerant to salt and water stress. The data presented in this work strongly support the involvement of auxin in stress responses and underlines the involvement of *ARF4* as a key actor in tomato tolerance to salt and drought stresses.

**Keywords:** Auxin, auxin response factors, *ARF4*, tolerance, salt stress, *Solanum lycopersicum*, water stress.

## Productions scientifiques

### Articles scientifiques internationaux

**Bouzroud S., Gasparini K., Hu G., Barbosa M., Luan B., Fahr M., Bendaou N., Bouzayen M., Zsögön A., Smouni A. and Zouine M.** 2020. Down-regulation and loss of Auxin Response Factor 4 function by CRISPR-Cas9 alters plant growth, stomatal functions and improves tomato tolerance to salinity and water deficit. *Genes*.

**Bouzroud S., Fahr M., Bendaou N., Bouzayen M., Zouine M., Smouni A.** 2018. *SIARF4* under expression improves tolerance to salinity in tomato (*Solanum lycopersicum*). 2018. *International Journal of Agricultural and Natural Sciences*.

**Bouzroud S., Gouia S., Hu N., Bernadac A., Mila I., Bendaou N., Smouni A., Bouzayen M., and Zouine M.** 2018. Auxin Response Factors are potential mediators of auxin action in tomato response to biotic and abiotic stress. 2018. *PLOSone*.

### Communications orales

**Bouzroud S., Fahr M., Bendaou N., Bouzayen M., Zouine M. and Smouni A.** Underexpression of Auxin Response Factor *SIARF4* increases tomato tolerance to salinity and water deficit. 1ère édition des Doctoriales du Centre BIOBIO, 25-26 Décembre 2018, Rabat, Morocco (Pitch).

**Elmamoun I., Bouzroud S., Mila I., Fahr M., Bendaou N., Bouzayen M., Smouni A. and Zouine M.** AUXIN RESPONSE FACTORS *ARF4* and *ARF2* are potential mediators of auxin action in salt and drought stress responses in tomato. 1<sup>st</sup> International Congress of Green Biotechnology for sustainable Agriculture, November 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup>, 2018, Taroudant, Morocco.

**Benjelloun J., Taoufyq A., Bouzroud S., Triqui Z., Smouni A. and Guedira A.** Optimisation de la germination et la régénération *in vitro* de *Cycas revoluta*. 1<sup>st</sup> International Congress of Green Biotechnology for sustainable Agriculture, November 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup>, 2018, Taroudant, Morocco.

**Bouzroud S., Mila I., Bernadac A., Fahr M., Bendaou N., Bouzayen M., Smouni A. and Zouine M.** Auxin signaling pathway as a potential strategy to improve tomato tolerance to salinity and water deficit. 4<sup>th</sup> International Agriculture Congress, July 5-8, 2018, Nevsehir, Turkey.

**Bouzroud S., Sagar M., Bendaou A., Bouzayen M., Smouni A. and Zouine M.** Auxin signaling pathway as a potential strategy to improve salt and drought tolerance and fruit quality in tomato. Congrès International Biotechnologie au Service de la Société "BioSeS 2015". 22-24 Octobre 2015, Fés, Maroc.

**Bouzroud S., Sagar M., Bernadac A., Bendaou N., Bouzayen M., Smouni A. and Zouine M.** Auxin signaling as a potential target to improve salt and drought tolerance and fruit quality in tomato. 4<sup>th</sup> annual conference COST FA1106 “QualityFruit”, September 27-30, 2015, Lisbon, Portugal.

**Bouzroud S., Gouia S., Hu N., Sagar M., Smouni A., Zouine M., Bernadac A., Bendaou N. and Bouzayen M.** Toward the understanding of the auxin signaling pathway implication in the response to abiotic stresses in tomato. Doctoriales, January 15-16, 2013, Rabat, Morocco.

### **Communications affichées**

**Benjelloun J., Taoufyq A., Bouzroud S., Triqui Z., Smouni A. and Guedira A.** Germination et la régénération *in vitro* de *Cycas revoluta*. 7<sup>ème</sup> Symposium International sur les plantes aromatiques et médicinales. 18 au 20 Avril 2019, El Jadida, Maroc.

**Bouzroud S., Fahr M., Bendaou N., Bouzayen M., Zouine M. and Smouni A.** Underexpression of Auxin Response Factor *SIARF4* increases tomato tolerance to salinity and water deficit. 1<sup>ère</sup> édition des Doctoriales du Centre BIOBIO, 25-26 Décembre 2018, Rabat, Morocco.

**Bouzroud S., Sagar M., Bernadac A., Bendaou N., Bouzayen M., Smouni A. and Zouine M.** Auxin signaling pathway as a potential strategy to improve salt and drought stress tolerance and fruit quality in tomato. 1<sup>er</sup> congrès international Biotechnologie au service de la société, October 22-24, 2015, Fes, Morocco.

**Bouzroud S., Gouia S., Hu N., Sagar M., Smouni A., Zouine M., Bernadac A., Bendaou N. and Bouzayen M.** Toward the understanding of the auxin signaling pathway implication in the response to abiotic stresses in tomato. Doctoriales, January 15-16, 2013, Rabat, Morocco.



Liste des Figures

**Figure 1** Schéma général des mécanismes de réponse aux stress abiotiques chez les plantes. Adaptée à partir de (Lugan, 2008)..... 7

**Figure 2** Schéma du mécanisme global de la réponse au stress abiotique chez les plantes. Adapté à partir de (Wang et al., 2016)..... 9

**Figure 3** Structure de l’AIA. (A) Structure chimique de l’AIA en conformation planaire montrant le noyau indolique sur lequel s’insère latéralement un groupement carboxyl en position terminale, (B) squelette carboné de la molécule d’AIA montrant la molécule d’azote en bleu et celle de l’oxygène en rouge (Ljung, 2013)..... 25

**Figure 4** La voie de biosynthèse de l’auxine dépendante du Tryptophane (Mashiguchi et al., 2011). . 27

**Figure 5** Modèle de transport intercellulaire de l’auxine (adaptée à partir de Friml, 2010). ..... 29

**Figure 6** Schéma représentant le complexe SCF. Le complexe SCF contient une protéine RBX1 (RING-box1), une protéine CUL1 (cullin 1), une protéine SKP1 (protéine associée à la phase-kinase S1) et une protéine hébergeant un domaine F-box, qui lie directement SKP1. La protéine F-box est composée des domaines de liaison à la protéine LRR (leucine-rich repeat) qui se lie aux substrats cibles pour la dégradation (Magori et Citovsky, 2011)..... 35

**Figure 7** Structure des ARFs chez la tomate (Zouine et al., 2013)..... 41

**Figure 8** Structure et composition des différentes régions des ARFs rencontrés chez *Arabidopsis thaliana*. Les ARFs de type activateur présentent une région centrale riche en Glutamine (Q), Sérine (S) et Leucine (L). Par contre, ceux qui présentent une région centrale riche respectivement en Sérine (S), Proline (P) et Leucine (L) sont des facteurs de transcription de type répresseur. At-ARF23 est qualifié de pseudogène (Guilfoyle and Hagen, 2007). ..... 42

**Figure 9** Les éléments clés dans la perception et la transduction du signal auxinique. En absence de l’auxine (A), les protéines Aux/IAA forment des multimères avec les ARFs et recrutent les protéines TOPLESS au niveau de la chromatine. La présence de l’auxine en fortes concentrations (B) déclenche l’ubiquitination et la dégradation des Aux/IAA par le complexe SCFTIR1/AFB et le protéasome 26S ( adaptée à partir de Li et al., 2016) ..... 46

**Figure 10** Composition de la matière sèche d’un fruit de tomate. La matière sèche représente environ 5% de la masse totale du fruit. Elle est composée majoritairement de sucres (48% de la matière sèche totale, principalement sous forme fructose et glucose). Adaptée à partir de (Davies and Hobson, 1981) ..... 49

**Figure 11** Courbe-étalon du saccharose employé pour la quantification des sucres solubles totaux selon Dubois, 1956. .... 63

**Figure 12** Représentation schématique de l’ensemble des éléments cis-régulateurs rencontrés au niveau de la région promotrice des 22 SIARFs rencontrés chez la tomate. Les séquences des motifs correspondant à ces éléments sont décrites au niveau du Tableau 1. .... 70

**Figure 13** Analyse in silico de l’expression des SIARFs au niveau des feuilles de tomate exposées à différents types de stress biotiques : Flagelline, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae* DC3000, *Pseudomonas fluorescens*, *Agrobacterium tumefaciens* et virus de TYLCV. Les résultats présentés ont été extraits de la base de données RNA-seq TOMEXPRESS (<http://gbf.toulouse.inra.fr/tomexpress>). 72

**Figure 14** Représentation schématique de l’ensemble des éléments cis-régulateurs associés à la réponse aux stress abiotiques retrouvés au niveau de la région promotrice des 22 SIARFs rencontrés chez la tomate. Les séquences des motifs correspondant à ces éléments sont décrites au niveau du Tableau 1. .... 81

**Figure 15** Expression des SIARFs dans les feuilles et les racines exposées au stress salin. Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ). ..... 82

**Figure 16** Expression des SIARFs dans les feuilles et les racines exposées au déficit hydrique. Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ) ..... 83

**Figure 17** Expression des SIARFs dans les feuilles et les racines exposées au stress d’anoxie. Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ). ..... 84

**Figure 18** L’expression du précurseur du miR160 et de SIARF10A en conditions de stress salin et hydrique. Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ). ..... 89

**Figure 19** L’expression des précurseurs du miR167 (miR167a, miR167b, miR167c et miR167d) et de SIARF8A en conditions de stress salin et hydrique. Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ). ..... 90

**Figure 20** Structure génomique du gène SI-ARF4 (A). La barre grise représente la région promotrice, les boîtes violettes sont les exons, la boîte bleue est la région non traduite (UTR), la boîte saumon représente le domaine DBD, la boîte jaune est le domaine III et la boîte verte représente le domaine IV. Les éléments putatifs agissant en cis trouvés dans la région promotrice et leurs positions sont indiqués en détail en (B). ..... 95

**Figure 21** Expression du *SIARF4* révélée par PCR quantitative au niveau : (A) des feuilles et (B) des racines après 2 heures et 24 heures d’application du stress salin. Le stress salin a été réalisé par arrosage des plantes avec une solution de NaCl à 250 mM. Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ). ..... 96

**Figure 22** Expression du *SIARF4* révélée par PCR quantitative au niveau : (A) des feuilles et (B) des racines après 48 heures et 5 jours d’application du stress salin. Le stress hydrique a été réalisé par arrêt d’arrosage des plantes. Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ). .... 97

**Figure 23** Poids frais de la partie aérienne et racinaire chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl. Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, ARF4-as et ARF4-ox désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l’ARF4. .... 100

**Figure 24** Poids frais de la partie aérienne et racinaire chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de PEG 20000. Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, ARF4-as et ARF4-ox désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l’ARF4. .... 101

**Figure 25** Poids sec de la partie aérienne et racinaire chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl. Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, ARF4-as et ARF4-ox désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l’ARF4. .... 102

**Figure 26** Poids sec de la partie aérienne et racinaire chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de PEG 20000. Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, ARF4-as et ARF4-ox désignent

respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'ARF4. .... 103

**Figure 27** Longueur de la racine principale chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl (à gauche) ou de PEG (à droite). Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, ARF4-as et ARF4-ox désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'ARF4. .... 105

**Figure 28** Densité racinaire chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl (à gauche) ou de PEG (à droite). Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, ARF4-as et ARF4-ox désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'ARF4. .... 106

**Figure 29** Taux de la chlorophylle a chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl (à gauche) ou de PEG (à droite). Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, ARF4-as et ARF4-ox désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'ARF4. .... 108

**Figure 30** Taux de la chlorophylle b chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl (à gauche) ou de PEG (à droite). Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, ARF4-as et ARF4-ox désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'ARF4. .... 109

**Figure 31** Teneur totale en chlorophylle chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl (à gauche) ou de PEG (à droite). Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT ARF4-as et ARF4-ox désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'ARF4. .... 110

**Figure 32** Taux des sucres solubles au niveau des feuilles chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl (à gauche) ou de PEG (à droite). Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, ARF4-as et ARF4-ox désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'ARF4. .... 112

**Figure 33** Taux des sucres solubles au niveau des racines chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl (à gauche) ou de PEG (à droite). Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, ARF4-as et ARF4-ox désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'ARF4. .... 113

**Figure 34** Expression de LeSUT1; gène codant pour un transporteur de sucres chez le WT, le mutant ARF4-as et le mutant ARF4-ox en réponse aux stress salin(A) et hydrique (B). Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ). .... 115

**Figure 35** Conductance stomatique chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl (à gauche) ou de PEG (à droite). Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$

écart type de douze répétitions indépendantes. Pour chaque concentration, la lignée marquée par une \* est significativement différente des autres lignées ( $p < 0,05$ ). WT, ARF4-as et ARF4-ox désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'ARF4. .... 117

**Figure 36** La teneur relative en eau déterminée en fonction du temps chez le WT, le mutant ARF4-as et le mutant ARF4-ox. .... 118

**Figure 37** Taux de l'ABA dans les feuilles des plantes WT et ARF4-as cultivées en conditions de stress salin (à gauche) et hydrique (à droite). Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de trois répétitions indépendantes. .... 120

**Figure 38** Expression des gènes de biosynthèse et de dégradation de l'ABA chez le WT et les mutants ARF4-as et ARF4-ox en conditions de stress salin et hydrique. Expression au niveau des feuilles (A) et des racines (B) après 2 heures d'application du stress salin, au niveau des feuilles (C) et des racines (D) après 24 heures d'application du stress salin, au niveau des feuilles (E) et des racines (F) après 48 heures d'application du stress hydrique. Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ). .... 122

**Figure 39** Expression des gènes impliqués dans le processus de détoxification des ROS chez le WT et les mutants ARF4-as et ARF4-ox en conditions de stress salin et hydrique. Expression au niveau des feuilles (A) et des racines (B) après 2 heures d'application du stress salin, au niveau des feuilles (C) et des racines (D) après 24 heures d'application du stress salin, au niveau des feuilles (E) et des racines (F) après 48 heures d'application du stress hydrique. Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ). .... 126

**Figure 40** Expression de LeNHX1; gène codant pour un transporteur d'ions chez la lignée sauvage WT, le mutant ARF4-as et le mutant ARF4-ox en réponse aux stress salin(A) et hydrique (B). Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ). .... 129

Liste des photos

**Photo 1** Diversité morphologique de la tomate (Anonyme, 2016). ..... 47

**Photo 2** Comparaison de la variété de tomate naine MicroTom avec d'autres variétés utilisées au laboratoire. Les variétés représentées sont : (MT) Micro-Tom, Ailsa Craig (A), Rutgers (R) et UC-82(U) (Martí et al., 2006)..... 53

**Photo 3** Base de données The Sol Genomics Network (SGN) plateforme dédiée à la biologie des Solanaceae (<https://solgenomics.net/>). ..... 54

**Photo 4** Plateforme des données RNA-seq publiques- TomExpress développée par le laboratoire de Génomique et Biotechnologie des Fruits de Toulouse (<http://gbf.toulouse.inra.fr/tomexpress/www/welcomeTomExpress.php>). ..... 56

**Photo 5** Le poromètre SC1 employé pour la mesure de la conductance stomatique au niveau des feuilles. .... 64

**Photo 6** Expression tissulaire du gène GUS dirigé par le promoteur synthétique de réponse à l'auxine DR5 observée chez des plantes de 3 semaines en présence de stress salin ou hydrique. Le stress salin a été effectué par addition de 250 mM de NaCl au milieu de culture hydroponique. Le stress hydrique a été réalisé par ajout de 15% de PEG 20 000 à la solution nutritive. Les flèches en noir montrent la localisation de l'activité du gène GUS dans les différents tissus analysés. .... 77

**Photo 7** Expression tissulaire du gène GUS dirigé par le promoteur du gène SIARF8A observée chez des plantes de 3 semaines en présence de stress salin ou hydrique. Le stress salin a été effectué par addition de 250 mM de NaCl au milieu de culture hydroponique. Le stress hydrique a été réalisé par ajout de 15% de PEG 20 000 à la solution nutritive. Les flèches en noir montrent la localisation de l'activité du gène GUS dans les différents tissus analysés. .... 86

**Photo 8** Expression tissulaire du gène GUS dirigé par le promoteur du gène SIARF10A observée chez des plantes de 3 semaines en présence de stress salin ou hydrique. Le stress salin a été effectué par addition de 250 mM de NaCl au milieu de culture hydroponique. Le stress hydrique a été réalisé par ajout de 15% de PEG 20 000 à la solution nutritive. Les flèches en noir montrent la localisation de l'activité du gène GUS dans les différents tissus analysés. .... 87

**Photo 9** Phénotype des mutants ARF4-as. (A) plantes âgées de 6 semaines de type sauvage (WT) et de type ARF4-as (AS). (B) aspect des feuilles chez les plantes de type sauvage et les mutants ARF4-as (enroulées), (C) fruits issus de plantes de type sauvage et du mutant ARF4-as (présentant le phénotype « Dark green » avec une augmentation du taux de la chlorophylle au niveau du fruit) (Sagar et al., 2013). ..... 93

**Photo 10** Expression tissulaire du gène GUS dirigé par le promoteur du gène SIARF4 observée chez des plantes de 3 semaines en présence de stress salin ou hydrique. Le stress salin a été effectué par addition de 250 mM de NaCl au milieu de culture hydroponique. Le stress hydrique a été réalisé par ajout de 15% de PEG 20 000 à la solution nutritive. Les flèches en noir montrent la localisation de l'activité du gène GUS dans les différents tissus analysés. .... 98

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1</b> Les éléments <i>cis</i> -régulateurs rencontrés au niveau de la région promotrice des SIARFs. ..	55
<b>Tableau 2</b> Séquences nucléotidiques des différentes amorces employées pour l'amplification des ARFs et des marqueurs de stress utilisés. ....	59
<b>Tableau 3</b> Séquences nucléotidiques des différentes amorces employées pour l'amplification des précurseurs de miRNA et de leurs ARFs cibles .....	60
<b>Tableau 4</b> Concentrations utilisées pour la courbe-étalon du saccharose selon Dubois, 1965.....	63
<b>Tableau 5</b> Séquences nucléotidiques des différentes amorces employées pour l'amplification des gènes codant pour les antioxydants ( <i>Cat1</i> , <i>mdhar</i> et <i>SOD</i> ), des gènes impliqués dans le transport ionique ( <i>LeNHX1</i> ) et des sucres ( <i>LeSUT1</i> ) ainsi que les gènes de biosynthèse et de dégradation de l'ABA....	66

---

---

### Liste des abréviations

<b>AAPK</b>	ABA-Activated Protein Kinase
<b>ABA</b>	Acide Abscisique
<b>ABCB/MDR</b>	ATP-binding Casette de Type B/Multidrug Resistance/Phosphoglycoprotein
<b>ABP1</b>	Auxin Binding Protein 1
<b>ACC</b>	Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique
<b>ACO1</b>	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1
<b>ADNc</b>	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
<b>AFB</b>	Auxin Receptor F-Box
<b>AIA</b>	Acide Indole-3- acétique
<b>ANA</b>	Acide Naphtalène Acétique
<b>AP2/ERF ou APETALA</b>	Ethylene responsive-element binding factors
<b>APX</b>	Ascorbate Peroxydase
<b>ARF</b>	Auxin Response Factor
<b>ARF4-as</b>	<i>ARF4</i> -antisens
<b>ARF4-ox</b>	<i>ARF4</i> -overexpressed
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>AsA</b>	Ascorbate
<b>ASK1</b>	Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1
<b>Aux/AIA</b>	Auxine/Acide indole-3-acétique
<b>Aux/LAX</b>	Auxin/ Like AUX1
<b>AuxRE</b>	Auxin Response Element
<b>BAC</b>	Bacterial Artificial Chromosome
<b>bZIP</b>	Basix-domain leucine zipper
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CBP1</b>	C-terminal Peptide Binding Protein 1
<b>CDPK/CPK</b>	Calcium Dependent Protein Kinase
<b>CI7</b>	Cold inductible 7
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de Carbone
<b>CTLH</b>	C-Terminal to Lissencephaly Homology
<b>Cu</b>	Cuivre
<b>CUL1</b>	Cullin 1

## Liste des abréviations

---

<b>DBD</b>	DNA Binding Domain
<b>DCL4</b>	DICER-LIKE4
<b>DHAR</b>	Déhydroascorbate réductase
<b>dNTP</b>	Désoxynucléotide
<b>DPB</b>	Protéine de dimérisation B
<b>DREB</b>	Dehydration Responsive Element Binding
<b>E2FC</b>	E2 promoter Binding Factor C
<b>EAR</b>	Ethylene Response Factor-associated amphiphilic repression
<b>ERF</b>	Ethylene Response Factor
<b>EST</b>	Expressed Sequence Tag
<b>ETC</b>	Electron Transport Chain
<b>Fe</b>	Fer
<b>Flg</b>	Flagelline
<b>FT</b>	Facteur de transcription
<b>GB</b>	Glycine Bétaine
<b>GH3</b>	Gretchen Hagen 3
<b>GPX</b>	Glutathion peroxydase
<b>GR</b>	Glutathion réductase
<b>GST</b>	Glutathion S transférase
<b>GUS</b>	Béta-glucuronidase
<b>HK1</b>	Mitogen activated protein kinase
<b>HLH</b>	Hélice Bouclé Hélice
<b>HSP</b>	Heat shock protein
<b>HTH</b>	Hélice Tour Hélice
<b>IAM</b>	Indole-3- acétamide
<b>IAOx</b>	Indole -3 acétaldoxine
<b>IP3</b>	Inositol triphosphate
<b>IPA</b>	Acide Indole-3-pyruvique
<b>JA</b>	Acide jasmonique/ Jasmonates
<b>LEA</b>	Late Embryogenesis Abundant
<b>LEC</b>	Leafy Cotyledon
<b>LRR1</b>	Leucine Rich Repeat Protein1
<b>LRR-RLKL</b>	leucine-rich repeat receptor-like protein kinase
<b>MAPK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase



## Liste des abréviations

---

<b>MDHAR</b>	Monodehydroascorbate Réductase
<b>MeJA</b>	Méthyl Jasmonate
<b>MIP</b>	Major Intrinsic Protein
<b>miRNA</b>	microARN
<b>Mn</b>	Manganèse
<b>MS</b>	Murashige and Skoog
<b>MYB</b>	Myeloblastosis oncogene
<b>MYC</b>	Myelocytomatosis oncogene
<b>NADP+</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
<b>NCED</b>	9-cis-époxy-caroténoïde dioxygénase
<b>OST1</b>	Open Stomata 1
<b>P5CR</b>	Pyrroline-5- carboxylase réductase
<b>P5CS</b>	Pyrroline-5- carboxylase synthase
<b>PCD</b>	Mort programmée des cellules
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PDC1</b>	Pyruvate Decarboxylase 1
<b>PF, PS, PT</b>	Poids frais, Poids sec, Poids à la turgescence
<b>PIF</b>	Phytochrom Interacting Factor
<b>PIN</b>	PIN-formed
<b>PIP</b>	Plasma Intrinsic Protein
<b>PLA,PLC,PLD</b>	Phospholipases A, C, D
<b>POD</b>	Peroxydase
<b>PSI, PSII</b>	Photosystem I, II
<b>PYL</b>	Pyrobactin Resistance
<b>QPCR</b>	Quantitative PCR
<b>RBX1</b>	Ring Box Protein 1
<b>RDR6</b>	RNA-DEPENDANT RNA POLYMERASE6 (RDR6)
<b>RLK</b>	Receptor Like Kinase
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>RT</b>	Reverse Transcriptase
<b>RUB</b>	Rubredoxin
<b>RWC</b>	Relative Water Content
<b>SA</b>	Acide Salicylique
<b>SAM</b>	S-adénosyl-L-méthionine

## Liste des abréviations

---

<b>SAUR</b>	Small Auxin Up RNA
<b>SAV</b>	Shade Avoidance Response
<b>SCF</b>	Skp, Cullin, F-box containing complex
<b>SGN</b>	Solanaceae Genomic Network
<b>SHI-STY</b>	Short Internodes/Stylish
<b>SKEWED5 (SKU5)</b>	Monocopper oxidase-like protein
<b>SKP1</b>	S-phase Kinase Protein 1
<b>SKP2A</b>	S-Phase-Kinase-associated Protein 2A
<b>SLAC1</b>	Slow Anion Channel Associated 1
<b>SLN1</b>	Histidine Kinase transmembranaire
<b>SOD</b>	Superoxide dismutase
<b>SOS</b>	Salt Overly Sensitive
<b>SSK1</b>	Suppressor of sensor kinase 1
<b>SUT1</b>	Sucrose transporter1
<b>TAA</b>	Tryptophan Aminotransférase of <i>Arabidopsis</i>
<b>TIGR</b>	The Institute for Genomic Research
<b>TIP</b>	Tonoplast Intrinsic Protein
<b>TIR1</b>	Transport Inhibitor Receptor 1
<b>TPL</b>	TOPLESS
<b>TPP</b>	Tréhalose-6- phosphate phosphatase
<b>TPS</b>	Tréhalose-6-phosphate synthase
<b>Trp</b>	Tryptophane
<b>TYLCV</b>	Tomato Yellow Leaf Curl Virus
<b>Ub</b>	Ubiquitine
<b>WT</b>	Wildtype
<b>YPD1</b>	Tyrosine phosphatase Dependent 1
<b>Zn</b>	Zinc

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
Productions scientifiques	
Liste des Figures	
Liste des photos	
Liste des Tableaux	
Table des matières	
Introduction Générale.....	1
Chapitre I Revue Bibliographique.....	5
I- Les plantes face aux stress abiotiques .....	6
1. Mécanismes moléculaires de réponse aux stress abiotiques .....	7
1.1. La perception du signal du stress .....	8
1.2. La transduction du signal du stress .....	8
1.2.1. <i>Le calcium</i> .....	9
1.2.2. <i>Les protéines kinases dépendantes de calcium</i> .....	10
1.2.3. <i>La voie « Salt Overly Sensitive »</i> .....	10
1.2.4. <i>Les espèces réactives d'oxygène</i> .....	11
1.3. La régulation transcriptionnelle .....	12
1.4. La détoxification des espèces réactives d'oxygène .....	13
1.4.1. <i>La Catalase</i> .....	13
1.4.2. <i>Le superoxyde dismutase</i> .....	14
1.4.3. <i>Le monodéhydroascorbate réductase</i> .....	14
1.5. L'ajustement osmotique- accumulation des solutés compatibles .....	15
1.5.1. <i>Les sucres et dérivés</i> .....	15
1.5.2. <i>La proline</i> .....	15
1.5.3. <i>La glycine bêtaïne</i> .....	16
1.5.4. <i>Les polyamines</i> .....	17
1.6. La synthèse des protéines chaperonnes.....	17
1.6.1. <i>Les protéines de choc thermique « Heat-shock proteins »</i> .....	17
1.6.2. <i>Les protéines « Late Embryogenesis abundant »</i> .....	18
1.7. Le transport d'eau et des solutés .....	18
2. Les phytohormones- molécules clés dans la réponse aux stress abiotiques.....	19

2.1.	L'acide abscissique .....	20
2.2.	L'éthylène .....	21
2.3.	L'acide salicylique .....	22
2.4.	Les jasmonates .....	23
2.5.	L'auxine .....	24
II.	L'auxine : biosynthèse, transport et signalisation .....	24
1.	La biosynthèse de l'auxine .....	25
1.1.	La voie de biosynthèse d'auxine indépendante de tryptophane.....	26
1.2.	Les voies de biosynthèse d'auxine dépendantes de tryptophane .....	26
1.3.	La localisation de la biosynthèse de l'auxine .....	27
1.4.	La régulation de la biosynthèse de l'auxine.....	28
2.	Le transport de l'auxine.....	28
3.	Rôles de l'auxine .....	30
3.1.	Rôles de l'auxine dans la plante.....	30
3.2.	L'auxine et la réponse aux stress abiotiques.....	30
4.	La perception de l'auxine .....	32
4.1.	Le récepteur auxinique : AUXIN BINDING PROTEIN 1 .....	32
4.1.1.	<i>Structure du récepteur « Auxin Binding Protein 1 » .....</i>	32
4.1.2.	<i>Fonctions de la protéine « Auxin Binding Protein 1 » .....</i>	33
4.1.3.	<i>La voie de signalisation de la protéine « Auxin Binding Protein 1 ».....</i>	33
4.2.	La voie S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN .....	34
4.3.	La voie de signalisation TIR 1/AFB .....	34
4.3.1.	<i>Structure du TIR1 et des AFB.....</i>	34
4.3.2.	<i>Les fonctions des protéines TIR1 et AFBs .....</i>	36
4.3.2.1.	<i>La fonction des protéines TIP1 et AFB1-3 .....</i>	36
4.3.2.2.	<i>La fonction des protéines AFB4-5 .....</i>	36
4.3.3.	<i>La voie de signalisation TIR1/AFBs .....</i>	37
5.1.	Les protéines Aux/AIA .....	38
5.1.1.	<i>Structure des Aux/AIA .....</i>	38
5.1.2.	<i>Fonctions des protéines Aux/AIA .....</i>	39
5.2.	Les facteurs de réponse à l'auxine (ARF).....	40
5.2.1.	<i>Structure des ARFs .....</i>	41
5.2.2.	<i>Fonctions des ARFs .....</i>	43
5.2.3.	<i>La régulation des ARFs .....</i>	44

5.3. Mécanisme de signalisation auxinique- Interaction entre les ARFs et les Aux/AIA .....	45
III. La tomate : Plante modèle .....	47
1. Intérêt économique .....	48
2. Intérêt nutritionnel .....	48
3. Intérêt scientifique .....	49
4. La tomate et les stress abiotiques .....	50
Chapitre II Matériel et Méthodes .....	52
I. Matériel végétal .....	53
II. Méthodes .....	54
1. Etude de l'implication des ARFs dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques....	54
1.1. Analyse <i>in silico</i> des promoteurs des ARFs à la recherche de motifs associés aux stress et à la réponse aux phytohormones .....	54
1.2. Expression des ARFs en conditions de stress biotiques .....	55
1.3. Analyse histochimique de l'expression du gène GUS .....	56
1.4. Expression des ARFs en conditions de stress abiotiques .....	57
1.4.1. Culture des plantes .....	57
1.4.2. Application du stress .....	57
1.4.3. Extraction des ARN totaux et synthèse de l'ADN <sub>c</sub> .....	57
1.4.4. RT-PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) .....	58
1.4.5. Expression des miRNA et des gènes SIARFs cibles .....	59
2. Etude de l'implication de l'ARF4 dans la tolérance aux stress salin et hydrique .....	60
2.1. Etude d'expression de l'ARF4 en conditions de stress .....	60
2.2. Etude de l'expression spatio-temporelle du gène SIARF4 en conditions de stress	61
2.3. Etude de la tolérance aux stress salin et hydrique.....	61
2.3.1. Culture des plantes .....	61
2.3.2. Application des stress .....	61
2.3.3. Les paramètres morphologiques .....	61
2.3.3.1. Détermination du poids frais et du poids sec .....	61
2.3.3.2. Détermination de la longueur de la racine principale et la densité des racines latérales .....	62
2.3.4. Les paramètres physiologiques et biochimiques .....	62
2.3.4.1. Teneur en chlorophylle a, b et en chlorophylle totale.....	62
2.3.4.2. Teneur en sucres solubles .....	63
2.3.4.3. Teneur relative en eau (RWC) .....	64
2.3.4.4. Mesure de la conductance stomatique .....	64

2.3.4.5. Dosage de l'ABA .....	65
2.3.5. Analyse de l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse aux stress et dans la voie de signalisation de l'ABA .....	65
2.4. Analyse statistique.....	66
Chapitre III Les Facteurs de Réponse à l'Auxine et la réponse aux stress biotiques chez la tomate .....	67
1. Analyse <i>in silico</i> de la région promotrice des <i>ARFs</i> à la recherche de motifs <i>cis</i> -régulateurs associés à la réponse aux stress biotiques.....	68
2. Etude d'expression des <i>ARFs</i> en conditions de stress biotiques .....	71
2.1. Expression des <i>ARFs</i> en réponse à l'infection par la flagelline.....	71
2.2. Expression des <i>ARFs</i> en réponse à l'infection bactérienne.....	71
2.3. Expression des <i>ARFs</i> en réponse à une infection virale.....	73
Chapitre IV Les Facteurs de Réponse à l'Auxine et la réponse aux stress abiotiques chez la tomate .....	75
1. Accumulation de l'auxine en conditions de stress .....	76
2. Les facteurs de réponse à l'auxine en réponse aux stress abiotiques .....	77
2.1. Analyse <i>in silico</i> de la région promotrice des <i>ARFs</i> à la recherche de motifs <i>cis</i> -régulateurs associés à la réponse aux stress abiotiques.....	77
2.2. Etude d'expression des <i>ARFs</i> en conditions de stress abiotiques .....	81
2.2.1. Expression des <i>ARFs</i> en réponse au stress salin .....	82
2.2.2. Expression des <i>ARFs</i> en réponse au déficit hydrique.....	82
2.2.3. Expression des <i>ARFs</i> en réponse au stress d'anoxie.....	83
2.3. Analyse spatio-temporelle de l'expression des gènes <i>SIARF8A</i> et <i>SIARF10A</i> en conditions de stress salin et hydrique .....	85
2.4. Etude d'expression des précurseurs des miRNAs et des gènes cibles en conditions de stress .....	88
Chapitre V Le Facteur de Réponse à l'Auxine <i>ARF4</i> et l'acquisition de la tolérance aux stress salin et hydrique chez la tomate .....	94
1. Caractérisation du gène <i>ARF4</i> .....	95
2. Expression de l' <i>ARF4</i> en réponse au stress salin et hydrique .....	96
3. Etude de la réponse des lignées transgéniques pour l' <i>ARF4</i> au stress salin et hydrique ..	99
3.1. Caractérisation morphologique de la tolérance aux stress salin et hydrique .....	99
3.1.1. Poids frais.....	99
3.1.2. Poids sec .....	102
3.1.3. Développement racinaire .....	104
3.1.3.1. L'élongation de la racine principale.....	104

3.1.3.2. Densité racinaire .....	105
3.2. Caractérisation physiologique, biochimique et moléculaire de la tolérance aux stress salin et hydrique .....	108
3.2.1. <i>Teneur en chlorophylle a, b et chlorophylle totale</i> .....	108
3.2.1.1. Teneur en chlorophylle a.....	108
3.2.1.2. Teneur en chlorophylle b .....	109
3.2.1.3. Teneur en chlorophylle totale .....	110
3.2.2. <i>Teneur en sucres solubles</i> .....	111
3.2.2.1. Teneur en sucres au niveau aérien .....	112
3.2.2.2. Teneur en sucres au niveau racinaire .....	113
3.2.2.3. Expression du transporteur du sucre <i>LeSUT1</i> .....	114
3.2.3. <i>Perte en eau, conductance stomatique et teneur en ABA</i> .....	116
3.2.3.1. Conductance stomatique .....	116
3.2.3.2. Teneur relative en eau .....	118
3.2.3.3. Teneur en ABA .....	119
3.2.4. <i>La détoxification des ROS- étude de l'expression des gènes impliqués</i> .....	124
3.2.4.1. Expression du gène codant pour la catalase.....	125
3.2.4.2. Expression du gène codant pour le superoxyde dismutase.....	127
3.2.4.3. Expression du gène codant pour le monodehydroxyascorbate réductase .	128
3.2.5. <i>Séquestration des ions –expression du gène codant pour l'antiport vacuolaire</i> .....	129
Conclusion Générale et Perspectives .....	132
Références bibliographiques .....	136
Annexes .....	161

# Introduction Générale



A l'horizon de 2050, le système alimentaire et agricole mondial devra répondre aux besoins d'une démographie croissante et satisfaire des exigences accrues de qualité, d'accessibilité et de disponibilité. La production agricole mondiale doit soulever un défi de taille consistant à augmenter la production alimentaire de 70 % pour satisfaire les besoins de 9,1 milliards de personnes, tout en utilisant moins d'eau, en préservant la biodiversité agricole et en émettant moins de gaz à effet de serre, et ce à partir de surfaces cultivables de plus en plus restreintes. Outre la rareté croissante des ressources naturelles, l'agriculture mondiale devra également affronter les effets du changement climatique, notamment des températures plus élevées, des précipitations plus variables et des conditions climatiques extrêmes plus fréquentes comme les inondations et les sécheresses. Ainsi, produire des variétés adaptées à une agriculture durable, en particulier plus résilientes face aux contraintes environnementales, représente un défi majeur pour l'agriculture mondiale.

En dépit des efforts fournis dans l'amélioration de la tolérance des cultures majeures aux stress abiotiques par des techniques classiques, le succès reste limité. Les plantes, face à ces conditions hostiles, développent un certain nombre de réponses morpho-physiologiques et biochimiques résultant de l'activation de l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans la réponse à ces stress (Aubert, 2011).

Plusieurs molécules sont connues pour leur implication dans la mise en place de réponses adaptatives aux différents stress abiotiques notamment les phytohormones telles que l'acide abscissique, l'éthylène et l'acide salicylique (Tuteja, 2007 ; Upreti and Sharma, 2016). L'auxine est connue pour son rôle crucial dans la régulation d'un large éventail de processus développementaux et vitaux comme le développement racinaire, la différenciation des tissus vasculaires, la formation des bourgeons axillaires, la dominance apicale, le développement floral et la maturation des fruits (Bohn-Courseau, 2010 ; Sauer et al., 2013 ; Tran and Pal, 2014). Des progrès significatifs ont été accomplis dans la compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels cette hormone intervient dans la croissance et le développement des plantes. En revanche, nos connaissances sur l'implication de l'auxine dans les réponses au stress biotique et abiotique demeurent assez limitées (Wani et al., 2016). Des études récentes ont suggéré que l'auxine pourrait intervenir dans la réponse des plantes aux stress environnementaux (Hu et al., 2015 ; Jain and Khurana, 2009 ; Van Ha et al., 2013 ; Wang et al., 2010).

---

L'auxine agit via deux types de régulateurs transcriptionnels qui sont respectivement les Auxine/Acide 3- Indole Acétique (Aux/AIA) et les facteurs de réponse à l'auxine (ARF) (Guilfoyle et al., 1998 ; Guilfoyle and Hagen, 2007 ; Ulmasov et al., 1995). Les facteurs de réponse à l'auxine jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes en réponse à l'auxine. Ces facteurs de transcription se lient de manière spécifique à des éléments de réponse à l'auxine TGTCTC (AuxRE), situés au niveau de la région promotrice des gènes cibles (Guilfoyle and Hagen, 2007). Les ARFs peuvent être des activateurs ou des répresseurs de l'expression des gènes de manière dépendante de l'auxine (Guilfoyle et al., 1998 ; Guilfoyle and Hagen, 2007 ; Zouine et al., 2014). Des études génétiques et moléculaires menées chez *Arabidopsis* et d'autres espèces végétales ont montré que ces protéines sont impliquées dans la régulation d'un large éventail de processus développementaux tels que l'embryogenèse, l'expansion et la sénescence des feuilles, le développement des racines latérales et le développement des fruits (Fukaki et al., 2006 ; Goh et al., 2012 ; Okushima et al., 2005 ; Sagar et al., 2013 ; Tatematsu et al., 2004 ; Wilmoth et al., 2005). Des études récentes ont souligné une potentielle implication des ARFs dans la réponse aux stress abiotiques chez le riz, le sorgho, le bananier, le thé et bien d'autres espèces végétales (Hu et al., 2015 ; Jain and Khurana, 2009 ; Van Ha et al., 2013 ; Wang et al., 2010).

La tomate attire de plus en plus l'attention de la communauté scientifique. En plus de son importance économique incontestable, elle s'attribue le titre de plante modèle pour l'étude des fruits charnus et d'espèce référence pour la famille des Solanacées qui regroupe un grand nombre d'espèces d'intérêt économique et agronomique telles que la pomme de terre, l'aubergine, le piment et le tabac. Son génome a fait l'objet de plusieurs programmes à l'échelle internationale ayant pour objectif d'approfondir les connaissances sur la physiologie, la croissance et le développement de cette plante. L'un des programmes les plus importants est inscrit dans le cadre du Consortium international pour les Solanacées visant à séquencer le génome entier de cette plante et qui vient d'être achevé en 2012 (Consortium, 2012). Les données qui en découlent ouvrent de nouvelles voies pour comprendre les mécanismes d'adaptation des plantes et pour l'amélioration de leur tolérance aux conditions de stress abiotiques.

L'amélioration de la tolérance des plantes aux stress abiotiques constitue un enjeu économique et agronomique majeurs. La connaissance des mécanismes moléculaires déployés par les plantes en réponse aux stress s'avère prometteuse pour le développement de nouvelles variétés capables d'assurer une production optimale dans des conditions environnementales de plus en

---

plus difficiles. Le présent travail a pour objectif de développer de nouveaux outils moléculaires pour la sélection et le développement de nouveaux cultivars aptes à tolérer les contraintes environnementales ce qui pourrait impacter d'une manière positive la production alimentaire mondiale dans de nombreuses régions.

La thèse se déclinera en trois parties complémentaires :

- **Etude de l'implication des facteurs de réponse à l'auxine dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques chez la tomate**

Le but étant d'évaluer le rôle des ARFs dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques. Pour cela, une analyse *in silico* de la région promotrice des ARFs à la recherche de motifs *cis*-régulateurs associés à la réponse aux stress biotiques et abiotiques a été réalisée. L'expression de l'ensemble des ARFs rencontrés chez la tomate a été également évaluée en réponse aux différents types de stress.

- **Identification des ARFs candidats pour l'étude de la réponse aux stress salin et hydrique**

En s'appuyant sur les résultats d'expression des ARFs en conditions de stress abiotiques, nous avons identifié plusieurs gènes candidats pour l'étude des mécanismes moléculaires déployés par la tomate pour la réponse aux stress abiotiques. Il s'agit en particulier de l'*ARF8A* et l'*ARF10A* dont l'expression fut nettement régulée par les deux stress à savoir le stress salin et hydrique. Nous avons également pu mettre en évidence une potentielle implication des miRNA (*miR160* et *miR167*) dans la régulation de l'expression de ces deux ARFs.

- **Evaluation de l'implication de l'*ARF4* dans l'acquisition de la tolérance à la salinité et à la sécheresse chez la tomate**

En raison de l'indisponibilité des mutants de sous-expression pour l'*ARF8A* et l'*ARF10A*, une analyse phénotypique des lignées transgéniques pour un certain nombre d'ARFs a montré que le mutant de perte de fonction pour l'*ARF4* présente des traits de tolérance à savoir, un enroulement sévère des feuilles et une forte accumulation des sucres et de la chlorophylle ; ce qui laisse penser que ce mutant pourrait mieux tolérer le stress salin et hydrique. Ainsi, une caractérisation morphologique, physiologique, biochimique et moléculaire de la réponse de ce mutant aux stress salin et hydrique a été effectuée en vue d'évaluer ses aptitudes à tolérer ces deux types de stress.

# Chapitre I

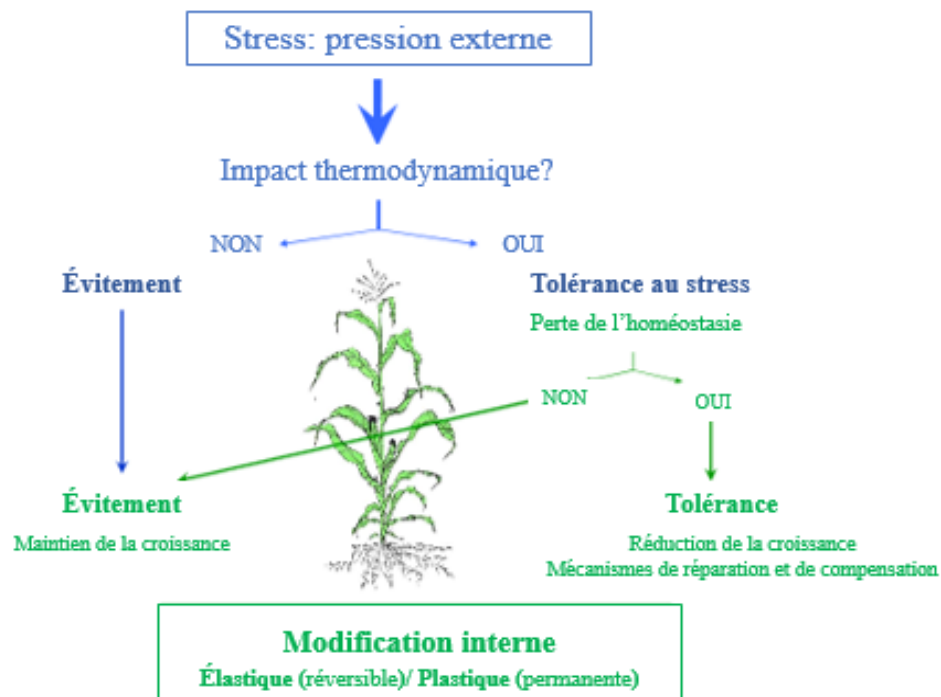
## Revue Bibliographique

---

## I- Les plantes face aux stress abiotiques

Les contraintes environnementales représentent les principaux obstacles qui limitent la productivité agricole. Elles peuvent être de nature biotique causées par des agents pathogènes ou abiotique (Fujita et al., 2006). Les stress abiotiques sont dus aux conditions environnementales défavorables, telles que la salinité, la sécheresse, les températures extrêmes, les métaux lourds, les radiations, les inondations, etc (Mickelbart et al., 2015). Sur le plan économique, les stress abiotiques sont responsables de pertes du rendement estimant plus de 50% pour la plupart des cultures mondiales (Verma et al., 2013). Selon les modèles de prévision climatique actuels, la détérioration du climat mondial entraînera inévitablement une fréquence accrue de sécheresse, de canicule et de salinisation (Wang et al., 2016). Cela signifie que la productivité agricole devra faire face à un défi plus important dans la lutte contre les stress environnementaux en vue de pouvoir subvenir aux besoins alimentaires d'une population mondiale qui ne cessent de s'accroître.

Face à la multiplicité de ces stress, les plantes ont développé, au cours de leur évolution, de nombreux mécanismes pour assurer leur survie et leur reproduction. On distingue classiquement deux stratégies : l'évitement et la tolérance (Figure 1). La stratégie d'évitement, qui consiste pour la plante à se soustraire à la contrainte par ajustement temporel de son cycle de développement en fonction de l'occurrence des périodes de stress (Lugan, 2008). Les plantes qui pratiquent cette stratégie vont tout mettre en œuvre pour permettre la reproduction avant que le stress ne devienne trop important et réduisent ainsi le risque de perte de rendement en échange d'une réduction du rendement maximum atteignable (Virilouvet, 2012). La tolérance est associée à une grande variété d'adaptations morphologiques, anatomiques et biochimiques, parfois très marquée chez les espèces extrémophiles (Lugan, 2008). Ces adaptations permettent le maintien du rendement maximal mais ont tendance à augmenter le risque de perte totale de rendement.



**Figure 1** Schéma général des mécanismes de réponse aux stress abiotiques chez les plantes. Adaptée à partir de (Lugan, 2008).

L'amélioration de la tolérance des plantes aux stress abiotiques reste une priorité dans le domaine des productions végétales. La compréhension des réponses biologiques aux stress, qu'ils soient d'origine biotique ou abiotique, conditionne les succès ultérieurs en matière d'ingénierie génétique et constitue un enjeu économique majeur. Actuellement, avec la disponibilité d'informations complètes sur le génome d'un certain nombre d'espèces végétales et la maîtrise des outils génomiques et protéomiques, les connaissances sur les mécanismes de réponses des plantes aux stress abiotiques ont avancées avec un rythme accéléré durant les dernières décennies. Ainsi, il a été démontré que les mécanismes de signalisation en condition de stress présentent énormément de complexité et restent encore mal connus. A ce jour, seuls un nombre limité de gènes jouant un rôle crucial dans l'adaptation aux stress ont été identifiés avec certitude. Quelques voies de signalisation du stress ont été révélées au complet.

### 1. Mécanismes moléculaires de réponse aux stress abiotiques

Au niveau moléculaire, la réponse de la plante à un stress se traduit par une induction ou une répression de l'expression de nombreux gènes. Il est possible de classer leurs produits en deux grandes catégories : (i) les protéines impliquées dans la transduction du signal et la régulation transcriptionnelle telles que les protéines kinases, les phospholipases

ou les facteurs de transcription ; (ii) les protéines impliquées dans le transport de l'eau et des ions, telles que les aquaporines et les transporteurs d'ions, et les protéines impliquées dans la protection des membranes et des protéines, telles que les protéines de choc thermique (« heat shock proteins, HSP), les chaperonnes et les protéines LEA (« late embryogenesis abundant »).

### **1.1. La perception du signal du stress**

La mise en place des réponses adaptatives aux stress repose sur l'existence de systèmes de perception et de complexes de transduction et d'amplification du signal capables d'intégrer et de véhiculer les signaux jusqu'au noyau, siège des reprogrammations génétiques et des réponses adaptative (Aubert, 2011). La perception du stress se fait à travers un ensemble de récepteurs membranaires sollicités par les différentes composantes du stress. Ces senseurs primaires déclenchent souvent un influx massif de  $Ca^{2+}$  dans la cellule. Les canaux ioniques membranaires pourraient aussi faire office de récepteur primaire. Les capteurs membranaires ou senseurs ont la capacité de reconnaître l'ensemble des variations produites au moment du stress telles que la diminution du potentiel hydrique, la diminution de la pression de turgescence, le changement du volume cellulaire ou des changements de conformation des macromolécules et par la suite activer la chaîne de transduction (Bray, 2002).

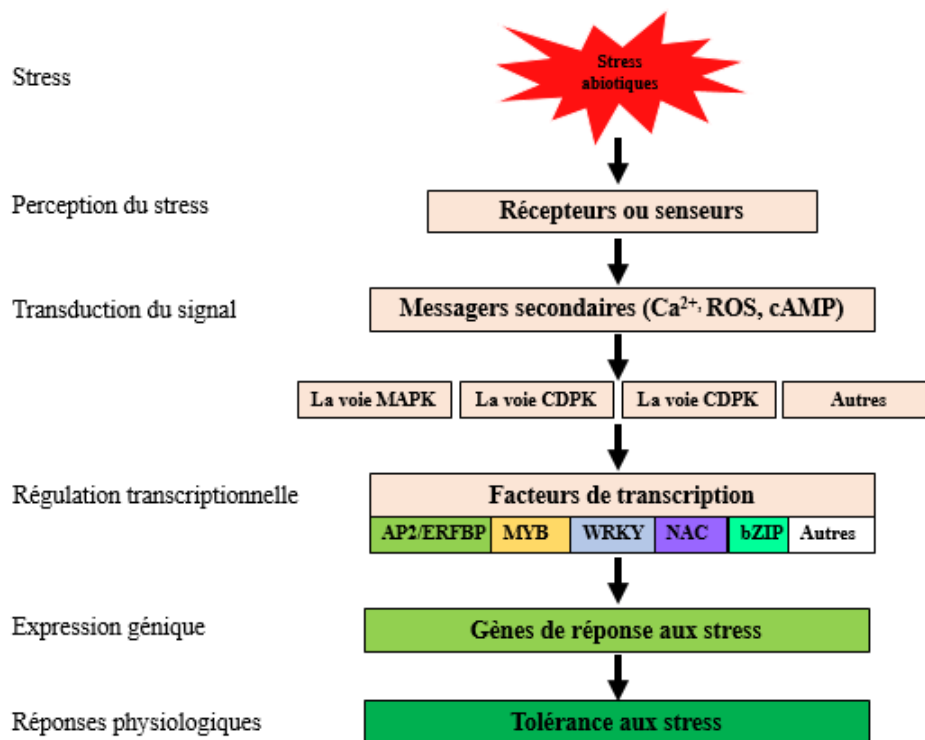
La perception du signal a été intensivement étudiée chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Ainsi, une histidine kinase transmembranaire SLN1 a été identifiée comme osmosenseur. Une protéine homologue AtHK1 a été retrouvée chez *Arabidopsis* (Urao et al., 1999). Il permet d'activer la cascade des MAPK par l'intermédiaire de deux molécules phospho-relais YPD1 et SSK1 (Boudsocq and Laurière, 2005). D'autres récepteurs membranaires ont été identifiés chez les plantes et les animaux. Il s'agit des protéines RLK (Receptor-Like Kinases). Ces dernières présentent un domaine extracellulaire qui sert pour la fixation du ligand ou dans les interactions protéine-protéine, un domaine transmembranaire et un domaine kinase intracellulaire (Xiong and Zhu, 2001).

### **1.2. La transduction du signal du stress**

La transduction du signal commence par une activation du récepteur suivie d'une génération de messagers secondaires qui traduisent le signal primaire externe en signaux intracellulaires. Ces derniers seront interprétés par d'autres co-facteurs permettant ainsi le déclenchement des voies de signalisations. Durant ce processus, une phosphorylation réversible des protéines

se produit fréquemment ce qui permet l'activation d'un certain nombre de facteurs de transcription et induire l'expression des gènes de réponse aux stress (Zhu, 2002).

La transduction du signal est requise dans la coordination de plusieurs activités cellulaires. Généralement, la transduction du signal commence par une perception du stimulus par des molécules cellulaires spécifiques. Ces récepteurs ou senseurs peuvent différer par leur identité moléculaire, leur mode de perception du signal ainsi que par leur localisation subcellulaire (Rai and Takabe, 2006). Il existe une panoplie de molécules qui assurent la transduction du signal dont les principales sont : le calcium, les protéines kinases dépendantes de calcium, les protéines de la voie de signalisation SOS et les espèces réactives d'oxygène (Figure 2).



**Figure 2** Schéma du mécanisme global de la réponse au stress abiotique chez les plantes. Adapté à partir de (Wang et al., 2016).

### 1.2.1. Le calcium

Le calcium constitue une molécule clé dans la transduction et la réponse des plantes aux différents types de stress abiotiques (Knight, 1999). La perception du stress se traduit par une augmentation de la concentration cytosolique du calcium due soit à un influx de calcium extracellulaire ou à une libération des stocks intracellulaires. Les modifications au niveau



de la concentration des ions  $\text{Ca}^{2+}$  constituent un signal spécifique contrôlant un certain nombre de mécanismes tels que la fermeture des stomates.

L'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  engendre toute une cascade de processus contrôlés par des senseurs calciques. Ces senseurs sont des calmodulines impliquées dans la réponse au froid, au stress oxydatif ou à une stimulation mécanique des CDPKs ( $\text{Ca}^{2+}$  dependent protein kinases) impliquées dans la réponse au stress froid, salin et à la sécheresse et des phosphatases régulées par le  $\text{Ca}^{2+}$  comme les sérine/thréonine phosphatases ou les calcineurines B-like qui interviennent également lors de stress salin ou froid (Hong-Bo et al., 2008 ; Zeng et al., 2015).

### ***1.2.2. Les protéines kinases dépendantes de calcium***

Chez les plantes, la famille multigénique des protéines kinases dépendantes de calcium (CDPK) code pour des protéines dont la structure est fortement conservée dotée d'un site unique pour la fixation des ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Ainsi, ils représentent des candidats idéaux pour la perception des changements dans la concentration intracellulaire des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et la traduction de ces signaux afin d'activer d'autres processus de signalisation en aval (Schulz et al., 2013).

Les protéines kinases dépendantes de calcium semblent intervenir dans la signalisation du stress. Actuellement, seulement quelques-unes sont impliquées dans la réponse aux stress. Chez *Arabidopsis thaliana*, les protéines CPK3, CPK6 et CPK10 sont décrites comme des régulateurs positifs de la réponse aux stress abiotiques (Asano et al., 2012). Par ailleurs, les mutants de perte de fonction du gène *CPK3* sont très sensibles au stress salin et il a été suggéré que ce gène soit associé à la membrane plasmique et à la vacuole et régule la signalisation indépendamment de la voie des MAPKs (Mehlmer et al., 2010). La sur expression du gène *CPK6* améliore considérablement la tolérance des plantes aux stress salin et hydrique (Xu et al., 2010).

### ***1.2.3. La voie « Salt Overly Sensitive »***

La voie de signalisation SOS semble être relativement spécifique pour l'aspect ionique du stress salin. Les cibles de cette voie sont les transporteurs ioniques qui contrôlent l'homéostasie ionique en cas de stress salin (Pareek et al., 2010). L'isolement et la caractérisation des mutants qui manifestent une hypersensibilité dans la croissance des racines en conditions de stress salin a permis l'identification des gènes *SOS1*, *SOS2* et *SOS3* qui représentent des éléments clés dans la voie de signalisation SOS impliquée dans l'extrusion des ions  $\text{Na}^+$  (Zhu et al., 1998). Le clonage et la caractérisation de l'activité des protéines ont permis d'identifier la protéine

SOS3 comme une protéine de liaison au calcium, la protéine SOS2 comme une protéine kinase et la protéine SOS1 comme une protéine  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport localisée au niveau de la membrane plasmique. La protéine SOS3 entre en interaction avec la protéine SOS2 ce qui permet le recrutement des protéines SOS2 au niveau de la membrane plasmique et leur activation. Le complexe SOS3-SOS2 ainsi formé nécessite pour son activité la *N*-myristoylation de la protéine SOS2 au niveau du consensus MGXXXS/T(K). Ce complexe active la protéine SOS1 par une phosphorylation directe du domaine d'auto-inhibition localisé au niveau de la région C-terminale de la protéine (Qiu et al., 2002).

Le rôle de la protéine SOS1 dans le contrôle de l'homéostasie ionique a été déterminé grâce à une combinaison d'analyses biochimiques, génétiques et physiologiques. L'utilisation de souches mutantes de levures a permis de démontrer que SOS1 assure le transport spécifique des ions  $\text{Na}^+$  vers l'extérieur de la cellule en condition de stress salin (Shi et al., 2003). Des analyses physiologiques combinées à des analyses d'expression chez *Arabidopsis thaliana* ont montré que la protéine SOS1 est impliquée dans l'efflux d'ions du cytosol aux cellules épidermales sous-jacentes et du parenchyme avoisinant aux tissus vasculaires maintenant ainsi des concentrations faibles des ions  $\text{Na}^+$  dans les racines (Ji et al., 2013).

#### ***1.2.4. Les espèces réactives d'oxygène***

Les espèces réactives d'oxygène comprennent à la fois des radicaux libres ( $\text{O}_2^-$ , OH,  $\text{HO}_2$ , ...) et des radicaux non libres ou formes moléculaires ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $^1\text{O}_2$ ). Ces molécules sont principalement synthétisées dans les chloroplastes par les photosystèmes I (PSI) et II (PSII). Elles peuvent se former dans la mitochondrie par le complexe I, l'ubiquinone et le complexe III de la chaîne de transport d'électrons (ETC) (Gill and Tuteja, 2010). Les ROS sont accumulées dans les cellules par divers mécanismes à savoir le transport d'électrons au niveau des chloroplastes ou des mitochondries ou par des mécanismes enzymatiques à travers l'intervention des peroxydases et de la NADPH oxydase (Panday et al., 2015). Suivant la nature du stress, les espèces réactives d'oxygène peuvent déclencher des réponses physiologiques pour permettre la mise en place des mécanismes adaptatifs et par conséquent améliorer la tolérance au stress comme ils peuvent déclencher le processus d'apoptose programmé (Schmitt et al., 2014).

Les stress environnementaux tels que la salinité, le déficit hydrique, le stress métallique, les radiations UV ainsi que les attaques des pathogènes conduisent à la génération des espèces réactives d'oxygène en raison de la perturbation de l'homéostasie cellulaire. La production accrue des ROS peut provoquer des dommages aux cellules en déclenchant les processus

de peroxydation des lipides, de l'oxydation des protéines, des dommages aux acides nucléiques, l'inhibition des enzymes, l'activation de la mort programmée des cellules (PCD) ce qui conduit à la mort des cellules (Sharma et al., 2012). L'application des espèces réactives d'oxygène (ROS) et plus précisément le peroxyde d'hydrogène induit la tolérance des plantes. Chez le blé, de faibles concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permettent l'induction de la synthèse de polypeptides similaires à ceux synthétisés en réponse au froid (Matsuda et al., 1994). Prasad, (1996) ont reporté que les plantules de Maïs deviennent plus tolérantes au froid à la suite d'un traitement avec le peroxyde d'hydrogène. Ce constat fut expliqué par le fait que l'augmentation transitoire de la concentration des ROS en occurrence le peroxyde d'hydrogène permet l'activation des mécanismes de tolérance (Bhattacharjee, 2012).

### **1.3. La régulation transcriptionnelle**

Les signaux émis au moment du stress sont responsables de l'activation de la transcription d'une panoplie de gènes afin d'assurer la survie de la plante dans des conditions hostiles. L'activation de la transcription des gènes de réponse aux stress se fait par le biais des facteurs de transcription (Riechmann and Ratcliffe, 2000 ; Yamasaki et al., 2013). Les facteurs de transcription (FT) sont constitués d'au moins deux domaines ; un domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain) dit DBD et un domaine d'activation de la transcription (Liu et al., 1999). Les facteurs de transcription peuvent également entrer en interaction avec d'autres types de facteurs de transcription pour l'activation de leurs cibles (Priest et al., 2009). Les FT peuvent être classés en groupes suivant la composition de leur motif de liaison à l'ADN ; par exemple, les domaines doigt de zinc, hélice-boucle-hélice (HLH), hélice-tour-hélice (HTH), leucine zipper... (Riechmann and Ratcliffe, 2000).

Chez les plantes, la régulation transcriptionnelle est réalisée par l'intermédiaire de plus de 1500 FT et chaque FT contrôle l'expression d'environ 10-1000 gènes cibles (Guo et al., 2008). Au cours des dernières décennies, de nombreuses recherches ont été menées pour identifier et caractériser les différents FTs impliqués dans la réponse des plantes aux stress abiotiques (Vinocur and Altman, 2005). Parmi cette multitude de facteurs de transcription, cinq grandes familles sont impliquées dans la réponse aux stress. On retrouve les AP2/ERF (ethylene-responsive-element-binding factors) ou APETALA2, des bZIP (basic-domain leucine-zipper), des WRKY, des MYB et les NAC (Figure 2) (Singh et al., 2002).

## 1.4. La détoxification des espèces réactives d'oxygène

Pour se protéger contre les espèces réactives d'oxygène et leurs dérivés, les cellules végétales utilisent des systèmes de défense antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Gill and Tuteja, 2010). La concentration des ROS dans les tissus des plantes est le résultat d'un équilibre dynamique entre les taux de leur production et de leur élimination par les antioxydants (Sharma et al., 2012 ; Das and Roychoudhury, 2014 ; Schmitt et al., 2014). La défense enzymatique contre le stress oxydatif occasionné par les stress abiotiques est représentée principalement par la catalase (CAT), le superoxyde dismutase (SOD), le monodéhydroascorbate réductase. Ces enzymes agissent en cascade et chacune d'elles assure une réaction et le produit de l'une représente généralement le substrat de l'autre.

### 1.4.1. La Catalase

La catalase ou CAT est une enzyme peroxysomale indispensable pour la neutralisation des radicaux libres durant le stress. Elle assure la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène. Elle est la seule enzyme capable de dégrader le peroxyde d'hydrogène sans consommer en contrepartie les équivalents réducteurs. Par conséquent, la catalase fournit à la cellule un mécanisme d'énergie très efficace pour éliminer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les iso-enzymes de la catalase ont été intensivement étudiées chez les angiospermes. Deux iso-enzymes de la catalase ont été identifiées chez *Hordeum vulgare*, trois chez *Arabidopsis thaliana*, quatre chez *helianthus annuus* et douze isoformes ont été retrouvées chez *Brassica* (Frugoli et al., 1996 ; Azevedo et al., 1998 ; Das and Roychoudhury, 2014). Chez *Arabidopsis*, *cat1* s'exprime au niveau du pollen et des graines, *cat2* s'exprime principalement dans les tissus photosynthétiques mais aussi dans les racines et les graines tandis que *cat3* (à localisation mitochondriale) s'exprime uniquement au niveau des feuilles et tissus vasculaires (Das and Roychoudhury, 2014). Chez plusieurs espèces végétales, l'activité de la catalase augmente considérablement en réponse aux stimuli environnementaux. C'est le cas chez *Cicer arietinum* où une augmentation de l'activité de la catalase a été signalée au niveau des feuilles et des racines en réponse à la salinité (Kukreja et al., 2005 ; Eyidogan and Öz, 2007). Ce même constat a été observé chez le blé tendre (*Triticum aestivum*) (Simova-Stoilova et al., 2010), le maïs (*Zea mays*) (Gondim et al., 2012), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) (M'Hamdi et al., 2009) et le riz (*Oryza sativa*) (Moriwaki et al., 2008). Chez le tabac, les mutants déficients en *cat1* présentent plus de dommage d'ADN en présence de fortes concentrations en cadmium (Gichner et al., 2008). Toujours chez le tabac, l'expression du gène *KatE* d'E.coli améliore sa tolérance au paraquat et au stress hydrique et empêche l'inactivation des enzymes

occasionnée par le stress oxydatif (Shikanai et al., 1998). L'introduction de ce même gène chez la tomate et chez le riz confère une meilleure résistance au stress salin (MOHAMED et al., 2003).

#### ***1.4.2. Le superoxyde dismutase***

Le superoxyde dismutase (SOD) est un métallo-enzyme omniprésent dans tous les organismes aérobiques et dans tous les compartiments subcellulaires sujets au stress oxydatif engendré par l'excès des espèces réactives d'oxygène. Il représente la première ligne de défense contre les effets toxiques des ROS (Gill and Tuteja, 2010). Cet enzyme catalyse la dismutation de  $^1\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  ce qui empêche la formation de  $\text{OH}^\cdot$  via la réaction de Habere-Weiss. Les SODs sont classés en fonction de l'ion métallique auquel ils sont associés en trois iso-enzymes et on distingue : Mn-SOD (localisé au niveau de la mitochondrie), Fe-SOD (localisé dans les chloroplastes) et Cu/Zn SOD (localisé au niveau du cytosol, des peroxisomes et des chloroplastes) (Das and Roychoudhury, 2014). Plusieurs études ont souligné l'implication des SOD dans la lutte contre le stress oxydatif occasionné par les stress abiotiques et biotiques. Une augmentation significative dans l'activité du SOD a été observée chez certaines espèces végétales comme la tomate (*Solanum lycopersicum*) (Shalata et al., 2001), le pois-chiche (*Cicer arietinum*) (Kukreja et al., 2005) et le mûrier (*Morus .L*) (Harinasut et al., 2003) en réponse au stress salin. Ainsi, la surexpression des iso-enzymes du SOD permet l'acquisition de la tolérance aux stress abiotiques chez plusieurs espèces végétales. Chez *Arabidopsis thaliana*, la surexpression du gène codant pour la Mn-SOD augmente considérablement la tolérance de cette espèce à la salinité. Ceci a été expliqué par l'augmentation dans l'activité de l'enzyme Mn-SOD et d'autres antioxydants à savoir Cu/Zn-SOD, Fe-SOD, CAT et POD chez les plantes transgéniques (Wang et al., 2004). La manipulation génétique de ce gène confère une tolérance au stress salin chez la tomate (Wang et al., 2007). Les plantes transgéniques du tabac sur-exprimant le gène Cu/ZnSOD tolèrent à la fois la salinité et le déficit hydrique (Badawi et al., 2004).

#### ***1.4.3. Le monodéhydroascorbate réductase***

Le monodéhydroascorbate réductase est une flavine adénine dinucléotide qui catalyse la régénération de l'ascorbate (AsA) à partir du monodéhydroascorbate (MDHA) en utilisant le NAD(P)H comme donneur d'électrons (Hossain and Asada, 1985). De ce fait, le monodéhydroascorbate réductase joue un rôle important dans le système d'antioxydants en conservant le pool d'ascorbate (Sharma et al., 2012). L'activité du MDHAR a été détectée

dans plusieurs compartiments cellulaires y compris les chloroplastes, la mitochondrie, les peroxysomes et le cytosol (Shin et al., 2013).

### **1.5. L'ajustement osmotique- accumulation des solutés compatibles**

L'accumulation des composés hydrophiles de faible poids moléculaire connus sous le nom de « solutés compatibles » ou « osmolytes » représente une stratégie commune adoptée par plusieurs organismes pour lutter contre les stress environnementaux. Les solutés compatibles les plus connus sont les bétaines, les sucres (mannitol, sorbitol et tréhalose), les polyols, les polyamines et les acides aminés (proline). Leur accumulation est favorisée en cas de déficit hydrique ou de stress salin car ils confèrent aux cellules une certaine tolérance sans que cette dernière n'interfère avec la machinerie cellulaire (Chen and Murata, 2002).

#### ***1.5.1. Les sucres et dérivés***

L'accumulation des sucres représente l'un des mécanismes physiologiques mis en place pour faire face aux effets négatifs du stress osmotique généré suite à l'exposition des plantes aux stress salin ou hydrique. Plusieurs études ont suggéré que, dans des conditions de stress, les glucides non structuraux (saccharose, hexoses...) s'accumulent à des degrés variables en fonction de l'espèce végétale. Une forte corrélation entre l'accumulation des sucres et la tolérance au stress osmotique a été largement rapportée (Thitisaksakul, 2008 ; Gandonou et al., 2011 ; Atkinson and Urwin, 2012). L'accumulation de saccharose chez les plantes reviviscentes est particulièrement importante et prendrait une large part dans l'acquisition de la tolérance à la déshydratation. *C. plantagineum* accumule de grandes quantités de 2-octulose qui servirait de source à la conversion en saccharose pour une part supérieure à 80% par les enzymes hydrolytiques (sucrose synthase et sucrose phosphate synthase). L'accumulation des carbohydrates (glucose, fructose et tréhalose) a été signalée chez d'autres espèces végétales en réponse à divers stress environnementaux. Chez le riz (*Oryza sativa*), une augmentation de la concentration du saccharose a été observée en conditions de stress salin (Alamgir and Ali, 1999). Ce constat a été également observé chez la tomate (*Solanum lycopersicum*) en réponse aux fortes concentrations en sel (Yin et al., 2009). L'accumulation des sucres empêche la cristallisation des solutés et réduit les dommages cellulaires irréversibles lors d'une dessiccation sévère (Golldack et al., 2014).

#### ***1.5.2. La proline***

La proline est l'un des solutés compatibles accumulé dans les plantes en conditions de stress et joue un rôle crucial dans l'acquisition de la tolérance à ces conditions (Kaur and Asthir,

2015). En plus de son rôle d'osmolyte par excellence, la proline contribue à la stabilisation des structures subcellulaires (membranes et protéines), la neutralisation des radicaux libres, la réduction de l'acidité cytoplasmique, le maintien d'un ratio  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  compatible avec le métabolisme, l'induction de l'expression des gènes de réponse aux stress (stress salin en particulier) et le tamponnage du potentiel redox des cellules en conditions de stress (Ashraf and Foolad, 2007 ; dos Reis et al., 2012). L'accumulation de la proline peut être due à sa synthèse *de novo* à partir du glutamate et de l'ornithine et/ou à la diminution de sa dégradation (Ashraf and Foolad, 2007). La voie du glutamate fournit la plus grande quantité de proline accumulée durant le stress osmotique (Verbruggen and Hermans, 2008). L'accumulation de la proline semble être corrélée avec l'activité de l'enzyme P5CS. Ainsi, les gènes codant pour cette enzyme ont été clonés et caractérisés chez plusieurs espèces végétales (*Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*) (Kaur and Asthir, 2015). Chez la figue de barbarie, il a été démontré que le stress salin stimule l'expression du gène codant pour la P5CS ce qui conduit à une forte accumulation de la proline (Silva-Ortega et al., 2008). Des études récentes ont reporté une augmentation dans l'activité des enzymes P5CS et P5CR chez les feuilles de tabac exposées au stress hydrique (Kaur and Asthir, 2015). L'apport exogène de la proline améliore considérablement la tolérance aux stress abiotiques.

### ***1.5.3. La glycine bétaine***

La glycine bétaine (N,N,N-triméthylglycine) est un composant d'ammonium quaternaire rencontré chez les plantes, les animaux et les microorganismes (Chen and Murata, 2011). Elle présente plusieurs propriétés chimiques à savoir une structure bipolaire neutre à pH physiologique, une forte solubilité dans l'eau et une absence de toxicité. Ainsi, elle présente un potentiel rôle dans la protection effective contre le stress salin, hydrique et les températures extrêmes (Hussain Wani et al., 2013). Elle joue un rôle vital dans l'ajustement et la protection de la membrane des thylacoïdes ce qui permet le maintien de l'activité photosynthétique (Ashraf and Foolad, 2007 ; dos Reis et al., 2012). Elle permet également la détoxification des radicaux réactifs d'oxygène produits au moment du stress (Ashraf and Foolad, 2007). En outre, à des faibles concentrations, la glycine bétaine assure la stabilité des structures quaternaires des enzymes et des protéines complexes. En effet, plusieurs protéines sont souvent sujettes à l'agrégation en conditions de stress salin et thermique, ce qui provoque la perte de leur structure de base et de leur activité. La glycine bétaine semble agir avec les protéines chaperonnes pour prévenir la formation de ces agrégats protéiques (Giri, 2011).

#### ***1.5.4. Les polyamines***

Les polyamines sont des composants naturels caractérisés par une structure d'azote aliphatique. Ils sont présents chez tous les organismes et jouent des rôles importants dans plusieurs processus vitaux (Gill and Tuteja, 2010). Ces amines ont été largement étudiés en raison de leur implication dans la régulation de plusieurs processus cellulaires tels que la division et l'élongation cellulaire, le développement racinaire, le développement floral, le développement du fruit, la réplication, la transcription, la traduction, la stabilisation de la membrane et de la paroi cellulaire, l'organisation de la chromatine, la biogenèse des ribosomes et la mort cellulaire programmée. Les polyamines sont également impliquées dans la réponse à divers stress environnementaux (Hussain et al., 2011). La putrescine, la spermidine et la spermine représentent les polyamines les plus souvent rencontrés chez les plantes et peuvent être présents sous une forme libre, conjuguée à d'autres solutés ou bien insoluble (Kaur-Sawhney et al., 2003).

Tout comme la proline et la glycine bétaine, les polyamines jouent un rôle imminent dans la réduction des effets néfastes des stress environnementaux. Des changements dans la concentration des polyamines ont été universellement observés chez plusieurs plantes exposées à une série de stress abiotiques y compris la sécheresse, les fortes salinités, les températures extrêmes et les déficiences en nutriments... (Alcázar et al., 2006).

### **1.6. La synthèse des protéines chaperonnes**

Les stress abiotiques sont à l'origine de dysfonctionnements protéiques. Pour y remédier, les plantes ont tendance à produire et à accumuler des protéines dites chaperonnes parmi lesquelles des **HSP** (Heat-shock proteins), des **LEA** (Late embryogenesis abundant proteins) et autres chaperonnes. Elles permettent de préserver le contenu de la cellule, stabilisent les protéines et les membranes et empêchent les altérations irréversibles des structures cellulaires (Wang et al., 2004 ; Vinocur and Altman, 2005).

#### ***1.6.1. Les protéines de choc thermique « Heat-shock proteins »***

Les protéines de choc thermique (HSPs) ou chaperonnes moléculaires sont des protéines hautement conservées et présentes chez tous les organismes vivants (Park and Seo, 2015). Chez les plantes, les Hsp sont divisées en cinq familles en fonction de la taille des protéines produites : les Hsp70 (DnaK), les Hsp60, les Hsp90, les Hsp100 (Clp) et les sHsp (small HSP) dont la taille varie de 12 à 40 kDa (Al-Whaibi, 2011). Les protéines de choc thermique ont été mises en évidence lors d'expositions à des températures élevées mais interviennent



également dans la réponse au stress hydrique, salin ou oxydatif, radiations UV et biotiques (Park and Seo, 2015). Les HSPs contribuent à l'homéostasie cellulaire et permettent le repliement, l'assemblage, la translocation et la dégradation des protéines (Wang et al., 2004).

### **1.6.2. Les protéines « Late Embryogenesis abundant »**

Les LEA sont des protéines hydrophiles qui s'accumulent dans les tissus tolérants à la dessiccation ou en réponse à la salinité, les basses températures et l'application d'ABA (Pedrosa et al., 2015). Elles représentent environ 4% des protéines cellulaires et s'accumulent principalement au niveau des graines au cours du stade de développement tardif de l'embryon. Elles sont également détectées au niveau des plantules, des racines et d'autres organes pendant toute la phase de développement (Hong-Bo et al., 2005). Les protéines LEA sont largement distribuées dans le règne végétal des algues aux angiospermes et sont également présentes chez les invertébrés anhydrobiotiques et chez certaines espèces bactériennes. Elles sont principalement composées d'acides aminés hydrophiles disposés en séquences répétées, formant une structure hautement hydrophile et stable thermiquement. L'analyse des séquences d'acides aminés a permis de distinguer sept groupes de protéines LEA (Pedrosa et al., 2015). En plus de leur rôle de chaperonnes, elles interviennent dans divers processus à savoir, la protection des protéines et des structures cellulaires des effets négatifs de la perte d'eau et de la dessiccation; la séquestration des ions et le repliement des protéines (Hong-Bo et al., 2005).

### **1.7. Le transport d'eau et des solutés**

En plus de l'accumulation des espèces réactives d'oxygène, les stress abiotiques peuvent provoquer une perturbation de l'homéostasie et du transport de l'eau dans la plante. Les mouvements d'eau à travers les membranes cellulaires sont régulés par une famille de protéines des canaux d'eau ; actuellement connue sous le nom d'aquaporines (Hussain et al., 2016). Elles appartiennent à une grande famille des protéines intra-membranaires hautement conservée appelée MIP « Major Intrinsic Proteins » (Maurel et al., 2008). Elles assurent le transport d'eau et des molécules de petite taille comme le glycérol, le CO<sub>2</sub> et le bore à travers les membranes (Maurel, 2007 ; Xu et al., 2014). Elles ont été localisées au niveau de la membrane plasmique (**PIP**/Plasma Intrinsic Protein) et dans la membrane de la vacuole (Tonoplaste) (**TIP**/Tonoplast Intrinsic Protein). Les protéines PIPs jouent un rôle important dans le contrôle du transport intercellulaire de l'eau. Les TIPs sont plutôt impliquées dans les échanges d'eau entre les compartiments cytosolique et vacuolaire et donc dans l'osmo-régulation (Hussain et al., 2016).

L'implication des aquaporines dans la tolérance aux divers stress abiotiques a été approuvée chez plusieurs espèces végétales. En effet, la surexpression du gène *TaAQP8* du blé (*Triticum aestivum*) stimule l'élongation racinaire chez les plantes de tabac en présence de fortes concentrations de sel (Hu et al., 2012). Toujours chez le tabac, Sade et al., (2010) ont démontré que le gène *NtAQP1* est impliqué dans l'amélioration de l'utilisation efficace de l'eau, de la conductivité hydraulique et du rendement en conditions de stress salin. Chez *Arabidopsis*, la surexpression du gène *MaPIP1;1* résulte en un meilleur développement du système racinaire et une nette réduction des dommages membranaires occasionnés par le stress salin et hydrique (Xu et al., 2014).

## 2. Les phytohormones- molécules clés dans la réponse aux stress abiotiques

Les phytohormones sont des molécules produites en très faibles concentrations, mais capables de réguler une panoplie de processus cellulaires dans les plantes. Ils œuvrent comme messagers chimiques pour véhiculer et réguler les activités cellulaires. Ils interviennent dans le contrôle d'un large éventail de processus physiologiques tout au long du cycle végétatif. En général, cinq classes de régulateurs de croissance sont identifiés (Wani et al., 2016). Ainsi, on retrouve les auxines et les gibbérellines qui stimulent principalement l'élongation cellulaire ; les cytokinines qui contrôlent la division cellulaire ; l'éthylène surtout connue pour son rôle dans la maturation des fruits et l'acide abscissique qui régule la sénescence et l'abscission des différentes parties de la plante. Outre ces cinq phytohormones qui existent naturellement, les brassinostéroïdes et les polyamines semblent intervenir dans la croissance des plantes et ainsi, ont fait l'objet des recherches approfondies (Upreti and Sharma, 2016).

Plusieurs phytohormones interviennent dans l'établissement des mécanismes de réponses aux stress abiotiques et biotiques. Typiquement, l'ABA joue un rôle prépondérant dans la réponse aux stress abiotiques alors que l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène interviennent plus dans la résistance aux pathogènes mais peuvent faire partie de l'arsenal de la réponse aux stress abiotiques (Zhang et al., 2006 ; Bari and Jones, 2009). Cependant, les mécanismes de réponse aux stress ne sont pas uniquement limités à ces hormones. Des études récentes ont souligné l'implication d'autres hormones, en occurrence, de l'auxine et ont fournis des preuves substantielles de la présence d'un cross-talk entre l'ABA, SA et JA et entre l'éthylène et les auxines dans la régulation des mécanismes de réponse aux stress (Verma et al., 2016).

## 2.1. L'acide abscissique

L'acide abscissique représente l'hormone végétale la plus importante dans la réponse aux fluctuations environnementales et par conséquent s'attribue par excellence, l'appellation de « hormone de stress » (Sah et al., 2016). L'ABA joue également un rôle crucial dans le contrôle de nombreux autres processus physiologiques tels que le développement de l'embryon, la dormance, le développement des graines, la promotion de la fermeture des stomates, la sénescence des feuilles et la réponse aux pathogènes et aux agressions physiques (Swamy and Smith, 1999 ; Tuteja, 2007).

L'implication de l'ABA dans la tolérance aux stress a été mise en évidence grâce à la découverte des mutants déficients en ABA (*aba1*, *aba2* et *aba3*) d'*Arabidopsis*. Ces derniers flétrissent et meurent facilement en présence de stress hydrique et présentent une faible croissance en réponse à la salinité (Xiong et al., 2001). Ces mutants déficients en ABA ont été également identifiés chez le maïs, la tomate et le tabac (Cho et al., 2009). Une augmentation drastique et rapide de la concentration endogène de l'ABA est observée chez plusieurs espèces végétales telles que le maïs (Wang et al., 2008), le riz (Ye et al., 2012), l'orge (Thameur et al., 2011), le soja (Bensen et al., 1988) et le blé (Guóth et al., 2009) en réponse au déficit hydrique. L'augmentation de la concentration endogène de l'ABA est également détectée en réponse au froid et à l'excès de sel (Sah et al., 2016). L'application exogène d'ABA permet l'amélioration de la réponse adaptative des plantes aux stress abiotiques. En effet, chez certaines espèces végétales, l'application de l'ABA augmente considérablement la tolérance de ces plantes à la sécheresse. Le traitement des plantes par l'ABA permet l'augmentation de la résistance au froid dans le concombre et la luzerne (Flores et al., 1988 ; Mohapatra et al., 1988) et atténue nettement les effets néfastes du stress salin chez le haricot et la pomme de terre (Khadri et al., 2006 ; Etehadnia et al., 2008).

Le contrôle de mouvement des stomates est régulé par un certain nombre des facteurs environnementaux tels que la lumière, la teneur en CO<sub>2</sub> et l'ensemble des stress biotiques et abiotiques. L'ABA intervient dans le contrôle des stomates en conditions de stress biotiques et abiotiques et ceci à travers l'activation et l'inactivation des canaux ioniques par les protéines kinases et les phosphatases (Lim et al., 2015). La protéine AAPK (ABA-Activated Protein Kinase) a été identifiée chez la fève (*Vicia faba*) comme étant protéine kinase spécifique des cellules de garde dont l'activité catalytique est déclenchée par l'ABA (Li and Assmann, 1996). Chez *Arabidopsis*, un homologue de la protéine AAPK ; la protéine kinase OST1 (Open Stomata 1) est responsable de la fermeture des stomates induite par l'ABA (Mustilli

et al., 2002). En effet, une fois activée, la protéine OST1 s'associe directement aux canaux anioniques SLAC1 et provoque leur phosphorylation ce qui empêche la libération des anions des cellules de garde et induit la fermeture des stomates (Lee et al., 2009). En plus de la régulation de l'ouverture et de la fermeture des stomates requise pour réduire les pertes d'eau en conditions de stress, l'ABA régule l'expression d'un ensemble de gènes dont les produits sont essentiels pour la réponse et/ou la tolérance aux stress abiotiques. Chez *Arabidopsis*, 245 gènes induits par l'ABA ont été identifiés par (Seki et al., 2002). Rabbani et ses collaborateurs ont pu identifier, chez le riz, 73 gènes induits par le stress dont 43 régulés par l'ABA (Rabbani et al., 2003).

La connaissance de l'ABA en tant que molécule clé dans la réponse aux stress abiotiques a été employée afin de développer des cultures dotées d'une meilleure tolérance vis-à-vis de diverses contraintes environnementales. Ainsi, la manipulation génétique des éléments impliqués dans les voies de biosynthèse, de catabolisme ou de signalisation de cette hormone a permis d'améliorer la tolérance au stress chez plusieurs espèces végétales (Sah et al., 2016). La surexpression du gène de biosynthèse de l'ABA ; *NCED1* (9-cis-époxy-caroténoïde dioxygénase) augmente considérablement la tolérance au stress hydrique chez la tomate et chez le tabac (Qin and Zeevaart, 2002 ; Thompson et al., 2007). L'introduction du gène *LeNCED1* de la tomate dans Pétunia (*Petunia hybrida*) améliore la résistance de cette dernière au stress hydrique (Estrada-Melo et al., 2015). De même, la surexpression des gènes *OsPYL3* et *OsPYL9* (Pyrobactin resistance) codant pour des récepteurs d'ABA permet une meilleure adaptation au gel et au stress hydrique chez le riz (Tian et al., 2015). Chez la tomate, la surexpression des gènes codant pour les récepteurs de l'ABA confère aux plantes transgéniques une tolérance au stress hydrique (Gonzalez-Guzman et al., 2014).

## 2.2. L'éthylène

L'éthylène est une phytohormone volatile impliquée dans plusieurs phases de la croissance et du développement des plantes, notamment de la maturation des fruits, la sénescence des fleurs et l'abscission des feuilles et des pétales (Wani et al., 2016). L'éthylène intervient également dans la formation de la coiffe apicale chez les plantes étiolées à l'obscurité, la régulation de l'expansion cellulaire ou le développement de la fleur. Cette hormone régule également la réponse de la plante aux stress biotiques, mais aussi aux stress abiotiques, tels que la sécheresse ou l'anoxie (O'Donnell et al., 2003).

L'implication de l'éthylène dans la réponse aux stress abiotiques a été mise en évidence grâce à l'étude des mutants insensibles en cette hormone. Ces derniers sont plus sensibles à la salinité suggérant que la voie de signalisation de l'éthylène réduit la sensibilité des plantes à la salinité (Cao et al., 2008). Plusieurs acteurs de la voie de signalisation de cette hormone ont été identifiés et semblent intervenir dans la réponse aux divers stress abiotiques. Parmi ces acteurs, certaines protéines DREB (facteurs de réponse à l'éthylène) interviennent dans la réponse au froid chez *Arabidopsis*. (Gilmour et al., 2004) ont pu améliorer la tolérance des plantes d'*Arabidopsis* au froid à travers la surexpression des gènes *DREB1A* et *DREB1B*. Toujours chez *Arabidopsis*, l'expression constitutive du gène *DREB2* permet une meilleure tolérance au stress hydrique et salin (Liu et al., 1998 ; Sakuma et al., 2006). D'autres membres de la famille des ERFs sont impliqués dans la tolérance aux stress. Chez le tabac, Trujillo et ses collaborateurs ont reporté que *SodERF3* est impliqué dans l'acquisition de la tolérance aux stress hydrique et salin (Trujillo et al., 2008). De même, Zhang et al., (2009) ont montré que la surexpression du gène *GmERF3* du Soja confère aux plantes transgéniques du tabac une meilleure tolérance à la salinité et à la sécheresse . Des études récentes ont montré que les ERFs régulent l'expression des gènes en conditions de stress abiotiques en se liant spécifiquement aux éléments *cis*-régulateurs GCC et DRE/CRT qui interviennent dans la réponse au froid et au stress osmotique (Wang et al., 2004).

### 2.3. L'acide salicylique

L'acide salicylique (SA) est un composé phénolique impliqué dans la régulation de la croissance et du développement des plantes. Il intervient dans la régulation d'un ensemble de processus physiologiques tels que la photosynthèse, la floraison, la maturation des fruits, le métabolisme de l'azote et de la proline, la production de la glycine bêtaïne (GB), le maintien de l'homéostasie cellulaire en conditions de stress et fournit ainsi une protection des plantes contre les stress (Raskin, 1992 ; Miura and Tada, 2014). L'acide salicylique semble également intervenir dans la régulation de l'ouverture et de la fermeture des stomates en conditions de stress et ceci indépendamment de l'ABA (Mori et al., 2001).

L'implication de l'acide salicylique dans la réponse et la tolérance au stress salin, hydrique et thermique a été étudiée d'une manière intensive chez plusieurs espèces végétales (Fahad and Bano, 2012 ; Yang et al., 2012 ; Fayez and Bazaid, 2014). L'application exogène de l'acide salicylique sur les plantes stressées permet la stimulation des mécanismes de tolérance aux stress abiotiques (Eyidogan et al., 2012). Chez le blé tendre (*Triticum aestivum*), l'application de 0,5mM de SA améliore considérablement la tolérance des plantes à la salinité

à travers la stimulation de la synthèse des antioxydants enzymatiques tels que GPX1, GPX, DHAR, GR, GST1, GST2, MDHAR et GS et l'augmentation de l'activité des enzymes impliqués dans la voie de l'ascorbate (AsA-GSH) (Li et al., 2013). Ce même constat a été également observé chez le maïs (*Zea mays*) en réponses aux basses températures (2°C). L'imbibition des graines de tomates et de petits pois dans une solution de 0,1- 0,5 mM de SA ou d'acétyl-SA augmente la tolérance de ces espèces aux stress hydrique et thermique (chaleur et froid) (Senaratna et al., 2000). L'ensemble des études conduites ont démontrées que l'amélioration de la tolérance des plantes par l'acide salicylique est étroitement associée à la stimulation du système d'antioxydants, l'accumulation des osmolytes (proline, glutathione), l'amélioration de l'absorption des éléments nutritifs (azote, phosphore, potassium...) ainsi que la réduction de la sensibilité à certaines hormones végétales (éthylène) (Kang et al., 2014).

#### **2.4. Les jasmonates**

Les jasmonates sont des cyclopentanones dérivés du métabolisme des acides gras membranaires. Le métyl-jasmonate (MeJA) et son acide libre ; l'acide jasmonique (JA) collectivement appelées jasmonates (JA) représentent les formes les plus répandues dans le règne végétal et participent à la régulation de divers processus de développement des plantes y compris la floraison, la fructification, la sénescence, le métabolisme secondaire et les réponses aux stress biotiques et abiotiques (Wani et al., 2016). Les jasmonates représentent des molécules de signalisation vitales induites par diverses contraintes environnementales, dont la salinité la sécheresse et aux radiations UV (Pauwels et al., 2009 ; Demkura et al., 2010 ; Seo et al., 2011). Ils présentent un grand potentiel pour atténuer les effets négatifs des stress environnementaux. En effet, l'application exogène du MeJA réduit efficacement les symptômes du stress salin chez les plants de Soja (*Glycine max*) (Yoon et al., 2009). Remarquablement, la concentration endogène des JA augmente significativement au niveau des racines de riz et permet ainsi de contrer les effets délétères du stress salin (Wang et al., 2001). Chez le citron, une augmentation rapide de la concentration du JA a été observée au niveau des racines après exposition au stress salin atteignant une concentration maximale après 6 heures de l'application du stress (Santino et al., 2013). Le traitement précoce des plantes de riz par le MeJA avant exposition au froid améliore considérablement la survie des plantes stressées plutôt que pendant ou après le stress (Lee et al., 1997).

## 2.5. L'auxine

Les auxines jouent un rôle prépondérant dans le contrôle de divers processus de développement des plantes comme le développement racinaire, la différenciation des tissus vasculaires, la formation des bourgeons axillaires, la dominance apicale, le développement floral et la maturation des fruits. Le rôle de l'auxine dans la réponse aux stress abiotiques reste encore mal connu, mais certaines études ont évoqué une éventuelle implication dans la réponse des plantes aux stress abiotiques. L'application de l'auxine permet de réduire les effets néfastes des stress chez plusieurs espèces végétales. Chez le blé, le traitement des graines par l'AIA supprime l'effet inhibiteur du stress salin sur la croissance (Irfan et al., 2005). Toujours chez le blé, une amélioration de la germination des graines cultivées en présence de fortes concentrations en sel a été obtenue grâce au traitement de celles-ci par l'AIA ou l'ANA (Akbari et al., 2007). Chez le piment, la tolérance aux températures élevées a été associée à la présence d'une forte concentration de l'AIA au niveau des organes reproducteurs (Upreti and Sharma, 2016).

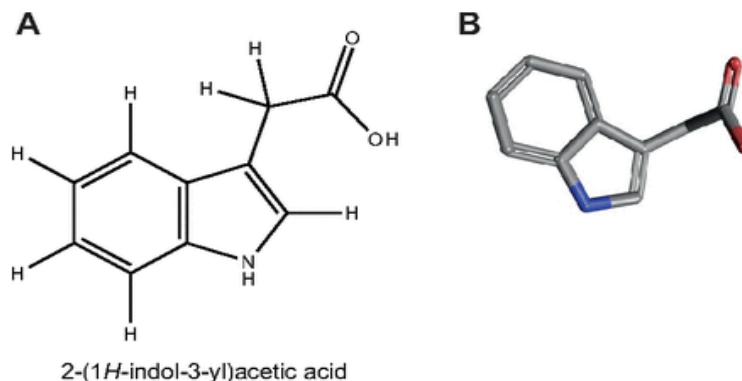
## II. L'auxine : biosynthèse, transport et signalisation

Le terme « auxine » provient du mot grec « auxein » ce qui désigne grandir/ agrandir (Sauer et al., 2013). L'auxine a été découverte grâce aux travaux de Charles et Francis Darwin en 1881 sur le phototropisme des coléoptiles de l'avoine. Ces derniers présentaient en contact avec la lumière une inflexion au niveau de la région apicale et que la courbure de ces coléoptiles vers la lumière est abolie lorsque l'apex est coupé ou recouvert d'un capuchon opaque. Ils constatent que la zone de courbure du coléoptile se situe légèrement en-dessous de l'apex. Ce constat a été expliqué la présence d'un signal de croissance qui une fois produit au sommet du coléoptile, migre jusqu'à la zone de croissance et induit une croissance plus rapide de la face ombrée du coléoptile par rapport à la face éclairée (Andres-Robin, 2012). Ce n'est qu'en 1934-1935 que cette substance a été identifiée comme étant l'acide indole 3- acétique grâce aux travaux des équipes Kögl en Hollande et K.V. Thimann aux Etats-Unis, qui ont montré que le bout du coléoptile séparé de la tige par un bloc de gélose continue de se courber en direction de la lumière alors que cette courbure est abolie quand le coléoptile est séparé de la tige par un bloc de mica, de platine ou de beurre de cacao (Mano and Nemoto, 2012). Ils en concluent qu'il s'agit d'un signal hydrosoluble, non pas électrique ni liposoluble. Sa structure finale a été découverte en 1931 par Kögl et Hagen-Smit (Kögl and Kostermans, 1935). Actuellement, le terme Auxine regroupe un ensemble de substances chimiques naturelles ou synthétiques de structure variable mais possédant des propriétés physiologiques identiques

et/ou voisines (Kepinski, 2007). L'auxine, dont la forme la plus prédominante est l'acide indole acétique (AIA), régule différents aspects de la croissance et du développement des plantes. Elle intervient dès les premiers stades de l'embryogenèse puis assure la croissance, l'organisation et la ramification des parties aériennes et souterraines. Ces multiples effets à l'échelle de la plante reflètent le contrôle qu'elle exerce sur la division cellulaire, l'élongation cellulaire et certaines étapes de différenciation vasculaire et florale (Yamamoto et al., 2007).

### 1. La biosynthèse de l'auxine

L'auxine est synthétisée à différents niveaux notamment au niveau des méristèmes, des jeunes primordiums, des tissus vasculaires et des organes reproducteurs. Elle est ensuite distribuée dans tous les tissus, compris dans les racines où elle s'accumule. Chez les plantes, la principale forme d'auxine est l'acide Indole-3-Acétique (AIA) (Figure 3). Elle est synthétisée dans les apex des tiges, les zones méristématiques, les jeunes feuilles des bourgeons terminaux et les graines en développement. Il atteint ensuite les différentes parties de la plante grâce à deux modes de transport: passif et actif (Bohn-Courseau, 2010).



**Figure 3** Structure de l'AIA. (A) Structure chimique de l'AIA en conformation plane montrant le noyau indolique sur lequel s'insère latéralement un groupement carboxyle en position terminale, (B) squelette carboné de la molécule d'AIA montrant la molécule d'azote en bleu et celle de l'oxygène en rouge (Ljung, 2013).

Malgré les grands progrès réalisés au cours des dix dernières années pour la compréhension des mécanismes moléculaires de la signalisation et du transport de l'auxine chez *Arabidopsis thaliana*, les différentes étapes de la biosynthèse et de la régulation de cette hormone restent encore mal connues (Dharmasiri et al., 2005 ; Paponov et al., 2005). Ceci s'explique en premier lieu par la complexité de sa biosynthèse chez les plantes. En effet, l'auxine présente dans les différents tissus végétaux peut provenir de l'une des voies de biosynthèse ou suite à la dégradation hydrolytique de ses conjugués. De plus, et bien que les plantes partagent les mêmes mécanismes de base pour la biosynthèse de l'auxine, certaines espèces



ont recours à des stratégies uniques et propres à elles pour optimiser la biosynthèse de cette hormone (Zhao, 2010).

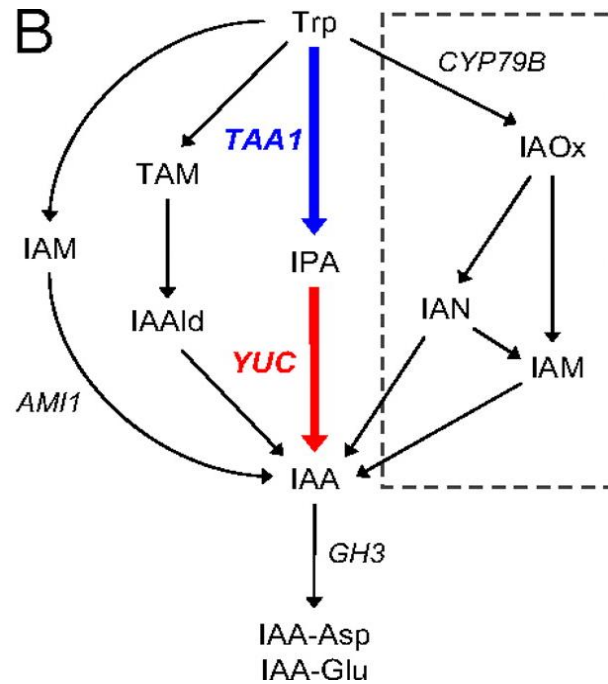
L'analyse des mutants de l'auxine chez *Arabidopsis thaliana* a révélé l'existence des différentes voies de biosynthèse de l'auxine impliquant le tryptophane (Trp) (Eckardt, 2001). De ce fait, des mutants déficients de tryptophane ont été générés pour élucider l'énigme de la biosynthèse de l'auxine. Cependant, une quantification de la concentration de l'AIA entre les lignées sauvages et les mutants de tryptophane montrant ainsi que l'AIA pouvait être également synthétisée par voie indépendante de tryptophane. Des études récentes sur des mutants auxotrophes de Trp ont montré que les voies dépendantes et indépendantes de Trp contribuent à la biosynthèse de l'AIA dans les pousses mais la voie dépendante de Trp reste prédominante dans les racines et est responsable du gravitropisme racinaire (Kiyohara et al., 2011).

### **1.1. La voie de biosynthèse d'auxine indépendante de tryptophane**

La voie de biosynthèse dépendante de tryptophane représente la voie la plus étudiée et la mieux décrite chez les plantes. L'existence d'une voie de biosynthèse indépendante de tryptophane a pu être démontrée au début des années 90. En effet, l'analyse des mutants de biosynthèse du tryptophane a permis de démontrer que les plantes peuvent également synthétiser l'AIA sans utiliser le tryptophane comme substrat intermédiaire (Woodward and Bartel, 2005). Chez *Arabidopsis*, les mutants affectés dans la synthèse du tryptophane *trp3-1* et *trp2-1* présentent respectivement des formes altérées des enzymes dans Trp  $\alpha$  et  $\beta$ -synthase (Eckardt, 2001). Ces mutants accumulent des formes conjugués d'AIA malgré que la concentration du tryptophane soluble soit réduite (Müller and Weiler, 2000). De même, le mutant orange péricarpe chez le maïs, affecté dans la fonction de Trp  $\beta$  synthase, accumule les formes conjuguées de l'AIA (Wright et al., 1992). L'ensemble de ces données confirment la présence de la voie indépendante de tryptophane pour la biosynthèse de l'AIA. Cependant, les bases moléculaires restent encore non élucidées.

### **1.2. Les voies de biosynthèse d'auxine dépendantes de tryptophane**

La voie de biosynthèse de l'AIA dépendante du tryptophane représente la voie de biosynthèse de l'auxine la plus étudiée et détaillée et comprend quatre voies distinctes qui sont respectivement : (i) la voie du tryptamine, (ii) la voie de l'indole -3 acétaldoxine (IAOx), (iii) la voie de l'acide indole -3 puryviqne et (vi) la voie de l'indole -3 acétalamide (IAM) (Figure 4).



**Figure 4** La voie de biosynthèse de l'auxine dépendante du Tryptophane (Mashiguchi et al., 2011).

### 1.3. La localisation de la biosynthèse de l'auxine

La localisation de la synthèse de l'auxine semble être un aspect important dans la régulation globale des fonctions de l'auxine (Zhao, 2010). Pendant longtemps, on croyait que la connaissance de la localisation de la biosynthèse de l'auxine n'était pas importante étant donné que l'auxine peut atteindre n'importe quelle zone de la plante grâce au transport polaire. Cependant, les récents progrès ont démontré sans équivoque que la biosynthèse localisée de l'auxine joue un rôle crucial dans presque tous les processus de développement à savoir l'embryogenèse, la croissance des semis, la structuration vasculaire, le développement racinaire et florale (Zhao, 2014).

L'auxine peut être produite à la fois au niveau des pousses et des racines des plantes. Des études récentes menées chez *Arabidopsis thaliana* ont montré le gène *TAA1* impliqué dans la voie IPA de biosynthèse de l'auxine est exprimé au niveau des racines et des pousses. De plus, l'évaluation de l'expression des gènes *YUCCA* a révélé que ces derniers s'expriment au niveau de l'ensemble des organes y compris les fleurs, les feuilles et les racines (Stepanova et al., 2008). Les effets de l'inactivation des gènes *YUC2* et *YUC6* au niveau des étamines ne sont pas rétablis par la production de l'auxine dans les autres organes floraux, ce qui signifie que durant le développement, chaque organe assure sa propre synthèse d'auxine pour sa croissance. De plus, l'expression des gènes *YUCCA* et *TAA1* varie selon de stade de développement. En effet, ces gènes s'expriment au niveau de la région apicale au stade globulaire

de l'embryogenèse puis se concentrent au niveau du méristème apical quand l'embryon atteint le stade cordiforme avant de se concentrer finalement au méristème apical dans l'embryon mature.

#### 1.4. La régulation de la biosynthèse de l'auxine

La biosynthèse de l'auxine peut être régulée aussi bien par les facteurs environnementaux que par les signaux développementaux propres à la plante (Tao et al., 2008). Des études récentes ont montré que l'expression des gènes *YUCCA* est contrôlée par des facteurs de transcription qui se lient à la région promotrice de ces gènes. De ce fait, plusieurs facteurs de transcription ont été identifiés par leur capacité à se lier directement aux promoteurs des gènes *YUCCA* et/ou *TAA*. Parmi ces facteurs de transcription, on distingue les SHORT INTENOTES/STYLISH (SHI/STY) qui interviennent dans le développement des feuilles et des fleurs en régulant l'expression des gènes *YUC*. Le gène *STY1* code pour une protéine qui se lie directement au motif ACTCTAC retrouvé au niveau du promoteur des gènes *YUC4* et *YUC8* permettant ainsi l'activation de la transcription de ce dernier (Eklund et al., 2010). L'expression des gènes *YUC2* et *YUC4* semble également être régulée à la fois par LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) au stade embryonnaire (Stone et al., 2008) et par la famille de facteurs de transcription dite NGATHA qui contrôle d'une façon redondante le développement du style et régule également l'expression de ces gènes au niveau de la région apicale du gynécée chez *Arabidopsis thaliana* (Zhao, 2014). Les gènes *YUC5* et *TAA1* sont par contre régulés par *IDD14* et *IDD16* (Cui et al., 2013).

Les facteurs environnementaux interviennent aussi dans la régulation de la synthèse de l'auxine. En effet, l'analyse des mutants déficients dans la réponse d'évitement de l'ombre « shade avoidance response » chez *Arabidopsis* a montré que l'expression du gène *TAA1* est fortement régulé par la lumière (Tao et al., 2008). Il paraît que *Phytochrome-Interacting Factors* (PIFs) régulent l'expression d'un certain nombre des gènes *YUCCA* en absence de lumière. Li et ses collaborateurs ont reporté que PIF7 se lie à la région promotrices des gènes *YUC2*, *YUC5*, *YUC8* et *YUC9* et active ainsi la transcription de ces gènes (Sun et al., 2012).

## 2. Le transport de l'auxine

L'auxine produite dans certains tissus spécifiques, doit être distribuée aux autres parties de la plante. Deux types de transport sont mis en évidence : transport passif et transport actif. Le transport passif est un transport direct et rapide qui se fait dans une longue distance de tissus sources vers les tissus puits (racines) à travers le phloème. Le transport actif permet le transport

de l'auxine de cellule en cellule de manière polaire, de la partie aérienne vers les racines (Vanneste and Friml, 2009). Ce système de transport est basé sur un modèle chimio-osmotique et se déroule en deux étapes : l'influx d'auxine dans la cellule suivie de son efflux.

En général, les molécules d'AIA subissent une dissociation réversible au niveau de l'espace extracellulaire, dont l'équilibre dépend du pH. Dans un environnement acide (environ 5,5), l'AIA sous forme protonée plus lipophile et peut rentrer dans la cellule par diffusion passive à travers la membrane plasmique (figure 5). Comme le pH du cytoplasme est moins acide (pH=7) que le pH extracellulaire, les molécules d'AIA sont souvent sous forme anionique moins lipophile et donc ne peuvent pas diffuser à travers la membrane plasmique, elles sont importées via des transporteurs d'influx AUX1/LAX. Dans le cytosol, IAA se dissocie et nécessite un transport actif à travers les protéines transporteur d'efflux PIN ou ABCB pour quitter la cellule. La localisation subcellulaire polarisée des protéines PIN détermine la direction du flux d'auxine dans la plante (Friml, 2010).

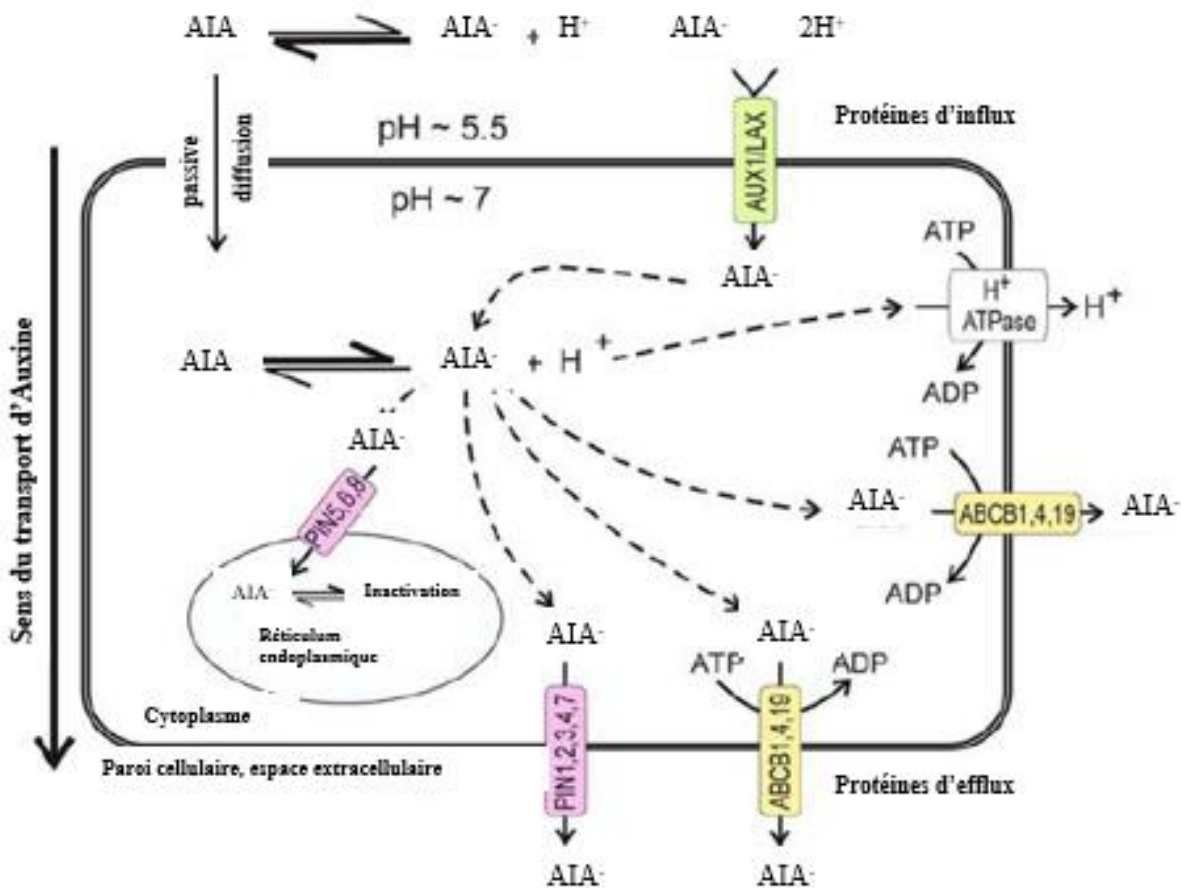


Figure 5 Modèle de transport intercellulaire de l'auxine (adaptée à partir de Friml, 2010).

### **3. Rôles de l'auxine**

#### **3.1. Rôles de l'auxine dans la plante**

L'auxine joue un rôle central dans la régulation d'un large éventail de processus physiologiques et développementaux des plantes et également dans la réponse aux stress environnementaux. Elle intervient dès les premiers stades de l'embryogenèse puis assure la croissance, l'organisation et la ramification des parties aériennes et souterraines. Ces multiples effets à l'échelle de la plante reflètent le contrôle qu'elle exerce sur la division cellulaire, l'élongation cellulaire et certaines étapes de différenciation vasculaire et florale (Yamamoto et al., 2007). La plasticité du développement et de la réponse des plantes à une multitude de contraintes environnementales laissent penser que les mécanismes de régulation sont très complexes. En effet, la privation des cellules de l'auxine conduit à l'arrêt de la division cellulaire qui ne peut être restauré qu'après application de l'auxine (Stals and Inzé, 2001). L'inactivation de la voie de perception de l'auxine provoque la perturbation de la division cellulaire voire même l'arrêt du cycle cellulaire (David et al., 2007). L'auxine induit également l'élongation rapide des cellules d'hypocotyle et des feuilles (Chen et al., 2001). L'étude du développement racinaire en réponse à différentes concentrations de l'auxine a montré que de faibles concentrations en AIA stimulent la croissance des racines alors que les concentrations élevées inhibent l'élongation racinaire (Casimiro et al., 2001 ; Overvoorde et al., 2010). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'auxine est transportée des jeunes feuilles à l'apex racinaire à travers les tissus vasculaires (transport acropète) puis l'AIA est redirigée vers la base de la racine par le biais des couches cellulaires externes (Le transport basipète) (Aloni et al., 2006). Ce processus déclenche la polarité des cellules conduisant à la différenciation des racines et des tissus (Saini et al., 2013). Ainsi, il a été démontré que l'inhibition du transport de l'auxine restreint l'initiation et l'émergence des racines latérales malgré que ces dernières émergent relativement loin de l'apex racinaire (Casimiro et al., 2001). La présence de l'auxine est essentielle pour l'initiation des organes et pour la formation des feuilles (Reinhardt et al., 2003). L'auxine participe également à la formation des organes floraux (Cheng and Zhao, 2007). L'auxine intervient également dans le contrôle des différents aspects du développement du fruit y compris la nouaison, la croissance, la maturation et l'abscission de celui-ci (Pattison et al., 2014).

#### **3.2. L'auxine et la réponse aux stress abiotiques**

L'auxine est une hormone végétale indispensable au développement de la plante. Elle joue un rôle crucial dans le contrôle des divers aspects de croissance et de développement des plantes

y compris, l'embryogenèse, l'organogenèse, la croissance tropicale, le développement des racines latérales, la différenciation des tissus vasculaires, l'initiation, le développement et la maturation des fruits ... (Kumar et al., 2011). Elle semble intervenir notamment dans la réponse aux stress abiotiques. En effet, des études récentes ont évoqué une potentielle implication de l'auxine dans la réponse aux stress abiotiques. Ainsi, une augmentation substantielle de la teneur endogène en AIA a été observée chez le riz en réponse aux températures extrêmes (Du et al., 2013).

Sur le plan moléculaire, plusieurs acteurs de la voie de signalisation de l'auxine sont impliqués dans la réponse aux stress abiotiques. Chez le riz (*Oryza sativa*), Jain and Khurana, (2009) ont démontré que les facteurs de réponse à l'auxine *OsARF11* et *OsARF15* présentent une expression différentielle en réponse à la salinité suggérant qu'ils sont impliqués dans la réponse à ce stress chez cette espèce. Toujours chez le riz, Zhou et ses collaborateurs ont souligné l'implication de neuf ARFs dans la réponse au stress hydrique. Il s'agit respectivement de : *OsARF2*, *OsARF4*, *OsARF10*, *OsARF14*, *OsARF16*, *OsARF18*, *OsARF18*, *OsARF19*, *OsARF22* et *OsARF23* (Zhou et al., 2007). Chez le sorgho (*Sorghum bicolor*), seuls *SbARF10*, *SbARF16* et *SbARF21* sont induits d'une manière significative au niveau des feuilles et des racines exposées au stress hydrique (Wang et al., 2010). Une étude similaire réalisée chez le soja (*Glycine max*) a signalé une surexpression des gènes *GmARF33* et *GmARF50* en conditions de déficit hydrique (Van Ha et al., 2013). D'autres acteurs de la voie de signalisation de l'auxine sont impliqués dans la réponse aux stress abiotiques. Il a été démontré que le miR393 est induit par le froid, la déshydratation, la salinité et l'ABA. Chez *Arabidopsis thaliana*, la sur expression d'une forme du gène *TIR1* résistante au *miR393* augmente significativement la tolérance des plantes au stress salin, ce qui permet l'augmentation du taux de germination, l'accumulation de la proline et des anthocyanines, la diminution des pertes en eau, la réduction de l'inhibition de l'élongation de la racine, le retard de la sénescence et la stabilisation des pigments chlorophylliens (Chen et al., 2014). Cependant, son rôle exact dans la réponse au stress reste encore indéfini. Le gène *AtNAC2* code pour un facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress salin et également dans le développement des racines latérales. Ce gène est induit par la salinité, l'ABA, l'éthylène et également par l'auxine. De plus, il semblerait que des mutations dans la protéine TIR1 inhibent l'expression de ce gène suggérant que l'auxine a un rôle positif dans l'induction de ce gène en condition de stress salin (He et al., 2005).

En plus de l'implication de la voie de signalisation de l'auxine dans la tolérance aux stress abiotiques, il semblerait même que les éléments impliqués dans la biosynthèse et dans le transport de l'auxine interviennent dans la réponse au stress. Chez *Arabidopsis thaliana*, l'activation du gène *YUCCA6* (*YUC6*) qui code pour une flavine monooxygénase ; molécule clé dans la voie de biosynthèse de l'auxine dépendante du tryptophane, engendre une augmentation de la concentration endogène de l'auxine et améliore la résistance des plantes au stress hydrique (Im Kim et al., 2013). De plus, les mutants de transport de l'auxine *aux1* sont relativement hypersensibles à la salinité et aux températures élevées indiquant un rôle fonctionnel du transport de l'auxine dans la tolérance au stress abiotique (Krishnamurthy and Rathinasabapathi, 2013). Le gène *PIN3* qui code pour un transporteur de l'auxine et qui intervient dans le gravitropisme de la racine est inhibé par le froid ce qui suggère que ce dernier peut affecter le transport de l'auxine (Shibasaki et al., 2009).

#### 4. La perception de l'auxine

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 précoce et les mécanismes cellulaires induits par cette hormone pléiotrope. Ce n'est que depuis ces 20 dernières années, avec l'avènement des outils de la génétique inverse, que les données relatives à la voie de transduction du signal auxinique et à la régulation transcriptionnelle des gènes de réponse à l'auxine ont commencé à émerger (Van Oostende, 2006). Ainsi, plusieurs molécules réceptrices ont été identifiées telles que le glutathione S transférase (Bilang et al., 1993), le  $\beta$ -glucosidase (Venis et al., 1995) et le 1,3- glucanase (Macdonald, 1997). Chacune de ces protéines présente une affinité différente avec l'auxine et une localisation spécifique. Au début des années quatre-vingts, l'ABP1 « Auxin-Binding Protein 1 », a été identifiée en tant que récepteur de l'auxine (Vanneste and Friml, 2009).

Récemment, d'autres récepteurs de l'auxine ont été décrits, il s'agit des protéines TIR1 « Transport Inhibitor Receptor 1 » et AFB « Auxin Receptor F-Box ». Ces deux récepteurs nucléaires font partie du complexe « SCF E3 ubiquitin ligase » impliqué dans la dégradation des répresseurs des gènes de réponse à l'auxine (Iglesias et al., 2010).

#### 4.1. Le récepteur auxinique : AUXIN BINDING PROTEIN 1

##### 4.1.1. Structure du récepteur « Auxin Binding Protein 1 »

L'ABP1 est une protéine glycosylée dimérique de 43kDa présente une très grande affinité vis-à-vis de l'auxine et de ce fait elle est suggérée comme un récepteur de cette hormone

et est localisée au niveau du réticulum endoplasmique, de la membrane plasmique et de la paroi cellulaire (Hopkins, 2003). Elle a été isolée pour la première fois des plantes de maïs grâce à son affinité à l'auxine. L'analyse des mutants chez *Arabidopsis* a abouti à la conclusion que la protéine ABP1 est essentielle pour l'embryogenèse, la division et l'expansion cellulaire, le contrôle de l'activité des méristèmes, la croissance racinaire et ainsi pour d'autres processus de développement (Gao et al., 2015). Les protéines ABP1 sont codées par une famille de gènes réduite chez *Arabidopsis*. Le nombre de gènes qui l'encodent ainsi que leur localisation varient chez les différentes espèces. L'ABP1 fait partie de la superfamille des « protéines Cupin » caractérisée par la prédominance d'un motif antiparallèle dit «  $\beta$ -sheet motif » (Bertoša et al., 2008). Elle présente une structure particulière composée de domaines conservés, le domaine BoxA qui permet la liaison avec l'auxine, le domaine BoxB et un C-terminal KDEL tétra-peptidique (Lys-Asp-Glu-Leu) qui lie la protéine au réticulum endoplasmique (Zažímalová et al., 2010).

#### **4.1.2. Fonctions de la protéine « Auxin Binding Protein 1 »**

La protéine de liaison de l'auxine 1 (ABP1) a été longtemps caractérisée comme étant une composante essentielle de l'action précoce de l'auxine au niveau de la membrane plasmique. Cependant, son rôle dans les réponses en aval reste mal connu jusqu'à présent (Tromas et al., 2010). Deux décennies de recherches intenses ont permis de conclure que l'ABP1 se lie spécifiquement à l'auxine et ainsi représente un récepteur auxinique ou une protéine capable de moduler la concentration de cette hormone (Chen et al., 2001). Plusieurs études suggèrent que la protéine ABP1 est impliquée également dans la médiation de certaines réponses cellulaires à l'auxine, à savoir, la division et l'élongation cellulaire, l'hyperpolarisation de la membrane plasmique et les flux d'ions (Bertoša et al., 2008; Shi and Yang, 2011). La surexpression du gène ABP1 confère une expansion dépendante de l'auxine des cellules différenciées qui ne sont pas de nature dynamique (Vanneste and Friml, 2009). L'identification des mutants *abp1* et des mutants knockdown chez *Arabidopsis* a montré que la protéine ABP1 est requise pour l'ensemble des réponses auxinique y compris la modulation de l'expression des gènes (Tromas et al., 2010, 2013). Des études récentes indiquent que la protéine ABP1 agit en amont de la voie de signalisation TIR1/AFB ainsi régule négativement cette voie de signalisation de l'auxine (Tran and Pal, 2014).

#### **4.1.3. La voie de signalisation de la protéine « Auxin Binding Protein 1 »**

Bien que la protéine ABP1 ait été reconnue comme un récepteur de l'auxine, des études portant sur l'identification de la voie de signalisation de l'ABP1 ont suggéré que cette dernière nécessite



l'intervention d'un co-récepteur. Jusqu'à présent, aucun co-récepteur n'a pu être identifié. Cependant, la protéine CBP1 (C-Terminal Peptide-Binding Protein 1), protéine de la membrane plasmique qui présente une homologie avec la protéine SKEWED5 (SKU5) d'*Arabidopsis thaliana* participe à l'ancrage de la protéine ABP1 à la membrane plasmique (Sauer et al., 2013; Tran and Pal, 2014). Récemment, plusieurs études ont mis en évidence l'implication d'une protéine leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) dans la transmission du signal auxinique à travers la voie de l'ABP1 (Sauer et al., 2013). Plusieurs phospholipases sont également impliquées dans la signalisation de l'auxine par la voie de l'ABP1 : PLD, sPLA2 et pPLA (Gao et al., 2015).

#### **4.2. La voie S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN**

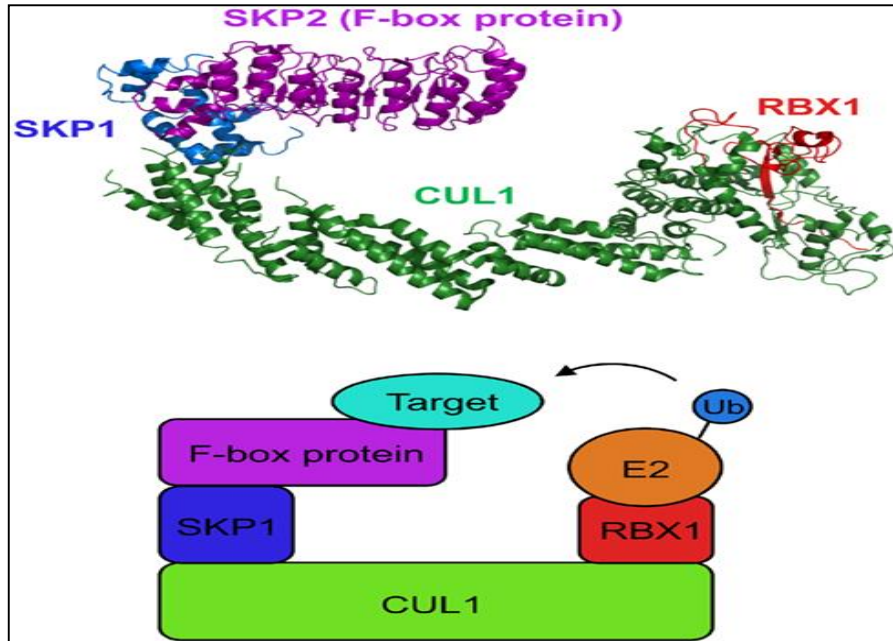
Des études récentes ont permis l'identification d'un nouveau récepteur auxinique connu sous le nom de S-phase kinase-associated protein 2A (SKP2A). La protéine SKP2A se lie directement à l'auxine et déclenche la protéolyse des répresseurs du cycle cellulaire et induit ainsi la division cellulaire (Takahashi, 2013). La protéine S-Phase Kinase-Associated Protein 2A (SKP2A) est une protéine nucléaire de type F-Box qui intervient dans la régulation des facteurs de transcription du cycle cellulaire (Jurado et al., 2010). Elle permet le contrôle de la stabilité d'au moins deux facteurs de division cellulaire qui sont respectivement l'adénovirus E2 promoter binding factor C (E2FC) et la protéine de dimérisation B (DPB). Cette dernière est impliquée dans les voies métaboliques de la signalisation de la lumière (del Pozo et al., 2006). Chez *Arabidopsis thaliana*, la stabilité de la protéine SKP2A est fortement régulée par l'auxine qui en effet stimule sa dégradation. La protéine SKP2A est régulée à deux niveaux distincts : (i) au niveau transcriptionnel durant le cycle cellulaire et (ii) au niveau post-traductionnel par ubiquitination à travers le complexe Ubiquitine/protéasome 26S (Jurado et al., 2010).

#### **4.3. La voie de signalisation TIR 1/AFB**

##### **4.3.1. Structure du TIR1 et des AFB**

Le signal auxinique est perçu par un complexe connu sous le nom de SCFTIR1. Ce complexe est formé de quatre protéines qui sont respectivement : la protéine E3-ubiquitin-protein ligase RING-BOX PROTEIN 1 (RBX1), La protéine S PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 1 (SKP1 ou ASK1), la protéine CULLIN 1 (CUL1) et finalement la protéine TRANSPORT INHIBITOR RECEPTOR 1 (TIR1) (Sparks et al., 2013). La protéine TIR1 présente une structure en champignon avec 18 répétitions riches en Leucine (LRR) à l'extrémité

C-terminal et un domaine F-box qui interagit avec la protéine ASK1 à l'extrémité N-terminal (Tan et al., 2007; Hayashi, 2012).



**Figure 6** Schéma représentant le complexe SCF. Le complexe SCF contient une protéine RBX1 (RING-box1), une protéine CUL1 (cullin 1), une protéine SKP1 (protéine associée à la phase-kinase S1) et une protéine hébergeant un domaine F-box, qui lie directement SKP1. La protéine F-box est composée des domaines de liaison à la protéine LRR (leucine-rich repeat) qui se lie aux substrats cibles pour la dégradation (Magori et Citovsky, 2011).

Le génome d'*Arabidopsis thaliana* contient cinq protéines liées au récepteur TIR1 nommées Auxin Signalisation F-BOX1-5 (AFB1-5). L'alignement des séquences a montré que la protéine AFB1 est étroitement liée à la protéine TIR1 et présente 70% de similitudes, alors que les protéines AFB2 and AFB3 présentent plus de 80% de similitudes entre elles (Parry et al., 2009). Les protéines AFB4 et AFB5 sont à 76% identiques les unes aux autres et sont à environ 50% identiques à la protéine TIR1 (Calderon-Villalobos et al., 2010). Des analyses génétiques ont montré que les protéines TIR1 et AFB2 sont les récepteurs auxiniques plus abondants chez les plantes (Pierre-Jerome et al., 2013). Des analyses *in vivo* ont démontré que tout comme la protéine TIR1, les protéines AFB1-3 interagissent avec les sous-unités ASK1-CUL pour former les complexes SCF (Dharmasiri et al., 2005). Le génome d'*Arabidopsis thaliana* contient 6 protéines CUL, 3 protéines RBX, 21 protéines ASKs et environ 700 protéines de type F-box. Les complexes SCF forment la plus large famille de sous unités de l'ubiquitine-ligase E3 chez les plantes. TIR1 est l'un des premières protéines F-box identifiées et bien caractérisées chez les plantes. Les protéines F-box jouent le rôle de récepteur des protéines de type SCF E3 ubiquitine ligase conférant ainsi une spécificité de substrat à ces derniers. Les sous-unités CUL et RBX1 forment le noyau des complexes SCF. Ils se lient

à divers sous-complexes FBP-Skp1 et permettent le recrutement de l'enzyme de conjugaison E2-ubiquitine (Calderon-Villalobos et al., 2010). Le complexe SCF est régulé par la modification de la sous-unité CUL et ceci à travers la protéine reliée à l'ubiquitine dite RUB/NEDD8. La conjugaison entre les protéines RUB et CUL se produit d'une façon similaire à la conjugaison de l'ubiquitine mais nécessite tout de même l'intervention des enzymes E1 et E2. Les protéines RUB/NEDD8 sont par la suite retirées de la sous-unité CUL par le signalosome COP1 (CSN); qui n'est qu'un complexe multiprotéique présentant des similitudes avec le protéasome 26S (Osaka et al., 2000).

### **4.3.2. Les fonctions des protéines TIR1 et AFBs**

#### **4.3.2.1. La fonction des protéines TIP1 et AFB1-3**

Les protéines TIR1 et AFBs constituent une nouvelle famille des récepteurs auxiniques. Des études récentes ont montré que les protéines AFB1-3 contribuent à la réponse auxinique à travers la régulation de la dégradation des protéines Aux/AIA. De plus, la plupart des cellules végétales semblent exprimer jusqu'à quatre gènes fonctionnellement redondants codant pour les récepteurs d'auxine. Ainsi, une perte de la réponse auxinique est atteinte seulement chez les mutants quadruples *tir1afb1 afb2 afb3* (dépourvus de tous ces gènes) (Dharmasiri et al., 2005). Ces derniers présentent plusieurs altérations à savoir un échec dans la spécification du méristème racinaire à l'état embryonnaire, une détérioration dans la formation de l'hypocotyle, du crochet apical, des racines latérales, de la morphologie des feuilles et du développement floral (Tatematsu et al., 2004). Ces altérations rencontrées chez ces mutants quadruples sont semblables à celles aperçues chez les doubles mutants *iaa12/bdl* ou *arf5/mp* suggérant que la létalité des plantules est peut-être due à l'accumulation des protéines AIA12 et AIA13. Ainsi, les protéines TIR1, AFB1, AFB2 et AFB3 assurent la signalisation de l'auxine au cours de l'embryogenèse et du développement de la plante (Parry and Estelle, 2006).

#### **4.3.2.2. La fonction des protéines AFB4-5**

Les protéines AFB4 et AFB5 présentent des différences sur le plan structural et fonctionnel par rapport aux autres récepteurs AFBs et TIR1. Les protéines AFB4-5 semblent plus spécifiques à une auxine synthétique nommée Picloram (McSteen and Zhao, 2008; Hayashi, 2012). Ces deux protéines sont considérées comme des régulateurs négatifs de la réponse auxinique. En effet, contrairement aux autres récepteurs AFBs, la perte de fonction de la protéine AFB4 ou de la protéine AFB5 entraîne une panoplie de défauts de croissance similaires à ceux rencontrés en cas d'hypersensibilité à l'auxine comprenant une augmentation

de l'élongation de l'hypocotyle et du pétiole et de la formation des racines latérales. Par ailleurs, le triple mutant *tir1afb2afb4* présente la même élongation de l'hypocotyle et du pétiole que chez le simple mutant *afb4* montrant que l'AFB4 est épinastrique pour TIR1 et AFB2 dans ces tissus (Greenham et al., 2011).

#### **4.3.3. La voie de signalisation TIR1/AFBs**

Plusieurs études ont établi que les protéines TIR1/AFBs véhiculent le signal auxinique grâce à leur liaison avec les protéines Aux/IAA. En effet, elles se lient aux protéines Aux/IAA à travers un domaine conservé nommé Domaine II composé d'un motif GWPPV (Tan et al., 2007; Hayashi, 2012). La liaison de l'auxine aux protéines Aux/IAA n'induit pas des changements dans la conformation du complexe SCFTIR1 mais nécessite l'interaction TIR1-ASK et augmente avec la liaison de l'auxine (Tan et al., 2007; Calderon-Villalobos et al., 2010).

L'interaction entre les protéines TIR1/AFBs, l'auxine et les protéines Aux/IAA conduit à la dégradation de ces derniers par le complexe protéasomique 26S. Ce mécanisme de dégradation permet à la régulation des gènes de réponse à l'auxine (Détailé plus loin dans la section) (Tan et al., 2007 ; Parry et al., 2009).

### **5. La signalisation de l'auxine**

Quels que soient les récepteurs de l'auxine et les voies de transduction du signal, il est évident que l'application exogène de l'auxine peut rapidement et précisément modifier l'expression des gènes impliqués dans divers processus de développement des plantes. Ces réponses au niveau de l'expression des gènes peuvent être détectées après 2 ou 3 minutes de la modification de la concentration de l'auxine (Guilfoyle et al., 1998). L'analyse des régions promotrices des gènes induits par l'auxine tels que le gène *PS-IAA4* rencontré chez le petit-pois, le gène *GH3* du soja a permis l'identification d'une séquence consensus TGTCTC nommée AuxRE (Ulmasov et al., 1995). Ainsi, des constructions artificielles formées par la répétition du motif AuxRE telle que DR5 ont été générées et ont permis l'identification d'un acteur principal dans la réponse auxinique. Il s'agit d'une famille de facteurs de transcription connue sous le nom des « Auxin Response Factors ». Ces facteurs de transcription semblent interagir avec les protéines Aux/IAA au niveau de la séquence cis-consensus AuxRE (Weijers et al., 2006).

## 5.1. Les protéines Aux/AIA

Les Aux/AIA ont été identifiés grâce à l'induction rapide de leur expression en réponse à l'auxine. Ils forment avec les « small auxin up RNA » (SAUR) et les Gretchen Hagen 3 (GH3) les trois familles des gènes de réponse précoce à l'auxine (Abel and Theologis, 1996 ; Jain et al., 2006). Les Aux/AIA ont été repérés chez plusieurs espèces végétales mais pas chez les bactéries, les champignons ou encore les animaux. Ainsi, cette famille de protéines serait probablement unique aux plantes (Reed, 2001). L'ensemble des membres de la famille des Aux/AIA a été identifié chez *Arabidopsis*, le riz, le maïs, le peuplier, le sorgho et chez la tomate et présentent une structure en quatre domaines (I, II, III et IV) fortement conservés (Guilfoyle et al., 1998; Tiwari et al., 2001).

### 5.1.1. Structure des Aux/AIA

Les protéines Aux/AIA sont des protéines nucléaires qui partagent quatre motifs de séquences d'acides aminés conservés nommés domaines I, II, III et IV bien que plusieurs protéines prédites manquent un ou plusieurs de ces domaines sont également inclus dans cette famille de protéines (Tian and Reed, 2001). Le domaine I est un domaine répresseur qui contient le motif riche en leucine (LxLxL) dit EAR (Ethylene Response Factor [ERF]-associated amphiphilic repression) responsable du recrutement des co-répresseurs transcriptionnels TOPLESS (TPL) (Long et al., 2006 ; Calderon-Villalobos et al., 2010). Le domaine I représente le domaine le plus petit et le moins strictement conservé des trois autres domaines et dont aucune activité biochimique spécifique n'ait été attribuée. En plus de l'activité répressive du domaine I des protéines Aux/IAA, ce domaine assure l'interaction entre les Aux/AIA et le domaine « C-terminal to lissencephaly homology » (CTLH) de la famille des co-répresseurs Topless (TPL). La famille des protéines TPL est formée de 5 membres chez *Arabidopsis thaliana*. Les Topless sont des co-répresseurs de type Groucho/Tup1-like qui interagissent avec le domaine de répression EAR des Aux/AIA et modifie sans doute la chromatine à l'état répressif (Long et al., 2006).

Le domaine II des protéines Aux/AIA représente le domaine le plus conservé. Les 17 acides aminés formant ce domaine permet le déclenchement de la dégradation de l'auxine à travers l'interaction avec les protéines TIR1/AFBs (Calderon-Villalobos et al., 2010). En effet, il a été démontré que le domaine II interagit avec la protéine TIR1 au niveau du motif conservé GWPP ce qui déclenche la dégradation rapide des protéines Aux/AIA (Tiwari et al., 2004; Jain et al., 2006). Des mutations au niveau de ce motif provoquent une stabilisation des protéines Aux/AIA et ainsi conduisent à une répression des gènes de réponse à l'auxine (Tiwari et al.,

2001 ; Jain et al., 2006 ; Guilfoyle, 2015). Certaines protéines Aux/AIA dont le domaine II est absent ont une durée de vie plus prolongée par rapport aux protéines Aux/AIA typiques tandis que ceux qui manquent à la fois des domaines I et II ne peuvent pas fonctionner comme répresseurs (Tiwari et al., 2004).

Les deux autres domaines conservés des Aux/AIA sont nommés domaines III et IV. Ils sont localisés au niveau de la région C-terminale de la protéine. Ils sont également rencontrés au niveau de la région carboxylique des ARFs (Reed, 2001 ; Szemenyei et al., 2008).

### 5.1.2. Fonctions des protéines Aux/AIA

La fonction des protéines Aux/AIA a été déterminée chez *Arabidopsis thaliana* grâce à l'étude des mutants présentant des altérations au niveau de la réponse à l'auxine (Reed, 2001 ; Yang et al., 2004). Ces mutants se caractérisent par la présence d'une mutation au niveau du domaine II des Aux/IAA impliqué dans la dégradation de ces derniers. En effet, ces mutations permettent la stabilisation des Aux/AIA ce qui entraîne l'apparition de phénotypes de gain de fonction (Wang et al., 2005). Ainsi, un total de dix gènes a été caractérisé grâce à cette approche. Il s'agit de : *IAA6/SHY1* (Kim et al., 1996), *IAA17/AXR3* (Rouse et al., 1998), *IAA3/SHY2* (Tian and Reed, 1999), *IAA7/AXR2* (Nagpal et al., 2000), *IAA8* (Reed, 2001), *IAA12/BDL* (Hamann et al., 2002), *IAA14/SRL* (Fukaki et al., 2002), *IAA1/AXR5* (Park et al., 2002), *IAA28* (Rogg et al., 2001) et *IAA19/MSG* (Tatematsu et al., 2004).

Les mutants *aux/iaa* présentent un ensemble de phénotypes de développement associés à l'auxine y compris une altération du phototropisme/ gravitropisme, des anomalies dans la formation des racines, la dominance apicale, l'élongation de l'hypocotyle, la formation et l'expansion des feuilles (Wang et al., 2005). La caractérisation du mutant *axr5/iaa1* chez *Arabidopsis thaliana* montre que ce dernier présente des altérations au niveau de l'élongation de la racine et de l'hypocotyle, la formation des racines latérales, le tropisme des racines et des tiges, la morphologie des feuilles et la structure de l'inflorescence (Yang et al., 2004). Des mutations dans le gène *iaa17/axr3* engendrent une augmentation de la dominance apicale, une réduction de l'élongation racinaire accompagnée d'une stimulation de la formation des racines adventives et un enroulement des feuilles (Rouse et al., 1998 ; Tian and Reed, 1999). Ce phénotype est généralement compatible avec une augmentation dans la magnitude de la réponse à l'auxine (Leyser, 2002). Le mutant *axr2/iaa7* se caractérise par des racines peu poilues et des formations exagérées de racines latérales en plus de sa taille relativement naine avec des pousses agravitropiques (Nagpal et al., 2000). Pour ce qui est du gène *iaa28*, les mutants de gain de fonction sont résistants à plusieurs

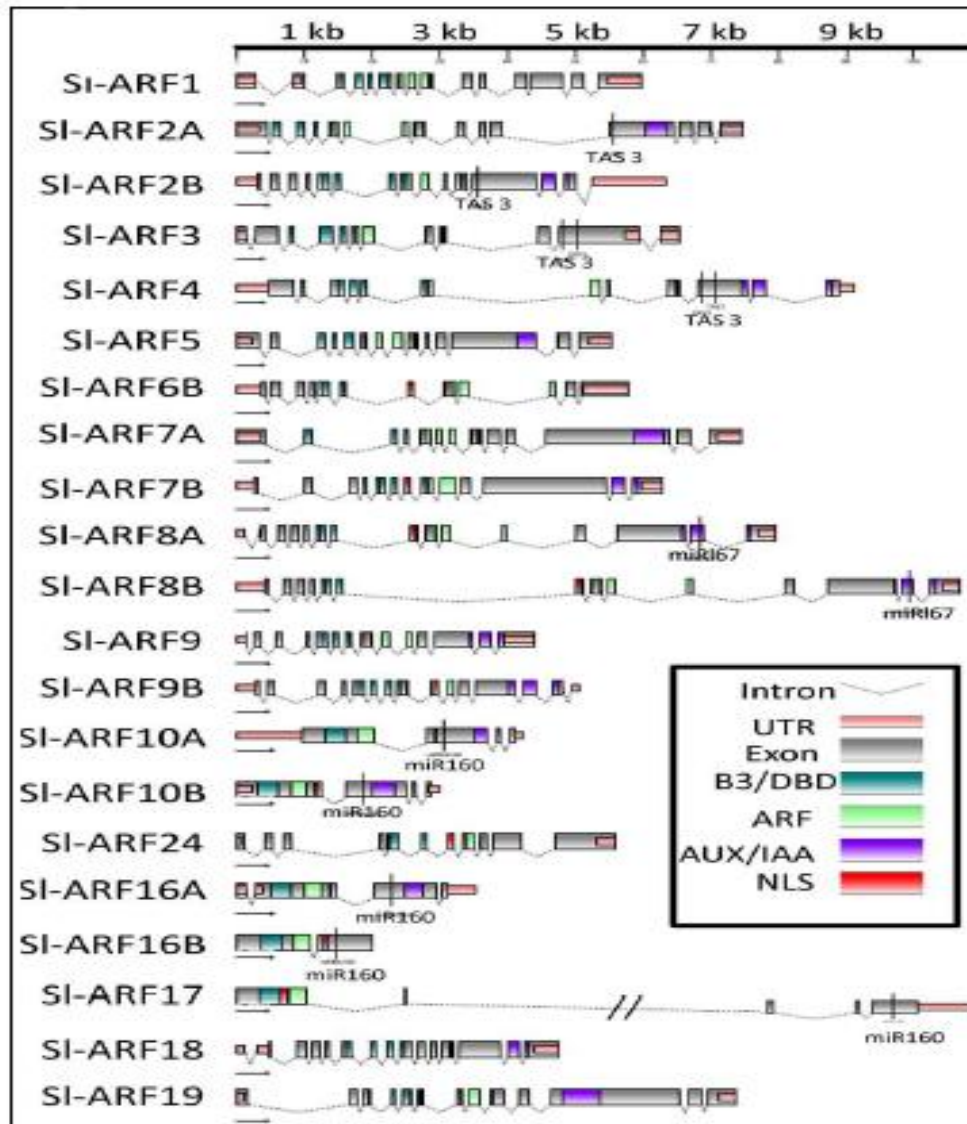
phytohormones et les plantes adultes présentent un phénotype marqué par une panoplie d'altérations morphologiques y compris une altération profonde dans l'initiation des racines latérales (Rogg et al., 2001). La caractérisation du mutant *slr/iaa14* a révélé que ce dernier ne présente aucune sensibilité vis-à-vis de l'auxine et manque complètement de racines latérales dû à une inhibition de la division des cellules du péricycle engendrant l'apparition d'un phénotype dit « Solitary Root Phenotype » (Fukaki et al., 2002 ; Goh et al., 2012). De plus, les plantes avec cette mutation de gain de fonction ont des feuilles de petite taille, des tiges courtes et un nombre réduit d'inflorescences (Muto et al., 2007). Le mutant *msg2/iaa19* présente les mêmes phénotypes avec des altérations du gravitropisme des racines et de la formation des racines latérales. En outre, quand il se développe en obscurité, ce mutant ne parvient pas à maintenir le crochet apical (Tatematsu et al., 2004). Egalement chez *Arabidopsis thaliana*, le mutant *bdl/iaa12* n'arrive pas à initier la formation du méristème racinaire au cours des stades précoces de l'embryogenèse dévoilant ainsi le rôle du gène *AtAIA12* dans le processus de la biogenèse racinaire (Hamann et al., 2002). L'analyse des mutants de gain et de perte de fonction du gène *iaa3/shy2* a montré que ce dernier intervient dans la régulation du développement racinaire. Ainsi, les mutations de gain de fonction induisent une réduction de la formation des racines latérales, une diminution de la courbure des racines et une lente réorientation de ces dernières alors que la mutation de perte de fonction du gène *iaa3* présente une augmentation de la formation des racines latérales et la flexion et la réorientation de la racine se font d'une manière accélérée (Tian and Reed, 1999). En conclusion, les protéines Aux/AIA semblent intervenir dans le contrôle de divers processus de développement de la plante depuis l'embryogenèse jusqu'à la maturité.

## 5.2. Les facteurs de réponse à l'auxine (ARF)

Les facteurs de réponse à l'auxine ou ARFs (Auxin Response Factors) sont des facteurs de transcription qui interviennent dans la régulation de l'expression des gènes de réponse à l'auxine. Ils ont la capacité de reconnaître un motif bien précis (TGTCTC) localisé au niveau des régions cis-régulatrices des promoteurs des gènes de réponse à l'auxine et de se fixer à ce niveau permettant ainsi, suivant les cas, d'initier ou de réprimer la transcription (Tiwari et al., 2004). Ils fonctionnent en combinaison avec les protéines Aux/AIA d'une façon dépendante de l'auxine. Au cours des dernières années, un nombre considérable d'informations quant à la fonction des ARFs dans la croissance et le développement des plantes et leur mécanisme d'action a été découvert (Guilfoyle and Hagen, 2007).

### 5.2.1. Structure des ARFs

Tout comme les protéines Aux/AIA, les ARFs présentent une structure en quatre domaines bien différenciés et qui peuvent fonctionner d'une façon indépendante les uns des autres. Chez *Arabidopsis thaliana*, la famille des ARFs est formée de 23 gènes (Ulmasov et al., 1999a). Chez la tomate, 22 ARFs ont été identifiés grâce à l'exploitation des résultats du grand projet international du séquençage du génome de cette espèce par le biais de la bio-informatique (Figure 7) (Zouine et al., 2013).

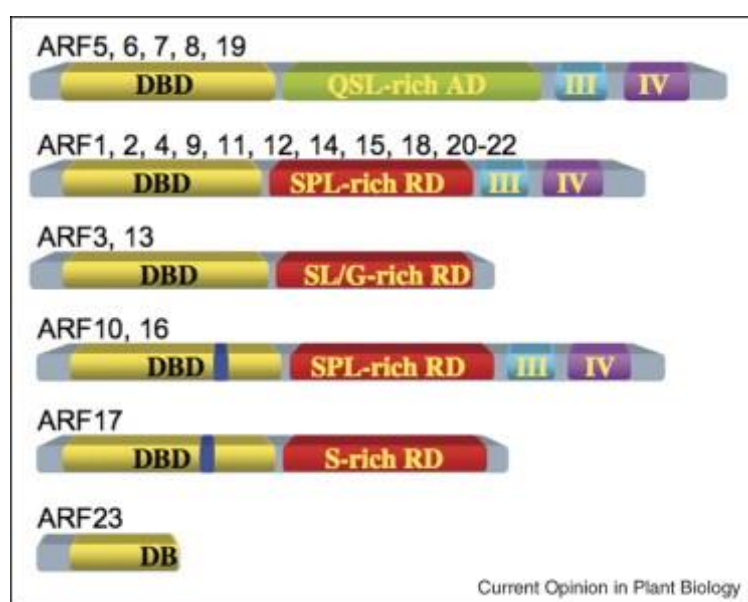


**Figure 7** Structure des ARFs chez la tomate (Zouine et al., 2013).

La majorité des ARF présentent un domaine conservé de liaison d'ADN 'DBD' qui reconnaît les éléments de réponse à l'auxine (AuxRE) situés au niveau des promoteurs des gènes de réponse à l'auxine ; un domaine médiane très divergent mais dans l'ensemble des cas testés assure la répression ou l'activation de la transcription et un domaine C-terminal



présentant deux motifs dits III et IV similaires aux deux domaines rencontrés chez les Aux/AIA (Guilfoyle and Hagen, 2007). Le domaine DBD des ARFs est un domaine de type B3 qui entre en contact avec la région AuxRE des promoteurs des gènes de réponse à l'auxine et dont la séquence d'acides aminés est apparentée aux domaines de liaison d'ADN des facteurs de transcription RAV, LAV et REM (Guilfoyle, 2015). La composition en acides aminés de la région centrale entre le domaine de liaison d'ADN et les domaines III et IV détermine si un ARF donné fonctionne comme activateur ou répresseur (Tiwari et al., 2004 ; Okushima et al., 2005). Chez *Arabidopsis thaliana*, il a été montré que les ARFs activateurs de la transcription, tels que AtARF6, AtARF7, AtARF8 et AtARF19, possèdent une région riche en glutamine et que les autres pourraient être des répresseurs de la transcription, comme AtARF1 et AtARF2 (Figure 8) (Tiwari et al., 2004 ; Guilfoyle and Hagen, 2007).



**Figure 8** Structure et composition des différentes régions des ARFs rencontrés chez *Arabidopsis thaliana*. Les ARFs de type activateur présentent une région centrale riche en Glutamine (Q), Sérine (S) et Leucine (L). Par contre, ceux qui présentent une région centrale riche respectivement en Sérine (S), Proline (P) et Leucine (L) sont des facteurs de transcription de type répresseur. At-ARF23 est qualifié de pseudogène (Guilfoyle and Hagen, 2007).

Les domaines III et IV présents au niveau de la région C-terminale des ARFs sont similaires aux domaines III et IV présents chez les Aux/IAA et sont nécessaires à l'interaction entre les ARF pour former des homo-dimères et avec les Aux/IAA pour former des hétéro-dimères (Tiwari et al., 2003 ; Guilfoyle and Hagen, 2007). Cependant, certains ARFs dotés d'un domaine médian de répression (RD) ne présentent pas de domaine carboxy-terminal PB1 (anciennement appelé Domaine III et IV). Ces ARFs sont au nombre de quatre chez *Arabidopsis thaliana* (AtARF3, AtARF13, AtARF17 et AtARF23) (Figure 7) (Guilfoyle, 2015).

### 5.2.2. Fonctions des ARFs

La fonction de certains ARFs dans la croissance et le développement des plantes a été identifiée grâce à la caractérisation des mutants déficients des ARFs. Les approches génétiques classiques ont permis l'identification des mutants *arf2*. Ces derniers présentent un phénotype pléiotropique avec des anomalies dans la formation du crochet apical, une augmentation de la croissance des organes aériens et de la taille des graines, une inhibition de l'ouverture du bouton floral, une sénescence des feuilles, un retard dans la floraison accompagné d'une abscission des organes floraux et d'un retard de la maturation des siliques et de leur déhiscence (Okushima et al., 2005 ; Schruff et al., 2006 ; Guilfoyle and Hagen, 2007). Ainsi, le phénotype des mutants *arf2* suggère que l'ARF2 agit comme répresseur de la division cellulaire et de la croissance des organes (Schruff et al., 2006). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'ARF5/MP (*Monopteros*) semble jouer un rôle important dans la formation de l'axe embryonnaire et dans le développement des faisceaux vasculaires. Des mutations dans ce gène interfèrent avec la formation des brins vasculaires pendant et après l'embryogenèse. Les mutants *arf5/mp* présentent des anomalies dans le développement de l'hypocotyle et des racines semblables à celles observées chez les plantes sauvages traitées par des inhibiteurs de transport de l'auxine (Hardtke and Berleth, 1998). L'analyse des mutants *arf7/nph4* d'*Arabidopsis thaliana* suggère que la protéine ARF7/NPH4 peut intervenir dans la régulation spécifique de la croissance (Stowe-Evans et al., 1998 ; Watahiki and Yamamoto, 1997). Initialement identifiés par leurs réponses phototropes considérablement réduites, les mutants *arf7/nph4* semblent présenter plusieurs anomalies de croissance, à savoir une altération du gravitropisme de la tige, une courbure de la tige dépendante du phytochrome, une détérioration du crochet apical et de l'expansion ad-abaxiale des feuilles. Sur cette base, il a été démontré que l'ARF7 qui est un facteur de transcription de type activateur est conditionnellement requis pour la modulation de la croissance différentielle des tissus aériens chez *Arabidopsis thaliana* et semble intervenir dans l'interaction entre l'auxine et l'éthylène (Harper et al., 2000 ; Guilfoyle and Hagen, 2007). Toujours chez *Arabidopsis thaliana*, l'ARF8 a été associé à plusieurs processus de développement de la plante à savoir l'élongation dépendante de la lumière de l'hypocotyle, la croissance racinaire, l'homéostasie de l'auxine, l'élongation du filet des étamines, la déhiscence des anthères (Tian et al., 2004). De plus, la perte de fonction dans ce gène engendre la parthénocarpie et provoque une altération de la division des cellules du carpelle (Goetz et al., 2006).

Les doubles mutants des ARFs ont généralement des phénotypes beaucoup plus prononcés que les mutants simples suggérant que les ARFs présentent une certaine redondance quant à leur fonction (Guilfoyle and Hagen, 2007). En effet, les mutants *arf2* se caractérisent par le retard de la floraison, la sénescence des feuilles, l'abscission des fleurs en plus des défauts dans la formation du crochet apical alors que ce phénotype est beaucoup plus prononcé chez les doubles mutants *arf1arf2* (Ellis et al., 2005). Les défauts dans la structuration et la vascularisation de l'embryon observés chez les mutants *arf5* sont beaucoup plus exprimés chez les doubles mutants *arf5arf7* (Hardtke et al., 2004). Les mutants simples *arf7* et *arf19* présentent une légère réduction du nombre des racines latérales et adventives alors que les doubles mutants *arf7arf19* montrent une remarquable réduction (Wilmoth et al., 2005). Alors simples que les mutants *arf10* et *arf16* ne présentent aucun phénotype, le double mutant *arf10arf16* présente une coiffe racinaire altérée et un gravitropisme racinaire anormal ; ceci montre que ces deux gènes fonctionnent de manière redondante dans la régulation de ces processus (Guilfoyle and Hagen, 2007).

### 5.2.3. La régulation des ARFs

La régulation post-transcriptionnelle de l'abondance des ARFs par le biais des microARN (*miRNA*) a récemment émergée pour expliquer l'absence des phénotypes chez les mutants *arf10*, *arf16* et *arf17* (Guilfoyle and Hagen, 2007). Les *miRNA* sont des molécules d'ARN simple brin formés d'environ 21 nucléotides connus pour leur rôle dans la régulation de l'expression d'une panoplie de gènes et ceci à par clivage de l'ARN messenger (ARNm) ou par répression de la traduction (Yang et al., 2006). Chez les plantes, le clivage de l'ARNm cible semble être le mécanisme le plus répandu de la régulation post-transcriptionnelle (Liu et al., 2007). Un certain nombre de paires de *miRNA*-gènes cibles respectives ont été prédit par des analyses bioinformatiques et quelques-uns d'entre eux ont été confirmés expérimentalement (Rhoades et al., 2002; Yang et al., 2004). Les gènes *ARF10*, *ARF16* et *ARF17* ont un site de reconnaissance du *miR160* et sont donc clivés par ce dernier (Mallory et al., 2005). Les mutants de ces ARFs mais qui sont résistants au *miR160*, présentent une forte croissance, et notamment au stade embryonnaire. De plus, le mutant *arf10* résistant au *miR160* présente de petites feuilles étroites et meurt avant d'atteindre le stade adulte (Mallory et al., 2005 ; Wang et al., 2005). De même, le *miR167* assure la régulation de l'ARF6 et l'ARF8. Chez *Arabidopsis thaliana*, la surexpression de *miR167* conduit à un phénotype similaire à celui du double mutant *arf6arf8*. Les mutants de ces gènes résistants au *miR167* présentent des altérations du développement des fleurs avec un arrêt de la croissance des téguments

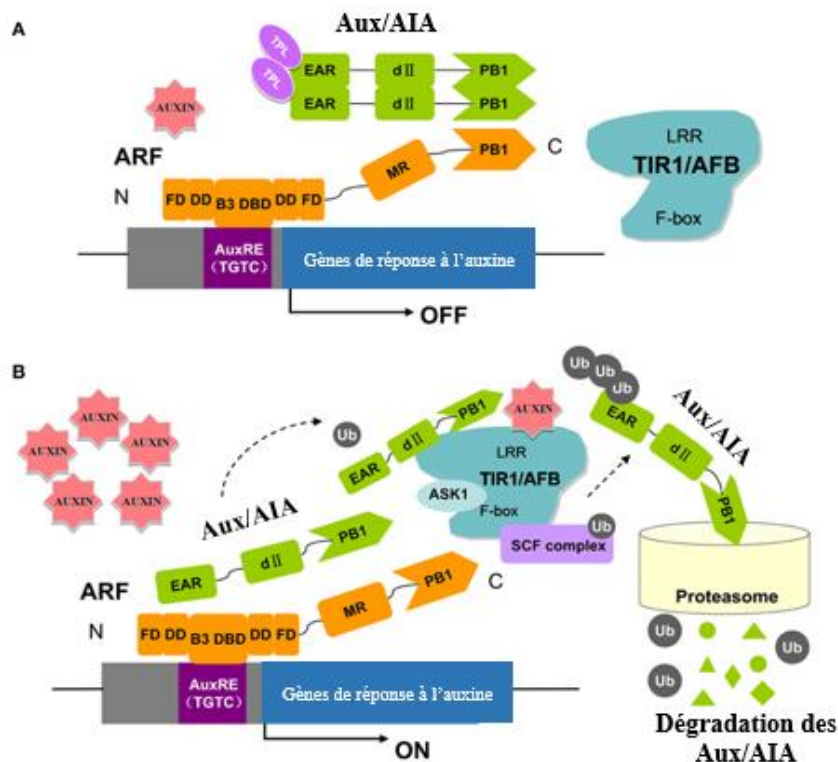
de l'ovule et une altération de la morphologie des anthères. Par conséquent, le contrôle de l'expression de *ARF6* et *ARF8* par miR167 est essentiel pour un développement normal de l'appareil reproducteur et floral (Liu et al., 2014). Dans le cas des gènes *ARF2*, *ARF3* et *ARF4*, la régulation post-transcriptionnelle de ces gènes se fait à travers un petit ARN interférant agissant en trans (ta-siRNA) appelé TAS3 ta-siARN. La formation de ce ta-siRNA à partir de transcrits primaires, implique miR390, RNA-DEPENDANT RNA POLYMERASE6 (RDR6) et DICER-LIKE4 (DCL4) (Marin et al., 2010).

### 5.3. Mécanisme de signalisation auxinique- Interaction entre les ARFs et les Aux/AIA

L'analyse moléculaire des mutants de réponse à l'auxine chez *Arabidopsis thaliana* a conduit à l'établissement d'un modèle de signalisation qui stipule que cette dernière se fait par une dégradation ciblée des répresseurs transcriptionnels de la famille des Auxine/ Acide Indole-3 acétique « Aux/AIA » (Leyser, 2002 ; Guilfoyle and Hagen, 2007). En effet, quand l'auxine est présente en faible proportion, les Aux/AIA s'associent aux facteurs de transcription de la famille des ARF « Auxin Response Factor » au niveau de la séquence cis- régulatrice des gènes de réponse à l'auxine connue sous le nom d'élément de réponse à l'auxine ou AuxRE (Weijers et al., 2006). L'interaction entre les Aux/AIA et les ARF à ce niveau induit la répression de la transcription des gènes associés. Leur dé-répression survient suite à l'élimination des Aux/AIA par le complexe protéasomique 26S déclenchée par la liaison de l'auxine au complexe SCFTIR1/AFB (Gray et al., 2001 ; Guilfoyle and Hagen, 2007). La dégradation des Aux/AIA se fait par ajout d'une molécule ou d'une chaîne de molécules modifiées appelées « Ubiquitine » ce qui permet la reconnaissance entre des Aux/AIA modifiés par le complexe protéasomique 26S et par conséquent l'initiation de la dégradation (Figure 8) (Leyser, 2002). La dégradation des Aux/AIA provoque la modification de la transcription de milliers de gènes. Parmi ces gènes, on retrouve ceux qui codent pour les protéines Aux/AIA impliquées dans la répression de la transcription, ceux de la famille des gènes *GH3* qui codent pour des enzymes d'inactivation de l'auxine et ceux de la famille des SAUR qui eux codent pour des ARN messagers très instables et dont l'expression fluctue quelques minutes après l'addition de l'auxine (Jain et al., 2005).

La signalisation de l'auxine repose généralement sur l'interaction entre les ARFs et les Aux/AIA. Ainsi, grâce au système d'hybride double de la levure « Yeast two hybrid », il a été démontré que la plupart des ARFs de type activateurs interagissent avec les protéines

Aux/AIA alors que peu d'interactions a été signalé entre les ARFs répresseurs et les Aux/AIA (Ulmasov et al., 1999b). Le gène *AtARF9* est le seul gène répresseur capable d'interagir avec les Aux/AIA. Ainsi, il a été suggéré que les ARFs répresseurs peuvent entrer en compétition avec les ARFs activateurs pour les éléments de réponse à l'auxine AuxRE au lieu d'entrer en interaction spécifique avec les Aux/AIA (Weijers et al., 2006). Chez *Arabidopsis thaliana*, L'analyse des mutants ARFs et Aux/AIA montre d'éventuelles interactions entre les membres des deux familles de facteurs de transcription (Fukaki et al., 2006). En effet, *AtAux/AIA14* interagit spécifiquement avec *AtARF7* et *AtARF19* pour l'inactivation de la formation de la racine latérale. L'ARF5 entre en interaction avec *Aux/AIA12* afin de contrôler la formation de la racine (Weijers et al., 2006). En plus des interactions entre les ARFs et les Aux/AIA, des co-répresseurs dits TOPLESS (TPL) interviennent dans la régulation de la signalisation de l'auxine. Les protéines TPL sont capables de se lier spécifiquement aux protéines Aux/AIA au niveau du domaine I (Szemenyei et al., 2008).



**Figure 9** Les éléments clés dans la perception et la transduction du signal auxinique. En absence de l'auxine (A), les protéines Aux/IAA forment des multimères avec les ARFs et recrutent les protéines TOPLESS au niveau de la chromatine. La présence de l'auxine en fortes concentrations (B) déclenche l'ubiquitination et la dégradation des Aux/IAA par le complexe SCFTIR1/AFB et le protéasome 26S ( adaptée à partir de Li et al., 2016) .

### III. La tomate : Plante modèle

La tomate *Solanum Lycopersicum* L. appartient à la famille des Solanaceae qui comporte beaucoup de nos plantes couramment cultivées (pommes de terre, poivrons, aubergines, tabac, pétunias...) ainsi que diverses mauvaises herbes (morelles, stramoine...). La tomate cultivée commune appartient au genre *Solanum* qui représente un vaste réservoir de variabilité génétique avec environ 1400 espèces largement sous-exploité (Heuvelink, 2005).

La tomate est originaire des régions occidentales de l'Amérique du Sud tropicale plus précisément de la région andine qui comprend des parties du Chili, de la Colombie, de l'Equateur, la Bolivie, le Pérou et dans les îles Galápagos, où deux espèces endémiques *Solanum cheesmaniae* et *Solanum galapagense* existent (Darwin et al., 2003 ; Peralta et al., 2005). La tomate cultivée est issue de la domestication de la forme semi sauvage *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, cette dernière étant un mélange de *S. lycopersicum* et de l'espèce sauvage *S. pimpinellifolium* (Bauchet and Causse, 2012).

La tomate présente une diversité morphologique importante (Photo 1). Elle est actuellement cultivée à presque toutes les latitudes avec une superficie d'environ 3 millions d'hectares ce qui représente le tiers des surfaces mondiales consacrées aux produits agricoles. Son centre de domestication reste à l'heure actuelle fortement débattu, et les hypothèses étudiées présentent deux origines probables ; une pré-domestication au Pérou complétée par une domestication complémentaire au Mexique (Blanca et al., 2015).



**Photo 1** Diversité morphologique de la tomate (Anonyme, 2016).

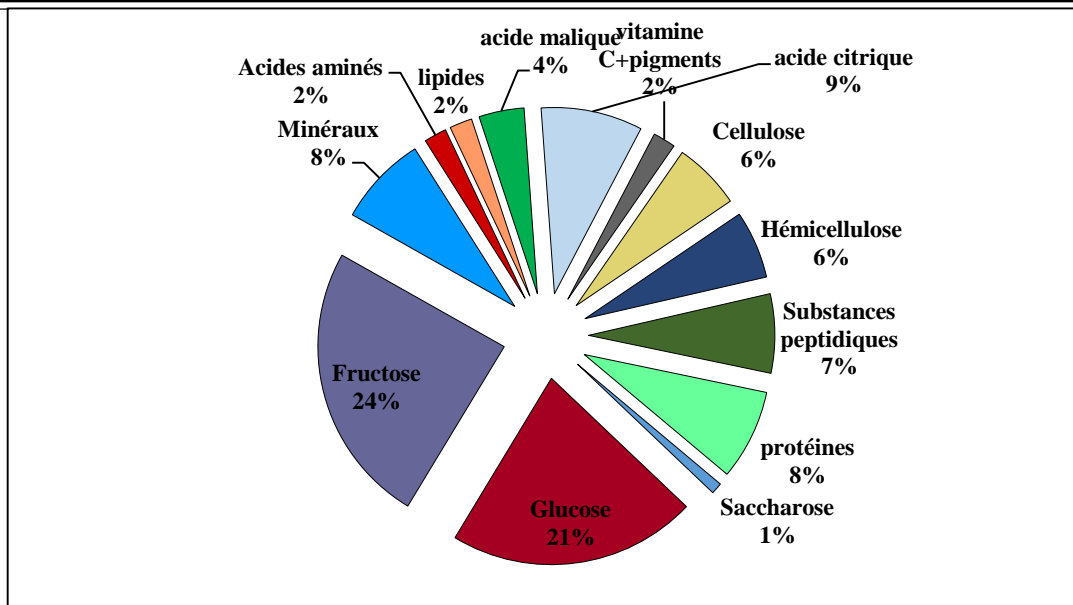
## 1. Intérêt économique

La production mondiale de tomate s'élevait à 165 millions de tonnes en 2013 (pour une surface de production estimée à 165 millions de hectares). Environ la moitié de la production de tomate est destinée au marché de frais, l'autre moitié aux industries de transformation (sauce, coulis, Ketchup...etc.). Le principal producteur de tomate est la Chine avec une production avoisinant les 50 millions de tonnes par an, suivie loin derrière par l'Inde (18,2 millions de tonnes) et les Etats-Unis (12,5 millions de tonnes). La tomate est le premier fruit (ou « légume ») cultivé en terme de volume de production, avant la pastèque (109 Mt) et la banane (107 Mt).

Au Maroc, la tomate représente l'une des cultures les plus importantes parmi les primeurs. Elle représente 27 % de la superficie et assure 63 % de la production globale et 70 % des exportations de primeurs. En effet, avec une superficie moyenne de 14016 ha, le secteur de la tomate assure une production totale de 1,3 millions de tonnes dont 450 000 tonnes ont été destinées à l'exportation (81% exportées vers l'Union européenne) (Aziki, 2014).

## 2. Intérêt nutritionnel

La tomate occupe une place importante dans l'alimentation humaine. Compte tenu de son faible coût, il serait digne de figurer dans l'alimentation quotidienne. A faible apport énergétique (22 Kcalories/100 g), Elle jouit d'une bonne valeur nutritive (Figure 10) car elle est assez riche en vitamines, et d'autres oligo-éléments comme le calcium, le phosphore et le fer. Dans les dernières décennies, la consommation de tomate a été associée à la prévention contre diverses pathologies comme le cancer ou les maladies cardiovasculaires (Lecerf, 2006). Cet effet protecteur a été principalement attribué à ses précieux composants bioactifs avec propriétés antioxydants comme les carotènes (lycopène qui donne leur couleur rouge aux tomates ainsi que  $\beta$ -carotène), l'acide ascorbique, tocophérol et les composés phénoliques (Johnson, 2002). Cependant, jusqu'à l'heure actuelle, les consommateurs n'ont réellement pris conscience de la valeur nutritionnelle de la tomate que très récemment, grâce au Programme National Nutrition Santé lancé en 2001 par l'INPES (Institut National de Prévention et d'Education pour la Santé), qui incite à la consommation quotidienne de fruits et légumes frais.



**Figure 10** Composition de la matière sèche d'un fruit de tomate. La matière sèche représente environ 5% de la masse totale du fruit. Elle est composée majoritairement de sucres (48% de la matière sèche totale, principalement sous forme fructose et glucose). Adaptée à partir de (Davies and Hobson, 1981)

### 3. Intérêt scientifique

La tomate est un organisme modèle bien établi pour l'étude de nombreux processus biologiques. Elle présente de multiples avantages qui font d'elle le modèle universel pour l'étude des fruits charnus (Barsan et al., 2010). Ce choix est en fait justifié par la disponibilité d'un large éventail de mutants spontanés ou induits très bien caractérisés, par la possibilité de la transformation génétique et de la culture, par l'existence de variétés naines et notamment par le grand nombre de ressources génétiques et génomiques (Chaabouni et al., 2009).

Sur le plan génétique, la tomate est une espèce diploïde avec 12 paires de chromosomes et présentant un génome de petite taille, de l'ordre de 950Mb, bien qu'il soit six fois plus grand que celui de *Arabidopsis thaliana* et deux fois plus grand que celui du riz. La région codante de ce génome représente seulement 23% de la totalité de l'ADN chromosomique et contient environ 35000 gènes. Sur le plan génomique, des banques d'ADN génomiques provenant de différents tissus ont été mises en place et un programme de séquençage des EST a vu le jour. L'ensemble des données EST estimées à 240 000 EST sont regroupées dans le Solanaceae Genomic Network (SGN) (Consortium, 2012).

Dans un même contexte, plusieurs outils moléculaires ont été mis en place durant cette dernière décennie par les différents participants du consortium international sur les Solanacées et ceci dans le cadre d'un grand projet de séquençage du génome de la tomate dit « The International Tomato Genome Sequencing Project ». Parmi les approches développées pour ces fins, l'approche BAC-by-BAC dont un total de 1 200 a été séquencé et l'approche complémentaire



whole-genome shotgun initiée en 2009 et récemment achevée. L'ensemble des données générées est rassemblé dans les bases de données du TIGR (The Institute for Genomic Research) et du SGN (Solanaceae Genomics Network).

Le séquençage du génome de la tomate domestique et de son parent sauvage *Solanum pimpinellifolium* s'est achevé grâce aux efforts déployés par les chercheurs dans le cadre du Consortium du génome de la tomate. Ainsi la connaissance de la séquence complète de ce génome ouvre de nouvelles perspectives pour l'amélioration des qualités nutritionnelles et sensorielles et pour accroître sa capacité de résister aux différents stress biotiques ou abiotiques. Les résultats ont été publiés le 31 mai 2012 dans la revue Nature.

#### 4. La tomate et les stress abiotiques

La culture de la tomate n'échappe pas aux effets néfastes des aléas climatiques. En effet, une simple perturbation dans les conditions de culture pourrait induire d'innombrables pertes économiques ou gustatives. Compte tenu de son importance économique et nutritionnelle incontestable, l'amélioration de la résistance de cette culture aux différents stress abiotiques ; la salinité, la sécheresse et les températures extrêmes constitue un enjeu économique et agronomique majeur.

Les ressources génétiques naturelles de la tomate ont été exploitées de manière abondante pour l'amélioration variétale en particulier pour l'amélioration de sa résistance à de nombreux contraintes environnementales, et plus récemment de ses qualités organoleptiques. Malgré une très grande diversité apparente de taille, forme, couleur des fruits, port des plantes, etc., la tomate cultivée présente une biodiversité génétique très faible à la fois du fait de son introduction récente en Europe et en raison de son autogamie qui constitue un handicap pour la diversification de cette espèce. Les recherches ont été axées sur l'utilisation des espèces sauvages qui constituent un important réservoir de gènes utilisable dans l'amélioration des formes cultivées. Parmi celles-ci, *Solanum pennellii*. Très résistant aux stress et en particulier à la sécheresse, elle a été souvent utilisée dans les schémas de croisements classiques avec la tomate cultivée et les lignées d'introgression dans lesquelles de grandes régions génomiques de *S.lycopersicum* sont substituées par les segments correspondant au espèce sauvage *S.pennellii* arborent des performances agronomiques nettement supérieures. Le séquençage du génome de tomate cultivée et son parent ouvre la voie à une meilleure compréhension des fondements génétiques de la tolérance aux stress environnementaux. En effet, la compréhension du fonctionnement intégré des systèmes biologiques étant devenue incontournable pour élaborer

les stratégies d'amélioration variétale, la connaissance des processus génétiques et épigénétiques tant chez les plantes est indispensable pour l'amélioration de la tolérance aux stress environnementaux. Effectivement, ils constituent une perspective intéressante pour les améliorateurs, généticiens et biotechnologues, pour contribuer à la gestion de l'impact du changement climatique, et sur le plan pratique pour le développement d'espèces tolérantes.

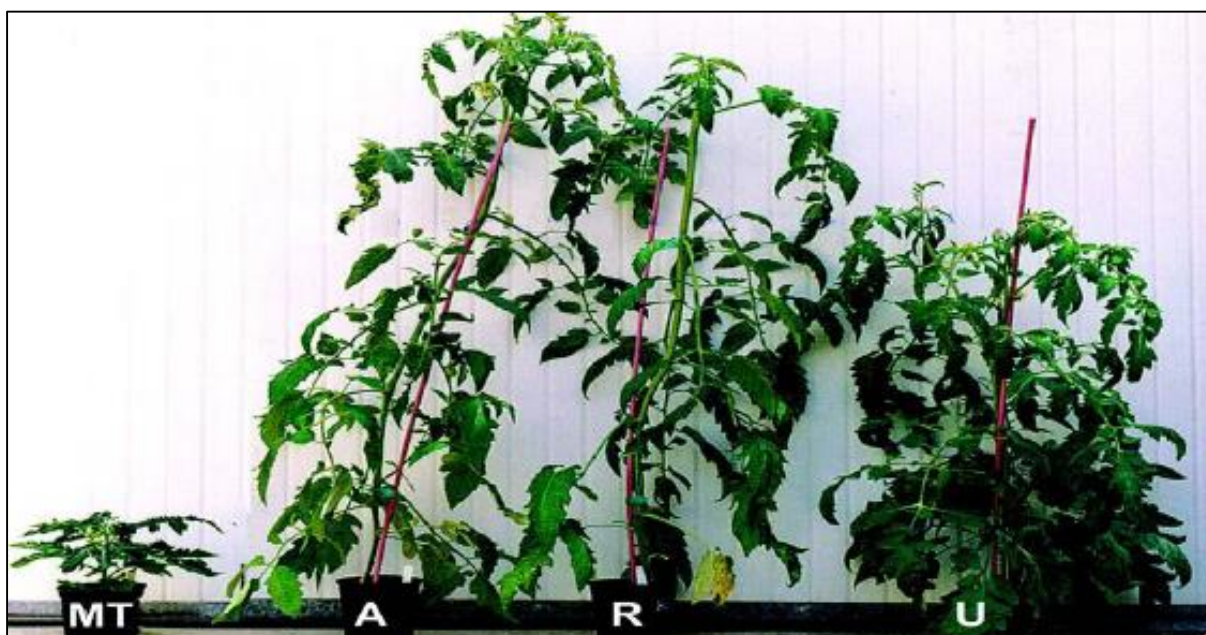
Le présent travail s'inscrit dans le cadre du développement des nouveaux outils moléculaires pour la sélection et l'amélioration de la tolérance de la tomate aux stress abiotiques en particulier la salinité et la sécheresse. Le choix s'est porté sur ces derniers vu que le Maroc se trouve soumis à l'occurrence de plus en plus fréquente de phénomènes extrêmes comme la sécheresse (une année sur trois), des inondations catastrophiques (inondation 2002, 2016), des vagues de chaleur en toutes saisons qui perturbent les cycles de cultures auxquels s'additionne le changement climatique qui vient exacerber les risques existants liés à la dégradation des sols par l'érosion et la salinisation, à la pression sur les ressources hydriques et à la vulnérabilité d'une grande partie des agrosystèmes.

# Chapitre II

## Matériel et Méthodes

## I. Matériel végétal

L'étude a été menée sur une variété naine de tomate (*Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom) obtenue par inter-croisement entre les cultivars Florida Basket et Ohio 4013-3 (Martí et al., 2006; Scott, 1989). Elle présente un phénotype semi-nain (10 à 20 cm de hauteur) (Photo 2), un cycle de développement relativement court de 70 à 90 jours depuis le semis jusqu'à l'obtention du fruit mûr et également la possibilité de transformation génétique par *Agrobacterium tumefaciens* (Meissner et al., 1997).



**Photo 2** Comparaison de la variété de tomate naine MicroTom avec d'autres variétés utilisées au laboratoire. Les variétés représentées sont : (MT) Micro-Tom, Ailsa Craig (A), Rutgers (R) et UC-82(U) (Martí et al., 2006).

L'étude de l'expression de l'ensemble des ARF notamment l'*ARF4* rencontrés chez la tomate et des précurseurs des miRNA (*miR160*, *miR167a*, *miR167b*, *miR167c* et *miR167d*) en présence de stress a été réalisée sur des plantes de tomate Micro-Tom de type sauvage. L'évaluation de la tolérance sur le plan morphologique, physiologique et moléculaire a été effectuée aussi bien sur des plantes de type sauvage et sur des lignées transgéniques pour le gène *SIARF4* (*ARF4-as* et *ARF4-ox*). Ces lignées ont été obtenues par transformation des fragments de cotylédons et d'hypocotyle par une souche désarmée d'*Agrobacterium tumefaciens* (souche C58) contenant des constructions spécifiques. La transformation a été réalisée selon la méthode décrite par (Jones et al., 2002). Pour la construction sur-exprimant le gène *SIARF4*, la séquence codante de ce gène (2436bp) (Annexe 2) a été clonée dans le vecteur binaire pGreen (Hellens et al., 2000) sous le contrôle du promoteur 35S CaMV du virus de la mosaïque du chou-fleur. La construction *ARF4-as* a été obtenue par clonage de la région qui correspond à la protéine

contenant le domaine de dimérisation (CTD) en C-terminal ainsi que la région 3'-UTR dans le vecteur pGreen.

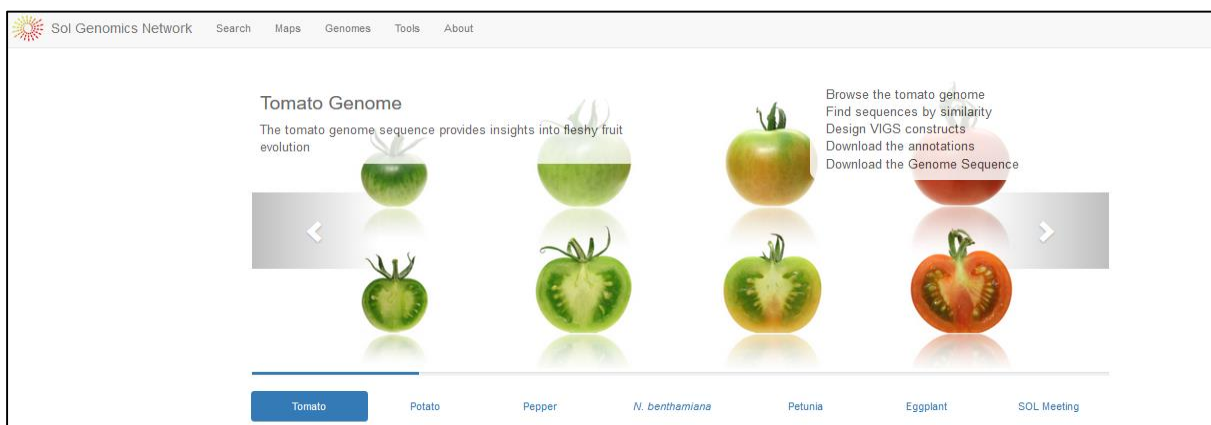
L'expression *in planta* des gènes *SIARF4*, *SIARF8A* et *SIARF10A* après application de stress salin a été menée sur des lignées de tomate suivantes : pARF4 ::GUS, pARF8A ::GUS et pARF10A ::GUS. Chez ces lignées, le promoteur des gènes *SIARF4*, *SIARF8A* et *SIARF10A* est fusionné au gène GUS. Ces lignées ont été obtenues par transformation génétique par *Agrobacterium tumefaciens* suivant le protocole décrit par (Wang et al., 2005). Pour cela, des PCR ont été réalisées sur l'ADN génomique de la tomate (Micro-Tom) (10ng.ml<sup>-1</sup>). Pour chaque promoteur, le fragment correspondant amplifié a été par la suite cloné dans le vecteur PMDC162 contenant le gène rapporteur GUS via la technologie Gateway (Invitrogen). Les promoteurs clonés ont été séquencé à partir des deux côtés en utilisant les amorces du vecteur afin de voir si la fin du promoteur est en correspondance avec le début du gène rapporteur. Les séquences résultantes ont été obtenues en utilisant les deux logiciels Vector NT1 et ContigExpress (Invitrogen) en se référant aux séquences promotrices des *SIARFs*.

## II. Méthodes

### 1. Etude de l'implication des ARFs dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques

#### 1.1. Analyse *in silico* des promoteurs des ARFs à la recherche de motifs associés aux stress et à la réponse aux phytohormones

















Cette analyse bioinformatique a pour objectif de repérer l'ensemble des motifs *cis*-régulateurs associés à la réponse aux stress biotiques et abiotiques (salin et hydrique) au niveau de la région promotrice de l'ensemble des ARFs à l'aide de l'outil de recherche de la plateforme PLACE (<https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?lang=en>).



**Photo 3** Base de données The Sol Genomics Network (SGN) plateforme dédiée à la biologie des Solanaceae (<https://solgenomics.net/>).

Pour cela, la séquence de 2Kb située en amont de chaque *SlARFs* a été extraite de la base de données The Sol Genomics Network (SGN) dédiée à la biologie des Solanaceae (<https://solgenomics.net/>) et ceci à partir du numéro d'accèsion spécifique de chaque gène (Solyc N°) (Photo 3).

**Tableau 1** Les éléments cis-régulateurs rencontrés au niveau de la région promotrice des *SlARFs*.

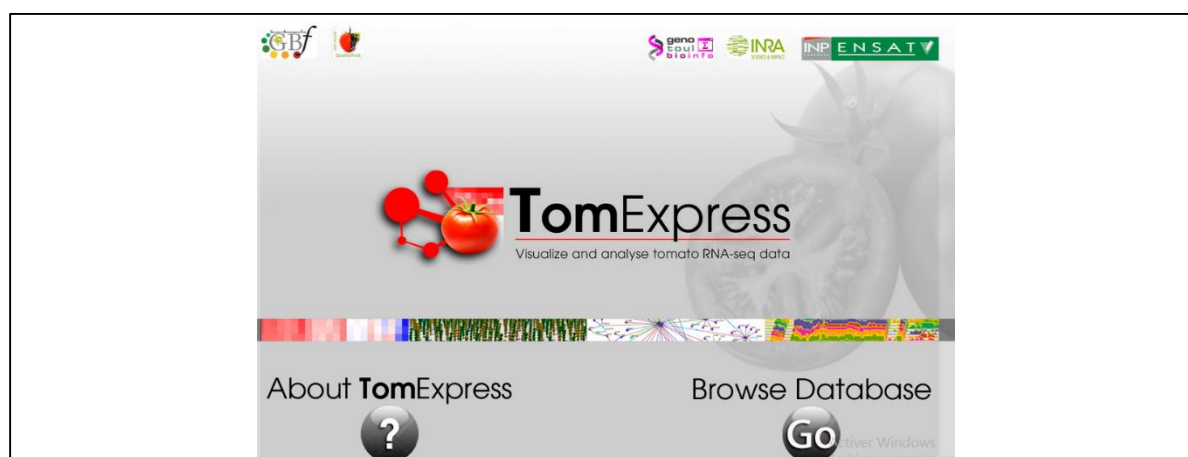
Motifs	Séquences	Symbole	Fonctions	Références
WBOXNTCHN48	CTGACY		« W box », réponse aux éliciteurs	(Deb and Kundu, 2015)
WBOXTERF3	TGACY		« W box », réponse aux blessures physiques	(Nishiuchi et al., 2004)
RAV1AAT	CAACA		Site de liaison à l'ADN « RAV1 », réponse au froid	(Guy, 1999)
MYB1AT	WAACAA		Élément impliqué dans la réponse à la déshydratation	(Abe et al., 2003)
MYBCORE	CNGTTR		Élément impliqué dans la réponse au stress hydrique	(Abe et al., 2003)
GT1GMSCAM4	GAAAAA		Élément induit en réponse à la salinité et au stress biotique	(Trivedi et al., 2013)
CCAATBOX1	CCAAT		HSE (élément de choc thermique)	(Sohn et al., 2006)
MYB2AT	TAACTG		Élément impliqué dans la réponse à l'ABA et au stress hydrique	(Abe et al., 2003)
MYB2CONSENSUSAT	YAACKG		Site de reconnaissance MYB impliqué dans la réponse à l'ABA et au stress hydrique	(Abe et al., 2003)
MYCATERD1	CATGTG		Site de liaison à l'ADN « MYC » impliqué dans la réponse à l'ABA et au stress hydrique	(Abe et al., 2003)
MYCATRD22	CACATG		Site de liaison à l'ADN « MYC » impliqué dans la réponse à l'ABA et au stress hydrique	(Abe et al., 1997)
MYCCONSUSAT	CANNTG		Motif impliqué dans la réponse précoce à l'ABA et au stress hydrique	(Dang et al., 2011)
ASF1MOTIFCAMV	TGACG		Motif de réponse à l'auxine et à l'acide salicylique	(Abe et al., 1997)
ARFAT	TGTCTC		Site de liaison des facteurs de réponse à l'auxine	(Abe et al., 2003)
CATATGGMSAUR	CATATG		Motif impliqué dans la réponse à l'auxine	(Abe et al., 2003)
TATA-Box	TATAAT		Site de reconnaissance à l'ARN polymérase	(Guy, 1999)

## 1.2. Expression des *ARFs* en conditions de stress biotiques

Les données d'expression des 22 *SlARFs* rencontrées chez la tomate ont été extraites de la plateforme de données TomExpress (<http://gbf.toulouse.inra.fr/tomexpress/www/welcomeTomExpress.php>) dédiée pour l'analyse des données RNA-seq publiques (Zouine et al., 2017) (Photo 4). Cette plateforme fournit une approche unifiée de l'expression des gènes. Elle permet de représenter, comparer et d'étudier les données RNA-seq pour 124 publiées, en effectuant une normalisation commune sur la base du génome récemment séquencé. Les données d'expression qui figurent dans cette plateforme bio-informatique représentent les comptages normalisés par base et la moyenne

des valeurs d'expression de plusieurs cultivars pour chaque condition. Sur l'ensemble des données disponibles dans TomExpress, nous nous sommes intéressés uniquement aux données d'expression des ARFs liées à la réponse à l'infection par la flagelline flag22 (protéine constituant le tube hélicoïdal des flagelles procaryotiques), des souches bactériennes (*Pseudomonas syringae* DC3000, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Agrobacterium tumefaciens*) et par le virus de l'enroulement des feuilles TYCL (Yellow curl leave virus). Ces données sont reportées en Annexe 1.

### 1.3. Analyse histochimique de l'expression du gène GUS



**Photo 4** Plateforme des données RNA-seq publiques- TomExpress développée par le laboratoire de Génomique et Biotechnologie des Fruits de Toulouse (<http://gbf.toulouse.inra.fr/tomexpress/www/welcomeTomExpress.php>).

L'observation de l'activité GUS a été réalisée sur des lignées transformées avec les constructions suivantes : DR5::GUS, pARF8A::GUS et pARF10A::GUS. Pour cela, des graines des différentes lignées ont été cultivées sur un milieu MS/2 sous une température de 25°C et une photopériode 16 heures à l'intensité de 150  $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Après une semaine de culture, les jeunes plantules ont été transférées en culture hydroponique pendant deux semaines dans le milieu BD (BROUGHTON & DILLWORTH) (Broughton and Dilworth, 1971) (Annexe 6). Les plantes ont été exposées aux stress salin et hydrique. Le stress salin a été effectué par addition de 250 mM de NaCl au milieu de culture hydroponique. Le stress hydrique a été réalisé par ajout de 15% de PEG 20 000 (correspondant à un potentiel osmotique final de -0,09 MPa) à la solution nutritive. Les plantes ont été par la suite placées dans une solution de coloration d'acide X-Glucuronique (100 mM tampon phosphate de sodium pH 7,2, 10 mM EDTA, 0,1% Triton, 1 mM 5- Bromo-4- chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronique) après 24 heures d'application du stress pour le stress salin et après 5 jours pour le stress hydrique (voir Annexe 3). Les échantillons ont été mis sous vide pendant 5 minutes puis 15 minutes avant

d'être incubés à 37°C pendant 24 heures. Ils ont ensuite été décolorés par plusieurs lavages à l'éthanol pur.

#### **1.4. Expression des ARFs en conditions de stress abiotiques**

##### ***1.4.1. Culture des plantes***

L'étude de l'expression des gènes *SlARFs* a été menée sur des plantules âgées de 3 semaines obtenues à partir des graines de tomate (*Solanum lycopersicum* cv MicroTom) cultivées sous serre dans des pots sous une température de 25°C ± 3°C, une photopériode de 16 heures de lumière à l'intensité de 150 µM.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> et une hygrométrie de l'ordre de 80%. L'arrosage a été réalisé d'une façon quotidienne avec 450 ml d'eau.

##### ***1.4.2. Application du stress***

L'étude s'est portée sur trois types de stress qui sont : le stress salin, le stress hydrique et l'hypoxie (Flooding). Le stress salin a été appliqué sur de jeunes plantes de tomate MicroTom âgées de 3 semaines en arrosant ces dernières par une solution de chlorure de sodium à 250 mM. Les feuilles et les racines sont récupérées après 24 heures de traitement pour l'extraction des ARN. Les plantes irriguées d'une façon normale sont utilisées comme témoins. L'application du stress hydrique s'est faite par un arrêt d'arrosage des plantes âgées de 3 semaines. Les échantillons de feuilles et de racines ont été récupérés après 5 jours de traitement. Les essais témoins sont constitués de plantes arrosées d'une façon quotidienne avec l'eau distillée (350 à 450 ml). L'hypoxie a été manié comme suit : les jeunes plantules de 3 semaines ont été arrosées jusqu'aux cotylédons avec une solution d'eau dé-ionisée. Après 72 heures, les échantillons des feuilles et des racines ont été recueillis pour servir à l'extraction des ARN.

##### ***1.4.3. Extraction des ARN totaux et synthèse de l'ADNc***

L'extraction des ARNs totaux est réalisée à partir d'échantillons de racines et de feuilles récupérées de plantes témoins et celles ayant subi les stress. Pour l'extraction et la manipulation des ARN, tout le matériel est nettoyé au chloroforme, rincé à l'éthanol 100% et stérilisé par autoclavage pendant 20 min à 120°C. Les échantillons de racines et de feuilles récoltés sont broyés dans l'azote liquide dans un mortier à l'aide d'un pilon. Les ARNs totaux ont été extraits en utilisant le kit d'extraction d'ARN sur colonne « RNeasy Mini Kit » (Qiagen, Cat. No. 74904) suivant les instructions du fournisseur. Les ARNs obtenus sont quantifiés par spectrophotométrie à 260 nm, 280 nm et 230 nm. Les rapports 260 nm/280 nm



et 260 nm/230nm sont calculés pour évaluer les contaminations, respectivement en protéines et en sucres.

La présence d'une éventuelle contamination par l'ADN génomique est évaluée en effectuant une réaction de polymérisation en chaîne PCR. Ces réactions de PCR de contrôle sont réalisées dans un mélange réactionnel de 25 µl comprenant le tampon d'activité de la Taq polymérase, une combinaison d'amorces d'Ubiquitine (sens et anti-sens), les dNTP (10 mM chaque) et 0,5 µM de la Taq polymérase. Les produits PCR subissent une migration sur gel d'agarose à 1 % pendant 20 minutes en présence d'un témoin positif d'ADN génomique amplifié et de marqueurs de Poids moléculaire. La révélation se fait suite à une immersion du gel dans une solution de Bromure d'éthidium (0,5µg/ml) et les bandes sont visualisées sous UV. Suivant le profil électrophorétique obtenu, les échantillons d'ARN totaux présentant une bande d'ADN génomique subissent un traitement DNase en utilisant le kit « Amibion : Invitrogen Cat. No. AM1906 ».

La synthèse des ADN complémentaires (ADN<sub>c</sub>) est réalisée à l'aide de la reverse transcriptase « Omniscript » (Qiagen, Cat. No. 74904) à partir de 1 µg d'ARN totaux suivant les instructions décrites par le fournisseur. Les ARN totaux sont ajoutés à 2 µl d'amorce oligodT, 2 µl dNTP et la même quantité de tampon RT en présence de 1 µl d'omniscript RT et 10 µl d'eau. Le mélange est incubé à 65°C pendant une heure, une fraction de la réaction est ensuite utilisée pour analyser la quantité de transcrits par PCR.

#### ***1.4.4. RT-PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)***

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur PRISM 7900HT « SYBR Green Master Mix » et se déroule en présence d'un intercalant fluorescent de l'ADN; Le SYBR® Green fourni par Applied Biosystems. Ce dernier permet de déceler la présence d'acides nucléiques en double brin dans le milieu réactionnel à chaque cycle d'amplification. La fluorescence émise enregistrée permet de visualiser la phase exponentielle de la réaction pendant laquelle le signal est proportionnel à la quantité de cible présente dans l'échantillon et ainsi en utilisant le programme CFX- Manager (Bio-Rad), le nombre de cycles nécessaires (annoté Ct pour threshold cycle) pour que le signal mesuré soit égal à un certain seuil (« Ct threshold ») est déterminé. Les niveaux d'expression pour chaque ADN<sub>c</sub> d'intérêt ont été normalisés par rapport au niveau d'expression du gène ubiquitaire d'actine (*Sl-Actin*) (Voir Annexe 4). Pour chaque ADN<sub>c</sub>, trois répétitions biologiques et trois techniques ont été effectuées.

La PCR quantitative a été réalisée à partir de 2 ng/μl d'ADNc dans un volume réactionnel de 10 μl. Les amorces nécessaires pour l'amplification de l'ensemble des *SIARFs* étudiés ont été conçues par un logiciel de bioinformatique dit « The PRIMER EXPRESS ». Le Tableau 2 regroupe la liste des amorces employées pour l'amplification spécifique des ARFs.

**Tableau 2** Séquences nucléotidiques des différentes amorces employées pour l'amplification des ARFs et des marqueurs de stress utilisés.

gène	Séquences des amorces		Caractéristiques des amorces		
	amorce sens	amorce anti-sens	Tm amorce sens	Tm amorce antisens	taille du produit
<i>SIARF1</i>	TCTCCTTCATCATTCTCATACTG	GAACCATTCTACCATAACC	55,31	53,67	107
<i>SIARF2A</i>	GCAAGGTCAAGAGTTATCGA	CATTGGTTTCTCAGACAAGTC	55,21	54,8	76
<i>SIARF2B</i>	CACTTAATCCACTTCCAATACC	TACAACACTTTGGATGAACCT	54,53	54,74	110
<i>SIARF3</i>	AATTGCAGTATCAGACTTTGG	TCTAGATATCCCAGAACTAGGA	54,17	54,03	163
<i>SIARF4</i>	CATTATTGTTGGTGACTTTGTG	GACCTTTGGAAACCTATTGG	54,24	53,85	82
<i>SIARF5</i>	CCTTCAGAGTTTGTCACTCCT	AACATCATCCAAATCTCATACC	54,51	54,74	89
<i>SIARF6A</i>	CCAACATATCCCTAGTACTTCAG	GTGCCTGAGATATTAGTTGGT	55,64	55,09	116
<i>SIARF6B</i>	ACCTCTAGTATCTTCATCCT	TCCGAGACCTTTGTATTGTG	55,15	55,25	110
<i>SIARF7</i>	TCAACTCCTCAAACATACCT	TGAACTATCCAAATAATCCATCTG	53,57	54,47	60
<i>SIARF8A</i>	TGACATCGAATGGAAATTCAG	GTCTCTTAGCACTAACAAACAC	54,29	55,1	95
<i>SIARF8B</i>	GTCAGTCCGTGATCATAGAG	GGAATCCAAGTACAATTTCC	54,82	54,88	149
<i>SIARF9A</i>	ATCATTCAATCTCAAATCAAAGGT	CCTCATCATGTCTTCTTCAG	54,02	55,06	77
<i>SIARF10</i>	ATTCTCTGTGCCTAGATACTG	CTATAAATGTGCCTAAACTTCCA	54,26	54,43	129
<i>SIARF17</i>	TGAAGTTGATGAAGTTACTATGAG	TCCTCCATTATTCGCATCTG	54,42	55,01	100
<i>SIARF18</i>	AATCTACACTCGGCATTGTC	AAGTCTCCTATCTTATCATTGGA	54,02	54,45	101
<i>SIARF19</i>	TGGTGGATGAATCTGTTGTC	TACTTAGACAGCTCTGAACCT	55,36	55,46	103
<i>SIARF24</i>	TCATTGTTGGATGTTTCAAAGG	GAAGTCTTGAAAGTAGTATACTC	55,44	54,27	55
<i>Sl-actin</i>	TGTCCTATTACGAGGGTT	AGTTAAATCACGACCAGCAAGAT	55,55	58,42	73
<i>PDC</i>	TCTTTGAGCACATTCAGAGG	AACAGACCAACCAATAGATCCA	55,37	57,07	149
<i>ACO1</i>	AAGGGACTCCGCGCTCAT	AGTTGAAGGCCACTCACTTTGTC	60,68	60,36	77
<i>CI7</i>	GGCAATTTTCATCTGAGTTGTCTGA	CTATTTGATCGATGAAGTTTCTTTTCC	59,54	57,50	90

#### 1.4.5. Expression des miRNA et des gènes *SIARFs* cibles

L'expression des précurseurs des *miR160* et *miR167* (*miR167a*, *miR167b*, *miR167c* et *miR167d*), et de leurs cibles respectifs *SIARF10* et *SIARF8A* a été évaluée en conditions de stress hydrique et salin. L'expression de ces gènes a été quantifiée par RT-PCR chez les plantes Micro-Tom de type WT, après 2 heures et 24 heures d'application du stress salin et après 48 heures et après 5 jours d'application du stress hydrique. Les différents stress ont été appliqué comme décrit dans le paragraphe 1.4.2. Des extractions d'ARN ont été réalisées à partir des différents échantillons et ont servi de matrices pour la synthèse d'ADN

complémentaire suivant le protocole décrit précédemment. Pour chaque échantillon, trois répétitions biologiques ont été réalisées (Racines ou feuilles).

Des PCR quantitatives ont été effectuées à partir de 2 ng/μl d'ADN<sub>c</sub> dans un volume réactionnel de 10 μl. Les amorces nécessaires pour l'amplification des miRNAs et de leurs cibles respectives ont été conçues par un logiciel de bioinformatique dit « The PRIMER EXPRESS ». Les séquences relatives à ces amorces sont représentées dans le Tableau 3.

**Tableau 3** Séquences nucléotidiques des différentes amorces employées pour l'amplification des précurseurs de miRNA et de leurs ARFs cibles.

Gène	Séquences des amorces	
	Amorce Sens	Amorce Anti-sens
<i>SIARF8A</i>	T G A C A T C G A A T G G A A A T T C A G	G T C T C T T A G C A C T A A C A A A C A C
<i>SIARF10A</i>	A T T C T C T G T G C C T A G A T A C T G	C T A T A A A T G T G C C T A A A C T T C C A
<i>miR160</i>	C C T G G A T G C C A A C T A A G A A C A G	G G T A C C A A C T A G G A A G A G T G T C
<i>miR167a</i>	T C C G A G C A T G A C C T A A C C T T	T C A A A A C C C T A C A T C C C A A A
<i>miR167b</i>	C A A T T C T G A A C C C T G G C C T A	G A C A G G T A A G G C T G C C A C A T
<i>miR167c</i>	T G G A T C G T G A A C C A C T A G C A	G C A C A A T T A G A C C C T T G T T G C
<i>miR167d</i>	G C C A C A T G A T C T G A T C T T T C C T C	G C C A G C A T G A T C T A A A C T T T C C
<i>Sl-actin</i>	T G T C C C T A T T T A C G A G G G T T	A G T T A A A T C A C G A C C A G C A A G A T

## 2. Etude de l'implication de l'*ARF4* dans la tolérance aux stress salin et hydrique

### 2.1. Etude d'expression de l'*ARF4* en conditions de stress

L'expression du gène *SIARF4* a été évaluée en conditions de stress hydrique et salin. Les stress ont été appliqués sur des plantes de tomate (*Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom) de 3 semaines selon le protocole décrit dans le paragraphe 1.4.2. Les échantillons (feuilles et racines) ont été recueillis des plantes stressées et témoins après 2 heures et 24 heures pour le stress salin et après 48 heures et 5 jours pour le stress hydrique. Les échantillons ont été par la suite broyés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. Des extractions d'ARN totaux ont été réalisées à partir des échantillons broyés et cryo-conservés. La synthèse des ADN complémentaires (ADN<sub>c</sub>) a été effectuée pour l'ensemble des ARN totaux extraits suivant le protocole décrit dans le paragraphe 1.4.3. Des PCR quantitatives ont été réalisées à partir de 2 ng/μl d'ADN<sub>c</sub> synthétisée dans un volume réactionnel de 10 μl. Les amorces sens et anti-sens nécessaires pour amplifier le gène *ARF4* sont les suivantes : 5' CATTATTGTTGGTGACTTTGTG 3' et 5' GACCTTTGGAAACCTATTGG 3'.

## **2.2. Etude de l'expression spatio-temporelle du gène *SIARF4* en conditions de stress**

L'étude de l'expression spatio-temporelle du gène *SIARF4* a été réalisée moyennant des plantes transgéniques de 3 semaines exprimant la construction pARF4::GUS. Ces plantes ont été exposées au stress salin pendant 24 heures et au stress hydrique pendant 5 jours suivant le protocole décrit dans le paragraphe 1.3.

## **2.3. Etude de la tolérance aux stress salin et hydrique**

### **2.3.1. Culture des plantes**

La caractérisation phénotypique et physiologique de la tolérance aux stress salin et hydrique a été effectuée sur des plantes de tomate de type sauvage (WT) et des plantes transgéniques pour le gène *SIARF4* (*ARF4-as* et *ARF4-ox*). Les graines des différentes lignées ont été préalablement stérilisées pendant dix minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium à 50% puis rincées abondamment à l'eau distillée stérile. Les graines ont ensuite été mise en culture sur milieu MS/2 additionné de 8g/ l d'agar. Après une semaine de culture, les jeunes plantules ont été transférées sur le milieu liquide BD.

### **2.3.2. Application des stress**

Après 2 semaines de culture sur milieu hydroponique, les plantes des différentes lignées ont été exposées au stress salin et hydrique. Le stress salin a été appliqué par addition de 100 mM ou 150 mM de NaCl au milieu de culture liquide. L'application du stress hydrique s'est faite par addition de 5% ou 15% de PEG 20000. Les échantillons de feuilles et de racines ont été récupérés après 2 semaines d'exposition au stress.

### **2.3.3. Les paramètres morphologiques**

Plusieurs paramètres de croissance ont été évalués chez les trois lignées étudiées. On cite : Le poids frais de la partie aérienne, le poids frais de la partie racinaire, le poids sec de la partie aérienne, le poids sec de la partie racinaire, la longueur de la racine principale et la densité racinaire.

#### **2.3.3.1. Détermination du poids frais et du poids sec**

Le poids frais de la partie aérienne et racinaire a été déterminé après deux semaines d'application du stress. Les plantes de chaque lignée ont été retirées du milieu nutritif, rincées à l'eau distillée et déposées sur du papier filtre. Le poids frais de la partie aérienne et de la partie racinaire a été déterminé à l'aide d'une balance de précision et la moyenne des poids a été

calculée sur la base de douze plantes par lignée pour chaque condition. Le poids sec a été déterminé après séchage des échantillons à 70°C pendant 72 heures. Le poids sec de chaque partie a été déterminé à l'aide d'une balance de précision et la moyenne des poids a été calculée sur la base de douze plantes par lignée.

### 2.3.3.2. Détermination de la longueur de la racine principale et la densité des racines latérales

La longueur de la racine principale a été déterminée à l'aide du logiciel ImageJ. Le nombre de racines latérales a été déterminé en comptant le nombre de racines émergentes et la moyenne a été calculée sur la base d'au moins douze plantes par ligne pour chaque condition. La densité racinaire (DRL) a été calculée en utilisant l'équation ci-dessous.

$$DRL = \frac{\text{Nombre de racines latérales}}{\text{Longueur de la racine principale}}$$

### 2.3.4. Les paramètres physiologiques et biochimiques

Plusieurs paramètres physiologiques ont été quantifiées chez les plantes WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* à savoir : la teneur en chlorophylle a, b et en chlorophylle totale et le dosage des sucres solubles au niveau foliaire et racinaire, la conductance stomatique, la teneur relative en eau des feuilles et la quantification de l'ABA au niveau foliaire.

#### 2.3.4.1. Teneur en chlorophylle a, b et en chlorophylle totale

Les feuilles sont prélevées et broyées dans de l'azote liquide. 100 mg de broyat est homogénéisé en présence de 1 ml d'acétone à 80%. Le liquide obtenu est centrifugé pendant 1 min à 10 000 rpm pour éliminer tout tissu solide restant. Les échantillons sont ensuite analysés par spectrophotométrie à deux longueurs d'onde différentes (645 nm et 663 nm) en utilisant une solution d'acétone à 80% comme témoin.

La teneur en chlorophylle a et b et en chlorophylle totale a été déterminée à l'aide des équations décrites par Bassa et al., (2012). A représente l'absorbance.

$$Chl\ a = 0,999A_{663} - 0,0989A_{645}$$

$$Chl\ b = -0,328A_{663} + 1,77A_{645}$$

$$Total\ chl = 20,2 \times Chl\ a + 8,02 \times Chl\ b$$

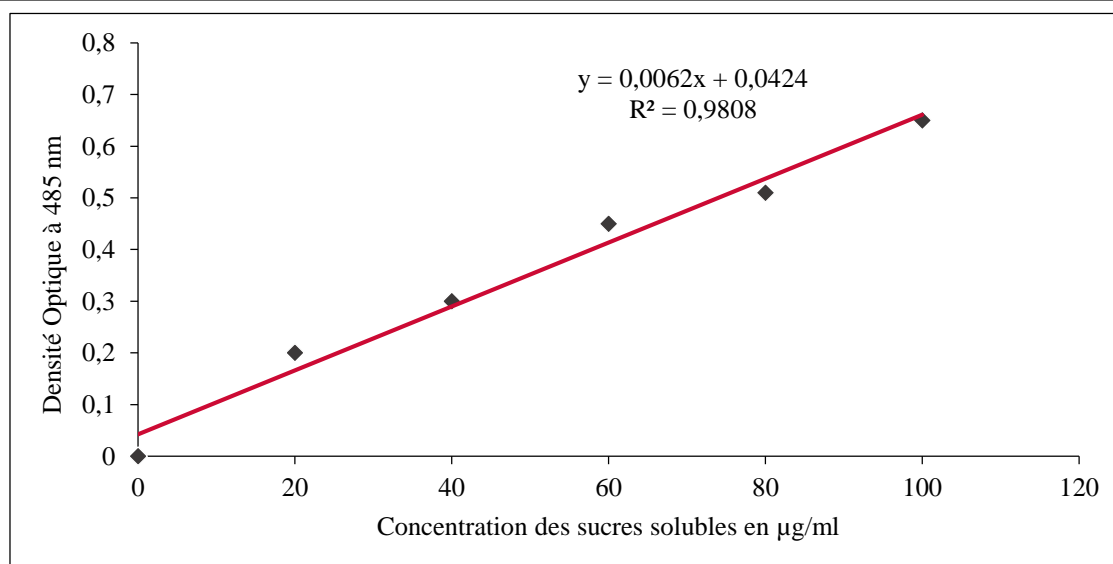
### 2.3.4.2. Teneur en sucres solubles

La teneur en sucres solubles totaux a été réalisée selon la méthode au phénol-sulfurique décrite par DuBois, (1956). Pour cela, 100mg de matière fraîche (Feuille ou racine) ont été placés dans des tubes à essais additionnés de 5 ml d'éthanol à 80%. Les tubes à essais ont été par la suite placés dans le bain-marie à 80°C pendant 1 heure. Après refroidissement des tubes, 0,5 ml d'eau distillée et 1 ml de phénol à 5% ont été ajoutés (en prenant soin de bien agiter) et les tubes ont été incubés pendant 1 heure à la température ambiante. Enfin, 2,5 ml d'acide sulfurique ont été ajoutés. L'absorbance a été déterminée par spectrométrie à 485 nm. Enfin, les résultats sont reportés sur une courbe-étalon de saccharose réalisé dans les mêmes conditions (Figure 11).

**Réalisation de la courbe-étalon :** Le saccharose séché à 80°C puis 100mg sont pesés avec précision, avant d'ajouter 0.5ml d'acide sulfurique concentré et ensuite le volume est complété à 100ml par l'eau distillée. La solution est diluée à 1% suivant le tableau ci-dessous (Tableau 4).

**Tableau 4** Concentrations utilisées pour la courbe-étalon du saccharose selon Dubois, 1956.

Concentration du saccharose en µg/ml	0	20	40	60	80	100
Volume prélevé de la solution de saccharose	2	1,8	1,6	1,4	1,2	1
Volume d'eau additionné	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1



**Figure 11** Courbe-étalon du saccharose employé pour la quantification des sucres solubles totaux selon Dubois, 1956.

### 2.3.4.3. Teneur relative en eau (RWC)

Des feuilles jeunes complètement développées (habituellement la cinquième feuille à compter de la base) des trois lignées étudiées (WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox*) ont été prélevées sur des plantes de trois semaines bien hydratées et ont été rapidement pesées pour déterminer leur poids frais (**PF**). Ensuite, les échantillons de feuilles ont été partiellement trempés dans l'eau et placés à 4°C et à l'obscurité. Après 24 heures, les feuilles ont été légèrement essorées au papier filtre (de manière à éliminer l'eau résiduelle non contenue dans les tissus) et le poids à la turgescence (**PT**) a été déterminé. Enfin, les échantillons ont été mis dans une étuve à 70°C pendant 48 heures pour déterminer leurs poids sec (**PS**). La teneur relative en eau, exprimée par RWC est calculée comme suit :

$$RWC = \frac{PF-PS}{PT-PS} \times 100$$

### 2.3.4.4. Mesure de la conductance stomatique

Les conductances stomatiques sont mesurées sur des plantes WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* âgées de 5 semaines exposées ou non au stress salin et hydrique. Les stress ont été appliqués sur des plantes âgées de 3 semaines par addition de 150mM de NaCl pour le stress salin et de 15% de PEG 20000 pour le stress hydrique comme décrit précédemment dans le paragraphe 2.3.2. La détermination de la conductance stomatique se fait en plaçant la pince du poromètre SC1(DECAGON, USA) sur une feuille bien développée (généralement la cinquième feuille à compter de la base de la plante) (Photo 5).



**Photo 5** Le poromètre SC1 employé pour la mesure de la conductance stomatique au niveau des feuilles.

Ce poromètre permet de déterminer la conductance stomatique au niveau des feuilles à travers la mesure de la différence de l'humidité entre les deux faces de la feuille et le flux de la vapeur d'eau. Ainsi, il permet de calculer la résistance entre l'intérieur et l'extérieur de la feuille. Pour chaque lignée et condition, douze répétitions indépendantes ont été réalisées.

#### 2.3.4.5. Dosage de l'ABA

Le dosage de l'ABA a été réalisé sur des feuilles des plantes WT et *ARF4-as* cultivées en conditions normales et en présence de stress salin ou hydrique, et ceci suivant le protocole décrit par Forcat *et al.*, (2008). Brièvement, 110 mg de feuilles préalablement broyées dans l'azote liquide ont été incubé à 4°C pendant 30 minutes en présence de 400 µl de solution d'eau supplémentée de 10% de méthanol et de 1% d'acide acétique. Les extraits ont été ensuite centrifugés à 4°C pendant 10 minutes à 13.000 g. Le surnageant a été retiré avec précaution et le culot a été par la suite incubé pendant 30 minutes en présence de 475 µl du mélange méthanol-acide acétique (solution d'eau supplémentée de 10% de méthanol et de 1% d'acide acétique). Après centrifugation, les surnageants ont été regroupés et analysés par chromatographie en phase liquide à haute pression (LC-MS using an Acquity UPLC coupled to a XevoQtof) (Waters, Massachusetts, USA). [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>] ABA a été utilisé comme témoin interne. La teneur en ABA dans les différents échantillons a été déterminée par rapport au témoin interne comme décrit par Jaulneau *et al.*, (2010).

#### 2.3.5. Analyse de l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse aux stress et dans la voie de signalisation de l'ABA

L'expression des gènes impliqués dans le processus de détoxification des ROS (*Cat1*, *mdhar* et *Cu/ZnSOD*), des gènes de transport d'ions (*LeNHX1*) ou de sucre (*LeSUT1*) ainsi que les gènes de la voie de biosynthèse (*NCED1*, *NCED2*) ou de dégradation de l'ABA (*CYP707A1*, *CYP707A2* et *CYP707A3*) a été évaluée chez les plantes WT et les lignées transgéniques pour le gène *SIARF4* (*ARF4-as* et *ARF4-ox*) en conditions de stress hydrique et salin. Les deux stress ont été appliqués par addition de 150 mM de NaCl pour le stress salin et de 15% de PEG 2000 pour le stress hydrique. Les échantillons de feuilles et de racines ont été récoltés après 2 heures et 24 heures pour le stress salin et après 48 heures pour le stress hydrique. Des extractions d'ARN totaux ont été réalisées à partir des échantillons broyés dans de l'azote liquide et cryo-conservés. La synthèse des ADN complémentaires (ADN<sub>c</sub>) a été effectuée pour l'ensemble des ARN totaux extraits suivant le protocole décrit dans le paragraphe 1.4.3. Des PCR quantitatives ont été réalisées à partir de 2 ng/µl d'ADN<sub>c</sub> synthétisée dans un volume réactionnel de 10 µl. Les amorces sens et anti-sens nécessaires ont été conçues par le logiciel



de bioinformatique «The PRIMER EXPRESS ». Les séquences exactes de ces amorces sont décrites dans le Tableau 5.

**Tableau 5** Séquences nucléotidiques des différentes amorces employées pour l'amplification des gènes codant pour les antioxydants (*Cat1*, *mdhar* et *SOD*), des gènes impliqués dans le transport ionique (*LeNHX1*) et des sucres (*LeSUTI*) ainsi que les gènes de biosynthèse et de dégradation de l'ABA.

Gène	Séquences des amorces		caractéristiques des amorces		
	amorce sens	amorce anti-sens	Tm amorce sens	Tm amorce antisens	taille du produit
<i>Cat1</i>	TGATCGCGAGAAGATACCTG	CTTCCACGTTTCATGGACAAC	56,93	57,03	174
<i>Mdhar</i>	CGGATTTCAAGGGTTTCGGTTC	CTCTCCAACCTACCACATACTCTC	60,10	59,66	103
<i>SOD</i>	CACATACAAAAATGGTGAAGGCCG	GGTATCACCAAGGGCATGGA	61,15	59,45	167
<i>LeSUTI</i>	AACTCCCGGAGAAAGAAGAG	TACAGTTTCGCATCACCGAC	56,57	58,29	235
<i>LeNHX1</i>	GACAGTCTGGAAAAATCT	GGTATCAGCCAAAACACC	50,97	56,18	309
<i>SINCED1</i>	AGGCAACAGTGAAACTTCCATCAAG	TCCATTAAGAGGATATTACCGGGGAC	60,58	61,60	209
<i>SINCED2</i>	TGGTTTTTCATGGGACATTCATTAGC	ATCTCCCTTCTCAACTCCCTATTCC	60,11	61,17	184
<i>SICYP707A1</i>	CCCAGAGTTCTTTCTGTATCCACAA	GAATGCCACTACCAGATCCTACCAC	62,50	62,70	200
<i>SICYP707A2</i>	TCGAAAAAGGATACAATTCGATGCC	CTGCAATTTGTTCTGTCAGTGAGTCC	60,22	62,75	195
<i>SICYP707A3</i>	CTCATGTCCAGGCAATGAGTTAGCC	GGAGCGAAGCTAGAATGAGAATCACC	63,66	63,36	188
<i>St-actin</i>	TGTCCCTATTTACGAGGGTT	AGTTAAATCACGACCAGCAAGAT	55,55	58,42	73

## 2.4. Analyse statistique

Les résultats figurant dans ce travail sont représentés en moyennes arithmétiques  $\pm$  écart type. Pour l'analyse des résultats QPCR, les données sont exprimées en  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. L'analyse statistique a été faite moyennant le test t de Student avec un seuil de significativité fixé à 0,05 en utilisant le logiciel Statistica version 10 (Statsoft, Tulsa, USA).

En ce qui concerne les résultats de la caractérisation morphologique et physiologique de la tolérance aux stress salin et hydrique des lignées transgéniques pour le gène *ARF4*, les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  écart type de douze répétitions biologiques. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse de variance à 5% par ANOVA à deux facteurs et les différences significatives ont été classées par le test Student Newman-Keuls avec le même seuil de significativité (0,05).

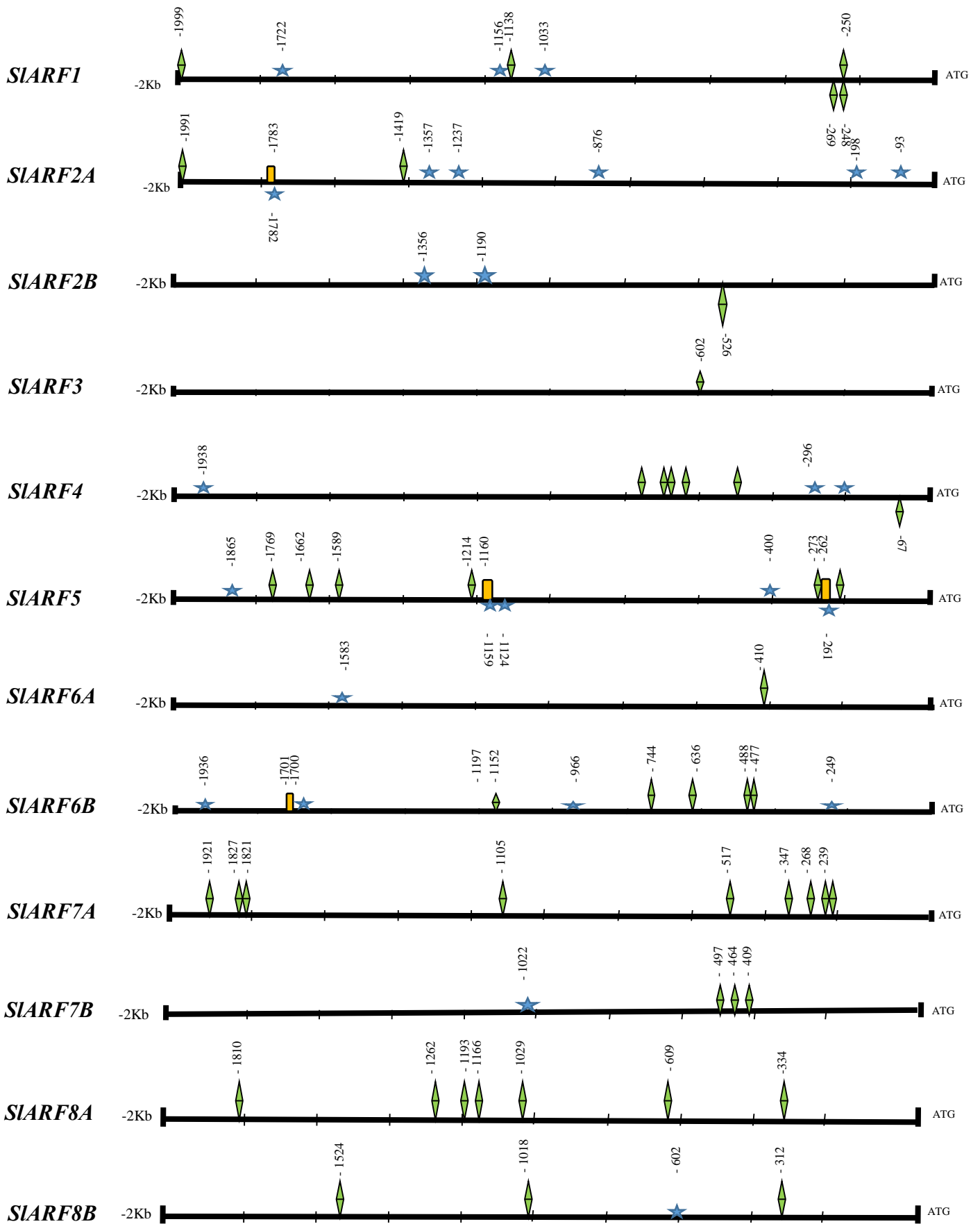
# **Chapitre III**

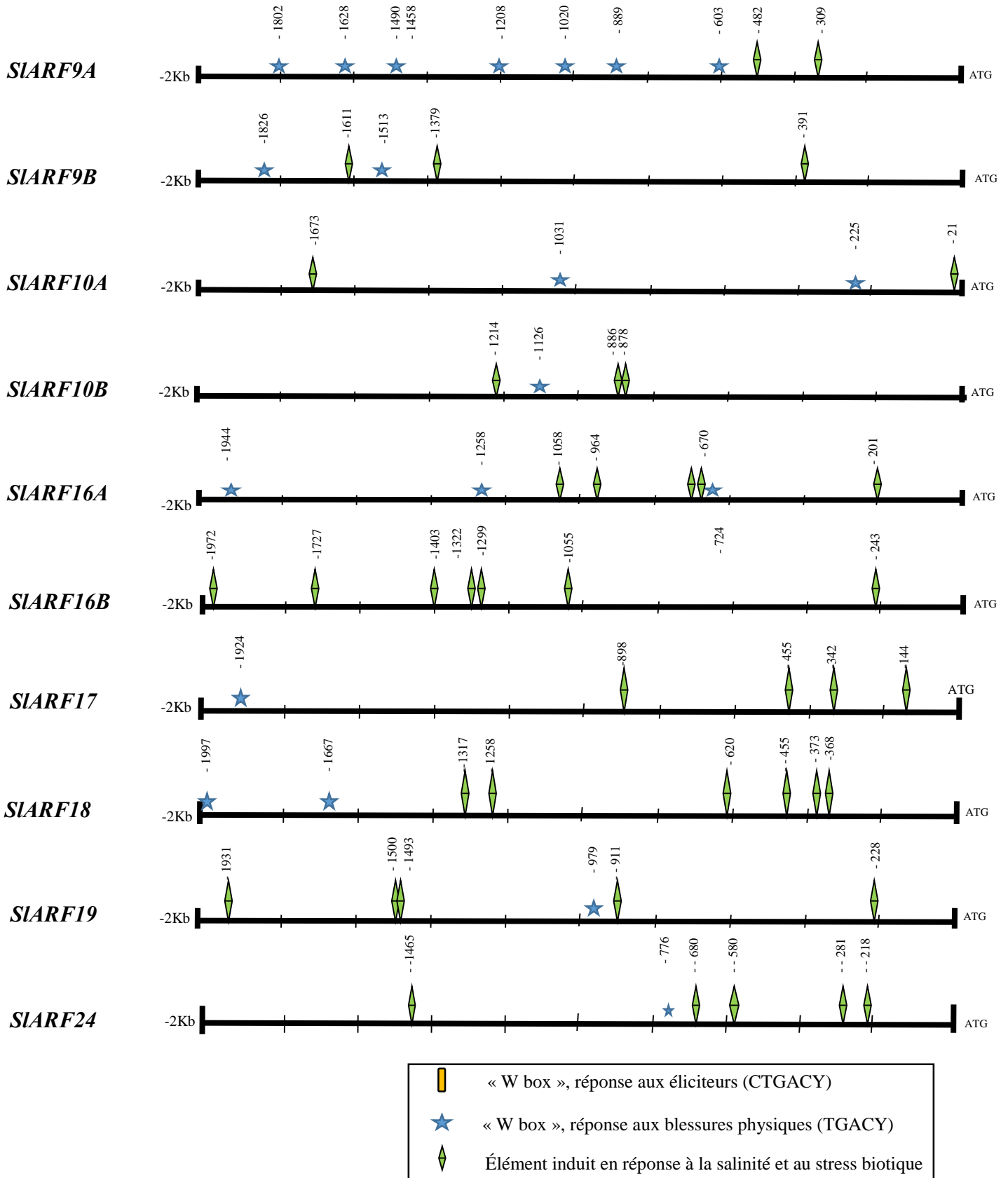
## **Les Facteurs de Réponse à l’Auxine et la réponse aux stress biotiques chez la tomate**

### 1. Analyse *in silico* de la région promotrice des *ARFs* à la recherche de motifs *cis*-régulateurs associés à la réponse aux stress biotiques

En vue d’approcher le rôle potentiel des facteurs de réponse à l’auxine dans la réponse aux stress, une analyse bio-informatique a été réalisée à la recherche de motifs *cis*-régulateurs associés aux stress au niveau de la région promotrice des 22 *ARFs* rencontrés chez la tomate. Pour cela, les séquences de 2 Kbp (2000 paires de base) en amont du codon d’initiation de la transcription des 22 *SLARFs* ont été extraites de la banque de données du génome de la tomate [Plateforme dédiée aux Solanacées (<https://solgenomics.net/>)]. Les motifs associés aux stress ont été repérés par le logiciel PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) ; base de données japonaise qui répertorie les séquences nucléotidiques *cis*-régulatrices de plantes. Cette base de données référence les motifs de base présents dans les promoteurs de plantes déjà identifiées dans des publications scientifiques.

Les motifs *cis*-régulateurs associés à la réponse au stress biotique tels que WBOXNTCHN48, WBOXNTERF3 et GT1GMSCAM4 ont été repérés au niveau de la région promotrice des 22 *ARFs* (Figure 12). L’élément GT1GMSCAM4 impliqué dans la réponse aux pathogènes (Trivedi *et al.*, 2013), est présent en une ou plusieurs copies au niveau de la région promotrice des *SLARFs* excepté pour le gène *SLARF2B*. En effet, ce motif est présent en neuf copies au niveau du promoteur du gène *SLARF7A*, en sept copies au niveau de la région promotrice des gènes *SLARF8A* et *SLARF16B* tandis que le promoteur du gène *SLARF3* ne présente qu’une seule copie de celui-ci. Le motif impliqué dans la réponse au stress mécanique WBOXNTERF3 (Nishiuchi *et al.*, 2004) est retrouvé dans la majorité des *SLARFs* sauf pour les gènes *SLARF3* et *SLARF7A*. Un grand nombre de copies de cet élément est repéré au niveau de la région promotrice du gène *SLARF9A* (avec sept copies) alors qu’une seule copie de celui-ci est présente dans le promoteur des gènes *SLARF6A*, *SLARF7B*, *SLARF8A*, *SLARF8B*, *SLARF17*, *SLARF19* et *SLARF24*. En ce qui concerne le motif conservé WBOXNTCHN48 de réponse aux éliciteurs (Deb and Kundu, 2015), ce motif est présent uniquement dans le promoteur des gènes *SLARF2A* (1 copie), *SLARF5* (2 copies) et *SLARF6B* (1 copie).





**Figure 12** Représentation schématique de l’ensemble des éléments cis-régulateurs rencontrés au niveau de la région promotrice des 22 SIARFs rencontrés chez la tomate. Les séquences des motifs correspondant à ces éléments sont décrites au niveau du Tableau 1.

## 2. Etude d’expression des ARFs en conditions de stress biotiques

L’expression de 22 ARFs en réponse aux stress biotiques a été analysée *in silico*, grâce à l’algorithme TomExpress (plateforme de RNAseq) (Zouine et al., 2017). Ce dernier permet de représenter, de comparer et d’étudier les données RNA-seq pour 114 conditions publiées, en effectuant une normalisation commune sur la base du génome de tomate récemment séquencé (Zouine et al., 2017). Parmi les données d’expression disponibles dans cette plateforme, nous nous sommes concentrés sur les données d’expression des ARFs en réponse à l’infection par : la flagelline, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae* DC3000, *Agrobacterium tumefaciens* et l’infection par le virus des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (*Yellow curl leaf virus* YCV) (Annexe 1).

### 2.1. Expression des ARFs en réponse à l’infection par la flagelline

La flagelline est la protéine majoritaire structurale du filament flagellaire des bactéries. La plante reconnaît dans la molécule de la flagelline un petit motif de 22 acides aminés, noté flg22. Ce motif est suffisant pour déclencher des réactions de défense chez différentes plantes. Une fois détecté, une cascade de signalisation cellulaire a lieu et conduit à l’activation, dans le noyau, de plusieurs gènes de défense.

En réponse à une infection par la flagelline (flg22), l’analyse de l’expression des ARFs a montré que la majorité de ces gènes sont réprimés à l’exception de *SLARF6A* et *SLARF18* qui sont deux fois plus exprimés par rapport aux conditions normales. Parmi les gènes sous-exprimés, *SLARF4*, *SLARF5* et *SLARF9A* sont trois à quatre fois plus réprimés (Figure 13).

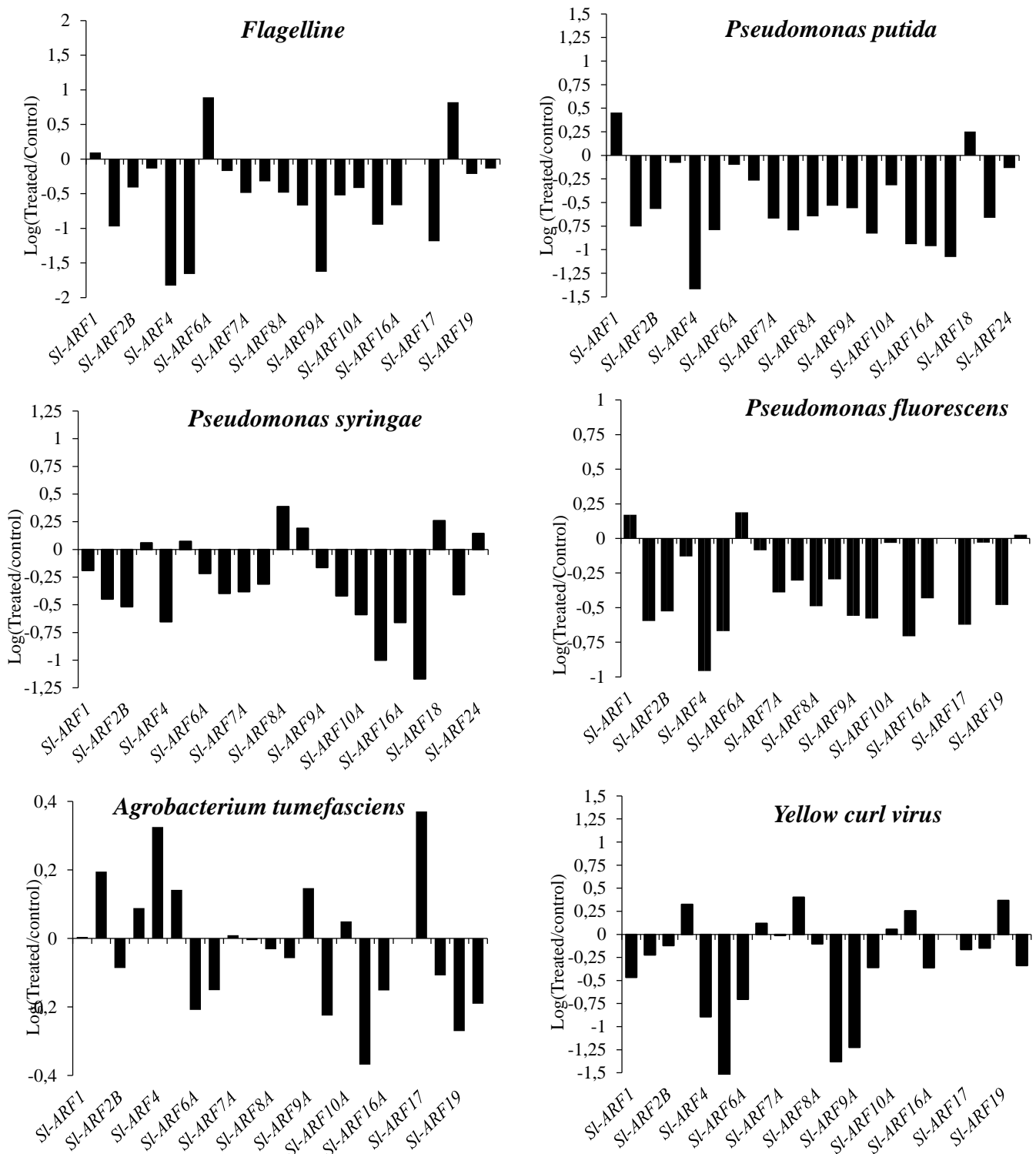
### 2.2. Expression des ARFs en réponse à l’infection bactérienne

L’expression des SLARFs a été évaluée en réponse à l’infection des feuilles par diverses bactéries telles que : *Pseudomonas syringae* DC3000, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* et *Agrobacterium tumefaciens*. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 13.

En réponse à l’infection par *Pseudomonas putida*, l’expression des ARFs est réprimée à l’exception des gènes *SLARF1* et *SLARF18* qui présentent une légère surexpression dans ces conditions. L’infection des feuilles par *Pseudomonas fluorescens* induit la sous-expression de la majorité des gènes sauf pour *SLARF1* et *SLARF6A* dont l’expression est faiblement induite.

De même, l’expression de la quasi-majorité des gènes *SLARFs* est régulée négativement suite à l’infection par *Pseudomonas syringae* DC3000 à l’exception du gène *SLARF8A* dont

l’expression est induite. Il convient de noter, qu’aucun des 22 *SIARFs* n’a montré un changement significatif dans l’expression après infection par *Agrobacterium tumefaciens*.



**Figure 13** Analyse in silico de l’expression des SIARFs au niveau des feuilles de tomate exposées à différents types de stress biotiques : Flagelline, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae* DC3000, *Pseudomonas fluorescens*, *Agrobacterium tumefaciens* et virus de TYLCV. Les résultats présentés ont été extraits de la base de données RNA-seq TOMEXPRESS (<http://gbf.toulouse.inra.fr/tomexpress>).

### 2.3. Expression des ARFs en réponse à une infection virale

Le virus des feuilles jaunes en cuillère de la tomate ou TYLCV (*Tomato Yellow Leaf Curl Virus*) est un phytovirus du genre *Begomovirus* (Famille des *Geminiviridae*) responsable d’une des principales maladies virales touchant les cultures de tomate. En réponse à TYLCV, l’expression des gènes *SLARF4*, *SLARF5*, *SLARF6A*, *SLARF8B* et *SLARF9A* est réprimé dans les tissus foliaires tandis que les *SLARFs* restants ne montrent pas de changement significatif dans leur expression (Figure 13).

L’auxine est connue pour son rôle crucial dans le contrôle des différents aspects de la croissance et du développement des plantes. Récemment, l’auxine est apparue comme un acteur clé dans la mise en place de réponses adaptatives des plantes vis-à-vis de l’invasion des pathogènes. Elle coordonne le développement des plantes essentiellement par le biais de deux régulateurs transcriptionnels ; Aux/AIA et les ARFs (Guilfoyle et al., 1998 ; Guilfoyle and Hagen, 2007). Chez la tomate, 22 ARFs ont été identifiés et caractérisés (Zouine et al., 2014). L’analyse *in silico* de la région promotrice des ARFs à la recherche des éléments *cis*-régulateurs impliqués dans la réponse aux pathogènes a révélé qu’au moins une copie du motif GTAGMSCAM4 (Pathogenesis induced element) est présente dans la région régulatrice des 22 ARFs. De plus, il semblerait qu’en réponse à l’infection par : la flagelline, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae* DC3000, *Agrobacterium tumefaciens* et l’infection par le virus des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (Yellow curl leave virus YCV), l’expression de la quasi majorité des ARFs est altérée. Ces résultats suggèrent que l’auxine pourrait être impliquée dans la réponse aux pathogènes à travers les ARFs. Des études antérieures ont fourni des preuves quant à l’implication de la voie de signalisation de l’auxine dans la réponse au stress biotiques. En effet, Bari and Jones (2009) ont démontré que l’invasion par un pathogène entraîne une modification de la teneur en auxine et une altération dans l’expression des gènes associés à cette hormone. Une répression globale des gènes de réponse à l’auxine a été rapporté chez *Arabidopsis thaliana* suite à l’infection par le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea* (Llorente et al., 2008). Chez le coton, l’infection par le champignon phyto-pathogène *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* induit une nette modification dans l’expression des gènes de réponse à l’auxine (Dowd et al., 2004). Des études menées sur le Riz (*Oryza sativa*) ont démontré que seuls deux *OsARFs* répondent à l’infection par le champignon ascomycète *Magnaporthe grisea* et l’infection par l’hémiparasite radriculaire obligatoire *Striga hermonthica* (Ghanashyam and Jain, 2009). Les résultats présentés dans ce travail ont révélé que l’expression de la famille des *SLARFs* était



modifiée par l’infection des pathogènes. Ainsi, nos résultats suggèrent que la régulation de la voie de l’auxine pourrait constituer un aspect important de la réponse de défense par la régulation de l’expression des *ARFs* chez la tomate.

L’auxine contrôle divers aspects de la croissance et du développement des plantes à travers une famille multigénique de facteurs de transcription connue sous le nom des facteurs de réponse à l’auxine (*ARFs*). L’analyse *in silico* de la région promotrice des 22 *ARFs* rencontrés chez la tomate a montré la richesse de celle-ci en éléments *cis*-régulateurs associés à la réponse aux pathogènes et aux agressions physiques. De plus, l’étude d’expression de ces gènes a montré une régulation négative de la majorité des *ARFs* suite à l’infection par des agents bactériens ou viraux. L’ensemble de nos résultats suggèrent que ces gènes pourraient jouer un rôle important dans la réponse de la tomate aux stress biotiques et fournissent de nombreux candidats pour des études ultérieures ; leurs fonctions méritent d’être approfondies.

L’auxine semble également intervenir dans la réponse aux stress abiotiques. En fait, des études récentes ont souligné une potentielle intervention de l’auxine dans ce processus. Ainsi, le prochain chapitre s’intéressera à l’étude de l’implication de l’auxine dans la réponse aux stress abiotiques à travers l’évaluation du rôle des facteurs de réponse à l’auxine dans ce processus.

# **Chapitre IV**

## **Les Facteurs de Réponse à l'Auxine et la réponse aux stress abiotiques chez la tomate**

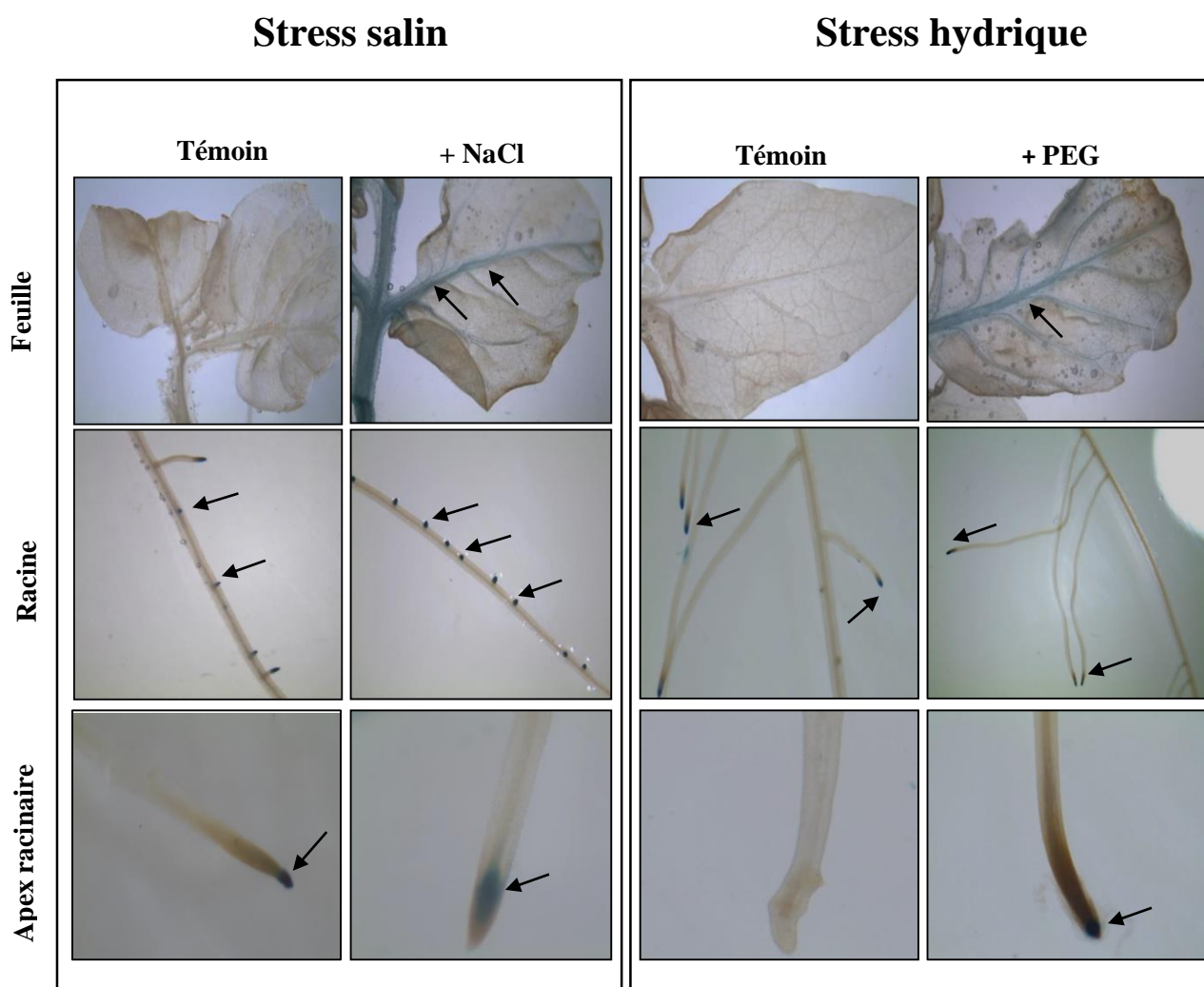
### 1. Accumulation de l’auxine en conditions de stress

L’accumulation de l’auxine suite à l’application d’un stress salin ou hydrique a été évaluée en utilisant des plantes de tomate exprimant le gène rapporteur GUS dirigé par le promoteur synthétique de réponse à l’auxine dit DR5 (Ulmasov et al., 1995). Pour cela, des plantes DR5 ::GUS âgées de 3 semaines ont été soumises au stress salin ou hydrique par addition de 250 mM de NaCl ou 15% de PEG 2000 respectivement (Photo 6).

Les résultats montrent, qu’après 24 heures d’application du stress salin, l’activité du gène GUS est limitée aux nervures des feuilles. Au niveau racinaire, l’activité du gène GUS est observée dans l’apex de la racine principale et des primordiums des racines latérales. Les plantes témoins ont également montré une coloration bleue dans l’apex des racines primaires et latérales.

L’exposition des plantes au stress hydrique (15% PEG 20000) pendant 5 jours induit l’apparition d’une coloration bleue (activité GUS) à la fois au niveau des nervures des feuilles et de l’apex de la racine principale et des racines latérales alors qu’elle est limitée aux primordiums des racines latérales chez plantes témoins.

L’application du stress salin et hydrique provoque une modification de la distribution de l’auxine dans les différentes parties analysées. En effet, en réponse à ces stress, l’auxine s’accumule surtout au niveau de l’apex de la racine principale et des primordiums des racines latérales. L’accumulation de l’auxine est étroitement liée à certains changements morphologiques observés chez les plantes exposées aux stress. Ces changements sont probablement associés à la formation des racines latérales et constituent l’une des réponses les plus spécifiques aux stress abiotiques (Ahmad and Prasad, 2011; Cao et al., 2008). L’acide indole-3-acétique (AIA), principale auxine endogène des plantes, est connue pour son implication dans l’initiation et le développement ultérieur des racines latérales (Bhalerao et al., 2002). Des études menées chez *Arabidopsis* ont établi une corrélation entre l’accumulation de l’auxine et le développement d’un grand nombre de primordiums de racines latérales (Bhalerao *et al.*, 2002; He *et al.*, 2005; López-Bucio *et al.*, 2005). Ainsi, la présence de l’auxine au niveau des primordiums des racines latérales des plantes exposées au stress salin et hydrique laisse suggérer que l’auxine pourrait contrôler l’émergence et le développement des racines latérales en conditions de stress.



**Photo 6** Expression tissulaire du gène GUS dirigé par le promoteur synthétique de réponse à l’auxine DR5 observée chez des plantes de 3 semaines en présence de stress salin ou hydrique. Le stress salin a été effectué par addition de 250 mM de NaCl au milieu de culture hydroponique. Le stress hydrique a été réalisé par ajout de 15% de PEG 20 000 à la solution nutritive. Les flèches en noir montrent la localisation de l’activité du gène GUS dans les différents tissus analysés.

## 2. Les facteurs de réponse à l’auxine en réponse aux stress abiotiques

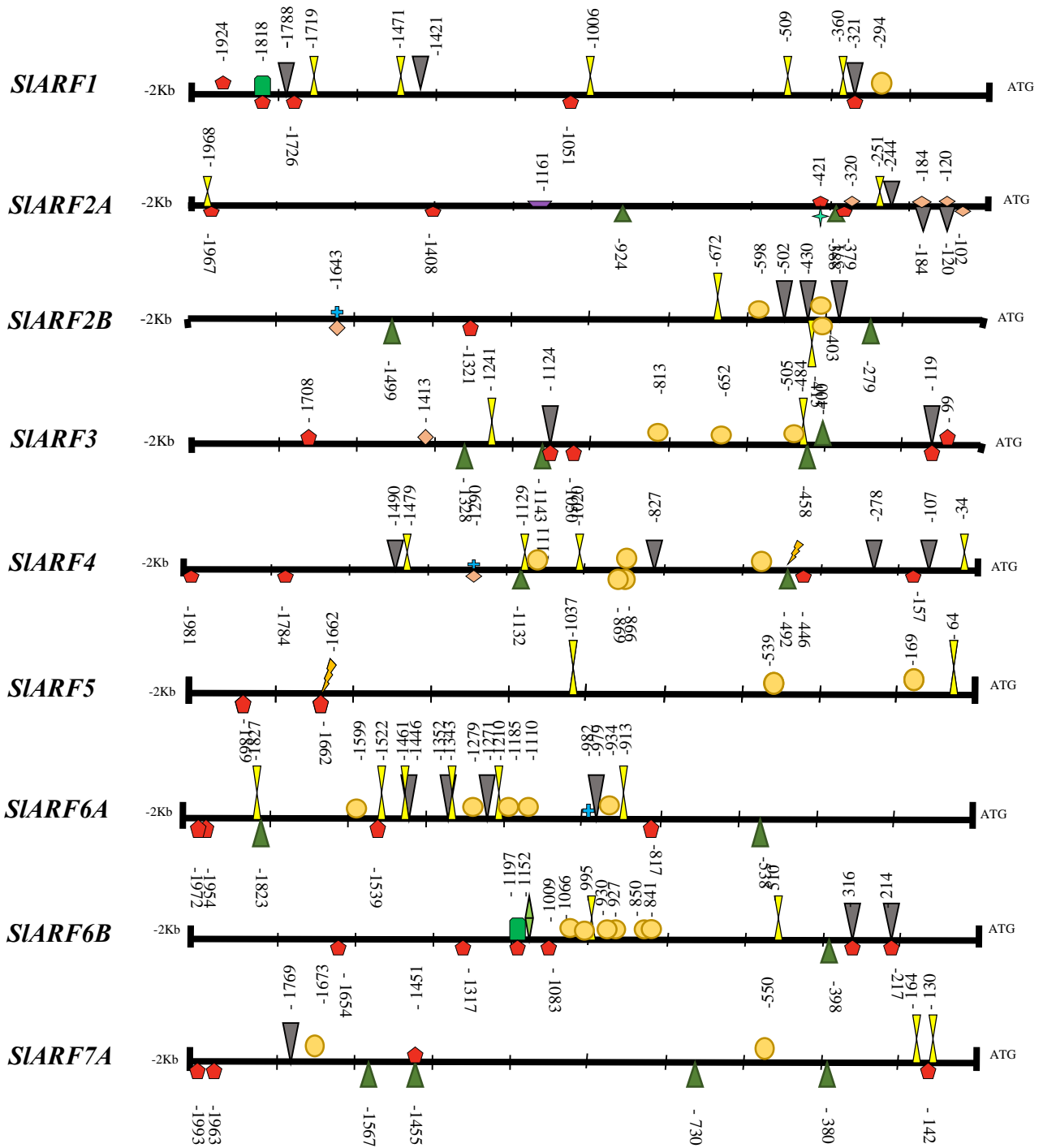
### 2.1. Analyse *in silico* de la région promotrice des ARFs à la recherche de motifs *cis*-régulateurs associés à la réponse aux stress abiotiques

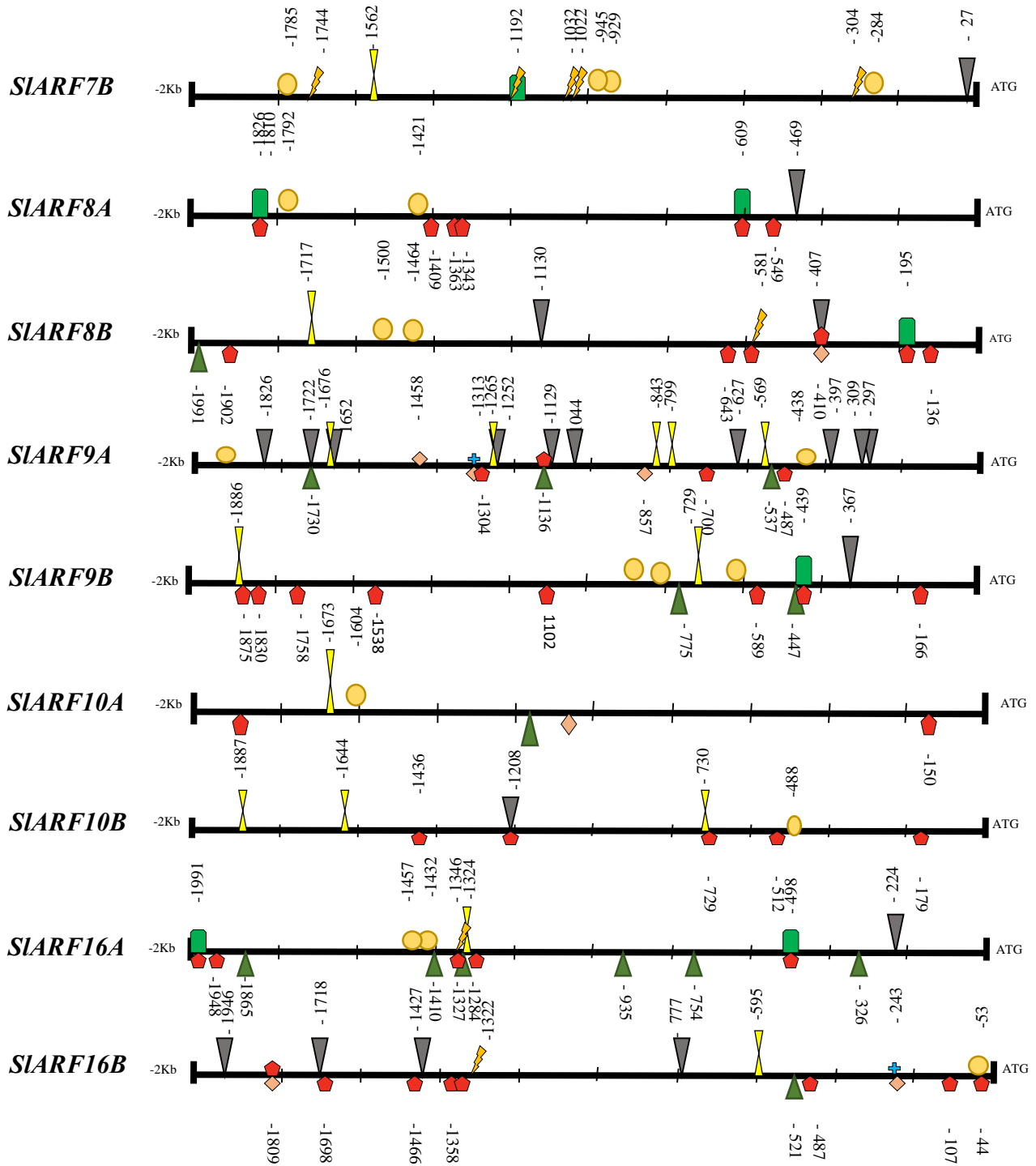
Plusieurs motifs *cis*-régulateurs spécifiques aux stress abiotiques ont été décrits dans la littérature. Parmi eux, on distingue les motifs RAV1AAT et CCAATBOX1 de réponse au stress thermique (Guy, 1999; Sohn *et al.*, 2006), le motif GT1GMSCAM4 impliqué dans la réponse au stress salin (Trivedi *et al.*, 2013), les motifs MYB1AT (Abe *et al.*, 2003), MYB2AT (Abe *et al.*, 2003), MYBCORE (Abe *et al.*, 1997), MYB2CONSENSUSAT, MYCONSENSUSAT (Dang *et al.*, 2011), MYCATERD1 (Abe *et al.*, 2003) et MYCATRD22 (Abe *et al.*, 1997) intervenant dans la réponse au stress hydrique (Figure 14).

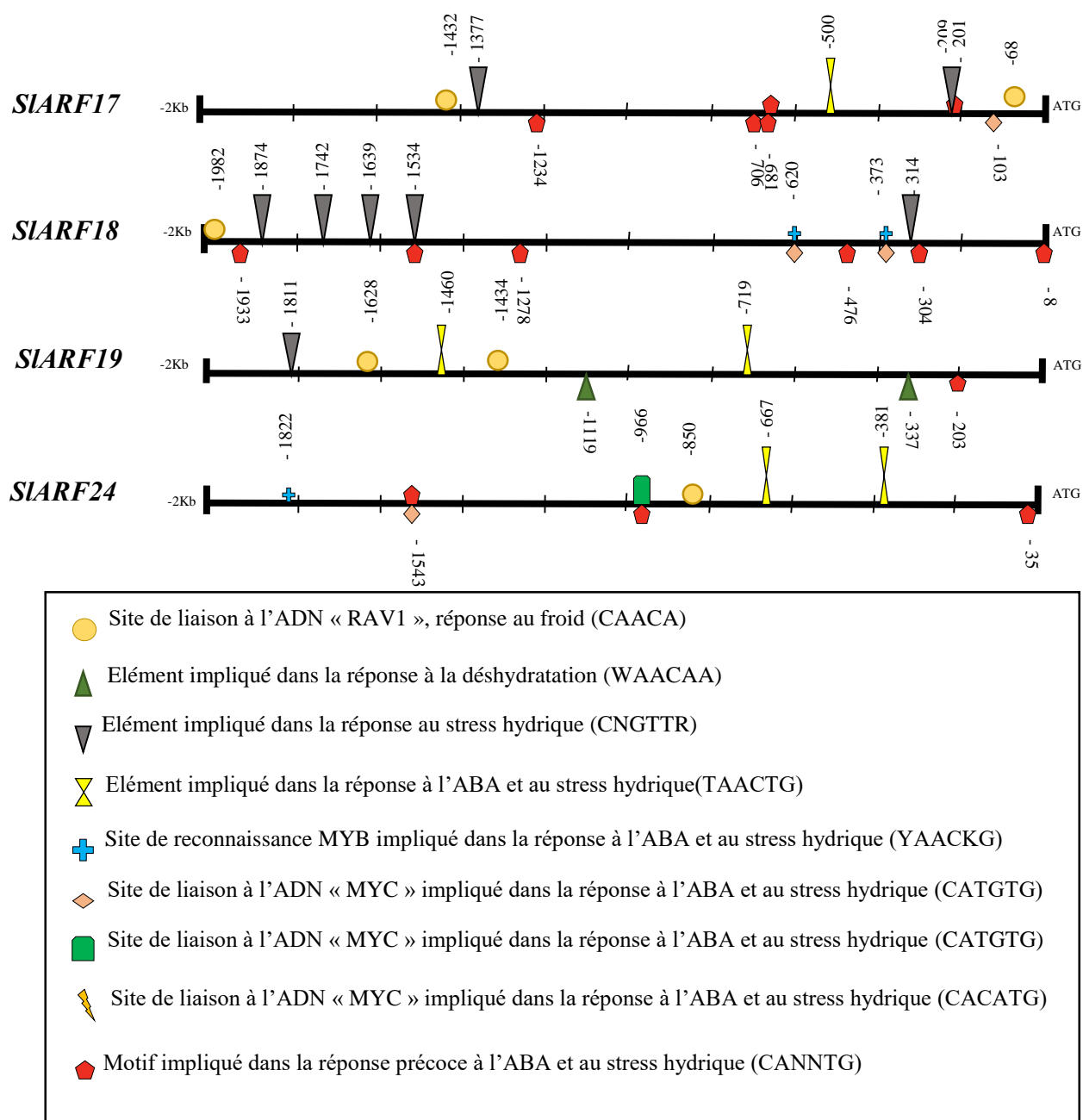
Les éléments *cis*-régulateurs spécifiques au stress thermique (RAV1AAT et CCAATBOX1) sont rencontrés avec une occurrence variable dans la majorité des promoteurs excepté pour les gènes *SLARF8A* et *SLARF16A* pour le motif RAV1AAT et les gènes *SLARF8A* et *SLARF8B* pour le motif CCAATBOX1. Le motif spécifique à la réponse au stress salin est présent dans l’ensemble des *SLARFs* excepté pour le gène *SLARF2B*.

Le screening des motifs impliqués dans la réponse à la déshydratation a montré que la région promotrice des gènes *SLARFs* est enrichie en ces motifs. En effet, le motif MYBCORE est repéré dans la majorité des *SLARFs* à l’exception des gènes *SLARF5*, *SLARF10A* et *SLARF24* alors que le motif MYB1AT est présent uniquement au niveau de la région promotrice de 13 *SLARFs*. Quant au MYB2AT, ce motif n’est détecté qu’au niveau du promoteur de *SLARF6A*, *SLARF9A*, *SLARF16B* et *SLARF24*. Il convient de noter que l’élément MYCONSENSUSAT est présent dans l’ensemble des 22 *SLARFs* à une fréquence qui varie d’un gène à un autre. Le motif de liaison aux facteurs de transcription de type MYC (MYCATERD1) n’est retrouvé qu’au niveau des promoteurs des gènes *SLARF1*, *SLARF6A*, *SLARF7B*, *SLARF8A*, *SLARF8B*, *SLARF9B*, *SLARF16A* et *SLARF24* alors que la présence du motif de liaison aux MYC (MYCATRD22) est spécifique pour *SLARF4*, *SLARF5*, *SLARF7A*, *SLARF7B*, *SLARF16A* et *SLARF16B*.

L’analyse *in silico* de la région promotrice des *SLARFs* a montré que ces régions sont riches en éléments *cis*-régulateurs associés aux stress. Les motifs spécifiques aux stress hydrique et salin ont été retrouvés dans la région promotrice des 22 *ARFs*. La région régulatrice des gènes *SLARF1*, *SLARF4*, *SLARF8A*, *SLARF19* et *SLARF24* étaient enrichies en motif GT1GMSCAM4 spécifique à la réponse à la salinité. Le promoteur de *SLARF3* et *SLARF9A* présente une copie unique de l’élément GT1GMSCAM4. Les motifs MYC (MYCATERD1, MYCATRD22 et MYCONSENSUSAT) ont été retrouvés en plusieurs copies dans la région régulatrice des gènes *SLARF1*, *SLARF4*, *SLARF6A*, *SLARF7A*, *SLARF8A*, *SLARF9A* et *SLARF18* alors que les motifs MYB (MYBCORE, MYB1AT, MYB2AT et MYB2CONSENSUSAT) étaient présents en grand nombre dans les promoteurs des gènes *SLARF2A*, *SLARF2B*, *SLARF4*, *SLARF6B*, *SLARF9A* et *SLARF18*. Tous ces constats suggèrent que les fonctions de ces facteurs de transcription peuvent être associées à la réponse aux stress abiotiques, en particulier aux stress salin et hydrique.







**Figure 14** Représentation schématique de l'ensemble des éléments cis-régulateurs associés à la réponse aux stress abiotiques retrouvés au niveau de la région promotrice des 22 SIARFs rencontrés chez la tomate. Les séquences des motifs correspondant à ces éléments sont décrites au niveau du Tableau 1.

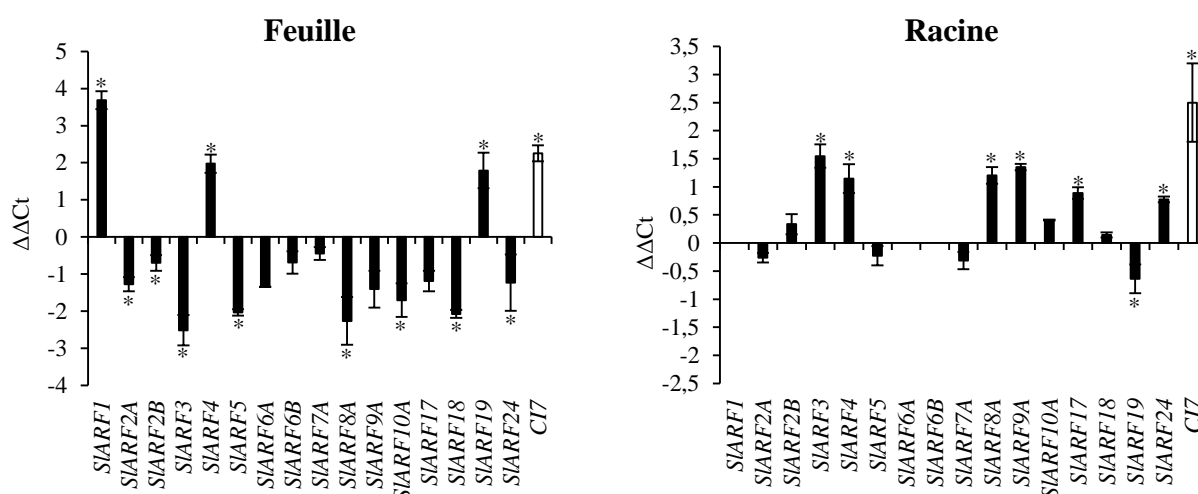
## 2.2. Etude d'expression des ARFs en conditions de stress abiotiques

En vue d'étudier l'implication des ARFs dans la réponse aux stress abiotiques, une étude d'expression par PCR quantitative a été réalisée sur des échantillons de feuilles et de racines de plantes de tomates de type sauvage exposées au stress salin, hydrique et d'hypoxie.



### 2.2.1. Expression des ARFs en réponse au stress salin

L’expression des *SIARFs* en réponse au stress salin a été évaluée au niveau des feuilles et des racines après 24 heures d’application du stress (Figure 15). Au niveau des feuilles, les résultats montrent que l’expression de la majorité des gènes est réprimée à l’exception de *SIARF1*, *SIARF4* et *SIARF19* dont l’expression est significativement induite. Les gènes *SIARF3*, *SIARF5*, *SIARF8A* et *SIARF18* sont fortement réprimés. Au niveau racinaire, l’analyse de l’expression des différents *ARFs* a montré que seuls 9 *SIARFs* sont surexprimés dans cette condition de stress salin. Parmi ces gènes, *SIARF3*, *SIARF4*, *SIARF8A* et *SIARF9A* ont montré une forte induction. Une très forte répression a été, cependant, observée pour le gène *SIARF19* alors que les gènes *SIARF2A*, *SIARF5* et *SIARF7A* sont légèrement réprimés. Comme prévu, l’expression du gène *CI7*, marqueur du stress salin (Kirch et al., 1997), a été significativement induite à la fois dans les feuilles et les racines, validant ainsi l’efficacité du stress appliqué.

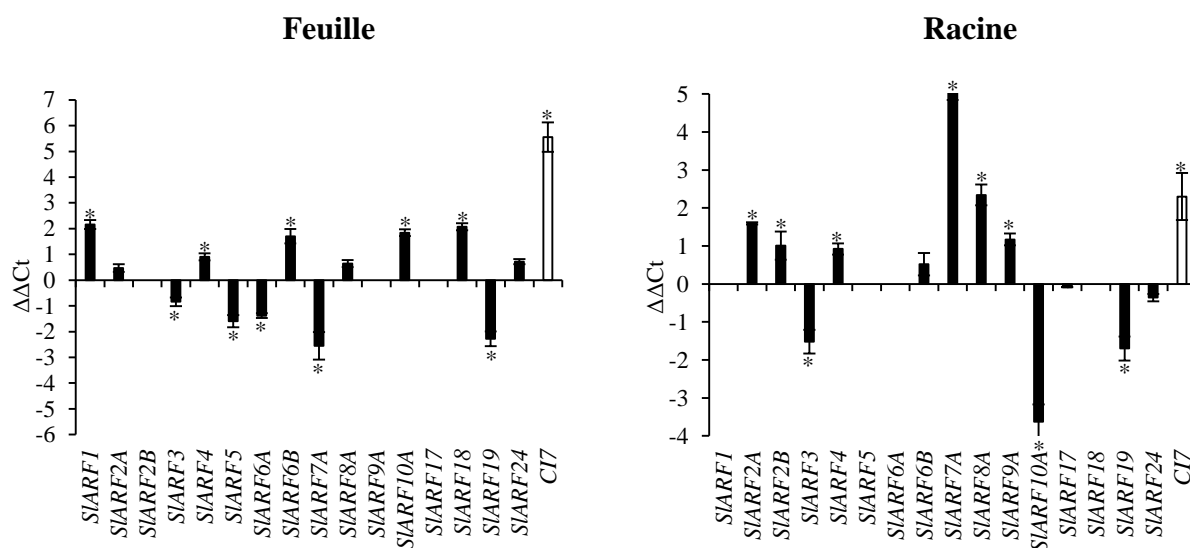


**Figure 15** Expression des *SIARFs* dans les feuilles et les racines exposées au stress salin. Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta C_t \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ).

### 2.2.2. Expression des ARFs en réponse au déficit hydrique

Après 5 jours d’application du stress hydrique, l’expression des *SIARFs* a été évaluée par PCR quantitative au niveau aérien et racinaire (Figure 16). Au niveau des feuilles, l’expression de *SIARF1*, *SIARF4*, *SIARF6B*, *SIARF10A* et *SIARF18* est significativement induite tandis que les gènes *SIARF3*, *SIARF5*, *SIARF6A*, *SIARF7A* et *SIARF19* sont significativement réprimés.

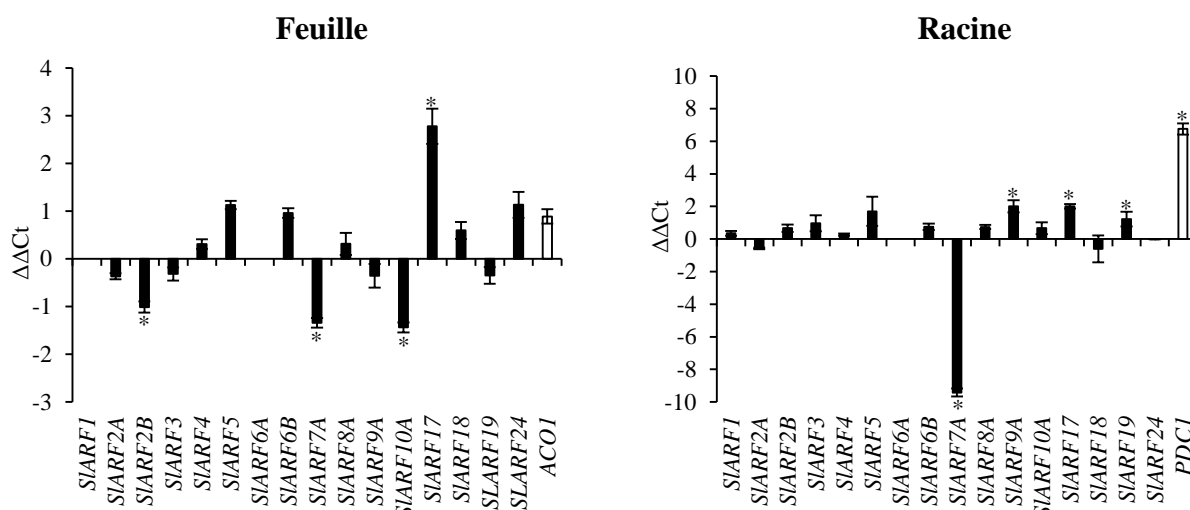
L’expression de certains *SIARFs* est significativement modifiée dans les racines exposées au stress hydrique. Les résultats montrent une induction significative de l’expression des gènes *SIARF2A*, *SIARF2B*, *SIARF4*, *SIARF7A*, *SIARF8A* et *SIARF9A*, en particulier l’*ARF7A* dont l’expression affiche une induction spectaculaire (32 fois plus exprimé). A l’opposé, les gènes *SIARF3*, *SIARF10A* et *SIARF19* sont significativement réprimés. L’expression du marqueur de stress hydrique *CI7* (Kirch et al., 1997) est significativement induit à la fois dans les feuilles et les racines, comme prévu, validant ainsi l’efficacité du stress appliqué.



**Figure 16** Expression des *SIARFs* dans les feuilles et les racines exposées au déficit hydrique. Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ )

### 2.2.3. Expression des *ARFs* en réponse au stress d’anoxie

L’évaluation de l’expression des *ARFs* a montré que les gènes *SIARF2B*, *SIARF7A* et *SIARF9A* sont significativement réprimés alors que *SIARF5*, *SIARF6B*, *SIARF17* et *SIARF24* sont surexprimés dans la partie aérienne de la plante. Les changements les plus marqués concernent les gènes *SIARF7A* et *SIARF17* dont l’expression est trois fois plus réprimée ou dix fois plus induite respectivement par rapport aux conditions normales. Dans les racines, seule l’expression du gène *SIARF7A* est significativement modifiée (512 fois plus réprimé) (Figure 17). L’expression des gènes marqueurs *ACO1* et *PDC* est significativement induite respectivement dans les feuilles et les racines comme indiqué par Nie et al., (2002) et Gharbi et al., (2007).



**Figure 17** Expression des SIARFs dans les feuilles et les racines exposées au stress d’anoxie. Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ).

L’analyse d’expression des *SIARFs* en conditions de stress a montré que l’expression de la plupart de ces gènes était modifiée par ces stress et que certains d’entre eux étaient régulés d’une manière significative. Parmi les gènes régulés, *SIARF1*, *SIARF4*, *SIARF8A*, *SIARF19* et *SIARF24* sont significativement surexprimés en réponse au stress salin tandis que *SIARF1*, *SIARF2A*, *SIARF2B*, *SIARF4*, *SIARF6A*, *SIARF6B*, *SIARF7A*, *SIARF8A*, *SIARF9A* et *SIARF18* ont été substantiellement induits en cas de déficit hydrique. L’implication des *ARFs* dans la réponse aux stress abiotiques a été soulignée par de nombreux travaux menés chez plusieurs espèces végétales. Chez le riz (*Oryza sativa*), plusieurs *OsARFs* sont impliqués dans la réponse aux stress salin et hydrique. Jain and Khurana, (2009) ont rapporté que les gènes *OsARF11* et *OsARF15* présentent une expression différentielle en réponse au stress salin et suggèrent une potentielle implication de ces deux gènes dans la réponse du riz à ce stress. Toujours chez le Riz, Zhou et ses collaborateurs ont montré, quant à eux, l’implication de neuf *OsARFs* dans la réponse au déficit hydrique (*OsARF2*, *OsARF4*, *OsARF10*, *OsARF14*, *OsARF16*, *OsARF18*, *OsARF19*, *OsARF22* et *OsARF23*) (Zhou et al., 2007). Chez le Sorgho (*Sorghum bicolor*), Wang *et al.*, (2010) ont démontré que l’expression des gènes *SbARF10*, *SbARF16* et *SbARF21* est significativement induite dans les tissus foliaires et racinaires des plantes exposées au stress hydrique. Parmi les 50 ARF isolés et identifiés chez le soja (*Glycine max*), seuls *GmARF33* et *GmARF50* étaient induits par le déficit hydrique et ont été suggérés comme gènes candidats pour l’étude de la réponse de cette plante au stress hydrique (Van Ha et al., 2013).

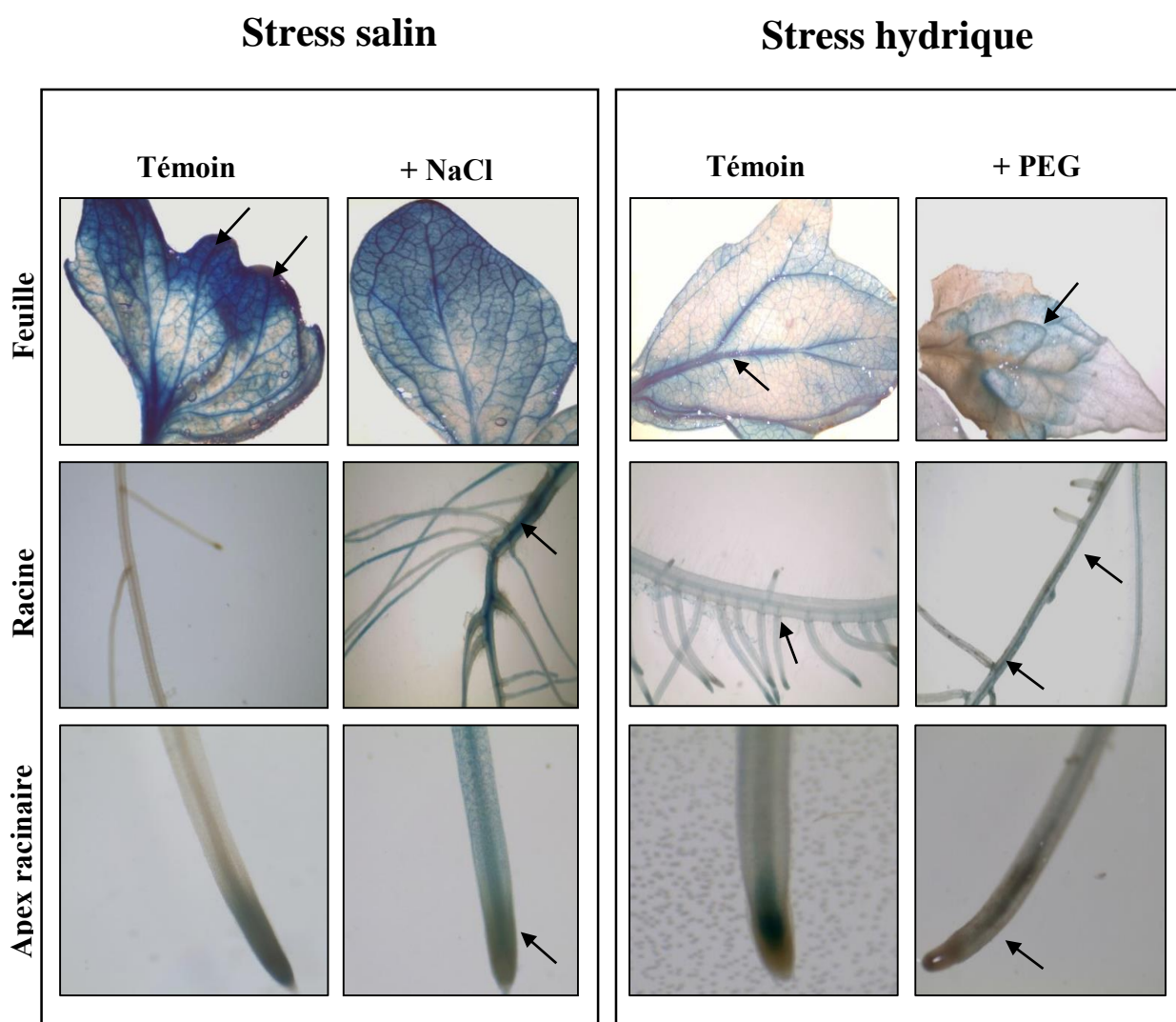
L'expression de certains *SIARFs* a montré sous le même traitement un profil différent dans les feuilles et dans les racines. Cette différence pourrait être associée à la fonction de ces *SIARFs*. En effet, la fonction de certains *ARFs* est plus liée à la partie souterraine qu'à la partie aérienne. C'est le cas de *SIARF7A* dont l'expression a été significativement réprimée et/ou induite respectivement dans les feuilles et des racines en réponse au déficit hydrique. Ce gène semble agir dans la partie souterraine de la plante. Cette hypothèse est confirmée par Okushima *et al.*, (2007) et Goh *et al.*, (2012) qui ont montré que l'*ARF7* est impliquée dans le contrôle de la formation des racines latérales chez *Arabidopsis thaliana*.

Des études fonctionnelles ont montré que les *ARFs* sont impliqués dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes. Okushima *et al.*, (2007) ont rapporté que le gène *AtARF7* agit en synergie avec le gène *AtARF19* dans le contrôle de la formation des racines latérales et dans le gravitropisme de l'hypocotyle. Chez la tomate, le gène *SIARF2* a été proposé comme un des régulateurs clés de la formation du crochet apical alors que chez *Arabidopsis thaliana*, il est identifié comme régulateur positif de la sénescence et de l'abscission des fleurs et comme un répresseur de la croissance cellulaire en présence ou en absence de lumière ainsi que dans la croissance de l'hypocotyle (Chaabouni *et al.*, 2009; Okushima *et al.*, 2005). Compte tenu de l'importance de ces gènes dans le développement des plantes, la modification de l'expression de ces *SIARFs* en conditions de stress pourrait jouer un rôle important dans la réponse aux stress et ceci en modulant la croissance de la plante afin de permettre un meilleur développement de celle-ci.

### **2.3. Analyse spatio-temporelle de l'expression des gènes *SIARF8A* et *SIARF10A* en conditions de stress salin et hydrique**

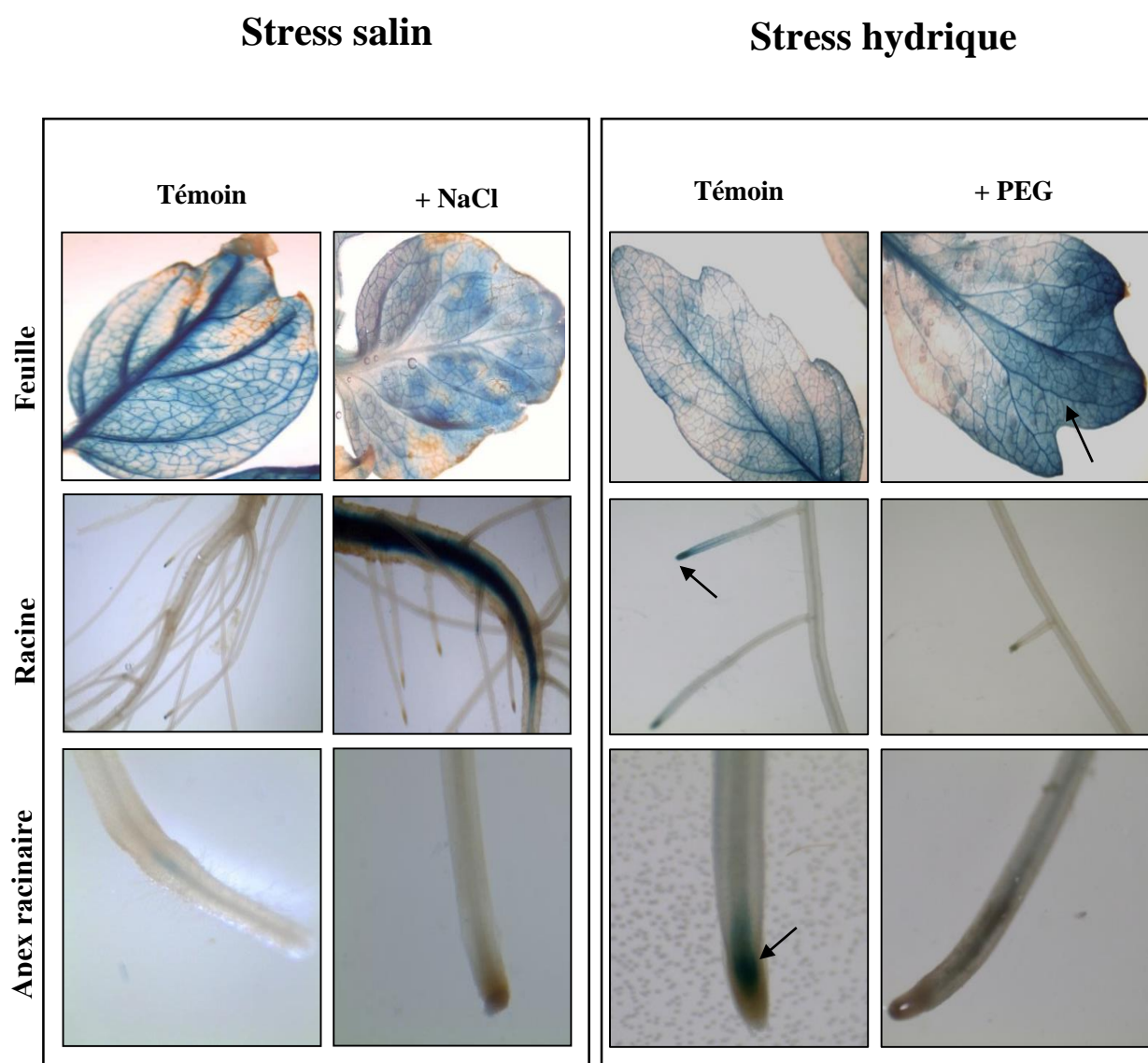
Etant donné que l'expression des gènes *SIARF8A* et *SIARF10A* est nettement modifiée par le stress salin et hydrique, nous avons cherché à examiner l'expression de ces gènes *in planta*. Pour cela, des plantes de tomate transformées par la construction pARF8A::GUS et pARF10A::GUS (promoteur du gène *SIARF8A* ou *SIARF10A* fusionné au gène rapporteur GUS) ont été générées et l'analyse de l'activité du gène GUS a été évaluée en réponse aux stress salin et hydrique. Les résultats ont montré une activité intense (forte coloration bleu) du gène GUS dirigé par le promoteur du gène *SIARF8A* au niveau des feuilles, de la racine principale et des racines latérales des plantes exposées au stress salin (Photo 7). En revanche, chez les plantes témoins, l'activité du gène GUS n'apparaît que dans la partie apicale des feuilles et au niveau des nervures. En réponse au stress hydrique, l'activité du gène GUS est détectée au niveau de la racine principale et la partie médiane du pétiole tandis que

les plantes témoins présentent une coloration bleue uniforme au niveau des nervures des feuilles et des primordiums de la racine primaire et des racines latérales.



**Photo 7** Expression tissulaire du gène GUS dirigé par le promoteur du gène SIARF8A observée chez des plantes de 3 semaines en présence de stress salin ou hydrique. Le stress salin a été effectué par addition de 250 mM de NaCl au milieu de culture hydroponique. Le stress hydrique a été réalisé par ajout de 15% de PEG 20 000 à la solution nutritive. Les flèches en noir montrent la localisation de l’activité du gène GUS dans les différents tissus analysés.

L’activité du gène GUS dans les plantes exprimant la construction PARF10A ::GUS est intense au niveau du tissu conducteur racinaire après 24 heures d’application du stress salin tandis qu’au niveau des feuilles, son expression reste similaire à celle observée chez le témoin qui, présente une coloration bleue uniforme sur l’ensemble du pétiole (Photo 8). L’exposition des plantes au stress hydrique pendant 5 jours résulte en une apparition d’une coloration bleue au niveau de la partie apicale des pétioles alors que les plantes témoins présentent une coloration bleue dans le pétiole et les primordiums de la racine principale et des racines latérales.



**Photo 8** Expression tissulaire du gène GUS dirigé par le promoteur du gène *SIARF10A* observée chez des plantes de 3 semaines en présence de stress salin ou hydrique. Le stress salin a été effectué par addition de 250 mM de NaCl au milieu de culture hydroponique. Le stress hydrique a été réalisé par ajout de 15% de PEG 20 000 à la solution nutritive. Les flèches en noir montrent la localisation de l’activité du gène GUS dans les différents tissus analysés.

L’étude d’expression des *ARFs* a révélé que l’expression de *SIARF8A* et *SIARF10A* est nettement régulée par l’application du stress salin et hydrique. De plus, la région promotrice de ces gènes contiennent plusieurs copies d’éléments induits par le sel et/ou la sécheresse. L’étude de leur expression *in planta* a révélé que leur expression est clairement modifiée en présence de stress salin et hydrique. En effet, d’après nos résultats, le promoteur de *SIARF8A* semble s’exprimer d’une manière spécifique au niveau des racines latérales des plantes stressées. Des études antérieures ont confirmé l’implication de l’*ARF8* dans la réponse au stress

abiotique. Chez *Arabidopsis thaliana*, Tian et al., (2004) ont trouvé que le gène *AtARF8* s’exprime de manière stable dans les racines latérales en réponse à la lumière.

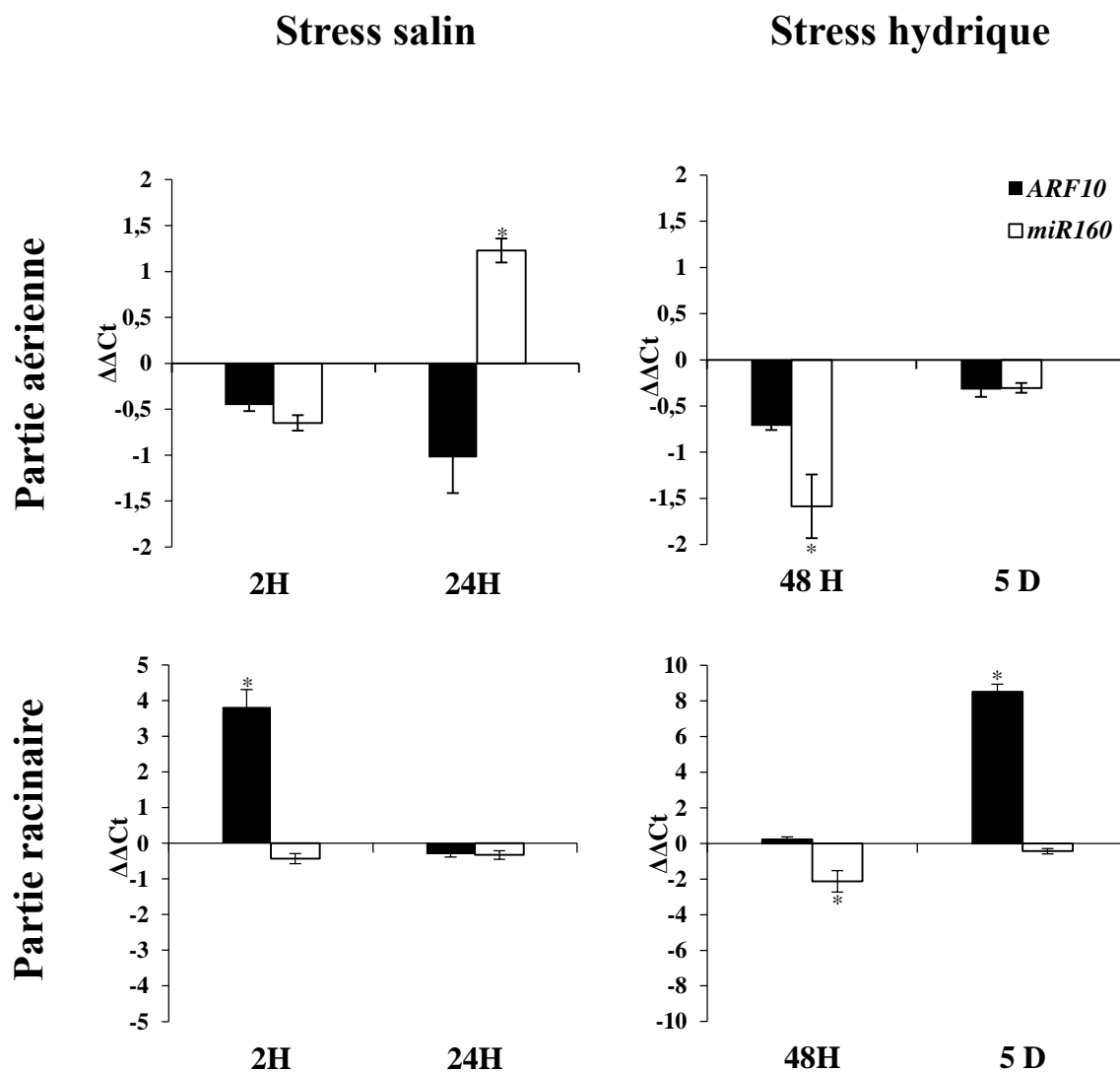
L’analyse *in planta* de l’expression du gène *SIARF10A* en conditions de stress salin et hydrique moyennant des lignées transgéniques exprimant la construction promoteur *SIARF10A*- gène rapporteur GUS a montré que ce gène s’exprime plus particulièrement au niveau de la racine principale et des racines latérales des plantes stressées. Chez *Arabidopsis thaliana*, Wang et ses collaborateurs qui ont démontré que l’*ARF10A* est impliqué dans la genèse et l’architecture racinaire en limitant la division cellulaire d’une part et d’autre part en favorisant la différenciation cellulaire au niveau de la région distale (Wang et al., 2005). Ainsi, l’activation du promoteur du gène *SIARF10A* dans les racines en réponse aux stress salin et hydrique laisse supposer que ce gène pourrait être impliqué dans le contrôle du développement du système racinaire en conditions de stress et ceci en inhibant la division anarchique des cellules de la racine.

#### **2.4. Etude d’expression des précurseurs des miRNAs et des gènes cibles en conditions de stress**

Les microARN sont des ARN non codants de 21 à 25 nucléotides qui contrôlent l’expression génique au niveau post-transcriptionnel (Bartel, 2004; Sunkar and Zhu, 2004). Ces microARNs régulent l’expression génique en s’appariant avec des ARNm cibles dont ils sont partiellement complémentaires. Cette hybridation réprime la traduction de la protéine correspondante ou clive l’ARNm cible au milieu du site de fixation du microARNs (Chen, 2005 ; Reinhart et al., 2002). La famille des facteurs de transcription ARFs est soumise à ce type de régulation. Ainsi, *SIARF6* et *SIARF8* sont régulés par le *miRNA167* alors que les gènes *SIARF10*, *SIARF16* et *SIARF17* sont spécifiquement régulés par *miRNA160* (Reinhardt et al., 2000).

L’expression du précurseur du *miR160* et du gène *SIARF10A* a été évaluée dans les feuilles et les racines de plantes exposées au stress salin ou hydrique par PCR quantitative (Figure 18). Les résultats montrent que l’expression de ces gènes change d’une manière significative en réponse au stress salin. Au niveau des feuilles, l’expression du précurseur du *miR160* est deux fois plus induite après 24 heures d’application du stress alors que le gène *ARF10A* est réprimé d’une manière concomitante. Au niveau des racines, *SIARF10A* est fortement surexprimé après 2 heures d’application du stress salin tandis que le taux du *miR160* reste inchangée.

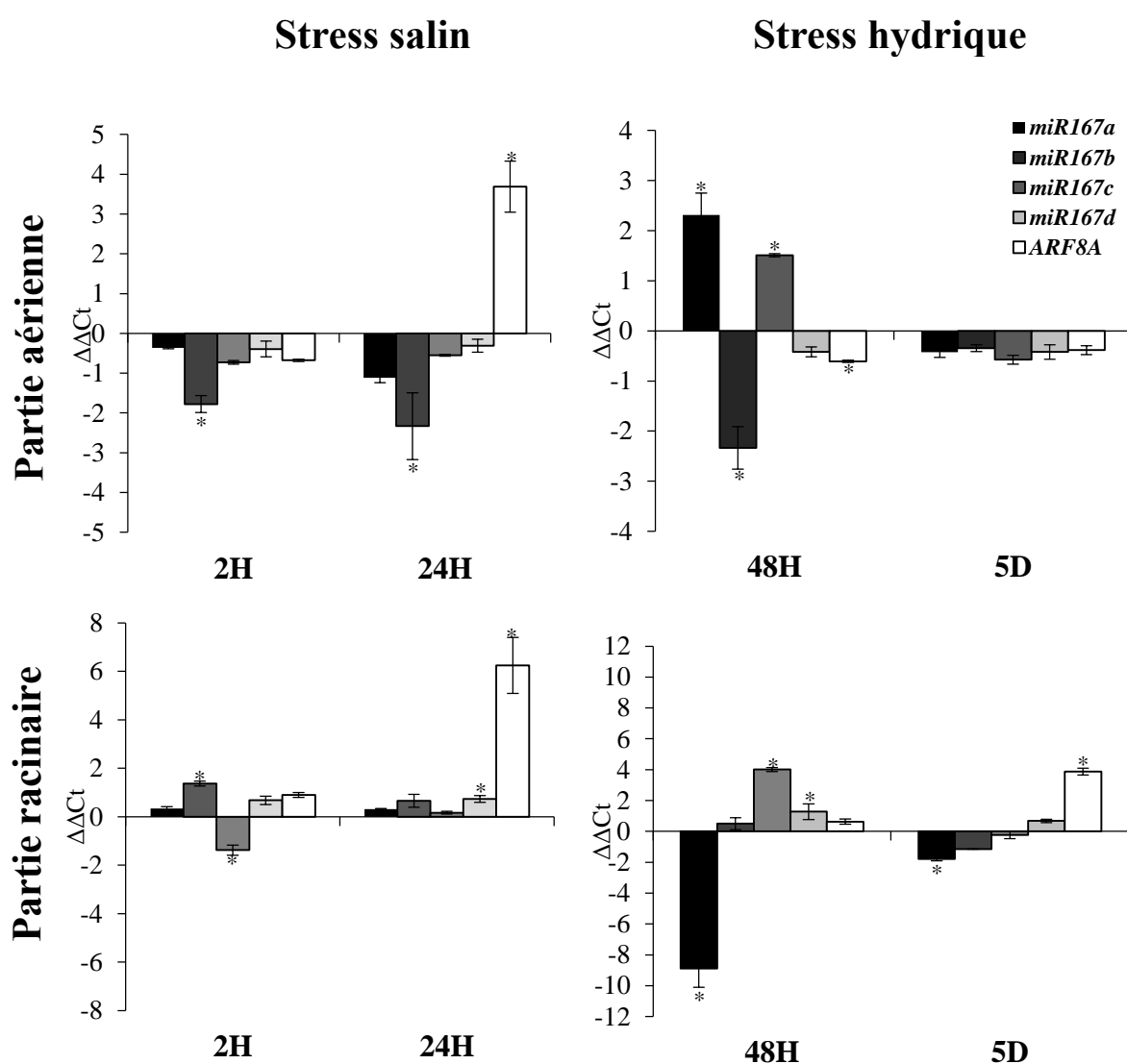
L’expression du précurseur du *miR160* présente une répression significative au niveau des feuilles après 48 heures d’application du stress hydrique. Au niveau des racines, l’expression du gène *SIARF10A* est induite d’une manière significative après 5 jours d’exposition au stress hydrique alors que le taux *miR160* demeure similaire à celle observée chez le témoin.



**Figure 18** L’expression du précurseur du *miR160* et de *SIARF10A* en conditions de stress salin et hydrique. Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ).



L’expression des précurseurs du *miR167* (*miR167a*, *miR167b*, *miR167c* et *miR167d*) a été évaluée par PCR quantitative en conditions de stress salin et hydrique (Figure 19). Les résultats montrent une nette modification dans leur expression dans ces conditions. En effet, au niveau aérien, l’expression du gène *SIARF8A* est induite d’une façon importante (16 fois plus) après 24 heures d’application du stress salin tandis que l’expression des gènes *miR167a* et *miR167b* est réprimée de la même manière. Dans les racines, une nette induction dans l’expression du gène *SIARF8A* a été observée après 24 heures d’application du stress salin bien que l’expression des précurseurs du *miR167* demeure similaire à celle observée chez les plantes non stressées.



**Figure 19** L’expression des précurseurs du *miR167* (*miR167a*, *miR167b*, *miR167c* et *miR167d*) et de *SIARF8A* en conditions de stress salin et hydrique. Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ).

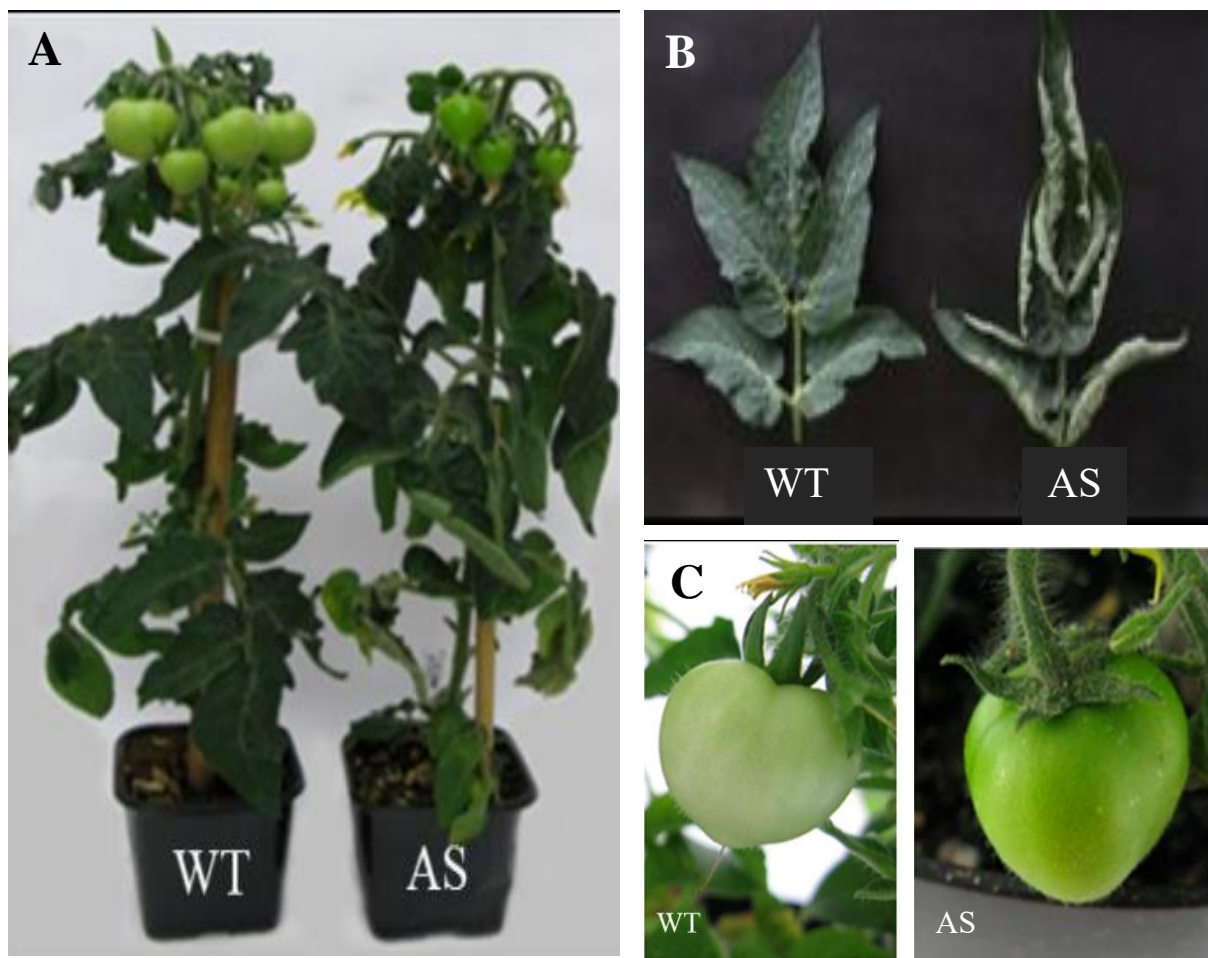
En réponse au stress hydrique, l’expression du gène *SIARF8A* est moins affectée par l’application du stress au niveau de la partie aérienne des plantes alors que les gènes *miR167a* et *miR167c* sont significativement induits et le gène *miR167b* nettement réprimé. Dans les racines, l’expression des précurseurs du miR167 ; *miR167a* et *miR167c* est significativement réprimée et induite respectivement. Par contre, l’expression du *SIARF8A* ne présente aucune modification significative. L’expression du gène *SIARF8A* est régulée positivement après 5 jours d’exposition au stress hydrique. En revanche, l’expression du précurseur *miR167a* est réprimée (Figure 19).

La régulation post-transcriptionnelle semble être impliquée dans la réponse des plantes aux stress abiotiques tels que la salinité, le froid et le déficit hydrique (Zhao and Srivastava, 2007). Des études antérieures ont montré que certains miRNA tels que miR160 et miR167, intervenant dans la régulation de la transcription des certains *ARFs*, présentent une altération au niveau de leur expression en réponse aux stress salin et hydrique. Par ailleurs, nos résultats ont révélé que la sous-expression des précurseurs était négativement corrélée avec l’accumulation de transcrits *SIARF8A* au niveau des feuilles après 24 heures d’application du stress salin. Ce constat fut notamment observé dans les racines des plantes sujettes au stress hydrique (5 jours du stress). Étant donné que le gène *ARF8A* est impliqué dans le développement des organes végétatifs et floraux chez les Dicotylédones (Tian et al., 2004), il semblerait que la sous-expression des précurseurs du *miR167* pourrait modifier la réponse auxinique et par conséquent stimuler le développement de l’appareil végétatif et reproducteur des plantes. Chez le manioc (*Manihot esculenta*), Xia et ses collaborateurs ont démontré que l’expression du *miR167* est nettement induite en réponse aux températures extrêmes, ce qui pourrait induire le clivage des transcrits de son gène cible ; *ARF8*, en raison de la présence des sites de clivage (Xia et al., 2014). Pour le miR160, l’expression de son précurseur a été négativement corrélée avec l’expression de son gène cible *SIARF10A* dans les racines des plantes exposées au stress hydrique. Ce résultat suggère une potentielle implication du miR160 dans la régulation post-transcriptionnelle de l’expression de l’*ARF10A* en conditions de stress.

Les résultats présentés dans ce chapitre fournissent plusieurs indices sur l’implication de l’auxine ; à travers les *ARFs* dans la réponse aux stress abiotiques chez la tomate. En effet, l’analyse *in silico* de la région promotrice des 22 *ARFs* rencontrés chez la tomate a montré la richesse de celle-ci en éléments *cis*-régulateurs associés à la réponse aux stress abiotiques (salin, hydrique et thermique). L’analyse d’expression des *SIARFs* a montré que de nombreux membres de cette famille de facteurs de transcription sont régulés par le stress

salin et hydrique, ce qui laisse suggérer que cette famille de facteurs de transcription pourrait être impliquée dans la réponse à ces stress. Grâce à cette analyse, plusieurs gènes candidats ont pu être identifiés pour le stress hydrique et salin. Parmi eux, le gène *SIARF4* est régulé d’une manière significative à la fois dans la partie aérienne et souterraine des plantes exposées à ces stress. De plus, ce gène intervient dans la régulation de la teneur en chlorophylle et en sucres au niveau des fruits et donc dans le développement du fruit de la tomate et dans l’amélioration de la qualité organoleptique de ce dernier (Jones *et al.*, 2002; Sagar *et al.*, 2013). Il intervient également dans l’initiation des racines latérales chez *Arabidopsis thaliana* (Marin *et al.*, 2010).

Une analyse phénotypique des mutants *SIARF4* a été réalisée et a montré la présence de certains caractères phénotypiques et physiologiques qui en font de bons candidats pour l’étude et l’amélioration de la tolérance aux stress hydrique et salin chez la tomate. Il s’agit en particulier des mutants affectés dans l’expression du gène *ARF4*. En effet, les mutants de sous-expression de ce gène *ARF4-as* se caractérisent par un enroulement prononcé des feuilles (Photo 9-A, B) autour de leur axe longitudinal en comparaison avec les feuilles du WT développées dans les mêmes conditions et par un phénotype dit « Dark Green » au niveau des fruits (coloration vert foncé) due à une teneur élevée en chlorophylle. Ce phénotype est observé à partir du stade 10 jours après anthèse et cette différence de couleur entre les fruits *ARF4-as* et ceux du WT (Photo 9-C) persiste jusqu’au stade Breaker (Sagar *et al.*, 2013). Ce caractère est souvent rencontré chez les génotypes qui tolèrent les stress environnementaux. En effet, chez le riz, des études récentes ont montré que les plantes qui présentent une grande teneur en chlorophylle a et b résistent plus aux stress abiotiques (Zhen-hua *et al.*, 2012). Le maintien d’une teneur élevée en chlorophylle chez ces plantes est principalement dû à la présence de certaines molécules anti-oxydantes assurant la protection des photosystèmes I et II contre l’action des espèces réactives d’oxygène produits au moment de stress et permet par conséquent un bon maintien de la fonction de la photosynthèse (Noctor *et al.*, 2002). Ainsi, le prochain chapitre s’intéressera à l’étude de l’implication de l’*ARF4* dans la réponse et/ou la tolérance au stress salin et hydrique chez la tomate.



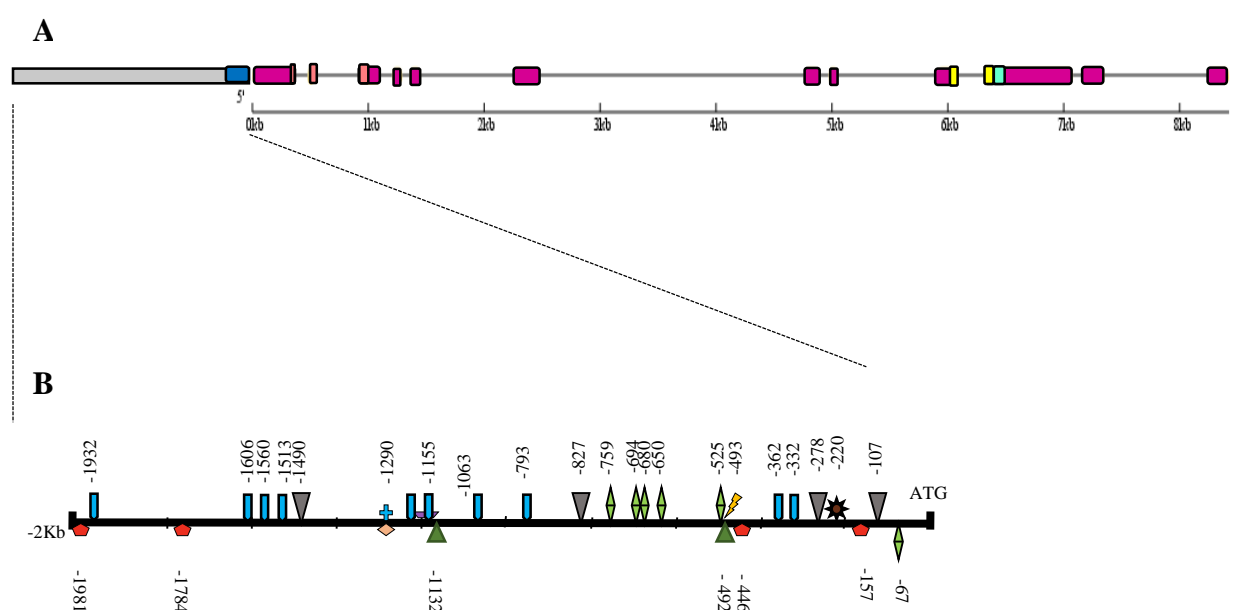
**Photo 9** Phénotype des mutants *ARF4-as*. (A) plantes âgées de 6 semaines de type sauvage (WT) et de type *ARF4-as* (AS). (B) aspect des feuilles chez les plantes de type sauvage et les mutants *ARF4-as* (enroulées), (C) fruits issus de plantes de type sauvage et du mutant *ARF4-as* (présentant le phénotype « Dark green » avec une augmentation du taux de la chlorophylle au niveau du fruit) (Sagar et al., 2013).

## Chapitre V

# Le Facteur de Réponse à l'Auxine *ARF4* et l'acquisition de la tolérance aux stress salin et hydrique chez la tomate

## 1. Caractérisation du gène *ARF4*

Le gène *SIARF4* (anciennement nommé *DR12*) est le premier gène isolé et caractérisé de la famille des *ARFs* chez la tomate. Il présente 57% de similitude à son analogue retrouvé chez *Arabidopsis thaliana* (Jones *et al.*, 2002). Présent au niveau du chromosome 11, son analyse montre qu'il est composé de 12 exons et de 11 introns (Figure 20-A). Sa séquence codante fait 2436 pb de longueur (Sagar *et al.*, 2013) et est traduite en une protéine de 811 acides animés présentant les trois domaines caractéristiques de la famille des *ARFs* ; le domaine de liaison à l'ADN (boite saumon), le domaine III (boite jaune) et IV (boite verte) responsables de l'hétéro-dimérisation entre les *ARFs* et les protéines Aux/AIA (Annexe 2).



**Figure 20** Structure génomique du gène *SI-ARF4* (A). La barre grise représente la région promotrice, les boîtes violettes sont les exons, la boîte bleue est la région non traduite (UTR), la boîte saumon représente le domaine DBD, la boîte jaune est le domaine III et la boîte verte représente le domaine IV. Les éléments putatifs agissant en cis trouvés dans la région promotrice et leurs positions sont indiqués en détail en (B).

L'analyse *in silico* par le logiciel PLACE/ signal search tool (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) de 2kb de la séquence promotrice du *SI-ARF4* a permis d'identifier plusieurs éléments *cis*-régulateurs associés à la réponse aux stress salin et hydrique et aux phytohormones (Figure 20-B).

La région promotrice du gène *SIARF4* est également enrichie en motifs impliqués dans la réponse à la déshydratation. Le motif MYBCORE est présent en trois copies alors qu'une seule copie des motifs MYB2AT, MYB2CONSENSUSAT et MYCATRD22 est repérée. L'élément MYCONSENSUSAT est présent en quatre copies. Il convient de noter que le motif

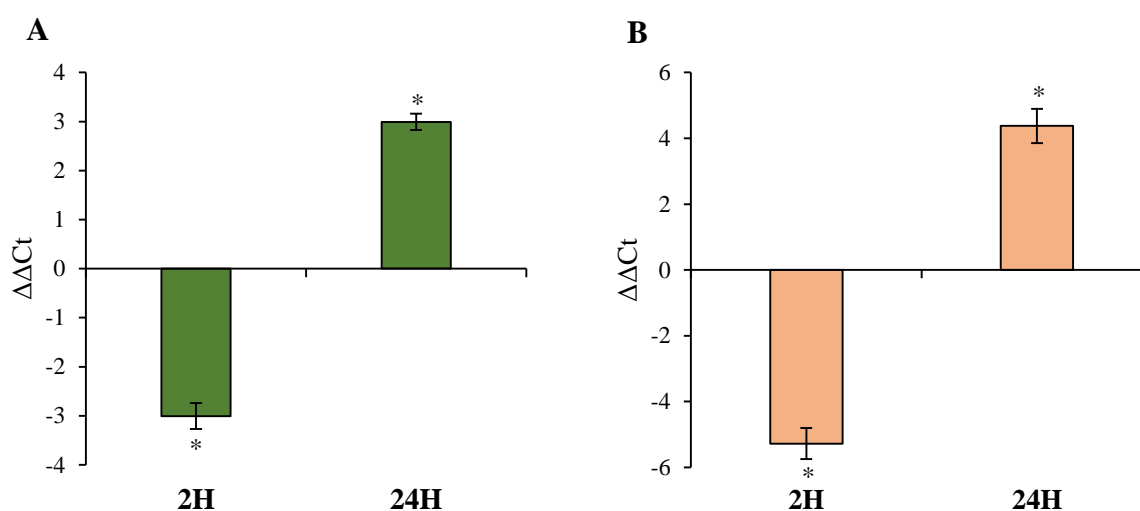
GT1GMSCAM4 spécifique à la réponse aux pathogènes et au stress salin est présent en grand nombre (5 copies) dans la séquence analysée.

L'analyse de la région promotrice a révélé la présence de motifs de réponse à certaines phytohormones, en l'occurrence, l'auxine, l'ABA et l'acide salicylique. En effet, une boîte canonique de réponse à l'auxine (TGTCTC) est retrouvée à la position -220, un autre élément de réponse à l'auxine et à l'acide salicylique en position -1155. En outre, les motifs de réponse à l'ABA (TAACTG, YAACKG, CACATG, CANNTG) sont également présents dans la région promotrice de l'*ARF4* à des fréquences qui varient d'un motif à un autre.

## 2. Expression de l'*ARF4* en réponse au stress salin et hydrique

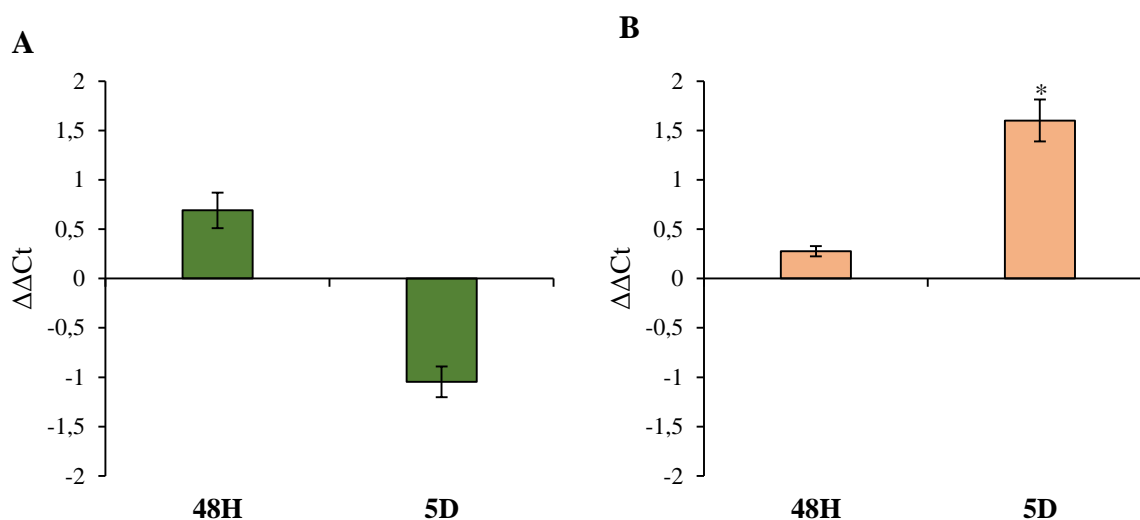
L'expression du gène *SIARF4* a été évaluée par PCR en temps réel (qPCR) au niveau de la partie aérienne et racinaire des plantes exposées au stress salin et hydrique. L'analyse d'expression a été réalisée après 2 heures et 24 heures d'exposition au stress salin et après 48 heures et 5 jours d'exposition au stress hydrique.

En réponse au stress salin, l'expression du gène *SIARF4* est réprimée d'une manière significative à la fois au niveau aérien et racinaire après 2 heures du stress alors qu'une forte induction est détectée après 24 heures d'application du stress salin dans les deux tissus analysés (Figure 21).



**Figure 21** Expression du *SIARF4* révélée par PCR quantitative au niveau : (A) des feuilles et (B) des racines après 2 heures et 24 heures d'application du stress salin. Le stress salin a été réalisé par arrosage des plantes avec une solution de NaCl à 250 mM. Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ).

En réponse au stress hydrique, le gène *SIARF4* présente une légère surexpression à la fois au niveau de la partie aérienne et racinaire des plantes exposées au stress pendant 48 heures. Le prolongement du stress jusqu'à 5 jours induit la sous-expression de *SIARF4* dans les racines alors qu'au niveau des feuilles, *SIARF4* est surexprimé d'une manière significative (Figure 22).

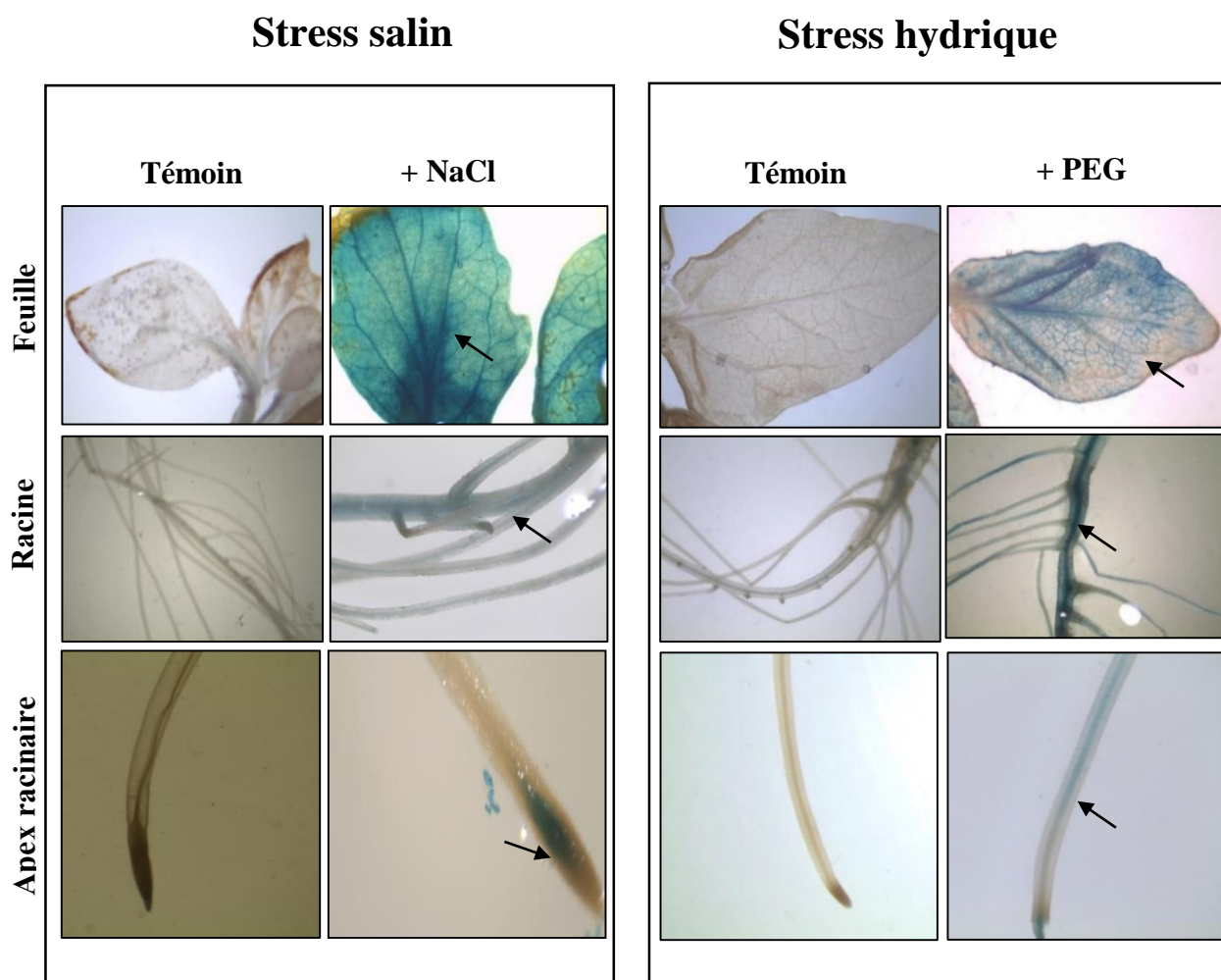


**Figure 22** Expression du *SIARF4* révélée par PCR quantitative au niveau : (A) des feuilles et (B) des racines après 48 heures et 5 jours d'application du stress salin. Le stress hydrique a été réalisé par arrêt d'arrosage des plantes. Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ).

L'étude de l'expression du *SIARF4* au niveau de la partie aérienne et racinaire en conditions de stress salin et hydrique a été également réalisée in planta par le biais de plantes transgéniques exprimant la construction ; promoteur du gène *SIARF4* fusionné au gène rapporteur GUS (*pARF4::GUS*) (Photo 10).

Les résultats obtenus ont montré que l'application du stress salin induit l'expression du gène GUS dans l'ensemble de la partie foliaire, dans la racine principale et les racines latérales et également dans l'apex de la racine principale tandis que les plantes témoins ne présentent aucune activité du gène GUS. En réponse au stress hydrique induit par l'addition du PEG dans le milieu de culture, l'activité du gène GUS est principalement localisée au niveau des nervures des feuilles, de la racine principale et racines latérales et dans l'apex de la racine principale alors que les plantes témoins ne présentent aucune coloration bleue indicatrice de la protéine GUS.





**Photo 10** Expression tissulaire du gène GUS dirigé par le promoteur du gène *SIARF4* observée chez des plantes de 3 semaines en présence de stress salin ou hydrique. Le stress salin a été effectué par addition de 250 mM de NaCl au milieu de culture hydroponique. Le stress hydrique a été réalisé par ajout de 15% de PEG 20 000 à la solution nutritive. Les flèches en noir montrent la localisation de l'activité du gène GUS dans les différents tissus analysés.

Les divers stimulus environnementaux induisent des changements dans l'homéostasie, la redistribution et la signalisation de l'auxine (Navarro et al., 2006; Park et al., 2007). Les preuves indiquent que l'auxine intervient dans les mécanismes déployés par les plantes pour faire face aux stress abiotiques à travers des réseaux de signalisation complexes. Des analyses d'expression ont signalé une modification de l'expression des facteurs de réponse à l'auxine chez plusieurs espèces végétales dont le riz (Jain and Khurana, 2009b), le sorgho (Wang et al., 2010), le soja (Van Ha et al., 2013) et la banane (Hu et al., 2015) en réponse aux stress abiotiques. Chez la tomate, le profil d'expression des *SIARFs* a montré que la plupart des *ARFs* montrent une expression différentielle en conditions de stress salin et hydrique et que certains d'entre eux sont significativement régulés par ces conditions. Parmi eux, *SIARF4*

a montré une nette régulation de son expression en réponse au stress salin et hydrique (Bouzroud et al., 2018). De plus, l'étude de son expression en réponse au stress salin et hydrique a révélé que celle-ci est nettement modifiée par l'application de ces stress. En effet, des modifications significatives dans l'expression de celui-ci ont été observées dans les tissus foliaires et racinaires des plantes WT stressées. L'étude d'expression *in planta* de ce gène moyennant des lignées de tomate transgéniques exprimant la construction promoteur *SlARF4*-GUS « p*ARF4* ::GUS » a permis déceler une nette différence dans l'expression de *SlARF4* entre les plantes témoins et les plantes exposées aux stress salin (NaCl) ou hydrique (PEG). De plus, l'analyse *in silico* de la région promotrice de l'*ARF4* a révélé la richesse de celle-ci en éléments *cis*-régulateurs associés aux stress salin et hydrique et à la réponse à certaines phytohormones en occurrence l'auxine, l'ABA et l'acide salicylique ce qui laisse suggérer que ce gène pourrait être impliqué dans la réponse de la tomate à ces stress.

### **3. Etude de la réponse des lignées transgéniques pour l'*ARF4* au stress salin et hydrique**

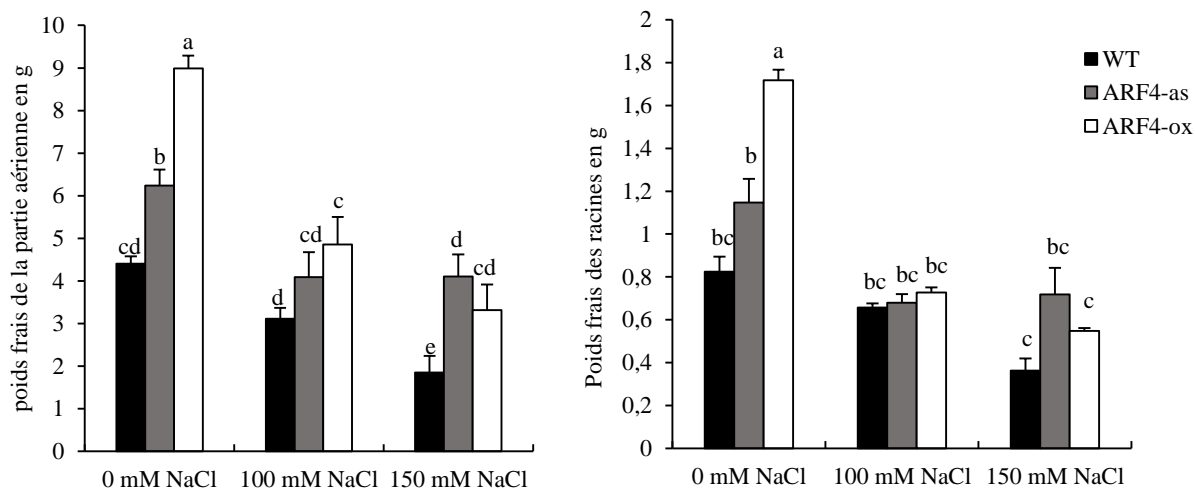
L'implication de l'*ARF4* dans la tolérance aux stress salin et hydrique a été étudiée par le biais de lignées de plantes transgéniques sous-exprimant ou sur-exprimant le gène en question. Pour cela, des plantes âgées de 3 semaines de type sauvage (WT), *ARF4*-as (lignée sous-exprimant le gène *SlARF4*) et *ARF4*-ox (lignée sur-exprimant le gène *SlARF4*) ont été exposées au stress salin (100 et 150 mM de NaCl) et hydrique (5% et 15% PEG 20000) pendant 2 semaines. Plusieurs paramètres morphologiques, biochimiques et physiologiques ont été mesurés pour évaluer leur degré de tolérance aux stress.

#### **3.1. Caractérisation morphologique de la tolérance aux stress salin et hydrique**

##### **3.1.1. Poids frais**

Le poids frais de la partie aérienne et racinaire a été évalué après 2 semaines d'application du stress salin. Les résultats montrent une nette réduction du poids frais de la partie aérienne chez les trois lignées de plantes testées (Figure 23). Cette réduction devient de plus en plus importante avec l'augmentation de la concentration de NaCl dans le milieu de culture chez le WT et chez le mutant *ARF4*-ox. A 100 mM de NaCl, le poids frais subit une réduction de l'ordre de 30%, 34% et 45% respectivement chez le mutant *ARF4*-as, le WT et le mutant *ARF4*-ox. Une diminution de 60% et de 70% du poids frais de la partie aérienne est observée respectivement chez les plantes WT et les plantes *ARF4*-ox suite à l'addition de 150 mM de NaCl alors le mutant *ARF4*-as présente une réduction relativement moins importante

et qui est de l'ordre de 30%. Il faut noter qu'en absence de sel, le poids frais de la partie aérienne des plantes *ARF4-ox* est nettement plus élevé par rapport aux plantes WT et *ARF4-as*.

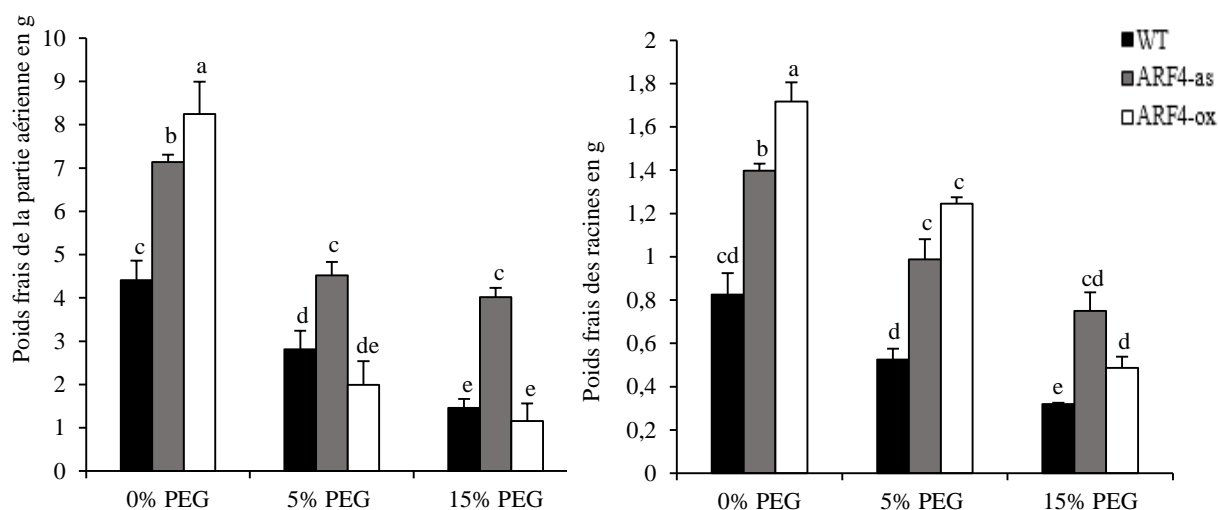


**Figure 23** Poids frais de la partie aérienne et racinaire chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl. Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'*ARF4*.

Au niveau racinaire, l'application du stress salin provoque une réduction significative du poids frais chez les trois lignées étudiées. En effet, le poids frais racinaire diminue de 20% chez les plantes de type sauvage (WT), de 40% chez le mutant *ARF4-as* et de 58% chez le mutant *ARF4-ox* après addition de 100 mM de NaCl dans la solution nutritive. En présence de 150 mM de NaCl, le poids frais racinaire diminue considérablement chez les plantes WT et *ARF4-ox* (de 56 % chez les plantes de type sauvage et de 60% chez les plantes *ARF4-ox*) alors que le poids frais racinaire des plantes *ARF4-as* n'est réduit que de 30%.

Le poids frais de la partie aérienne et racinaire a été également évalué chez les trois lignées de plantes après 2 semaines de culture en présence des différentes concentrations de PEG (0%, 5% et 15% PEG 20000) (Figure 24). Le poids frais de la partie aérienne des plantes WT et *ARF4-ox* diminue significativement avec l'augmentation de la concentration en PEG dans le milieu de culture tandis que le poids frais de la partie aérienne des plantes *ARF4-as* subit une réduction relativement moins importante. En effet, en présence de 5% de PEG 20000, le poids frais de la partie aérienne chute d'environ 35% à la fois chez le WT et le mutant *ARF4-as* contre 73% chez le mutant *ARF4-ox*. Une réduction de l'ordre de 60%, 43% et 71%

est observée chez le WT, le mutant *ARF4-as* et le mutant *ARF4-ox* respectivement lorsque ces plantes sont cultivées en présence de 15% de PEG (Figure 24).



**Figure 24** Poids frais de la partie aérienne et racinaire chez les différentes lignées testées en présence de différentes concentrations de PEG 20000. Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'*ARF4*.

Au niveau racinaire, le poids frais décline d'une façon significative chez les trois lignées après application des différentes concentrations de PEG. Cependant, la baisse du poids frais reste moins importante chez le mutant *ARF4-as* par rapport au WT et au mutant *ARF4-ox*. En effet, le poids frais racinaire subit une réduction de 62% et de 72% respectivement chez les plantes WT et le mutant *ARF4-ox* alors que le mutant *ARF4-as* présente une réduction de 40% seulement quand les plantes sont cultivées en présence de 15% de PEG 20000. Il faut noter qu'à 5% de PEG 20000, le poids frais racinaire diminue de 36%, 29% et 27% respectivement chez les plantes WT, le mutant *ARF4-as* et le mutant *ARF4-ox*.

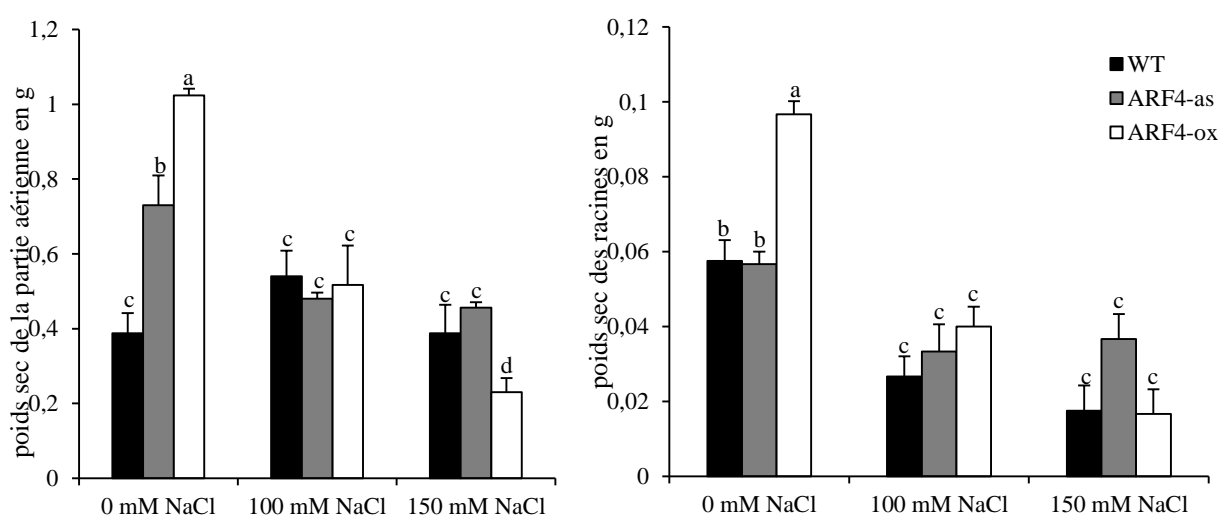
La croissance et le développement des plantes sont souvent entravés par les stress environnementaux. La mesure de l'évolution du poids frais des plantes peut renseigner sur l'état des plantes. Ainsi, des études menées sur plusieurs espèces végétales ont rapporté une nette réduction du poids frais en réponse à la salinité et au déficit hydrique (Farooq et al., 2009). Chez l'Orge (*Hordeum vulgare*), Fayez et ses collaborateurs ont observés une nette réduction du poids frais de la partie arienne et racinaire suite à l'exposition de différentes concentrations de NaCl (Fayez and Bazaid, 2014). Ce constat a été également signalé chez la canne à sucre (*Beta vulgaris* L.) et le chou cabus (*Brassica oleracea capitata* L.) (Jamil et al., 2007). Un déclin significatif du poids frais a été signalé chez le Sorgho (*Sorghum bicolor*) en réponse au stress hydrique (Saddam et al., 2014). La diminution de la croissance des plantules

(évaluée par la mesure du poids frais) est due à la restriction de la division et de l'élongation cellulaire occasionnée par l'application du stress salin ou hydrique (Akıncı and Lösel, 2012).

Chez certaines variétés ou espèces tolérantes, la tolérance à la salinité et au déficit hydrique est souvent associée à une réduction relativement moins importante du poids frais (Jaleel et al., 2009). Chez la tomate, l'étude menée par Manoj et ses collaborateurs a montré que les cultivars tolérants maintiennent un poids frais relativement plus important en conditions de stress hydrique et ceci en comparaison avec les cultivars dits sensibles (Manoj and Uday, 2010). Ce constat a également été rapportée chez de nombreuses espèces végétales telles que le blé (Hassan et al., 2015), le maïs (Cai et al., 2012), le coton (Basal, 2010) et la pomme de terre (Rahnama et al., 2011). A l'issue des 2 semaines d'exposition au stress salin ou hydrique, une diminution du poids frais des pousses et des racines a été observée chez le WT et les lignées transgéniques pour l'*ARF4*. Cependant, cette réduction était significativement moins prononcée chez les plantes *ARF4*-as, ce qui suggère que les plantes *ARF4*-as pourraient mieux tolérer ces deux stress que les autres lignées.

### 3.1.2. Poids sec

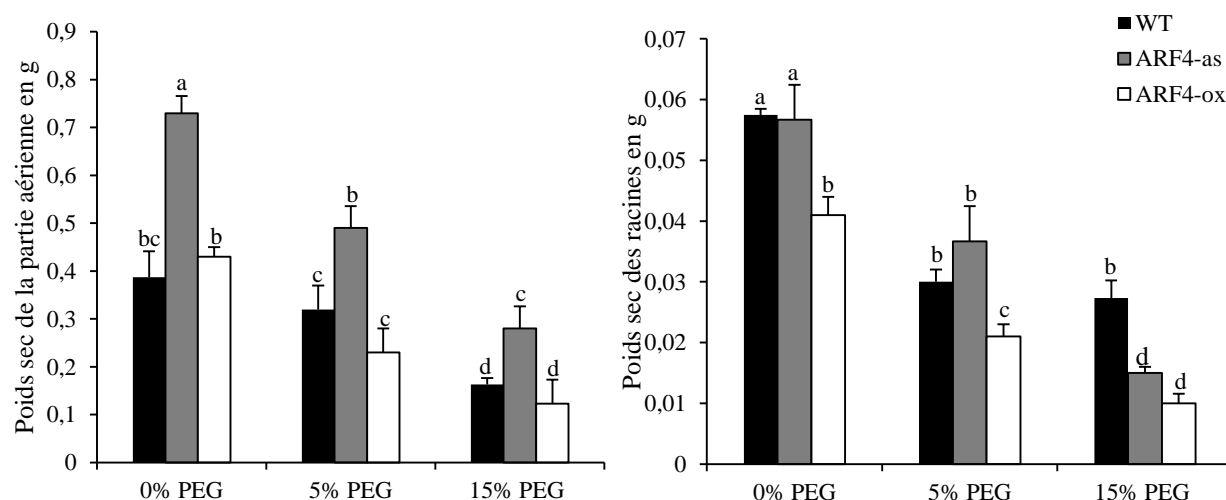
Le poids sec de la partie aérienne et racinaire des plantes WT, *ARF4*-as et *ARF4*-ox a été déterminé après 2 semaines d'application des différentes concentrations de NaCl par séchage des différentes parties pendant 72 heures. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure ci-dessous (Figure 25).



**Figure 25** Poids sec de la partie aérienne et racinaire chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl. Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, *ARF4*-as et *ARF4*-ox désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'*ARF4*.

Le poids sec des racines diminue significativement avec l'application ou l'augmentation de la concentration de NaCl. Une réduction de 53%, 42% et 58 % du poids sec racinaire est observée respectivement chez les plantes WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* après application de 100 mM de NaCl. A 150 mM de NaCl, le poids sec diminue significativement chez les plantes WT (70%) et *ARF4-ox* (82%) tandis que le mutant *ARF4-as* présente une réduction de 35%.

Le poids sec de la partie aérienne et racinaire a été également évalué chez les différentes lignées en réponse aux différentes concentrations de PEG (0%, 5% et 15% PEG 20000). Le poids sec de la partie aérienne des plantes WT et *ARF4-ox* diminue significativement avec l'augmentation de la concentration en PEG dans le milieu de culture alors que le poids sec de la partie aérienne des plantes *ARF4-as* subit une réduction moins importante par rapport aux autres lignées testées (Figure 26). En présence de 5% de PEG 20000, le poids frais de la partie aérienne subit une réduction de 19% à la fois chez les plantes WT et le mutant *ARF4-as* et d'environ 46% chez le mutant *ARF4-ox* alors qu'une réduction de l'ordre de 46%, 34% et de 71% est observée chez le WT, le mutant *ARF4-as* et le mutant *ARF4-ox* respectivement après culture des plantes en présence de 15% de PEG.



**Figure 26** Poids sec de la partie aérienne et racinaire chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de PEG 20000. Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'*ARF4*.

Dans les racines, le poids sec diminue significativement chez les trois lignées après application des différentes concentrations de PEG. Cependant, la baisse reste moins importante chez le mutant *ARF4-as* par rapport à la lignée sauvage et au mutant *ARF4-ox*. En effet, en présence de 5% de PEG, le poids sec racinaire chute de 48% à la fois chez les plantes WT et le mutant

*ARF4-ox* alors que le mutant *ARF4-as* présente une réduction de 17% seulement. A 15% de PEG 20000, le poids sec racinaire diminue de 52%, 20% et 75% respectivement chez les plantes WT, le mutant *ARF4-as* et le mutant *ARF4-ox*.

Tout comme le poids frais, le poids sec des plantes subit une nette réduction en réponse au stress salin ou hydrique. Cette réduction de la croissance a été relevée chez plusieurs espèces végétales soumises à ces deux stress y compris la tomate, la fève, la vigne, le pois chiche et le riz (Amini and Ehsanpour, 2006 ; Cordovilla et al., 1995 ; Mamo et al., 1996 ; Manickavelu et al., 2006, 2006 ; Pardha Saradhi et al., 1996 ; Parvin et al., 2015). Cette réduction peut être attribuée à l'inhibition de l'élongation cellulaire due à la perte de turgescence occasionnée par ces stress (Fahad et al., 2017). Le poids sec de la partie aérienne et racinaire des plantes *ARF4-as* est moins affecté par l'application du stress salin et hydrique en comparaison aux autres lignées ce qui laisse suggérer que le stress salin et hydrique influence moins la croissance des plantes *ARF4-as*. Ainsi, la sous-expression du gène *SIARF4* confère une meilleure tolérance aux plantes transgéniques.

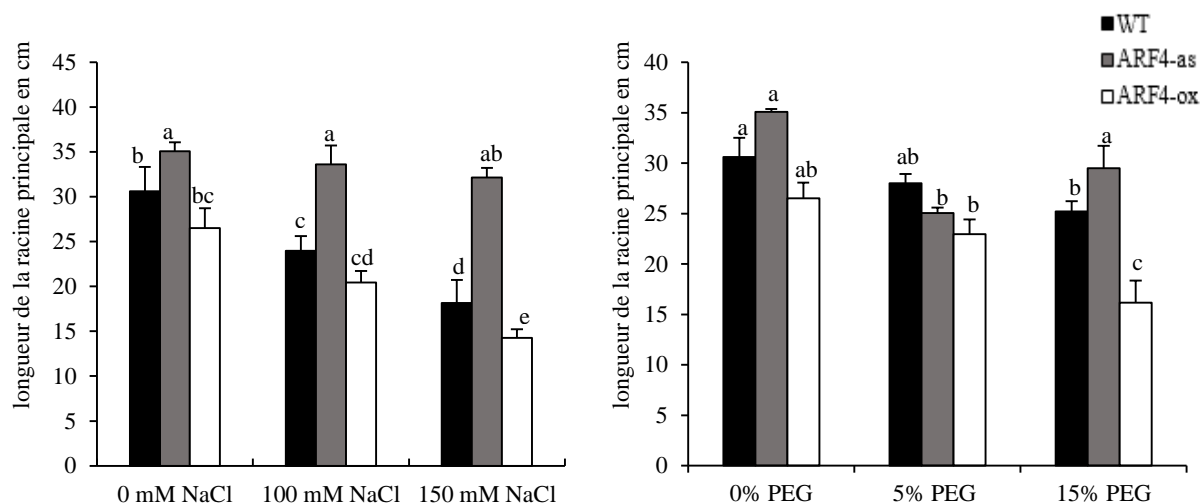
### **3.1.3. Développement racinaire**

Etant donné que le système racinaire est l'un des premiers organes à subir les fluctuations de l'environnement qui l'entoure, l'étude des modifications qui peuvent l'atteindre suite au changement des conditions permet de renseigner sur les mécanismes de réponse des plantes face aux conditions hostiles. Plusieurs études se sont concentrées sur l'étude du comportement du système racinaire en conditions de stress et ont témoigné que celui-ci se caractérise par une certaine plasticité lui permettant de s'adapter aux changements environnementaux afin de subvenir aux besoins de la plante en eau et en éléments minéraux.

Ainsi, nous avons étudié la réponse du système racinaire des plantes WT et des mutants *ARF4-as* et *ARF4-ox* aux différentes concentrations de NaCl ou de PEG à travers l'évaluation de certains paramètres de la croissance racinaire, à savoir : l'élongation racinaire (longueur de la racine principale) et la densité racinaire (déterminée à partir de la longueur de la racine principale et du nombre des racines latérales formées).

#### **3.1.3.1. L'élongation de la racine principale**

L'élongation de la racine principale des plantes des différentes lignées a été évaluée en présence de différentes concentrations de NaCl ou de PEG. Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 27.



**Figure 27** Longueur de la racine principale chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl (à gauche) ou de PEG (à droite). Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'*ARF4*.

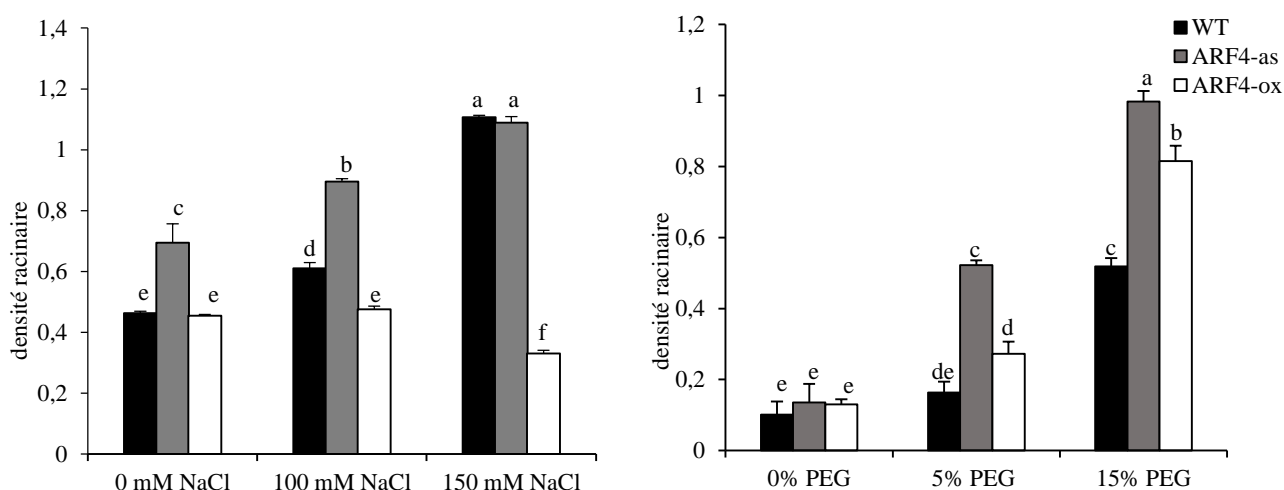
En présence de stress salin, la longueur moyenne de la racine principale des plantes WT et *ARF4-ox* diminue significativement avec l'augmentation de la concentration en NaCl tandis que la croissance de la racine principale des mutants *ARF4-as* reste comparable à celle observée chez les plantes témoins. En effet, une baisse de l'ordre 21% et de 22% est enregistrée chez les plantes WT et *ARF4-ox* cultivées à 100 mM de NaCl contre une réduction de 5% chez le mutant *ARF4-as*. A 150 mM de NaCl, l'inhibition de l'élongation de la racine principale devient plus prononcée. Ainsi, nous avons noté une réduction de 40% chez les plantes WT et de 46% chez le mutant *ARF4-ox* tandis que le mutant *ARF4-as* présente une légère réduction (8%) de la longueur de la racine principale.

La croissance en longueur de la racine principale diminue d'une façon significative chez les trois lignées en conditions de stress hydrique. Cependant, cette réduction est relativement moins importante chez le mutant *ARF4-as*. En effet, l'application de 15% de PEG inhibe de 17%, 15% et 39% la longueur de la racine principale des plantes WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* respectivement.

### 3.1.3.2. Densité racinaire

La densité racinaire a été estimée pour les trois lignées en présence des différentes concentrations de NaCl ou de PEG. Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure 28.





**Figure 28** Densité racinaire chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl (à gauche) ou de PEG (à droite). Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'*ARF4*.

En réponse au stress salin, la densité racinaire augmente d'une manière significative avec l'augmentation de la concentration en NaCl dans le milieu nutritionnel. Cependant, cette augmentation est beaucoup plus importante chez les plantes WT et le mutant *ARF4-as*. En effet, à 100 mM de NaCl, la densité racinaire présente une augmentation de 31%, 28% et 8% respectivement chez les plantes WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox*. L'application d'une concentration de 150mM de NaCl provoque une augmentation significative de la densité racinaire des plantes WT et *ARF4-as*. Ainsi, on note une augmentation de l'ordre de 139% et de 56% chez les plantes WT et *ARF4-as* respectivement. En revanche, le mutant *ARF4-ox* présente une réduction significative de la densité racinaire qui dépasse les 70%.

En réponse au stress hydrique, la densité racinaire des plantes des différentes lignées enregistre une augmentation significative avec l'augmentation de la concentration en PEG. Cependant, cette augmentation est beaucoup plus importante chez les plantes *ARF4-as*. En effet, l'application de 5% de PEG 20000 résulte en une augmentation de 150% chez les plantes *ARF4-as* contre une augmentation de 80% et de 38% respectivement chez les plantes WT et *ARF4-ox*. L'application d'une concentration de 15 % PEG 20000 provoque une augmentation significative de la densité racinaire chez les plantes WT et *ARF4-ox* (environ 5 fois plus de racines latérales qu'à 0% PEG 20000). A cette même concentration de PEG, le mutant *ARF4-as* présente une densité racinaire très importante par rapport aux conditions normales.

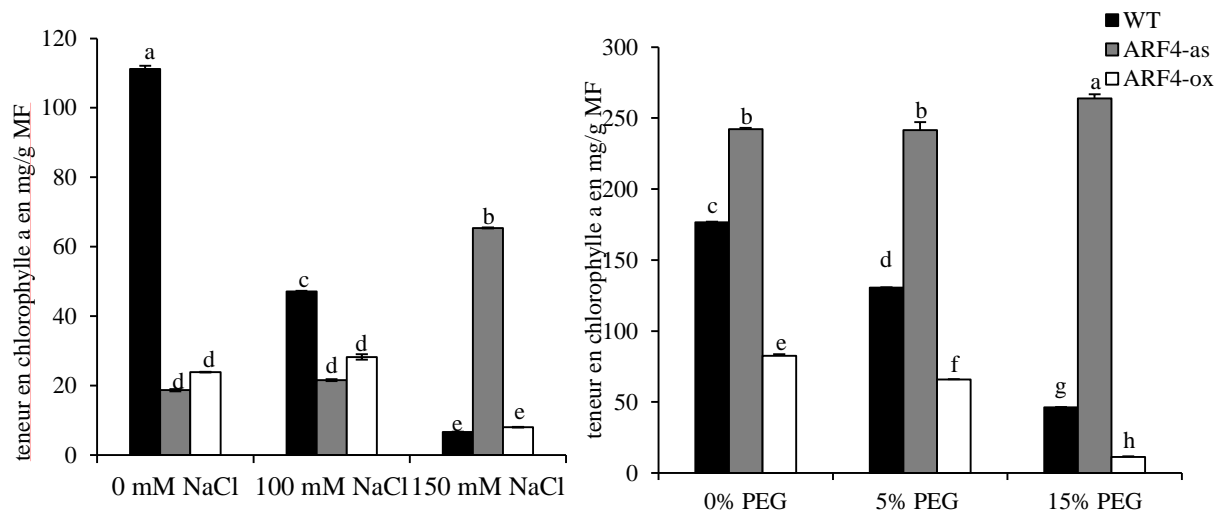
Le système racinaire est l'un des premiers organes à être confronté au stress salin et hydrique. Les racines jouent un rôle crucial dans la survie de la plante en assurant une meilleure acquisition de l'eau et des nutriments nécessaires pour la croissance et le développement des plantes (Malamy, 2005). Le développement des racines peut être gravement affecté par les stress environnementaux (Kurth et al., 1986). Chez *Arabidopsis*, la croissance et le développement racinaire sont entravés en réponse au stress salin (Burssens et al., 2000). Dans ce travail, nous avons noté une diminution significative de la longueur de la racine principale à la fois chez le WT et les mutants *ARF4-as* et *ARF4-ox* et ceci en réponse aux différentes concentrations de NaCl ou de PEG. Cependant, la réduction de la longueur de la racine principale est nettement moins importante chez le mutant *ARF4-as* par rapport aux autres lignées testées. Le développement d'un système racinaire profond se révèle bénéfique pour la production végétale et la survie dans des conditions de déficit hydrique. En effet, un bon développement du système racinaire augmente l'absorption d'eau, ce qui confère l'avantage de soutenir la croissance des plantes dans des conditions défavorables (Comas et al., 2013). De nombreuses études ont établi un lien entre la tolérance au stress des plantes et l'augmentation de la longueur et de la densité des racines (Florina et al., 2013). Chez l'orge, Munns et ses collaborateurs ont remarqué que la tolérance au stress salin est corrélée avec un meilleur développement racinaire (Munns et al., 2006). D'autres études ont montré que les cultivars tolérants du tournesol (*Helianthus Annuus* L.), du blé (*Triticum aestivum*) (Manschadi et al., 2008), du riz (*Oryza sativa*) (Jaleel et al., 2009) et du coton (*Gossypium hirsutum*) (Basal et al., 2005) ont tendance à avoir des systèmes racinaires plus profonds que les cultivars sensibles. Des études portant sur l'identification des génotypes de plantes tolérantes aux stress ont conclu que pour une même espèce, les plantes qui présentent une racine principale plus longue tolèrent plus le stress salin contrairement aux plantes sensibles, chez lesquelles le développement de la racine principale est entravé par la présence du stress (Ribaut et al., 2009). Chez le maïs (*Zea mays*), Khan et son équipe ont pu démontrer que la tolérance à une concentration de 150 mM de NaCl se manifeste par le développement d'une racine principale plus longue chez les lignées tolérantes que chez les lignées sensibles (Khan et al., 2003). Les plantes *ARF4-as* ont montré une légère réduction de la longueur de la racine primaire associée à une augmentation de la densité racinaire. *ARF4* s'est avéré impliqué dans la définition de l'architecture des racines chez *Arabidopsis* dans les conditions de croissance optimales grâce au contrôle de l'émergence des racines latérales (Marin et al., 2010), ce qui suggère que ce gène pourrait jouer un rôle important à l'amélioration de la tolérance de la tomate à la salinité et au déficit hydrique.

### 3.2. Caractérisation physiologique, biochimique et moléculaire de la tolérance aux stress salin et hydrique

#### 3.2.1. Teneur en chlorophylle a, b et chlorophylle totale

##### 3.2.1.1. Teneur en chlorophylle a

La teneur en chlorophylle a a été évaluée chez les plantes WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* après deux semaines de culture en présence de différentes concentrations de NaCl ou de PEG. Les résultats du dosage obtenus sont résumés dans la figure ci-dessous (Figure 29).



**Figure 29** Taux de la chlorophylle a chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl (à gauche) ou de PEG (à droite). Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'*ARF4*.

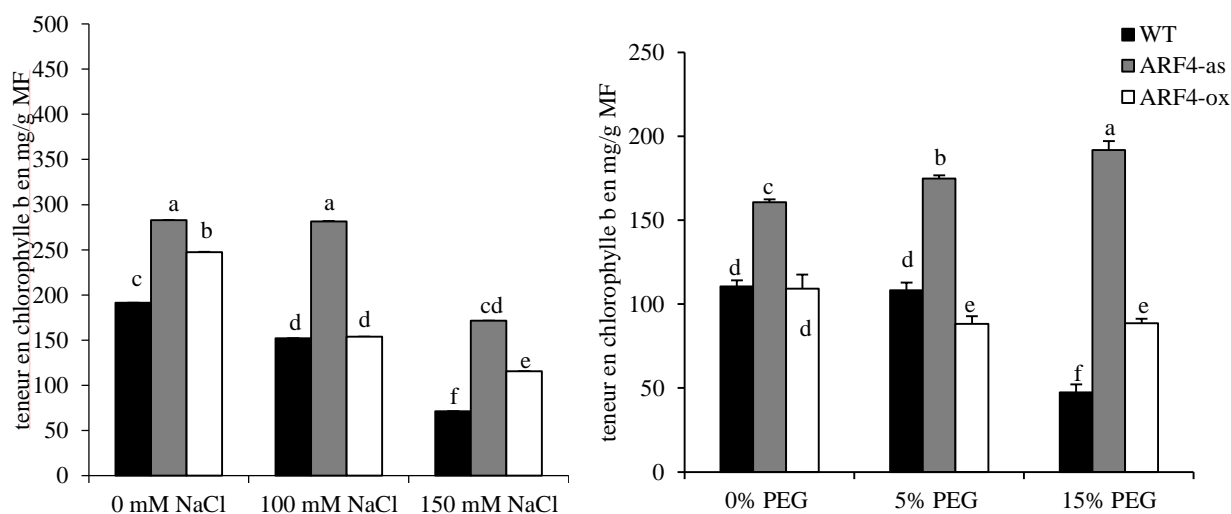
La teneur en chlorophylle a des plantes WT et *ARF4-ox* a connu une baisse significative ( $p < 0,05$ ) avec l'augmentation de la concentration en NaCl. En effet, à 100 mM de NaCl dans le milieu, la concentration de la chlorophylle a diminue de 57% chez le WT alors que le mutant *ARF4-as* et *ARF4-ox* présente une hausse légère mais non significative de la concentration de la chlorophylle a. Avec 150 mM de NaCl, la concentration de la chlorophylle a dans les plantes *ARF4-as* est 3,5 fois plus élevée que dans les conditions normales tandis qu'une baisse de 94% et de 66% est enregistrée respectivement chez les plantes WT et *ARF4-ox*. Il faut noter qu'en absence de sel (témoins), les teneurs en chlorophylle a dans les feuilles des plantes *ARF4-as* et *ARF4-ox* sont de  $18,68 \pm 0,05$  et  $23,88 \pm 0,01$  contre  $111,22 \pm 0,09$  chez les plantes WT.

La teneur en chlorophylle a enregistre une baisse significative chez le WT et les plantes *ARF4-ox* en réponse au stress hydrique. En effet, le taux de la chlorophylle a présente

une diminution de l'ordre de 28% et de 20% respectivement chez le WT et le mutant *ARF4-ox* cultivés en présence de 5% de PEG 20000. En revanche, le mutant *ARF4-as* a maintenu une concentration en chlorophylle a relativement élevée même en présence de PEG. L'exposition à 15% de PEG 20000 engendre une baisse dans le taux de la chlorophylle a chez les plantes WT (73%) et les plantes *ARF4-ox* (24%) tandis que le mutant *ARF4-as* enregistre une légère hausse dans le taux de la chlorophylle a.

### 3.2.1.2. Teneur en chlorophylle b

La teneur en chlorophylle b dans les feuilles a été évaluée chez les trois lignées de plantes en réponse au stress salin et hydrique. Comme le montre la figure 30, la teneur en chlorophylle b des plantes WT et *ARF4-ox* diminue significativement avec l'augmentation de la concentration de NaCl tandis que le mutant *ARF4-as* enregistre une augmentation significative dans ce taux. En effet, à 100mM de NaCl, la concentration de la chlorophylle b diminue de 16% et de 36% respectivement chez le WT et le mutant *ARF4-ox* tandis qu'une légère baisse est observée chez le mutant *ARF4-as*. A 150 mM de NaCl, une réduction de 48% et de 73% est observée chez les plantes WT et *ARF4-ox* contre une baisse de 36% chez le mutant *ARF4-as*.



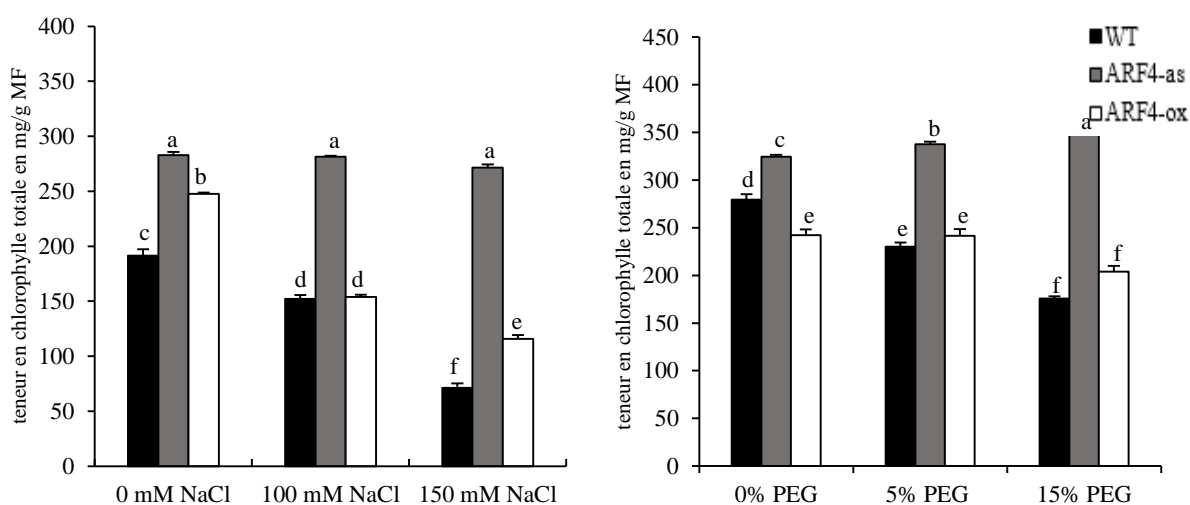
**Figure 30** Taux de la chlorophylle b chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl (à gauche) ou de PEG (à droite). Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'*ARF4*.

En réponse au stress hydrique, la teneur des feuilles en chlorophylle b décline de manière considérable chez le WT et le mutant *ARF4-ox* en réponse à l'augmentation de la concentration du PEG (Figure 30). En effet, l'application de 5% de PEG induit une baisse du taux

de la chlorophylle b de 2% et de 20% chez le WT et le mutant *ARF4-ox* respectivement. En revanche, ce taux connaît une augmentation de l'ordre de 8% chez le mutant *ARF4-as*. L'application de 15% de PEG a conduit à une baisse dans le taux de la chlorophylle b chez les plantes WT (58%) et les plantes *ARF4-ox* (20%) tandis que le mutant *ARF4-as* enregistre une hausse significative (19%) du le taux de la chlorophylle b.

### 3.2.1.3. Teneur en chlorophylle totale

La teneur en chlorophylle totale a été déterminée chez des plantes issues des trois différentes lignées après 2 semaines d'exposition à différentes concentrations de NaCl ou de PEG. Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure 31.



**Figure 31** Teneur totale en chlorophylle chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl (à gauche) ou de PEG (à droite). Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT *ARF4-as* et *ARF4-ox* désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'*ARF4*.

En réponse au stress salin, la teneur en chlorophylle totale a connu une baisse nettement significative chez le WT et le mutant *ARF4-ox* et qui devient de plus en plus importante avec l'augmentation de la concentration en NaCl. En effet, une baisse de l'ordre de 20% et de 38% est enregistrée chez le WT et le mutant *ARF4-ox* respectivement en présence de 100mM de NaCl et a atteint 63% et 53% chez le WT et le mutant *ARF4-ox* lorsque ces derniers sont cultivés à 150 mM de NaCl. En revanche, le mutant *ARF4-as* présente une légère réduction du taux de la chlorophylle totale mais qui demeure non significative (de l'ordre de 0,4% à 100 mM de NaCl et d'environ 4% à 150 mM de NaCl).

La teneur en chlorophylle totale diminue significativement chez les plantes WT et *ARF4-ox* avec l'augmentation de la concentration du PEG dans le milieu de culture. Chez le WT,

la teneur en chlorophylle totale diminue de 18% et de 37% respectivement en présence de 5% et de 15% de PEG 20000 alors qu'une baisse relativement moins importante est enregistrée chez le mutant *ARF4-ox*, chez lequel le taux de la chlorophylle totale diminue de 1% en présence de 5% de PEG 20000 et de 16% à 15% de PEG 20000. Inversement, le mutant *ARF4-as* maintient un taux de chlorophylle relativement plus élevé que celui mesuré en absence de stress hydrique. Ainsi, nous avons noté une augmentation de 4% du taux de la chlorophylle totale à 5% de PEG 20000 et de 20% en présence de 15% de PEG 20000.

La photosynthèse est l'un des principaux processus affectés par la salinité et le stress hydrique (Chaves, 1991 ; Munns et al., 2006). La teneur en chlorophylle des plantes est positivement corrélée avec leur activité photosynthétique. La réduction du taux de la chlorophylle contribue à l'inhibition de la photosynthèse dans des conditions de stress abiotique (Zhou et al., 2011). Dans notre étude, la teneur en chlorophylle a, b et chlorophylle totale au niveau des feuilles a connu une nette réduction en réponse aux fortes concentrations en NaCl ou PEG. Une diminution de la teneur en chlorophylle induite par le stress a été signalée chez plusieurs espèces végétales, notamment la tomate (Dogan et al., 2010), le blé dur (Marcinińska et al., 2013) et le blé tendre (Saeidi and Abdoli, 2015). Zarafshar et al. (2014) ont expliqué cette diminution due à la photo-oxydation des pigments et de la dégradation de la chlorophylle (Zarafshar et al., 2014). Le mutant *ARF4-as* a cependant montré une légère diminution de la teneur totale en chlorophylle en réponse au stress salin et à une légère augmentation des conditions de stress hydrique. Dogan et al. (2010) et Furdi et al. (2013) ont montré que les génotypes de tomate présentant moins de pertes de pigments photosynthétiques étaient plus tolérants à la salinité (Dogan et al., 2010; Florina et al., 2013). Chez le petit pois (*Pisum sativum*), les cultivars qui tolèrent la salinité ne présentaient aucun changement dans la teneur en chlorophylle en réponse aux stress (Hernandez et al., 2000). Le maintien d'une activité photosynthétique relativement élevée chez le mutant *ARF4-as* indique une meilleure tolérance à la salinité et au stress hydrique.

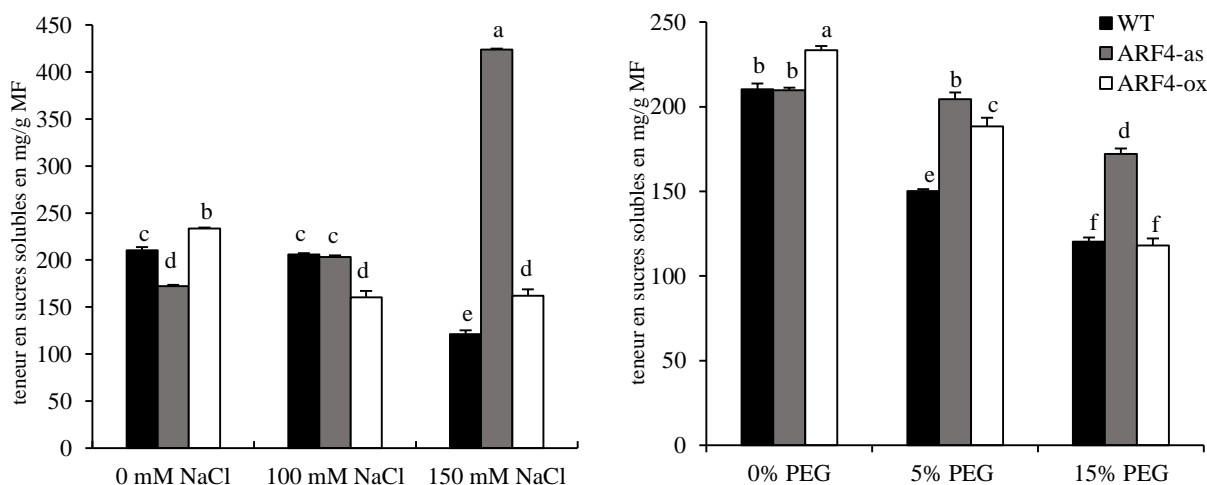
### **3.2.2. Teneur en sucres solubles**

Les sucres peuvent servir comme composés pour l'ajustement osmotique. Les principaux glucides accumulés sous stress sont : le glucose, le fructose et le saccharose. Ils jouent un rôle crucial dans le maintien d'une pression de turgescence qui est à la base des différents processus contrôlant la vie d'une plante. L'augmentation des glucides solubles au niveau des racines et des feuilles semblent être un indicateur de la résistance des plantes au stress osmotique induit

par la salinité ou la sécheresse. Ainsi, les modifications des teneurs en glucides représentent un test commode de prédiction de la résistance des plantes à la salinité ou à la sécheresse.

### 3.2.2.1. Teneur en sucres au niveau aérien

La teneur en sucres solubles a été quantifiée dans la partie aérienne des plantes WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* en absence ou en présence de différentes concentrations de NaCl ou de PEG. La figure 32 résume l'ensemble des résultats obtenus.



**Figure 32** Taux des sucres solubles au niveau des feuilles chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl (à gauche) ou de PEG (à droite). Les valeurs sont représentées en moyenne ± écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes (p<0,05) suivant le test Student Newman Keuls. WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'*ARF4*.

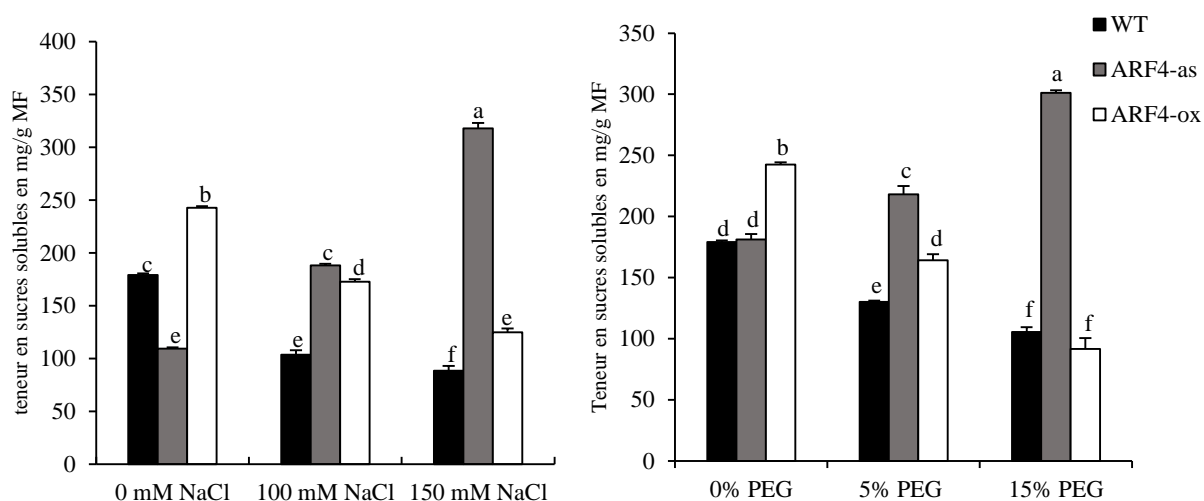
En réponse au stress salin, le taux des sucres solubles a connu une baisse significative à la fois chez le WT et le mutant *ARF4-ox*. Ainsi, chez le WT, la teneur en sucres solubles passe de  $210,346 \pm 0,34$  à  $121,034 \pm 0,40$  lorsque les plantes sont cultivées à de 150 mM de NaCl soit une réduction de 42%. Le mutant *ARF4-ox* présente à son tour une réduction nettement significative du taux des sucres dépassant 30%. Le mutant *ARF4-as* présente, subséquemment, une nette accumulation des sucres solubles au niveau foliaire avec l'augmentation de la concentration de NaCl. Nous avons noté alors, une augmentation de 18% et de 146% du taux des sucres solubles quand les plantes sont cultivées en présence de 100mM et de 150mM de NaCl respectivement.

La teneur en sucres solubles diminue d'une façon significative chez les trois lignées de plantes avec l'augmentation de la concentration du PEG. En effet, le taux des sucres solubles enregistre une nette diminution estimée à 28% et à 19% respectivement chez le WT et le mutant

*ARF4-ox* en présence de 5% de PEG 20000 tandis que le mutant *ARF4-as* présente une légère baisse. L'exposition des plantes à une concentration plus élevée en PEG (15%) résulte en une diminution relativement importante qui dépasse de loin 40% chez les plantes WT et *ARF4-ox* et une réduction de 17% uniquement chez le mutant *ARF4-as*.

### 3.2.2.2. Teneur en sucres au niveau racinaire

La teneur en sucres solubles a été déterminée dans les racines des plantes WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* en absence ou en présence de différentes concentrations de NaCl ou de PEG. La figure 33 illustre les différents résultats obtenus.



**Figure 33** Taux des sucres solubles au niveau des racines chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl (à gauche) ou de PEG (à droite). Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) suivant le test Student Newman Keuls. WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'*ARF4*.

L'exposition des plantes WT et *ARF4-ox* au NaCl induit une baisse significative du taux des sucres accumulées. Chez le WT, le taux des sucres accumulées a connu une baisse de 42% à 100mM de NaCl et de 50% à 150 mM de NaCl alors que le mutant *ARF4-ox* présente une réduction de l'ordre de 29% et de 49% respectivement à 100 mM et 150 mM de NaCl. En revanche, le mutant *ARF4-as* présente une hausse nettement significative du taux des sucres avec l'augmentation de la concentration de NaCl. Ainsi, la teneur en sucres solubles dans les racines des plantes *ARF4-as* augmente d'un facteur de 1,7 et de 2,9 à 100 mM et 150 mM de NaCl respectivement.



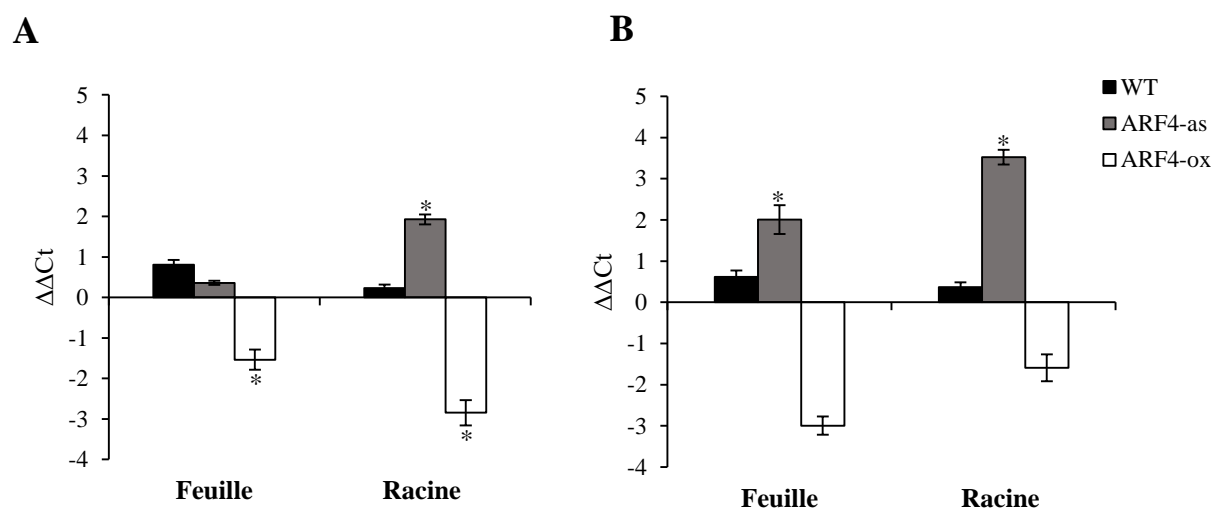
En réponse au stress hydrique, la teneur en sucres solubles diminue d'une façon importante avec l'augmentation de la concentration en PEG chez le WT et le mutant *ARF4-ox* contrairement au mutant *ARF4-as* chez lequel une augmentation nettement significative a été observée. Ainsi, à 5% de PEG 20000, une réduction de 27% et de 32% a été enregistrée respectivement chez le WT et le mutant *ARF4-ox* tandis que le taux des sucres augmente d'un facteur de 1,2 chez le mutant *ARF4-as*. L'exposition des plantes à 15% de PEG 20000 provoque une baisse de 41% chez le WT et de 62% chez le mutant *ARF4-ox*. En revanche, le mutant *ARF4-as* présente une nette augmentation de la teneur des sucres solubles (soit une augmentation d'un facteur de 1,6).

Les plantes produisent des glucides principalement par le biais de la photosynthèse (Okumura et al., 2016). Les sucres jouent un rôle important non seulement en tant que source d'énergie, mais également en tant que molécules de signalisation dans le cycle de vie des plantes (Lastdrager et al., 2014). La teneur en sucres est influencée par les stress biotiques et abiotiques (Roitsch, 1999). L'accumulation de glucides solubles a été associée à des mécanismes de tolérance à la sécheresse et à la salinité chez de nombreuses espèces végétales. L'accumulation des sucres aide les plantes à tolérer les stress abiotiques en améliorant leur capacité à préserver l'équilibre osmotique au sein des cellules (Atkinson and Urwin, 2012). Les espèces et les variétés tolérantes accumulent plus de sucres solubles dans les feuilles et les tissus en croissance (Pattanagul and Thitisaksakul, 2008). Les sucres solubles se sont fortement accumulés chez les génotypes tolérants de la canne à sucre et du riz en réponse au stress salin, ce qui indique que les sucres solubles jouent un rôle clé dans la tolérance à ce stress chez ces deux espèces (Dubey and Singh, 1999 ; Gandonou et al., 2011). Les sucres solubles amorcent le potentiel d'oxydoréduction cellulaire, aident à stabiliser les membranes et les structures protéiques et fournissent une source d'énergie possible dans les conditions hostiles (Keunen et al., 2013 ; Rosa et al., 2009 ; Sami et al., 2016). L'accumulation des sucres chez le mutant *ARF4-as* pourrait améliorer la tolérance à la salinité et au stress hydrique en augmentant l'osmolarité cellulaire qui favorise l'afflux d'eau dans les cellules ou au moins en diminuant l'écoulement de l'eau.

### 3.2.2.3. Expression du transporteur du sucre *LeSUT1*

La signalisation du sucre joue un rôle important dans la réponse aux stress abiotiques. En effet, elle entre en interaction avec les voies de stress afin de moduler les réponses métaboliques des plantes (Rosa et al., 2009). Les protéines SUT1 sont impliquées dans le mouvement du saccharose dans et hors des tissus de la sève et à travers le phloème via les voies

apoplastiques. L'expression du gène *LeSUT1* a été quantifiée chez le WT et chez les mutants *ARF4-as* et *ARF4-ox* exposées au stress salin et hydrique (Figure 34). Nos résultats montrent que l'expression de ce gène est significativement reprimée dans les feuilles des plantes WT et *ARF4-ox* après 2 heures d'application du stress salin tandis que son expression légèrement induite chez le mutant *ARF4-as* (Figure 34A). Au niveau racinaire, l'expression de ce gène connaît une répression nettement plus importante chez les plantes WT contrairement aux mutants *ARF4-as* et *ARF4-ox* chez lesquels aucune modification significative (Figure 34A). Après 24 heures d'application du stress salin, l'expression du gène *LeSUT1* est induite d'une manière significative dans les feuilles et les racines des plantes WT et dans les racines du mutant *ARF4-as*. En revanche, son expression est réprimée d'une manière significative à la fois dans les feuilles et dans les racines des plantes *ARF4-ox* (Figure 34A).



**Figure 34** Expression de *LeSUT1*; gène codant pour un transporteur de sucres chez le WT, le mutant *ARF4-as* et le mutant *ARF4-ox* en réponse aux stress salin(A) et hydrique (B). Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ).

L'exposition des plantes des différentes lignées au stress hydrique induit une modification dans l'expression du gène *LeSUT1*. En effet, l'expression du gène *LeSUT1* est induite de manière significative dans les feuilles des plantes WT et dans les feuilles et les racines du mutant *ARF4-as* tandis que son expression est significativement reprimée chez le mutant *ARF4-ox* (Figure 34B).

Les glucides produits dans les feuilles lors de la photosynthèse sont transportés vers les différentes parties de la plante via les transporteurs SUT pour soutenir la croissance des plantes. Les protéines SUT1 sont impliquées dans le mouvement du saccharose dans et en dehors des tissus et à travers le phloème via les voies apoplastiques. Ainsi, il est admis que les protéines SUT sont importantes pour la croissance des plantes et la tolérance au stress

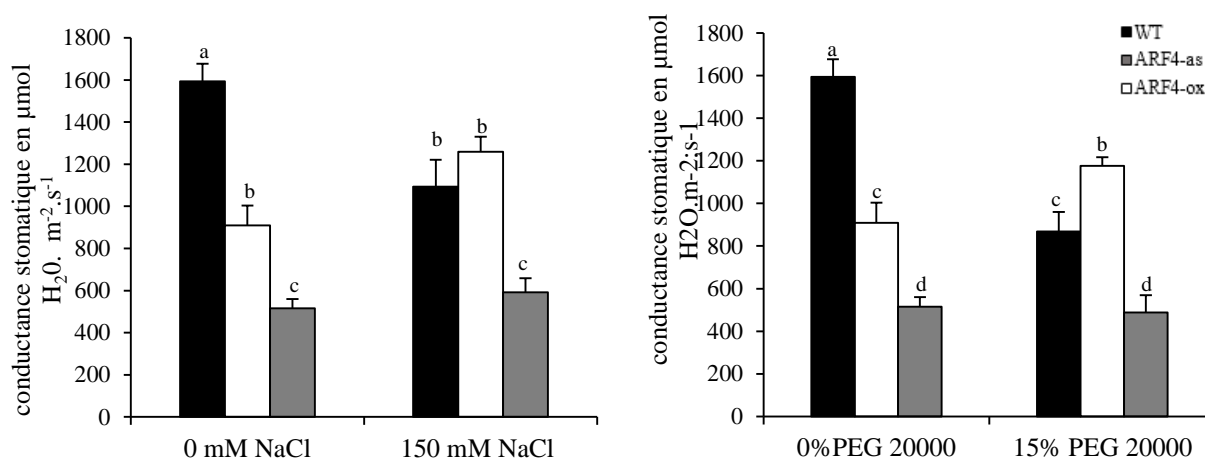
(Jia et al., 2015 ; Rolland et al., 2002). Des études ont montré que l'expression des transporteurs de sucre est régulée par des stress abiotiques (salinité et lumière) chez la pomme de terre et le céleri (Kühn et al., 1997 ; Noiraud et al., 2000). Chez le riz, l'analyse d'expression des transporteurs de sucre a montré qu'un seul gène *SUT* est sur exprimé en réponse à l'application du stress salin ou hydrique (Ibraheem et al., 2011). Patade et ses collaborateurs ont constaté que les transcrits du gène *SUT1* ont augmenté de 40% dans les feuilles de la canne à sucre après 24 heures d'application du PEG (Patade et al., 2012). Une induction de l'expression du gène *SUT1* a été également rapportée chez un génotype de sorgho qui tolère mieux la salinité (Sui et al., 2015). Compte tenu de l'importance des transporteurs de sucre dans la tolérance aux stress abiotiques, la régulation positive du gène *LeSUT1* chez le mutant *ARF4-as* pourrait améliorer la tolérance de celui-ci à la sécheresse et la salinité via la stimulation du transport des sucres pour l'osmo-régulation et pour fournir l'énergie nécessaire.

### 3.2.3. Perte en eau, conductance stomatique et teneur en ABA

#### 3.2.3.1. Conductance stomatique

Les stomates sont des pores situés sur l'épiderme des parties aériennes des plantes. Les stomates contrôlent deux des plus importants processus des plantes, la photosynthèse et la transpiration. Ils jouent un rôle imminent dans l'adaptation des plantes aux changements environnementaux car ils contrôlent à la fois les pertes d'eau et l'absorption de CO<sub>2</sub> (Damour et al., 2010a). Plus de 95% du dioxyde de carbone (entrant pour la photosynthèse) et de la vapeur d'eau (sortante pour la transpiration et le refroidissement de la surface foliaire) échangés entre la feuille et l'atmosphère passent par les stomates. L'ouverture ou la fermeture des stomates résultent des changements de turgescence des cellules de garde par rapport aux cellules de l'épiderme. La régulation de l'ouverture et la fermeture des stomates joue un rôle clé dans l'adaptation aux variations des conditions environnementales, notamment en situation de stress (Brugnoli and Lauteri, 1991 ; Jung et al., 2008). La mesure de la conductance stomatique, directement dépendante de l'ouverture des stomates, permet d'avoir des indications sur le taux de transpiration foliaire des plantes.

La conductance stomatique a été évalué chez des plantes WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* exposées au stress salin (150 mM de NaCl) ou au stress hydrique (15% PEG 20000) pendant deux semaines. Les mesures ont été réalisées en plaçant le poromètre sur la face adaxiale des feuilles bien développées. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 35.



**Figure 35** Conductance stomatique chez les différentes lignées testées en présence des différentes concentrations de NaCl (à gauche) ou de PEG (à droite). Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de douze répétitions indépendantes. Pour chaque concentration, la lignée marquée par une \* est significativement différente des autres lignées ( $p < 0,05$ ). WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* désignent respectivement la lignée sauvage, le mutant de sous-expression et le mutant de surexpression de l'*ARF4*.

L'évaluation de la conductance stomatique chez le WT et les lignées transgéniques pour l'*ARF4* en conditions normales et de stress a révélé une nette variation de ce paramètre entre les différentes lignées à la fois en absence et en présence de stress. Les résultats montrent qu'en absence de stress, la conductance stomatique est nettement plus élevée chez le WT et le mutant *ARF4-ox* tandis que le mutant *ARF4-as* enregistre de faibles valeurs de la conductance stomatique soit en moyenne  $515,8 \pm 44,58$  contre  $909,5 \pm 93,95$  chez le mutant *ARF4-ox* et  $1594,12 \pm 83,14$  chez le WT. En réponse au stress, la conductance stomatique augmente d'une façon significative chez le mutant *ARF4-ox* soit  $1259,75 \pm 70,37$  en présence de NaCl et  $1176,4 \pm 40,52$  lorsque les plantes sont cultivées en présence de 15% de PEG. Chez le WT, une baisse dans la conductance stomatique est enregistrée après exposition au stress. Ainsi, nous avons noté une réduction de l'ordre de 31,4% et 45,5% en présence de NaCl ou de PEG respectivement. En revanche, le mutant *ARF4-as* maintient une valeur relativement basse de la conductance stomatique à la fois en absence et en présence de stress soit une valeur de  $591,5 \pm 67,90$  en réponse au stress salin et une valeur de  $488,5 \pm 80,78$  en réponse au stress hydrique.

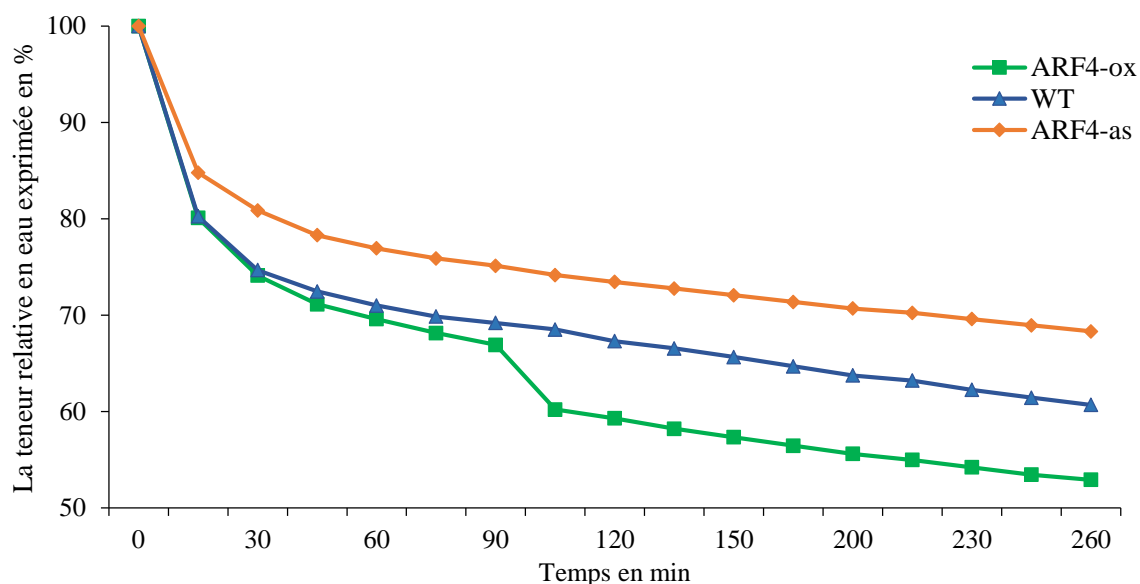
Les stomates jouent un rôle imminent dans la réponse des plantes aux changements environnementaux, car ils contrôlent à la fois les pertes d'eau et l'absorption de  $\text{CO}_2$ . La fermeture des stomates est considérée comme une réponse adaptative aux stress salin et hydrique (Brugnoli and Lauteri, 1991 ; Damour et al., 2010). Plusieurs études ont établi une corrélation entre la tolérance à la salinité et / ou à la sécheresse et la diminution de la conductance stomatique (Heschel and Riginos, 2005). Une diminution de la conductance

stomatique a été détectée chez trois variétés de pois chiche (*Cicer arietinum*) soumises à un stress hydrique (Mafakheri et al., 2010). Chez le maïs, Anjum et ses collaborateurs ont indiqué que le stress hydrique entraînait une diminution considérable (de l'ordre de 25,54%) de la conductance stomatique. Chez le coton, plante qui tolère la salinité, la conductance stomatique décline d'une manière significative en réponse aux concentrations croissantes de NaCl (Brugnoli and Lauteri, 1991). Le maintien d'une faible conductance stomatique chez le mutant *ARF4-as* pourrait avoir des effets protecteurs vis-à-vis du stress salin et hydrique en permettant d'économiser l'eau et d'améliorer l'efficacité de l'utilisation de l'eau.

### 3.2.3.2. Teneur relative en eau

La fermeture des stomates peut être déclenchée par divers facteurs internes et externes. Schultz, (2003) a montré que le déclin dans le potentiel hydrique foliaire peut induire la fermeture des stomates dans des conditions de stress. Ainsi, il serait judicieux de suivre l'évolution dans le temps de la teneur relative en eau dans les feuilles des trois lignées ; qui renseigne de près sur le potentiel hydrique foliaire.

La teneur relative en eau (RWC) a été déterminée chez la lignée sauvage (WT) et les lignées transgéniques pour l'*ARF4* (*ARF4-as* et *ARF4-ox*). La Figure 36 représente les résultats obtenus en fonction du temps.



**Figure 36** La teneur relative en eau déterminée en fonction du temps chez le WT, le mutant *ARF4-as* et le mutant *ARF4-ox*.

Une diminution remarquable de la teneur relative en eau (RWC) a été observée chez les trois lignes de plantes (Figure 36). En fait, des valeurs de pertes d'eau atteignant les 25%, 28% et 15% ont été enregistrées au cours des 30 premières minutes de déshydratation respectivement chez les plantes WT, *ARF4-ox* et *ARF4-as*. Une chute remarquable dans la teneur relative en eau est observée après 1 heure et demi de déshydratation chez le mutant *ARF4-ox* dépassant les 40% contre 30% chez le WT et 25% chez le mutant *ARF4-as*. Après 4 heures de déshydratation, la perte en eau atteint 72% et 61% respectivement chez le WT et le mutant *ARF4-ox* tandis qu'une diminution de 50% a été observée chez les plantes *ARF4-as*.

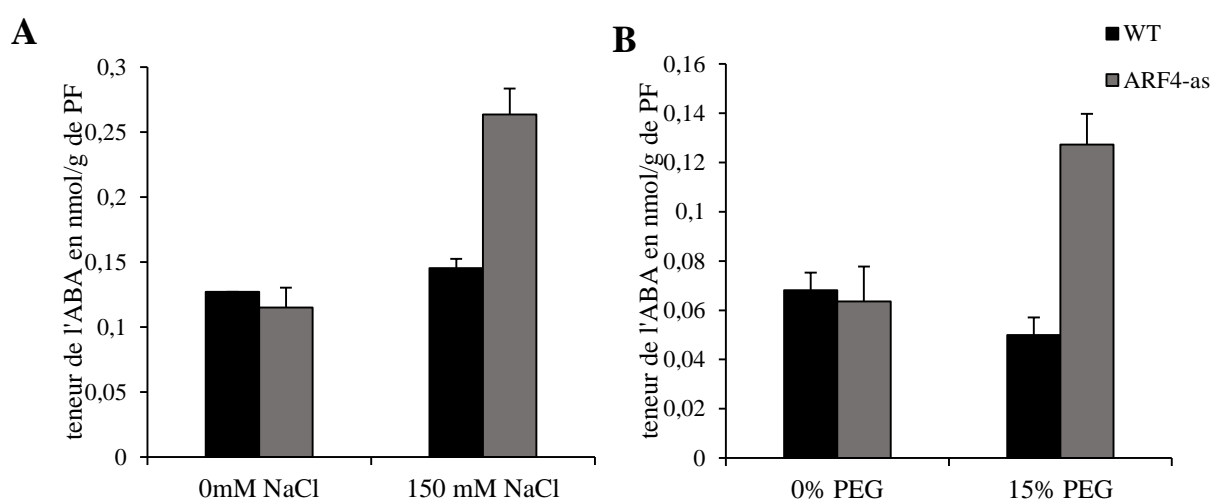
La fermeture des stomates peut être déclenchée par divers facteurs internes et externes. Schultz, (2003) a montré que le déclin du potentiel hydrique des feuilles peut déclencher une fermeture stomatique en conditions de stress (Schultz, 2003). La teneur relative en eau constitue un indicateur important de l'état de l'eau dans les plantes puisqu'il renseigne sur le degré d'hydratation des cellules et des tissus. Ainsi, le déclin de la teneur relative en eau reflète généralement une carence en eau des tissus végétaux. Le potentiel hydrique des feuilles a été considéré comme le principal paramètre contrôlant le comportement stomatique pendant le stress hydrique (Cornic, 2000 ; Hillova et al., 2014). Le maintien d'une RWC relativement élevée en cas de pénurie d'eau indique une meilleure tolérance vis-à-vis de ce stress (Roy and Basu, 2009). Silva et al. (2007) ont établi une corrélation entre la tolérance à la sécheresse chez la canne à sucre et le maintien d'une RWC relativement élevée (Silva et al., 2007). Ce constat a également été signalé chez les variétés tolérantes du blé, de l'orge, du riz et du maïs (Altinkut et al., 2001 ; Colom and Vazzana, 2003 ; Dionisio-Sese and Tobita, 2000 ; Moradi and Ismail, 2007). Le fait que les plantes *ARF4-as* maintiennent des valeurs de RWC relativement élevées associée à une diminution significative de la conductance stomatique suggère que ces plantes pourraient mieux tolérer la déshydratation que les plantes WT.

### 3.2.3.3. Teneur en ABA

L'acide abscissique constitue l'hormone végétale la plus importante dans la réponse aux fluctuations environnementales et par conséquent s'attribue par excellence, l'appellation de « hormone de stress ». L'accumulation de l'ABA dans les cellules végétales augmente en réponse aux stress. Cette accumulation induit la fermeture des stomates pour minimiser les pertes en eau occasionnées par les stress en particulier les stress salin et hydrique. Ainsi, le dosage de cette phytohormone dans les tissus végétaux permet de renseigner d'une part sur la réponse des lignées de tomate aux stress et d'autre part de vérifier si les basses valeurs

de la conductance stomatique observées chez le mutant *ARF4-as* sont corrélées avec une teneur élevée en ABA.

La détermination du taux de l'ABA dans les tissus foliaires des plantes WT et *ARF4-as* cultivées en absence ou en présence de stress hydrique ou salin a permis de déceler une augmentation nettement significative de la teneur en cette hormone chez le mutant *ARF4-as*. En effet, une augmentation de l'ordre de 193 % et de 200% est enregistrée dans les feuilles des plantes *ARF4-as* cultivées en présence de 150 mM de NaCl et de 15% de PEG 20000 respectivement (Figure 37). En revanche, on note une légère baisse dans la teneur en ABA dans les feuilles des plantes WT exposées aux stress hydrique et salin par rapport aux plantes témoins.



**Figure 37** Taux de l'ABA dans les feuilles des plantes WT et *ARF4-as* cultivées en conditions de stress salin (à gauche) et hydrique (à droite). Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  écart type de trois répétitions indépendantes.

L'ABA joue un rôle important dans plusieurs aspects de la croissance et du développement des plantes et constitue également un acteur principal dans la réponse des plantes aux stimuli environnementaux défavorables. La teneur en ABA augmente généralement en réponse aux différents types de stress abiotiques (Swamy and Smith, 1999 ; Tuteja, 2007). Plusieurs études ont rapporté une accumulation importante de l'ABA chez plusieurs espèces végétales dont le blé, le maïs, le sorgho, le riz, l'orge et le soja en réponse au déficit hydrique et chez la luzerne et le tabac en réponse au stress salin (Bensen et al., 1988b ; Durley et al., 1983 ; Guóth et al., 2009b ; Henson, 1984 ; Luo et al., 1992 ; Singh et al., 1987 ; Thameur et al., 2011 ; Zhou et al., 2011). L'accumulation de cette hormone en conditions de stress permet en partie l'ajustement du statut hydrique de la cellule à travers la régulation de la fermeture des stomates. Ainsi, plusieurs études ont démontré l'implication de l'ABA dans la régulation stomatique chez plusieurs espèces végétales. Chez le lupin blanc (*Lupinus albus* L.), Correia et Pereira

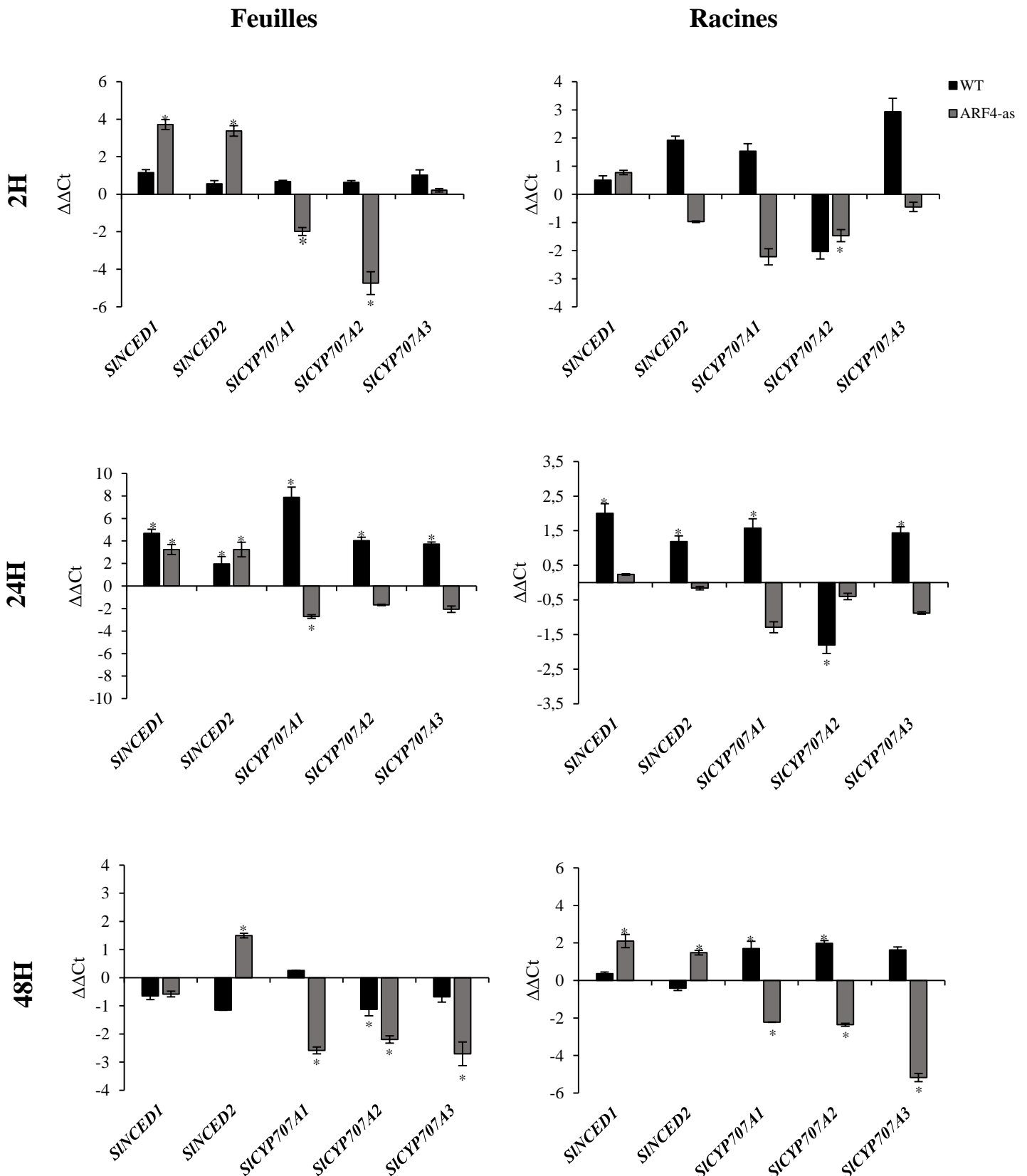
ont associé la baisse de la conductance stomatique à une forte accumulation de l'ABA chez les plantes soumises à un stress hydrique (Correia and Pereira, 1995). Ce constat a été également observé chez l'acacia (*Acacia confusa*) et le faux mimosa (*Leucaena leucocephala*) en réponse au stress hydrique (Liang et al., 1997). Chez l'oranger, le stress hydrique induit une augmentation de la teneur en ABA ce qui aboutit à la fermeture des stomates (Gomes et al., 2004). De ce fait, on peut en conclure que les basses valeurs de la conductance stomatique observée chez le mutant *ARF4-as* par rapport au WT peuvent être associées à une forte accumulation de l'ABA dans les feuilles ce qui laisse suggérer que le mutant *ARF4-as* tolère mieux le stress salin et hydrique.

La teneur en ABA dans les tissus végétaux est définie par l'équilibre entre sa biosynthèse et sa dégradation. Chez la tomate, les gènes *SINCE1* et *SINCE2* codant pour la 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase sont les principaux gènes responsables de la biosynthèse de l'ABA, tandis que le catabolisme est assuré par quatre principaux gènes dits *SICYP707A1*, *SICYP707A2*, *SICYP707A3* et *SICYP707A4* codant pour l'ABA 8'-hydroxylase (Yang et al., 2014).

L'étude de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ABA chez le WT et le mutant *ARF4-as* a révélé que leur expression est significativement régulée par l'application du stress salin ou hydrique (Figure 38). En effet, l'expression du gène *SINCE1* est induite à la fois dans les feuilles et les racines des plantes WT et dans les feuilles du mutant *ARF4-as* après 2 heures et 24 heures d'exposition au stress salin.

L'expression du gène *SINCE2* est nettement modifiée par l'application du stress salin et hydrique. Chez les plantes de type sauvage, ce gène est induit d'une manière significative dans les racines après 2 heures d'application du stress salin et dans les feuilles après 24 heures d'application de ce même stress. Une légère répression et surexpression du gène *SINCE2* est observée à la fois dans les feuilles et les racines des plantes *ARF4-as* exposées à 2 heures et 24 heures de stress salin respectivement. En réponse au stress hydrique, une nette surexpression du *SINCE2* est observée dans les feuilles et les racines des plantes *ARF4-as* alors qu'il est sous exprimé chez le WT.





**Figure 38** Expression des gènes de biosynthèse et de dégradation de l'ABA chez le WT et les mutants *ARF4-as* et *ARF4-ox* en conditions de stress salin et hydrique. Expression au niveau des feuilles (A) et des racines (B) après 2 heures d'application du stress salin, au niveau des feuilles (C) et des racines (D) après 24 heures d'application du stress salin, au niveau des feuilles (E) et des racines (F) après 48 heures d'application du stress hydrique. Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta\text{Ct} \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ).

L'expression des gènes *SICYP707A1*, *SICYP707A2* et *SICYP707A3* ; impliqués dans la dégradation de l'ABA a été évaluée chez le WT et le mutant *ARF4-as* en réponse au stress salin ou hydrique. Les profils d'expression obtenus sont représentés dans la figure 38. En réponse au stress salin, nos résultats montrent que l'expression des trois gènes est induite dans les feuilles des plantes WT après 2 heures et 24 heures d'application du stress. Une nette répression dans l'expression des gènes *SICYP707A1* et *SICYP707A2* est observée au niveau des feuilles des plantes *ARF4-as*. Au niveau racinaire, l'expression des gènes *SICYP707A1* et *SICYP707A3* est nettement induite chez les plantes WT alors que le gène *SICYP707A2* est réprimé d'une manière significative après 2 heures et après 24 heures d'application du stress salin. Chez le mutant *ARF4-as*, les gènes *SICYP707A1*, *SICYP707A2* et *SICYP707A3* sont sous-exprimés.

En réponse au stress hydrique, l'expression des gènes *SICYP707A1*, *SICYP707A2* et *SICYP707A3* est réprimée dans les feuilles et les racines des plantes *ARF4-as* et dans les feuilles des plantes WT alors que son expression est induite dans les racines des plantes WT. Chez le mutant *ARF4-ox*, l'expression de ces gènes est réprimée dans les racines bien qu'elle soit induite dans les feuilles.

Des études antérieures ont montré que le stress hydrique induit l'expression des gènes *NCED* chez plusieurs espèces végétales y compris la tomate (*Solanum lycopersicum*) (Burbidge et al., 1999), le maïs (*Zea mays*) (Tan et al., 1997), le haricot (*Phaseolus vulgaris*) (Qin and Zeevaart, 1999), *Arabidopsis* (Iuchi et al., 2001), la cornille (*Vigna unguiculata*) (Iuchi et al., 2000) et l'avocatier (*Persea Americana*) (Chernys and Zeevaart, 2000). De plus, il semblerait que la surexpression du gène *NCED* induit une forte accumulation de l'ABA et confère une meilleure résistance des plantes au stress hydrique. Par ailleurs, une meilleure tolérance à la sécheresse a été obtenue chez plusieurs espèces végétales telles que la tomate (Thompson et al., 2000), *Nicotiana plumbaginifolia* (Qin et Zeevaart, 2002) et *Arabidopsis* (Iuchi et al., 2001; Wan and Li, 2006) par manipulation génétique du gène *NCED*.

Parallèlement à la surexpression des gènes de biosynthèse de l'ABA, l'expression des gènes impliqués dans la dégradation de cette hormone ; à savoir les gènes *SICYP707A1*, *SICYP707A2* et *SICYP707A3* sont nettement réprimés chez le mutant *ARF4-as* à la fois en cas de stress salin ou hydrique. Plusieurs études se sont penchées sur l'évaluation de l'expression des gènes impliqués dans la signalisation de l'ABA en conditions de stress. Ainsi, une augmentation de la transcription des gènes du *CYP707A* a été rapportée en réponse au stress salin ou hydrique. En effet, Yang et son équipe ont pu déceler une augmentation significative des transcrits

du *CYP707A3* chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) en cas de déficit hydrique bien qu'aucune modification dans l'expression du *CYP707A1* et du *CYP707A2* n'a été observée (Yang and Zeevaart, 2006). Une nette induction de l'expression des gènes *CYP707A1* et *CYP707A4* a été par contre observée chez *Arabidopsis* en réponse à 250 mM de NaCl (Saito et al., 2004). Ce même constat a été rapporté par Liu et ses collaborateurs chez les plantes d'arachide (*Arachis hypogaea*) sujettes à un stress osmotique induit par le PEG 6000 ou le NaCl (Guo et al., 2009). Chez *Arabidopsis thaliana*, Le mutant de perte de fonction *cyp707a3-1* tolère mieux le stress hydrique grâce à une forte accumulation de l'ABA couplée à une nette réduction de l'évapotranspiration (Umezawa et al., 2006). De cela, nous pouvons en conclure que la sous-expression des gènes *CYP707A* chez le mutant *ARF4-as* en conditions de stress salin et hydrique pourrait empêcher la dégradation de l'ABA. Ainsi, les teneurs élevées en ABA observées chez le mutant *ARF4-as* en conditions de stress salin et hydrique peuvent être expliquées à la fois par la stimulation de la biosynthèse de l'ABA suite à la sur-expression des gènes de biosynthèse et à l'inhibition du processus de dégradation à cause de la répression des gènes de catabolisme.

#### **3.2.4. La détoxification des ROS- étude de l'expression des gènes impliqués**

Les stress abiotiques tels que la salinité, la sécheresse, les températures extrêmes ... engendrent une production excessive d'espèces réactives d'oxygène (ROS) ; des molécules hautement réactives et toxiques qui causent des dommages aux protéines, aux lipides, aux hydrates de carbone et à l'ADN et occasionnent par conséquent un stress oxydatif (Gill and Tuteja, 2010). La capacité des plantes à atténuer les effets négatifs des contraintes abiotiques dépend en grande partie de l'efficacité des systèmes de défense antioxydants pour protéger les cellules végétales des dommages oxydatifs en éliminant les ROS accumulés en raison du stress abiotique. La machinerie cellulaire des plantes est dotée d'un système efficace d'antioxydants enzymatiques (la catalase, la superoxyde dismutase (SOD), la monodehydroascorbate réductase (MDHAR), la déshydroascorbate réductase (DHAR)) et non enzymatiques (Das and Roychoudhury, 2014). L'expression de gènes codant pour certains antioxydants enzymatiques (*Cat1*, *mdhar* et *Cu/ZnSOD*) a été évaluée chez le WT et les lignées transgéniques pour l'*ARF4* après exposition au stress salin et hydrique.

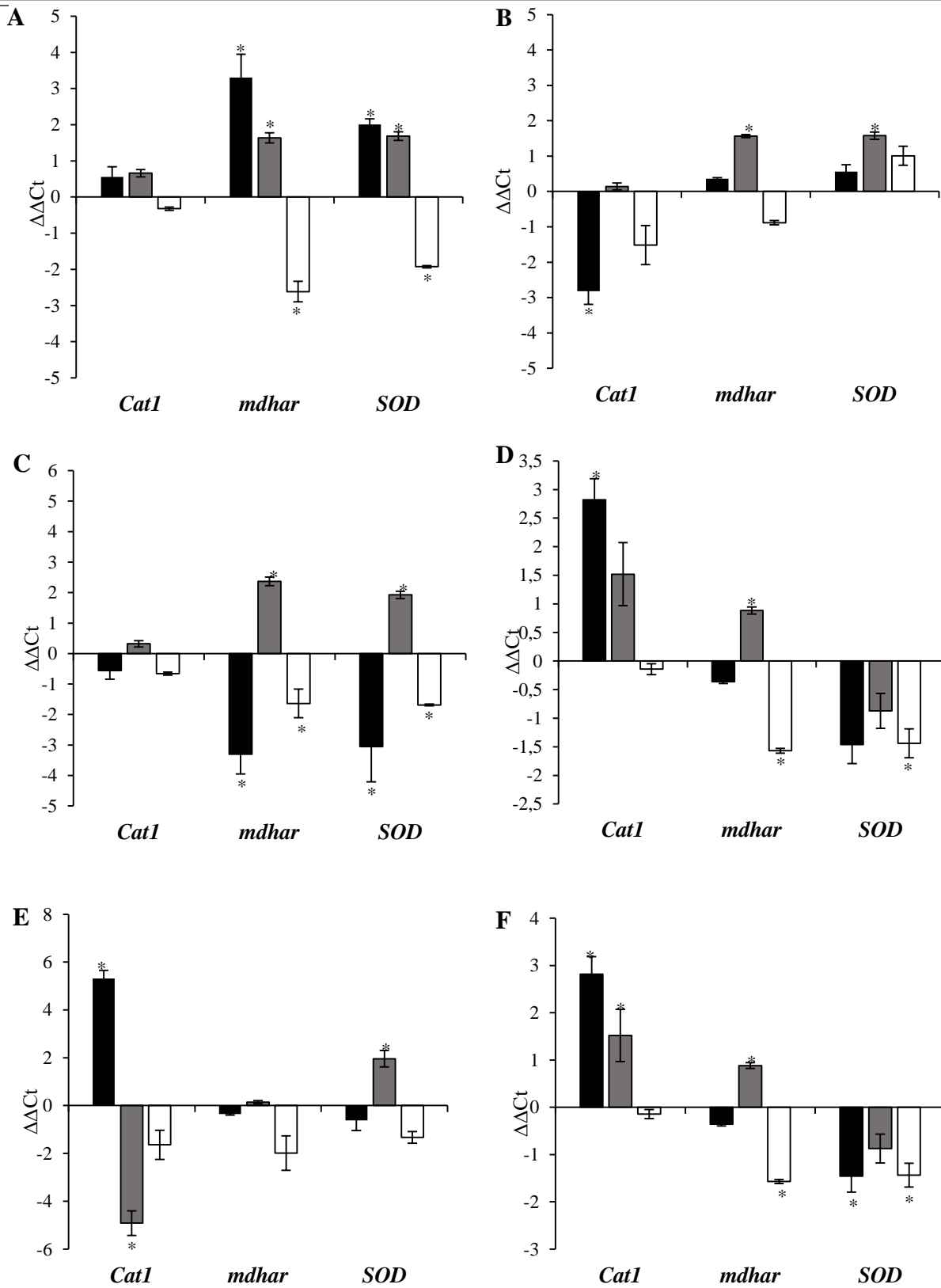
### 3.2.4.1. Expression du gène codant pour la catalase

Les catalases sont des enzymes tétramériques hème-dépendantes dotées d'un potentiel de dismutation directe de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$ . De ce fait, elle est essentielle pour la désintoxication des ROS produites au moment de stress (Gill and Tuteja, 2010). Chez les angiospermes, la catalase est codée par trois gènes connus sous le nom de *Cat1*, *Cat2* et *Cat3* (Das and Roychoudhury, 2014).

L'expression du gène *Cat1* a été quantifiée chez le WT et chez les mutants *ARF4-as* et *ARF4-ox* exposées au stress salin et hydrique (Figure 38). Nos résultats montrent que l'expression du gène *Cat1* est significativement réprimée dans les racines des plantes WT après 2 heures d'application du stress salin tandis que son expression reste inchangée chez le mutant *ARF4-as* et *ARF4-ox* (Figure 39B). Au niveau aérien, aucune modification significative n'a été détectée chez les trois lignées de plantes (Figure 39A). Après 24 heures d'application du stress salin, l'expression du gène *Cat1* est induite d'une manière significative dans les racines des plantes *ARF4-as* et des plantes WT bien qu'aucun changement significatif dans l'expression de ce gène n'est détecté dans les feuilles chez ces trois lignées (Figure 39C, D).

En réponse au stress hydrique, l'expression du gène *Cat1* connaît une induction nettement significative au niveau de la partie aérienne (32 fois) et racinaire des plantes WT (8 fois) et dans les racines des plantes *ARF4-as*. En revanche, le gène *Cat1* est significativement réprimée dans les feuilles des plantes *ARF4-as* (16 fois). Le mutant *ARF4-ox* ne présente aucune modification significative dans l'expression de ce gène (Figure 39E, F).

L'expression du gène codant pour la catalase (*Cat1*) dans les feuilles et les racines des plantes WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* exposées aux stress salin ou hydrique a révélé que son expression est nettement surexprimée chez le mutant *ARF4-as* ce qui laisse suggérer que ce mutant pourrait mieux tolérer ces deux stress. En effet, plusieurs études ont établi une corrélation entre la tolérance aux stress salin et hydrique et une production de la catalase. Ainsi, une augmentation de l'activité de la catalase 1 a été signalée chez le blé en réponse au déficit hydrique et chez la patate douce en réponse au stress salin (Luna *et al.* 2005; Yong *et al.* 2017). La surexpression du gène *cat1* (d'origine bactérienne) améliore d'une manière considérable la tolérance à la salinité à la fois chez la tomate et chez le tabac (Al-Taweel *et al.* 2007; Mohamed *et al.* 2003). Chez le Riz, l'expression constitutive de ce même gène confère une meilleure tolérance au stress salin aux plantes transgéniques (Moriwaki *et al.*, 2008).



**Figure 39** Expression des gènes impliqués dans le processus de détoxification des ROS chez le WT et les mutants *ARF4*-as et *ARF4*-ox en conditions de stress salin et hydrique. Expression au niveau des feuilles (A) et des racines (B) après 2 heures d'application du stress salin, au niveau des feuilles (C) et des racines (D) après 24 heures d'application du stress salin, au niveau des feuilles (E) et des racines (F) après 48 heures d'application du stress hydrique. Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta Ct \pm$  écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.4.2. Expression du gène codant pour le superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme de la famille des métalloenzymes omniprésente chez tous les organismes aérobiques. Cet enzyme permet l'élimination de l' $O_2^-$  en catalysant la réaction de dismutation de l' $O_2^-$  en  $H_2O_2$  et  $O_2$  et ainsi constitue la première ligne de défense contre les dommages induits par les ROS (Choudhury et al., 2013; Gill and Tuteja, 2010). En fonction de l'ion métallique auquel elles sont associées, les SOD sont classées en trois isoenzymes ; MnSOD (localisée dans les mitochondries), FeSOD (localisée dans les chloroplastes) et Cu/ZnSOD (localisée dans le cytosol, les peroxisomes et les chloroplastes) (Das and Roychoudhury, 2014).

L'expression du SOD a été évaluée chez le WT et les mutants *ARF4-as* et *ARF4-ox* après 2 heures et 24 heures d'application du stress salin (Figure 39). Nos résultats montrent que l'expression du gène SOD est significativement modifiée par le stress. Ainsi, on constate une induction significative de l'expression de celui-ci dans les feuilles des plantes WT et *ARF4-as* après 2 heures de stress alors qu'elle est nettement réprimée chez le mutant *ARF4-ox*. Dans les racines, le gène SOD est 3 fois plus exprimé chez le mutant *ARF4-as*. En revanche, aucun changement d'ordre significatif n'est détecté chez le WT et le mutant *ARF4-ox* au niveau racinaire. 24 heures d'exposition au NaCl résulte en une répression significative de l'expression du gène SOD chez le WT et le mutant *ARF4-ox*. Or, chez le mutant *ARF4-as*, le gène SOD est significativement surexprimé. Dans les racines, aucun changement significatif n'est détecté sauf pour le mutant *ARF4-ox* chez lequel l'expression de ce gène est nettement réprimée.

Il est fortement admis que les stress abiotiques induisent la production du superoxyde en raison de l'altération du transport d'électrons dans les chloroplastes des cellules végétales (Wang, Wang, Kwon, Kwak & Su 2005). L'élimination du superoxyde dépend généralement de l'activité de la superoxide dismutase SOD. Ainsi, plusieurs études ont rapporté une augmentation significative de l'activité de la SOD en réponse au stress osmotique chez de nombreuses espèces végétales telles que la tomate (Gapińska et al., 2008), le pois chiche (*Cicer arietinum*) (Kukreja et al., 2005), la pomme de terre (Aghaei et al., 2009) et de mûrier (Ahmad et al., 2014). Les génotypes de petit-pois tolérants (*Pisum sativum*) tolèrent mieux le stress salin en partie grâce au pouvoir chélateur des enzymes Mn-SOD mitochondriale et de CuZn-SOD chloroplastique (Hernández et al., 1994). Une augmentation de l'activité du superoxide dismutase a été observée chez l'olivier et le riz en réponse au stress hydrique (Szöllősi, 2014). La manipulation génétique des gènes codant pour les isoformes de la SOD

permet d'améliorer la tolérance des plantes aux stress abiotiques. Chez *Arabidopsis*, l'expression constitutive du gène MnSOD confère une meilleure tolérance au stress salin chez les plantes transgéniques (Wang et al., 2004d). L'introduction du gène Cu / ZnSOD de la tomate dans les plantes de pomme de terre aboutit à l'augmentation de la tolérance de ces plantes au paraquat (Perl et al., 1993). De même, la surexpression de la forme cytosolique du Cu / Zn-SOD du riz dans les chloroplastes de tabac améliore les performances photosynthétiques des plantes exposées au stress oxydatif (Badawi et al., 2004).

#### 3.2.4.3. Expression du gène codant pour le monodehydroxyascorbate réductase

La monodehydroxyascorbate réductase (MDHAR) est un antioxydant enzymatique impliqué d'une manière indirecte dans la détoxification des ROS. En effet, elle intervient dans la régénération de l'acide ascorbique ; indispensable à la dismutation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par l'enzyme Ascorbate peroxydase ou APX (Das and Roychoudhury, 2014).

L'expression du gène *mdhar* a été déterminée dans les feuilles et les racines des plantes WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* après exposition à 150 mM de NaCl ou à 15% de PEG (Figure 39). Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 38. En réponse au stress salin, l'expression du gène *mdhar* est induite d'une manière significative chez le mutant *ARF4-as* après 2 heures et après 24 heures d'application du stress. En revanche, une induction (significative) de l'expression de ce gène est détectée dans les feuilles des plantes WT après 2 heures de stress alors qu'on observe une repression significativement importante de son expression après 24 heures d'application du stress. Le mutant *ARF4-ox* ne présente aucun changement significatif dans l'expression de celui-ci.

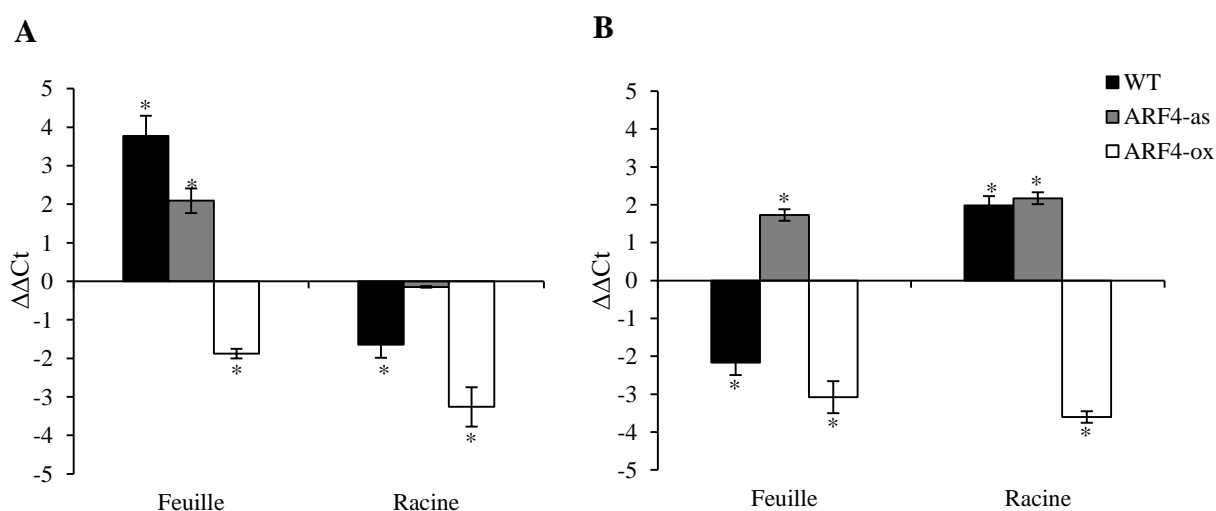
L'exposition des plantes des différentes lignées au stress hydrique induit une modification dans l'expression du gène *mdhar*. Ainsi, on note une induction nettement significative de l'expression du gène *mdhar* dans les racines du mutant *ARF4-as* tandis que son expression est significativement reprimée chez le mutant *ARF4-ox*. Chez le WT, aucune modification significative dans l'expression n'est détectée. De même pour le mutant *ARF4-as* et *ARF4-ox* au niveau aérien.

Le MDHAR semble jouer un rôle important dans la voie de détoxification des ROS d'ascorbate-glutathion en restaurant l'ascorbate (AsA) utilisé comme donneur d'électrons pour piéger les molécules de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gill et al., 2013). Plusieurs études ont souligné le rôle protecteur du *mdhar* dans la tolérance des plantes à divers stress abiotiques. Sharma & Shanker Dubey (2005) ont signalé une augmentation de l'activité de MDHAR chez les plantes

de riz exposés au stress hydrique (Sharma and Dubey, 2005). Ce constat a également été observé dans le blé (*Triticum aestivum*) et le mûrier (*Morus alba*) soumis à un stress hydrique (Reddy et al., 2004). Chez le tabac, la surexpression de *mdhar* augmente la tolérance des plantes transgéniques à la salinité et au déficit hydrique (Eltayeb et al., 2006). Suite à l'application du stress salin ou hydrique, l'expression du gène *mdhar* est significativement induite chez le mutant *ARF4-as* ce qui laisse suggérer que celui-ci pourrait mieux tolérer le stress hydrique et salin. En effet, la régulation à la hausse de ce gène pourrait réduire les dommages occasionnés par l'accumulation des espèces réactives d'oxygène et ainsi augmenter la survie des plantes.

### 3.2.5. Séquestration des ions –expression du gène codant pour l'antiport vacuolaire

Le contrôle du transport des ions  $\text{Na}^+$  à l'intérieur des cellules est crucial pour l'acquisition de la tolérance au stress hydrique et salin (Abiotic Stress Adaptation in Plants, 2010 ; Mahajan and Tuteja, 2005). Plusieurs gènes sont impliqués dans le contrôle du mouvement des ions  $\text{Na}^+$  dans l'ensemble de la plante. Parmi eux, l'antiport vacuolaire de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$   $\text{NHX}_1$  est impliqué dans les échanges de cations et de protons à travers les membranes cellulaires et contribuent à la régulation du pH cellulaire (Hasegawa et al. 2000 ; Padan et al. 2001 ; Horie et Schroeder 2004 ; Pardo et al. 2006). Il joue un rôle primordial dans l'homéostasie cellulaire et permet en particulier, la séquestration des ions  $\text{Na}^+$  à l'intérieur des vacuoles et, par conséquent, ils améliorent la tolérance à la salinité et au stress osmotique chez les plantes. L'expression du gène *LeNHX1* a été étudiée chez les plantes WT, *ARF4-as* et *ARF4-ox* exposées au stress salin ou hydrique (Figure 40).



**Figure 40** Expression de *LeNHX1*; gène codant pour un transporteur d'ions chez la lignée sauvage WT, le mutant *ARF4-as* et le mutant *ARF4-ox* en réponse aux stress salin(A) et hydrique (B). Les valeurs sont représentées en moyenne des  $\Delta\Delta\text{Ct} \pm$  écart type de répétitions biologiques indépendantes. Le signe (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ ).



En réponse au stress salin, l'expression du gène *LeNHX1* a montré une forte répression dans les feuilles des plantes *ARF4-ox*, tandis que son expression est remarquablement induite chez les plantes WT et *ARF4-as*. Dans les racines, l'expression de *LeNHX1* est réprimée chez les trois lignées. L'exposition au PEG induit une nette surexpression (significative) du gène *LeNHX1* chez le mutant *ARF4-as* tandis que ce gène connaît une répression remarquable chez les plantes *ARF4-ox*.

Les fonctions cellulaires végétales sont tributaires d'un rapport  $K^+/Na^+$  élevé. En présence d'une forte concentration en NaCl, les ions  $Na^+$  entrent en compétition avec les ions  $K^+$  à travers les co-transporteurs  $Na^+-K^+$  ou même les transporteurs  $K^+$  spécifiques des cellules racinaires (Zhu, 2003). Ce déséquilibre ionique entraîne des niveaux toxiques de  $Na^+$  et des concentrations en  $K^+$  insuffisantes pour les réactions enzymatiques et l'ajustement osmotique. Les plantes ont développé des stratégies de réponse pour réduire les effets néfastes occasionnés par l'excès des ions  $Na^+$  dans les tissus végétaux. La séquestration de ces ions dans la vacuole représente l'une de ces stratégies. Cette séquestration vacuolaire permet non seulement d'abaisser les concentrations cytoplasmiques en  $Na^+$  mais aussi d'ajuster le potentiel osmotique (Yokoi et al., 2002 ; Zhu, 2003). Elle est assurée par des antiports  $Na^+/H^+$  (NHX). Plusieurs études ont montré l'importance des protéines NHX dans la tolérance au stress (Moshaei et al., 2014 ; Rodríguez-Rosales et al., 2009 ; Yokoi et al., 2002). Chez *Arabidopsis*, Yokoi et ses collaborateurs ont rapporté une accumulation des transcrits du gène *AtNHX1* en réponse au stress salin ou osmotique (Yokoi et al., 2002). La surexpression du gène *AtNHX1* d'*Arabidopsis thaliana* chez la tomate induit une augmentation de la concentration vacuolaire des ions  $K^+$  et stimule de manière considérable le transport de ces ions de la racine vers les feuilles, ce qui entraîne une augmentation du ratio  $K^+/Na^+$  et réduit par conséquent les effets négatifs des ions  $Na^+$  (Barragán et al, 2012). Outre *Arabidopsis*, la tolérance à la salinité a été obtenue chez un certain nombre d'espèces cultivées telles que *Brassica napus* (Zhang et al., 2001), le coton (He et al., 2005), le riz (Verma et al., 2007), le blé (Xue et al., 2004) et l'orge (Fukuda et al., 2004) et ceci grâce à l'expression constitutive du gène *AtNHX1* ou l'un de ces homologues. La surexpression du gène *LeNHX1* chez le mutant *ARF4-as* pourrait améliorer la tolérance de ce dernier au stress salin et hydrique en réduisant les effets délétères de l'excès de  $Na^+$  grâce à la séquestration de ces ions toxiques dans les vacuoles.

L'*ARF4* joue un rôle crucial dans la régulation de plusieurs processus tels que le développement des racines latérales, le développement et la maturité du fruit (Jones et al. 2002 ; Marin et al. 2010; Sagar et al. 2013). Les résultats présentés dans ce chapitre ont montré que le gène *ARF4* intervient également dans l'acquisition de la tolérance aux stress salin et hydrique chez la tomate. En utilisant une approche de génétique inverse, nous avons constaté que la sous-expression de ce gène confère une meilleure tolérance à ces stress chez les plantes. En effet, le mutant de sous-expression présente un bon développement racinaire, un enroulement sévère des feuilles, une teneur élevée en chlorophylle en sucres solubles en conditions de stress. A ceci s'ajoute une faible conductance stomatique, une teneur élevée en eau et en ABA. Sur le plan moléculaire, la sous-expression du gène *SIARF4* résulte en une surexpression des gènes impliqués dans la détoxification des ROS, le transport des sucres ou des ions ce qui confère aux plantes transgéniques une meilleure tolérance vis-à-vis de ces stress.

Les données présentées dans ce chapitre ont montré que le gène *SIARF4* intervient dans l'acquisition de la tolérance à la salinité et à la sécheresse chez la tomate, offrant ainsi de nouvelles perspectives pour l'amélioration de la tolérance de la tomate à ces deux stress.

# Conclusion Générale et Perspectives

Les stress environnementaux constituent un défi majeur pour le maintien du rendement des cultures. La tolérance des plantes à ces contraintes dépend de la mise en œuvre de mécanismes moléculaires, résultant de l'activation des cascades de perception du signal et de transduction, des réseaux de transcription et des voies métaboliques adaptatives. La connaissance des mécanismes moléculaires développés par les plantes s'avère incontournable pour l'amélioration de la tolérance aux stress environnementaux. En effet, ils constituent une perspective intéressante le développement d'outils permettant la sélection et le développement de nouvelles variétés capables d'assurer une production optimale dans des conditions environnementales de plus en plus difficiles.

L'auxine est une hormone importante qui exerce des effets pléiotropiques sur la croissance des plantes, en contrôlant un large éventail de processus vitaux comme le développement des racines, la différenciation des tissus vasculaires, la formation des bourgeons axillaires, la dominance apicale, le développement floral et la maturation des fruits. Plusieurs progrès ont été réalisés pour identifier les mécanismes moléculaires par lesquels cette hormone module la croissance et le développement des plantes. Par contre, nos connaissances sur l'implication de l'auxine dans les réponses aux stress biotique et abiotique restent encore limitées. Ce n'est que récemment que certaines études ont souligné une implication potentielle de cette hormone dans la mise en place des réponses aux stress environnementaux.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'implication de l'auxine dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques. Une analyse d'expression combinée à une analyse fonctionnelle de facteurs de réponse à l'auxine a été réalisée en vue d'étudier l'implication de ces acteurs clés de la voie de signalisation de l'auxine dans le processus de réponse aux stress chez la tomate.

La première partie de cette thèse a été consacrée à l'étude générale de la réponse des facteurs de réponse à l'auxine aux stress biotiques. Ainsi, une analyse *in silico* de leur expression a montré une régulation négative de la majorité des *ARFs* suite à l'infection par des agents bactériens ou viraux. A ce constat s'ajoute la présence de plusieurs éléments *cis*-régulateurs spécifiques à ces stress ce qui laisse suggérer que ces facteurs de transcription jouent un rôle important dans la réponse aux stress biotiques et montrent clairement l'implication de l'auxine dans ce processus. Une caractérisation fonctionnelle de l'ensemble des *ARFs* dont l'expression est régulée par les différents stress de nature biotique est à envisager afin d'élucider le rôle des ces régulateurs transcriptionnels dans la réponse de la tolérance ces types de stress.

Dans le but d'évaluer l'implication de l'auxine dans la réponse aux stress abiotiques chez la tomate, une analyse d'expression des ARFs en réponse à ces stress par PCR quantitative a été réalisée. Les résultats obtenus montrent clairement une nette régulation de ces gènes par le stress salin, hydrique et d'hypoxie. De plus, l'analyse *in silico* de la région promotrice des 22 ARFs a montré la richesse de celle-ci en éléments *cis*-régulateurs associés à la réponse aux stress abiotiques (salin, hydrique et thermique). Ainsi, ces résultats suggèrent que les facteurs de réponse à l'auxine interviennent de près dans la réponse de la tomate aux stress abiotiques et fournissent de nombreux candidats dont la fonction mérite d'être approfondie. L'évaluation de l'expression des précurseurs des *miR160* et *miR167* (*miR167a*, *miR167b*, *miR167c* et *miR167d*) et de leurs gènes cibles *SIARF10* et *SIARF8* a permis de mettre à l'évidence une potentielle implication de ces miRNAs dans la régulation post-transcriptionnelle de l'*ARF8A* et l'*ARF10A* ce qui indique l'importance de ce processus dans la voie de signalisation de l'auxine et dans la réponse de la plante aux stress abiotiques. Ainsi, il serait intéressant d'explorer de près le rôle de ces miRNAs dans la régulation post-transcriptionnelle des ARFs en conditions de stress par le biais de l'étude du comportement de mutants ARFs exprimant une forme résistante à ces miRNA face aux différents stress. En outre, la connaissance de la fonction exacte de ces miRNA dans la régulation post-transcriptionnelle des ARFs représenterait un atout majeur pour la compréhension des mécanismes moléculaires déployés par les plantes pour faire face aux stress abiotiques.

L'analyse phénotypique des mutants *SIARF4* a montré la présence de certains caractères phénotypiques et physiologiques qui en font de bons candidats pour l'étude et l'amélioration de la tolérance aux stress hydrique et salin chez la tomate. Sur cette base, une analyse morphologique, physiologique et moléculaire a été effectuée. Les résultats obtenus dévoilent clairement que le mutant *ARF4-as* tolère mieux ces deux stress. En effet, ce mutant présente un système racinaire plus important, une teneur élevée en chlorophylle et une nette accumulation des sucres solubles en conditions de stress par rapport aux autres lignées. En outre, ce mutant exhibe une conductance stomatique faible, une teneur en eau relativement élevée associée à une forte accumulation de l'ABA en conditions de stress. Sur le plan moléculaire, la sous-expression du gène *SIARF4* induit la surexpression des gènes *Cat1*, *mdhar* et *SOD* ; impliqués dans le processus de détoxification des ROS. En perspective, il serait intéressant de quantifier la présence des espèces réactives d'oxygène formées telles que  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ..., et d'étudier en parallèle l'activité d'enzymes antioxydantes codées par les gènes étudiés. Compte tenu de la forte teneur en sucres dans la partie aérienne et racinaire des plantes *ARF4-as*, l'étude

---

d'expression du gène *LeSUT1* codant pour un transporteur des sucres a révélé une nette sur expression de celui-ci en réponse aux stress ce qui laisse supposer que ce gène pourrait jouer un rôle important dans le transport de sucres produits au niveau aérien dans les différentes parties de la plante. Les gènes de biosynthèse et de dégradation de l'ABA ont été régulés à la hausse et/ ou à la baisse chez le mutant *ARF4-as* expliquant ainsi les fortes teneurs en ABA observées en conditions de stress salin et hydrique. Malgré le fait que la sous-expression de l'*ARF4* confère une meilleure tolérance aux stress salin et hydrique, il reste beaucoup de travail à réaliser afin d'identifier les différents acteurs moléculaires impliqués dans ce phénomène. En perspective, cette étude pourrait être appuyée par une analyse complète du transcriptome en vue d'identifier de nouveaux éléments impliqués de la tolérance à ces stress et qui sont régulés par l'*ARF4* et par conséquent définir les différents acteurs impliqués dans l'acquisition de la tolérance chez le mutant de sous-expression de l'*ARF4*.

Hormis l'*ARF4*, d'autres ARFs répondent de manière différentielle aux stress salin et hydrique ce qui laisse suggérer que ces gènes peuvent jouer un rôle important dans la réponse et/ou la tolérance à ces stress. Ainsi, une caractérisation fonctionnelle de ces gènes est à envisager en vue d'approcher la fonction exacte de ces facteurs de transcription dans la signalisation auxinique. Toutefois, une redondance fonctionnelle au sein de la famille des *ARFs* n'est pas à écarter, ce qui pourra masquer tout effet dans ces lignées transgéniques. Ainsi, la génération des doubles et des multiples mutants s'avère indispensable et pourrait révéler certains aspects encore inconnus des fonctions des gènes *ARFs* dans la réponse aux stress.

Ce travail apporte de nouvelles informations sur l'implication de l'auxine dans la réponse aux stress chez la tomate. Une étude fonctionnelle menée sur le gène *SlARF4* a révélé que la sous expression de ce gène conduit à une meilleure tolérance aux stress salin et hydrique offrant ainsi, des perspectives encourageantes aussi bien au niveau fondamental que sur le niveau appliqué, pour le développement d'outils moléculaires pour la sélection et l'amélioration des plantes.

# Références bibliographiques

- Abel, S., and Theologis, A. (1996). Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* 111, 9–17.
- Aghaei, K., Ehsanpour, A. A., and Komatsu, S. (2009). Potato responds to salt stress by increased activity of antioxidant enzymes. *J. Integr. Plant Biol.* 51, 1095–1103.
- Ahmad, P., Ozturk, M., Sharma, S., and Guzel, S. (2014). Effect of sodium carbonate-induced salinity–alkalinity on some key osmoprotectants, protein profile, antioxidant enzymes, and lipid peroxidation in two mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *J. Plant Interact.* 9, 460–467.
- Ahmad, P., and Prasad, M. N. V. (2011). *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability*. Springer Science & Business Media.
- Akbari, G., Sanavy, S. A. M. M., and Yousefzadeh, S. (2007). Effect of auxin and salt stress (NaCl) on seed germination of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Pak. J. Biol. Sci. PJBS* 10, 2557–2561.
- Akinci, Ş., and Lösel, D. M. (2012). “Plant water-stress response mechanisms,” in *Water stress* (InTech).
- Alamgir, A., and Ali, M. Y. (1999). Effect of salinity on leaf pigments, sugar and protein concentrations and chloroplast ATPase activity of rice (*Oryza sativa* L.). *Bangladesh J. Bot.* 28, 145–149.
- Alcázar, R., Marco, F., Cuevas, J. C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., et al. (2006). Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnol. Lett.* 28, 1867–1876.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., and Ullrich, C. (2006). Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann. Bot.* 97, 883–893.
- Al-Taweel, K., Iwaki, T., Yabuta, Y., Shigeoka, S., Murata, N., and Wadano, A. (2007). A Bacterial Transgene for Catalase Protects Translation of D1 Protein during Exposure of Salt-Stressed Tobacco Leaves to Strong Light. *Plant Physiol.* 145, 258–265. doi:10.1104/pp.107.101733.
- Altinkut, A., Kazan, K., Ipekci, Z., and Gozukirmizi, N. (2001). Tolerance to paraquat is correlated with the traits associated with water stress tolerance in segregating F2 populations of barley and wheat. *Euphytica* 121, 81.
- Al-Whaibi, M. H. (2011). Plant heat-shock proteins: a mini review. *J. King Saud Univ.-Sci.* 23, 139–150.
- Amini, F., and Ehsanpour, A. (2006). Response of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars to MS, water agar and salt stress in in vitro culture. *Asian J Plant Sci* 9, 170–175.
- Andres-Robin, A. (2012). Rôle d’ETTIN/ARF3 dans le développement du carpelle chez *Arabidopsis thaliana*.
- Anonyme (2016). La sélection génétique de la tomate. <https://www.supagro.fr/wordpress/apimet20160921-Sel.-Genet.-Tomate-Mariem>. Available at: [https://www.researchgate.net/publication/249920205\\_Difference\\_in\\_the\\_root\\_structure\\_of\\_hyperaccumulator\\_Thlaspi\\_caerulescens\\_and\\_non-hyperaccumulator\\_Thlaspi\\_arvense](https://www.researchgate.net/publication/249920205_Difference_in_the_root_structure_of_hyperaccumulator_Thlaspi_caerulescens_and_non-hyperaccumulator_Thlaspi_arvense) [Accessed April 1, 2019].
- Asano, T., Hayashi, N., Kikuchi, S., and Ohsugi, R. (2012). CDPK-mediated abiotic stress signaling. *Plant Signal. Behav.* 7, 817–821.
- Ashraf, M., and Foolad, Mr. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59, 206–216.
- Atkinson, N. J., and Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J. Exp. Bot.* 63, 3523–3543.
- Aubert, Y. (2011). Rôles de deux protéines à EF-Hand dans les réponses au stress hydrique et à l’acide abscissique. Analyse fonctionnelle de RD20, une caléosine et de CML9, une forme divergente de calmoduline.



- Azevedo, R., Alas, R., Smith, R., and Lea, P. (1998). Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* 104, 280–292.
- Aziki, O. (2014). Le dilemme du modèle agro-exportateur marocain. Available at: <http://www.cadtm.org/Le-dilemme-du-modele-agro> [Accessed October 27, 2016].
- Badawi, G. H., Yamauchi, Y., Shimada, E., Sasaki, R., Kawano, N., Tanaka, K., et al. (2004). Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. *Plant Sci.* 166, 919–928.
- Bari, R., and Jones, J. D. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 69, 473–488.
- Barragán, V., Leidi, E. O., Andrés, Z., Rubio, L., De Luca, A., Fernández, J. A., et al. (2012). Ion Exchangers NHX1 and NHX2 Mediate Active Potassium Uptake into Vacuoles to Regulate Cell Turgor and Stomatal Function in Arabidopsis[W][OA]. *Plant Cell* 24, 1127–1142. doi:10.1105/tpc.111.095273.
- Barsan, C., Sanchez-Bel, P., Rombaldi, C., Egea, I., Rossignol, M., Kuntz, M., et al. (2010). Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. *J. Exp. Bot.* 61, 2413–2431. doi:10.1093/jxb/erq070.
- Basal, H. (2010). Response of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genotypes to salt stress. *Pak J Bot* 42, 505–511.
- Basal, H., Smith, C., Thaxton, P., and Hemphill, J. (2005). Seedling drought tolerance in upland cotton. *Crop Sci.* 45, 766–771.
- Bassa, C., Mila, I., Bouzayen, M., and Audran-Delalande, C. (2012). Phenotypes associated with down-regulation of SI-IAA27 support functional diversity among Aux/IAA family members in tomato. *Plant Cell Physiol.* 53, 1583–1595.
- Bauchet, G., and Causse, M. (2012). Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives.
- Bensen, R. J., Boyer, J. S., and Mullet, J. E. (1988). Water deficit-induced changes in abscisic Acid, growth, polysomes, and translatable RNA in soybean hypocotyls. *Plant Physiol.* 88, 289–294.
- Bertoša, B., Kojić-Prodić, B., Wade, R. C., and Tomić, S. (2008). Mechanism of auxin interaction with Auxin Binding Protein (ABP1): a molecular dynamics simulation study. *Biophys. J.* 94, 27–37.
- Bhalerao, R. P., Eklöf, J., Ljung, K., Marchant, A., Bennett, M., and Sandberg, G. (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in Arabidopsis seedlings. *Plant J.* 29, 325–332.
- Bhattacharjee, S. (2012). The language of reactive oxygen species signaling in plants. *J. Bot.* 2012.
- Bilang, J., Macdonald, H., King, P. J., and Sturm, A. (1993). A soluble auxin-binding protein from *Hyoscyamus muticus* is a glutathione S-transferase. *Plant Physiol.* 102, 29–34.
- Blanca, J., Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M. J., et al. (2015). Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics* 16, 1.
- Bohn-Courseau, I. (2010). Auxin: a major regulator of organogenesis. *C. R. Biol.* 333, 290–296.
- Boudsocq, M., and Laurière, C. (2005). Osmotic signaling in plants. Multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiol.* 138, 1185–1194.
- Bouzroud, S., Gouiaa, S., Hu, N., Bernadac, A., Mila, I., Bendaou, N., et al. (2018). Auxin Response Factors (ARFs) are potential mediators of auxin action in tomato response to biotic and abiotic stress (*Solanum lycopersicum*). *PloS One* 13, e0193517.
- Bray, E. (2002). Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the Arabidopsis genome. *Plant Cell Environ.* 25, 153–161.

- Broughton, W., and Dilworth, M. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem. J.* 125, 1075–1080.
- Brugnoli, E., and Lauteri, M. (1991a). Effects of Salinity on Stomatal Conductance, Photosynthetic Capacity, and Carbon Isotope Discrimination of Salt-Tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and Salt-Sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C3 Non-Halophytes. *Plant Physiol.* 95, 628–635. doi:10.1104/pp.95.2.628.
- Brugnoli, E., and Lauteri, M. (1991b). Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity, and carbon isotope discrimination of salt-tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt-sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C3 non-halophytes. *Plant Physiol.* 95, 628–635.
- Burbidge, A., Grieve, T. M., Jackson, A., Thompson, A., McCarty, D. R., and Taylor, I. B. (1999). Characterization of the ABA-deficient tomato mutant notabilis and its relationship with maize Vp14. *Plant J.* 17, 427–431.
- Burssens, S., Himanen, K., Van de Cotte, B., Beeckman, T., Van Montagu, M., Inzé, D., et al. (2000). Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211, 632–640.
- Cai, H., Chen, F., Mi, G., Zhang, F., Maurer, H. P., Liu, W., et al. (2012). Mapping QTLs for root system architecture of maize (*Zea mays* L.) in the field at different developmental stages. *Theor. Appl. Genet.* 125, 1313–1324.
- Calderon-Villalobos, L. I., Tan, X., Zheng, N., and Estelle, M. (2010). Auxin perception—structural insights. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a005546.
- Cao, Y.-R., Chen, S.-Y., and Zhang, J.-S. (2008). Ethylene signaling regulates salt stress response. *Plant Signal. Behav.* 3, 761–763. doi:10.4161/psb.3.10.5934.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R. P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., et al. (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13, 843–852.
- Chaabouni, S., Jones, B., Delalande, C., Wang, H., Li, Z., Mila, I., et al. (2009). SI-IAA3, a tomato Aux/IAA at the crossroads of auxin and ethylene signalling involved in differential growth. *J. Exp. Bot.* 60, 1349–1362. doi:10.1093/jxb/erp009.
- Chaves, M. (1991). Effects of water deficits on carbon assimilation. *J. Exp. Bot.* 42, 1–16.
- Chen, J., Shimomura, S., Sitbon, F., Sandberg, G., and Jones, A. M. (2001). The role of auxin-binding protein 1 in the expansion of tobacco leaf cells. *Plant J.* 28, 607–617.
- Chen, T. H., and Murata, N. (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 250–257.
- Chen, T. H., and Murata, N. (2011). Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant Cell Environ.* 34, 1–20.
- Chen, X. (2005). microRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett.* 579, 5923–5931. doi:10.1016/j.febslet.2005.07.071.
- Chen, Z., Hu, L., Han, N., Hu, J., Yang, Y., Xiang, T., et al. (2014). Overexpression of a miR393-resistant form of transport inhibitor response protein 1 (mTIR1) enhances salt tolerance by increased osmoregulation and Na<sup>+</sup> exclusion in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, pcu149.
- Cheng, Y., and Zhao, Y. (2007). A Role for Auxin in Flower Development. *J. Integr. Plant Biol.* 49, 99–104. doi:10.1111/j.1744-7909.2006.00412.x.
- Chernys, J. T., and Zeevaert, J. A. (2000). Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. *Plant Physiol.* 124, 343–354.

- Cho, S. H., von Schwartzberg, K., and Quatrano, R. (2009). "The Role of Abscisic Acid in Stress Tolerance," in *Annual Plant Reviews Volume 36: The Moss Physcomitrella patens*, eds. C. D. Knight, P.-F. Perroud, and D. J. Cove (Wiley-Blackwell), 282–297. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781444316070.ch11/summary> [Accessed November 30, 2016].
- Colom, M., and Vazzana, C. (2003). Photosynthesis and PSII functionality of drought-resistant and drought-sensitive weeping lovegrass plants. *Environ. Exp. Bot.* 49, 135–144.
- Comas, L., Becker, S., Cruz, V. M. V., Byrne, P. F., and Dierig, D. A. (2013). Root traits contributing to plant productivity under drought. *Front. Plant Sci.* 4, 442.
- Consortium, T. T. G. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485, 635–641. doi:10.1038/nature11119.
- Cordovilla, M., Ocana, A., Ligeró, F., and Lluch, C. (1995). Growth stage response to salinity in symbiosis *Vicia faba*-*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Plant Physiol* 14, 105–111.
- Cornic, G. (2000). Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture—not by affecting ATP synthesis. *Trends Plant Sci.* 5, 187–188.
- Correia, M., and Pereira, J. (1995). The control of leaf conductance of white lupin by xylem ABA concentration decreases with the severity of water deficits. *J. Exp. Bot.* 46, 101–110.
- Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8 Available at: <http://www.nature.com/onc/journal/v18/n48/full/1203093a.html> [Accessed September 3, 2015].
- Cui, F., Wu, S., Sun, W., Coaker, G., Kunkel, B., He, P., et al. (2013). The *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 promotes pathogen virulence via stimulating *Arabidopsis* auxin/indole acetic acid protein turnover. *Plant Physiol.* 162, 1018–1029.
- Damour, G., Simonneau, T., Cochard, H., and Urban, L. (2010). An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. *Plant Cell Environ.* 33, 1419–1438.
- Darwin, S. C., Knapp, S., and Peralta, I. E. (2003). Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae). *Syst. Biodivers.* 1, 29–53.
- Das, K., and Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 2, 53.
- David, K. M., Couch, D., Braun, N., Brown, S., Grosclaude, J., and Perrot-Rechenmann, C. (2007). The auxin-binding protein 1 is essential for the control of cell cycle. *Plant J.* 50, 197–206.
- del Pozo, J. C., Diaz-Trivino, S., Cisneros, N., and Gutierrez, C. (2006). The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCF/SKP2A pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 2224–2235.
- Demkura, P. V., Abdala, G., Baldwin, I. T., and Ballaré, C. L. (2010). Jasmonate-Dependent and -Independent Pathways Mediate Specific Effects of Solar Ultraviolet B Radiation on Leaf Phenolics and Antiherbivore Defense. *Plant Physiol.* 152, 1084–1095. doi:10.1104/pp.109.148999.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., et al. (2005). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev. Cell* 9, 109–119.
- Dionisio-Sese, M. L., and Tobita, S. (2000). Effects of salinity on sodium content and photosynthetic responses of rice seedlings differing in salt tolerance. *J. Plant Physiol.* 157, 54–58.
- Dogan, M., Tipirdamaz, R., and Demir, Y. (2010). Salt resistance of tomato species grown in sand culture. *Plant Soil Env.* 56, 499–507.

- dos Reis, S. P., Lima, A. M., and de Souza, C. R. B. (2012). Recent molecular advances on downstream plant responses to abiotic stress. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 8628–8647.
- Dowd, C., Wilson, I. W., and McFadden, H. (2004). Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 17, 654–667.
- Du, H., Liu, H., and Xiong, L. (2013). Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Front. Plant Sci.* 4. doi:10.3389/fpls.2013.00397.
- Dubey, R., and Singh, A. (1999). Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolising enzymes in rice plants. *Biol. Plant.* 42, 233–239.
- DuBois, M. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28, 350–356.
- Durley, R., Kannangara, T., Simpson, G., and Seetharama, N. (1983). DROUGHT RESISTANCE OF Sorghum bicolor. 5. GENOTYPIC DIFFERENCES IN THE CONCENTRATIONS OF FREE AND CONJUGATED ABSCISIC, PHASEIC AND INDOLE-3-ACETIC ACIDS IN LEAVES OF FIELD-GROWN DROUGHT-STRESSED PLANTS. *Can. J. Plant Sci.* 63, 131–145.
- Eckardt, N. A. (2001). New insights into auxin biosynthesis. *Plant Cell* 13, 1–3.
- Eklund, D. M., Thelander, M., Landberg, K., Ståldal, V., Nilsson, A., Johansson, M., et al. (2010). Homologues of the Arabidopsis thaliana SHI/STY/LRP1 genes control auxin biosynthesis and affect growth and development in the moss Physcomitrella patens. *Development* 137, 1275–1284.
- Ellis, C. M., Nagpal, P., Young, J. C., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., and Reed, J. W. (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in Arabidopsis thaliana. *Development* 132, 4563–4574.
- Eltayeb, A. E., Kawano, N., Badawi, G. H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Morishima, I., et al. (2006). Enhanced tolerance to ozone and drought stresses in transgenic tobacco overexpressing dehydroascorbate reductase in cytosol. *Physiol. Plant.* 127, 57–65.
- Estrada-Melo, A. C., Chao, Reid, M. S., and Jiang, C.-Z. (2015). Overexpression of an ABA biosynthesis gene using a stress-inducible promoter enhances drought resistance in petunia. *Hortic. Res.* 2. doi:10.1038/hortres.2015.13.
- Etehadnia, M., Waterer, D. R., and Tanino, K. K. (2008). The Method of ABA Application Affects Salt Stress Responses in Resistant and Sensitive Potato Lines. *J. Plant Growth Regul.* 27, 331. doi:10.1007/s00344-008-9060-9.
- Eyidogan, F., and Öz, M. T. (2007). Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings. *Acta Physiol. Plant.* 29, 485–493.
- Eyidogan, F., Oz, M. T., Yucel, M., and Oktem, H. A. (2012). “Signal Transduction of Phytohormones Under Abiotic Stresses,” in *Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants*, eds. N. A. Khan, R. Nazar, N. Iqbal, and N. A. Anjum (Springer Berlin Heidelberg), 1–48. doi:10.1007/978-3-642-25829-9\_1.
- Fahad, S., Bajwa, A. A., Nazir, U., Anjum, S. A., Farooq, A., Zohaib, A., et al. (2017). Crop Production under Drought and Heat Stress: Plant Responses and Management Options. *Front. Plant Sci.* 8. doi:10.3389/fpls.2017.01147.
- Fahad, S., and Bano, A. (2012). Effect of salicylic acid on physiological and biochemical characterization of maize grown in saline area. *Pak. J. Bot.* 44, 1433–1438.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., and Basra, S. (2009). “Plant drought stress: effects, mechanisms and management,” in *Sustainable agriculture* (Springer), 153–188.

- Fayez, K. A., and Bazaid, S. A. (2014). Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 13, 45–55. doi:10.1016/j.jssas.2013.01.001.
- Flores, A., Grau, A., Laurich, F., and Dörffling, K. (1988). Effect of New Terpenoid Analogues of Abscisic Acid on Chilling and Freezing Resistance. *J. Plant Physiol.* 132, 362–369. doi:10.1016/S0176-1617(88)80121-4.
- Florina, F., Giancarla, V., Cerasela, P., and Sofia, P. (2013). The effect of salt stress on chlorophyll content in several Romanian tomato varieties. *J Hortic For. Biotechnol* 17, 363–367.
- Forcat, S., Bennett, M. H., Mansfield, J. W., and Grant, M. R. (2008). A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress. *Plant Methods* 4, 16.
- Friml, J. (2010). Subcellular trafficking of PIN auxin efflux carriers in auxin transport. *Eur. J. Cell Biol.* 89, 231–235.
- Frugoli, J. A., Zhong, H. H., Nuccio, M. L., McCourt, P., McPeck, M. A., Thomas, T. L., et al. (1996). Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* 112, 327–336.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., et al. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 436–442.
- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H., and Tasaka, M. (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 29, 153–168.
- Fukaki, H., Taniguchi, N., and Tasaka, M. (2006). PICKLE is required for SOLITARY-ROOT/IAA14-mediated repression of ARF7 and ARF19 activity during *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant J.* 48, 380–389.
- Fukuda, A., Chiba, K., Maeda, M., Nakamura, A., Maeshima, M., and Tanaka, Y. (2004). Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase, H<sup>+</sup>-ATPase subunit A, and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from barley. *J. Exp. Bot.* 55, 585–594.
- Gandonou, C. B., Bada, F., Abrini, J., and Skali-Senhaji, N. (2011). Free proline, soluble sugars and soluble proteins concentration as affected by salt stress in two sugarcane (*Saccharum* sp.) cultivars differing in their salt tolerance. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 5, 2441–2453.
- Gao, Y., Zhang, Y., Zhang, D., Dai, X., Estelle, M., and Zhao, Y. (2015). Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or *Arabidopsis* development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 2275–2280.
- Gapińska, M., Skłodowska, M., and Gabara, B. (2008). Effect of short-and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. *Acta Physiol. Plant.* 30, 11.
- Ghanashyam, C., and Jain, M. (2009). Role of auxin-responsive genes in biotic stress responses. *Plant Signal. Behav.* 4, 846–848.
- Gichner, T., Patková, Z., Száková, J., Žnidar, I., and Mukherjee, A. (2008). DNA damage in potato plants induced by cadmium, ethyl methanesulphonate and  $\gamma$ -rays. *Environ. Exp. Bot.* 62, 113–119.
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D. K., Ahmad, I., et al. (2013). Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiol. Biochem.* 70, 204–212.
- Gill, S. S., and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.
- Gilmour, S. J., Fowler, S. G., and Thomashow, M. F. (2004). *Arabidopsis* transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Mol. Biol.* 54, 767–781.

- Giri, J. (2011). Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal. Behav.* 6, 1746–1751.
- Goetz, M., Vivian-Smith, A., Johnson, S. D., and Koltunow, A. M. (2006). AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in Arabidopsis. *Plant Cell* 18, 1873–1886.
- Goh, T., Kasahara, H., Mimura, T., Kamiya, Y., and Fukaki, H. (2012). Multiple AUX/IAA–ARF modules regulate lateral root formation: the role of Arabidopsis SHY2/IAA3-mediated auxin signalling. *Phil Trans R Soc B* 367, 1461–1468.
- Golldack, D., Li, C., Mohan, H., and Probst, N. (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Abiotic Stress Mol. Genet. Genomics*, 15.
- Gomes, M. de M. de A., Lagôa, A. M. M. A., Medina, C. L., Machado, E. C., and Machado, M. A. (2004). Interactions between leaf water potential, stomatal conductance and abscisic acid content of orange trees submitted to drought stress. *Braz. J. Plant Physiol.* 16, 155–161.
- Gondim, F. A., Gomes-Filho, E., Costa, J. H., Alencar, N. L. M., and Prisco, J. T. (2012). Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize. *Plant Physiol. Biochem.* 56, 62–71.
- Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Lorenzo-Orts, L., Pons, C., Sarrion-Perdigones, A., Fernandez, M. A., et al. (2014). Tomato PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors show high expression in root, differential sensitivity to the abscisic acid agonist quinabactin, and the capability to enhance plant drought resistance. *J. Exp. Bot.*, eru219. doi:10.1093/jxb/eru219.
- Gray, W. M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., and Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414, 271–276.
- Greenham, K., Santner, A., Castillejo, C., Mooney, S., Sairanen, I., Ljung, K., et al. (2011). RETRACTED: The AFB4 Auxin Receptor Is a Negative Regulator of Auxin Signaling in Seedlings. *Curr. Biol.* 21, 520–525.
- Guilfoyle, T., Hagen, G., Ulmasov, T., and Murfett, J. (1998). How does auxin turn on genes? *Plant Physiol.* 118, 341–347.
- Guilfoyle, T. J. (2015). The PB1 Domain in Auxin Response Factor and Aux/IAA Proteins: A Versatile Protein Interaction Module in the Auxin Response[OPEN]. *Plant Cell* 27, 33–43. doi:10.1105/tpc.114.132753.
- Guilfoyle, T. J., and Hagen, G. (2007). Auxin response factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 453–460.
- Guo, A.-Y., Zhu, Q.-H., Gu, X., Ge, S., Yang, J., and Luo, J. (2008). Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene* 418, 1–8.
- Guo, D., Liang, J., and Li, L. (2009). Abscisic acid (ABA) inhibition of lateral root formation involves endogenous ABA biosynthesis in *Arachis hypogaea* L. *Plant Growth Regul.* 58, 173–179.
- Guóth, A., Tari, I., Gallé, Á., Csiszár, J., Pécsvárad, A., Cseuz, L., et al. (2009). Comparison of the Drought Stress Responses of Tolerant and Sensitive Wheat Cultivars During Grain Filling: Changes in Flag Leaf Photosynthetic Activity, ABA Levels, and Grain Yield. *J. Plant Growth Regul.* 28, 167–176. doi:10.1007/s00344-009-9085-8.
- Hamann, T., Benkova, E., Bäurle, I., Kientz, M., and Jürgens, G. (2002). The Arabidopsis BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev.* 16, 1610–1615. doi:10.1101/gad.229402.
- Hardtke, C. S., and Berleth, T. (1998). The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J.* 17, 1405–1411.
- Hardtke, C. S., Ckurshumova, W., Vidaurre, D. P., Singh, S. A., Stamatiou, G., Tiwari, S. B., et al. (2004). Overlapping and non-redundant functions of the Arabidopsis auxin response factors MONOPTEROS and NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4. *Development* 131, 1089–1100.

- Harinasut, P., Poonsopa, D., Roengmongkol, K., and Charoensataporn, R. (2003). Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. *Sci Asia* 29.
- Harper, R. M., Stowe-Evans, E. L., Luesse, D. R., Muto, H., Tatematsu, K., Watahiki, M. K., et al. (2000). The NPH4 locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial Arabidopsis tissue. *Plant Cell* 12, 757–770.
- Hassan, N. M., El-Bastawisy, Z. M., El-Sayed, A. K., Ebeed, H. T., and Alla, M. M. N. (2015). Roles of dehydrin genes in wheat tolerance to drought stress. *J. Adv. Res.* 6, 179–188.
- Hayashi, K. (2012). The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant Cell Physiol.* 53, 965–975.
- He, C., Yan, J., Shen, G., Fu, L., Holaday, A. S., Auld, D., et al. (2005). Expression of an Arabidopsis vacuolar sodium/proton antiporter gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fiber yield in the field. *Plant Cell Physiol.* 46, 1848–1854.
- He, X., Mu, R., Cao, W., Zhang, Z., Zhang, J., and Chen, S. (2005). AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *Plant J.* 44, 903–916.
- Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S., and Mullineaux, P. M. (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42, 819–832.
- Henson, I. (1984). Inhibition of abscisic acid accumulation in seedling shoots of pearl millet (*Pennisetum americanum* [L.] Leeke) following induction of chlorosis by norflurazon. *Z. Für Pflanzenphysiol.* 114, 35–43.
- Hernández, J. A., del Río, L. A., and Sevilla, F. (1994). Salt stress-induced changes in superoxide dismutase isozymes in leaves and mesophyll protoplasts from *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *New Phytol.* 126, 37–44.
- Hernandez, J., Jimenez, A., Mullineaux, P., and Sevilla, F. (2000). Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ.* 23, 853–862.
- Heschel, M. S., and Riginos, C. (2005). Mechanisms of selection for drought stress tolerance and avoidance in *Impatiens capensis* (Balsaminaceae). *Am. J. Bot.* 92, 37–44.
- Heuvelink, E. (2005). *Tomatoes*. CABI.
- HILLOVÁ, D., TAKÁCSOVÁ, M., and LICHTNEROVÁ, H. (2014). Stomatal response to water stress in herbaceous perennials. *Plants Urban Areas Landsc.*
- Hong-Bo, S., Li-Ye, C., and Ming-An, S. (2008). Calcium as a versatile plant signal transducer under soil water stress. *BioEssays* 30, 634–641.
- Hong-Bo, S., Zong-Suo, L., and Ming-An, S. (2005). LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 45, 131–135.
- Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur.
- Hossain, M. A., and Asada, K. (1985). Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *J. Biol. Chem.* 260, 12920–12926.
- Hu, W., Yuan, Q., Wang, Y., Cai, R., Deng, X., Wang, J., et al. (2012). Overexpression of a wheat aquaporin gene, TaAQP8, enhances salt stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol.* 53, 2127–2141.
- Hu, W., Zuo, J., Hou, X., Yan, Y., Wei, Y., Liu, J., et al. (2015). The auxin response factor gene family in banana: genome-wide identification and expression analyses during development, ripening, and abiotic stress. *Front. Plant Sci.* 6, 742.

- Hussain, S. S., Ahsan, M. A., Rashid, B., and Shi, B.-J. (2016). Plant aquaporin biotechnology: Challenges and prospects for abiotic stress tolerance under a changing global environment. *Water Stress Crop Plants Sustain. Approach 2 Vol. Set*, 150.
- Hussain, S. S., Ali, M., Ahmad, M., and Siddique, K. H. (2011). Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnol. Adv.* 29, 300–311.
- Hussain Wani, S., Brajendra Singh, N., Haribhushan, A., and Iqbal Mir, J. (2013). Compatible solute engineering in plants for abiotic stress tolerance-role of glycine betaine. *Curr. Genomics* 14, 157–165.
- Ibraheem, O., Dealtry, G., Roux, S., and Bradley, G. (2011). The Effect of Drought and Salinity on the Expressional Levels of Sucrose Transporters in Rice ('Oryza sativa'Nipponbare) Cultivar Plants. *Plant Omics* 4, 68.
- Iglesias, M. J., Terrile, M. C., Bartoli, C. G., D'Ippólito, S., and Casalongué, C. A. (2010). Auxin signaling participates in the adaptative response against oxidative stress and salinity by interacting with redox metabolism in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 74, 215–222.
- Im Kim, J., Baek, D., Park, H. C., Chun, H. J., Oh, D.-H., Lee, M. K., et al. (2013). Overexpression of Arabidopsis YUCCA6 in potato results in high-auxin developmental phenotypes and enhanced resistance to water deficit. *Mol. Plant* 6, 337–349.
- Irfan, A., Shahzadm, A. B., and Amir, I. (2005). The effects of seed soaking with plant growth regulators on seedling vigor of wheat under salinity stress. *J. Stress Physiol. Biochem.* 1.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., et al. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J.* 27, 325–333.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2000). A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiol.* 123, 553–562.
- Jain, M., Kaur, N., Garg, R., Thakur, J. K., Tyagi, A. K., and Khurana, J. P. (2005). Structure and expression analysis of early auxin-responsive Aux/IAA gene family in rice (*Oryza sativa*). *Funct. Integr. Genomics* 6, 47–59. doi:10.1007/s10142-005-0005-0.
- Jain, M., Kaur, N., Garg, R., Thakur, J. K., Tyagi, A. K., and Khurana, J. P. (2006). Structure and expression analysis of early auxin-responsive Aux/IAA gene family in rice (*Oryza sativa*). *Funct. Integr. Genomics* 6, 47–59.
- Jain, M., and Khurana, J. P. (2009). Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. *Febs J.* 276, 3148–3162.
- Jaleel, C. A. (DMJM I. (Cansult M. L., Manivannan, P. (Annamalai U., Wahid, A. (University of A., Farooq, M. (University of A., Al-Juburi, H. J. (Annamalai U., Somasundaram, R. (Annamalai U., et al. (2009). Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol. Pak.*
- Jamil, M., Rehman, S., and Rha, E. (2007). Salinity effect on plant growth, PSII photochemistry and chlorophyll content in sugar beet (*Beta Vulgaris* L.) and cabbage (*Brassica Oleracea Capitata* L.). *Pak J Bot* 39, 753–760.
- Jaulneau, V., Lafitte, C., Jacquet, C., Fournier, S., Salamagne, S., Briand, X., et al. (2010). Ulvan, a Sulfated Polysaccharide from Green Algae, Activates Plant Immunity through the Jasmonic Acid Signaling Pathway. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010. doi:10.1155/2010/525291.
- Ji, H., Pardo, J. M., Batelli, G., Van Oosten, M. J., Bressan, R. A., and Li, X. (2013). The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. *Mol. Plant* 6, 275–286.



- Jia, W., Zhang, L., Wu, D., Liu, S., Gong, X., Cui, Z., et al. (2015). Sucrose transporter AtSUC9 mediated by a low sucrose level is involved in Arabidopsis abiotic stress resistance by regulating sucrose distribution and ABA accumulation. *Plant Cell Physiol.* 56, 1574–1587.
- Johnson, E. J. (2002). The role of carotenoids in human health. *Nutr. Clin. Care Off. Publ. Tufts Univ.* 5, 56–65.
- Jones, B., Frasse, P., Olmos, E., Zegzouti, H., Li, Z. G., Latché, A., et al. (2002). Down-regulation of DR12, an auxin-response-factor homolog, in the tomato results in a pleiotropic phenotype including dark green and blotchy ripening fruit. *Plant J.* 32, 603–613.
- Jung, C., Seo, J. S., Han, S. W., Koo, Y. J., Kim, C. H., Song, S. I., et al. (2008). Overexpression of AtMYB44 Enhances Stomatal Closure to Confer Abiotic Stress Tolerance in Transgenic Arabidopsis. *Plant Physiol.* 146, 623–635. doi:10.1104/pp.107.110981.
- Jurado, S., Abraham, Z., Manzano, C., López-Torrejón, G., Pacios, L. F., and Del Pozo, J. C. (2010). The Arabidopsis cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin. *Plant Cell* 22, 3891–3904.
- Kang, G., Li, G., and Guo, T. (2014). Molecular mechanism of salicylic acid-induced abiotic stress tolerance in higher plants. *Acta Physiol. Plant.* 36, 2287–2297. doi:10.1007/s11738-014-1603-z.
- Kaur, G., and Asthir, B. (2015). Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biol. Plant.* 59, 609–619.
- Kaur-Sawhney, R., Tiburcio, A. F., Altabella, T., and Galston, A. W. (2003). Polyamines in plants: an overview. *J Cell Mol Biol* 2, 1–12.
- Kepinski, S. (2007). The anatomy of auxin perception. *Bioessays* 29, 953–956.
- Khadri, M., Tejera, N. A., and Lluch, C. (2006). Alleviation of Salt Stress in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) by Exogenous Absciscic Acid Supply. *J. Plant Growth Regul.* 25, 110–119. doi:10.1007/s00344-005-0004-3.
- Khan, A. A., Rao, S. A., and McNeilly, T. (2003). Assessment of salinity tolerance based upon seedling root growth response functions in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica* 131, 81–89.
- Kim, B. C., Soh, M. C., Kang, B. J., Furuya, M., and Nam, H. G. (1996). Two dominant photomorphogenic mutations of Arabidopsis thaliana identified as suppressor mutations of hy2. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 9, 441–456.
- Kiyohara, S., Honda, H., Shimizu, N., Ejima, C., Hamasaki, R., and Sawa, S. (2011). Tryptophan auxotroph mutants suppress the superroot2 phenotypes, modulating IAA biosynthesis in arabidopsis. *Plant Signal. Behav.* 6, 1351–1355.
- Knight, H. (1999). Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int. Rev. Cytol.* 195, 269–324.
- Kögl, F., and Kostermans, D. (1935). Über die Konstitutions-Spezifität des Hetero-auxins. 16. Mitteilung über pflanzliche Wachstumsstoffe. *Hoppe-Seyler' Z. Für Physiol. Chem.* 235, 201–216.
- Krishnamurthy, A., and Rathinasabapathi, B. (2013). Auxin and its transport play a role in plant tolerance to arsenite-induced oxidative stress in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ.* 36, 1838–1849.
- Kühn, C., Franceschi, V. R., Schulz, A., Lemoine, R., and Frommer, W. B. (1997). Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* 275, 1298–1300.
- Kukreja, S., Nandwal, A., Kumar, N., Sharma, S., Unvi, V., and Sharma, P. (2005). Plant water status, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging enzymes, ethylene evolution and membrane integrity of Cicer arietinum roots as affected by salinity. *Biol. Plant.* 49, 305–308.

- Kumar, R., Tyagi, A. K., and Sharma, A. K. (2011). Genome-wide analysis of auxin response factor (ARF) gene family from tomato and analysis of their role in flower and fruit development. *Mol. Genet. Genomics* 285, 245–260.
- Kurth, E., Cramer, G. R., Läubli, A., and Epstein, E. (1986). Effects of NaCl and CaCl<sub>2</sub> on cell enlargement and cell production in cotton roots. *Plant Physiol.* 82, 1102–1106.
- Lastdrager, J., Hanson, J., and Smeekens, S. (2014). Sugar signals and the control of plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 65, 799–807.
- Lecerf, J.-M. (2006). Tomate, lycopers et prévention cardiovasculaire. 34–39.
- Lee, S. C., Lan, W., Buchanan, B. B., and Luan, S. (2009). A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 21419–21424. doi:10.1073/pnas.0910601106.
- Lee, T.-M., Lur, H.-S., and Chu, C. (1997). Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings.: II. Modulation of free polyamine levels. *Plant Sci.* 126, 1–10. doi:10.1016/S0168-9452(97)00076-9.
- Leyser, O. (2002). Molecular genetics of auxin signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 377–398.
- Li, G., Peng, X., Wei, L., and Kang, G. (2013). Salicylic acid increases the contents of glutathione and ascorbate and temporally regulates the related gene expression in salt-stressed wheat seedlings. *Gene* 529, 321–325. doi:10.1016/j.gene.2013.07.093.
- Li, J., and Assmann, S. M. (1996). An Abscisic Acid-Activated and Calcium-Independent Protein Kinase from Guard Cells of Fava Bean. *Plant Cell* 8, 2359–2368. doi:10.1105/tpc.8.12.2359.
- Liang, J., Zhang, J., and Wong, M. (1997). Can stomatal closure caused by xylem ABA explain the inhibition of leaf photosynthesis under soil drying? *Photosynth. Res.* 51, 149–159.
- Lim, C. W., Baek, W., Jung, J., Kim, J.-H., and Lee, S. C. (2015). Function of ABA in Stomatal Defense against Biotic and Drought Stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 15251–15270. doi:10.3390/ijms160715251.
- Liu, L., White, M. J., and MacRae, T. H. (1999). Transcription factors and their genes in higher plants. *Eur. J. Biochem.* 262, 247–257.
- Liu, N., Wu, S., Van Houten, J., Wang, Y., Ding, B., Fei, Z., et al. (2014). Down-regulation of AUXIN RESPONSE FACTORS 6 and 8 by microRNA 167 leads to floral development defects and female sterility in tomato. *J. Exp. Bot.* 65, 2507–2520.
- Liu, P., Montgomery, T. A., Fahlgren, N., Kasschau, K. D., Nonogaki, H., and Carrington, J. C. (2007). Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *Plant J.* 52, 133–146.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., et al. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1391–1406.
- Llorente, F., Muskett, P., Sánchez-Vallet, A., López, G., Ramos, B., Sánchez-Rodríguez, C., et al. (2008). Repression of the auxin response pathway increases *Arabidopsis* susceptibility to necrotrophic fungi. *Mol. Plant* 1, 496–509.
- Long, J. A., Ohno, C., Smith, Z. R., and Meyerowitz, E. M. (2006). TOPLESS regulates apical embryonic fate in *Arabidopsis*. *Science* 312, 1520–1523.
- López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Pérez-Torres, A., Rampey, R. A., Bartel, B., et al. (2005). An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root

- architectural alterations in Arabidopsis. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiol.* 137, 681–691.
- Lugan, R. (2008). Phénotypage métabolique des réponses aux stress abiotiques chez *Arabidopsis thaliana*: analyse fonctionnelle et intégrative du métabolome.
- Luna, C. M., Pastori, G. M., Driscoll, S., Groten, K., Bernard, S., and Foyer, C. H. (2005). Drought controls on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *J. Exp. Bot.* 56, 417–423. doi:10.1093/jxb/eri039.
- Luo, M., Liu, J., Mohapatra, S., Hill, R., and Mohapatra, S. (1992). Characterization of a gene family encoding abscisic acid- and environmental stress-inducible proteins of alfalfa. *J. Biol. Chem.* 267, 15367–15374.
- Macdonald, H. (1997). Auxin perception and signal transduction. *Physiol. Plant.* 100, 423–430.
- Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P., and Sohrabi, Y. (2010). Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Aust. J. Crop Sci.* 4, 580.
- Malamy, J. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ.* 28, 67–77.
- Mallory, A. C., Bartel, D. P., and Bartel, B. (2005). MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* 17, 1360–1375.
- Mamo, T., Richter, C., and Heiligtag, B. (1996). Salinity effects on the growth and ion contents of some chickpea (*Cicer arietinum* L.) and lentil (*Lens culinaris* Medic.) varieties. *J. Agron. Crop Sci.* 176, 235–247.
- Manickavelu, A., Nadarajan, N., Ganesh, S., Gnanamalar, R., and Babu, R. C. (2006). Drought tolerance in rice: morphological and molecular genetic consideration. *Plant Growth Regul.* 50, 121–138.
- Mano, Y., and Nemoto, K. (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J. Exp. Bot.*, ers091.
- Manoj, K., and Uday, D. (2010). RAPD based fingerprinting of tomato genotypes for identification of mutant and wild cherry specific markers. *J. Plant Sci.* 5, 273–281.
- Manschadi, A. M., Hammer, G. L., and Christopher, J. T. (2008). Genotypic variation in seedling root architectural traits and implications for drought adaptation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Soil* 303, 115–129.
- Marcińska, I., Czyczyło-Mysza, I., Skrzypek, E., Filek, M., Grzesiak, S., Grzesiak, M. T., et al. (2013). Impact of osmotic stress on physiological and biochemical characteristics in drought-susceptible and drought-resistant wheat genotypes. *Acta Physiol. Plant.* 35, 451–461.
- Marin, E., Jouannet, V., Herz, A., Lokerse, A. S., Weijers, D., Vaucheret, H., et al. (2010). miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *Plant Cell* 22, 1104–1117.
- Martí, E., Gisbert, C., Bishop, G. J., Dixon, M. S., and García-Martínez, J. L. (2006). Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *J. Exp. Bot.* 57, 2037–2047.
- Matsuda, Y., Okuda, T., and Sagisaka, S. (1994). Regulation of protein synthesis by hydrogen peroxide in crowns of winter wheat. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 906–909.
- Maurel, C. (2007). Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *Febs Lett.* 581, 2227–2236.
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D.-T., and Santoni, V. (2008). Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol* 59, 595–624.
- McSteen, P., and Zhao, Y. (2008). Plant hormones and signaling: common themes and new developments. *Dev. Cell* 14, 467–473.

- Mehlmer, N., Wurzinger, B., Stael, S., Hofmann-Rodrigues, D., Csaszar, E., Pfister, B., et al. (2010). The Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt-stress acclimation in Arabidopsis. *Plant J.* 63, 484–498.
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., et al. (1997). A new model system for tomato genetics. *Plant J.* 12, 1465–1472.
- M'Hamdi, M., Bettaieb, T., Harbaoui, Y., Mougou, A. A., and du Jardin, P. (2009). Insight into the role of catalases in salt stress in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biotechnol. Agron. Société Environ.* 13, 373–379.
- Mickelbart, M. V., Hasegawa, P. M., and Bailey-Serres, J. (2015). Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nat. Rev. Genet.* 16, 237–251.
- Miura, K., and Tada, Y. (2014). Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front. Plant Sci.* 5, 4. doi:10.3389/fpls.2014.00004.
- Miyashita, K., Tanakamaru, S., Maitani, T., and Kimura, K. (2005). Recovery responses of photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance in kidney bean following drought stress. *Environ. Exp. Bot.* 53, 205–214.
- MOHAMED, E., Iwaki, T., Munir, I., Tamoi, M., Shigeoka, S., and Wadano, A. (2003). Overexpression of bacterial catalase in tomato leaf chloroplasts enhances photo-oxidative stress tolerance. *Plant Cell Environ.* 26, 2037–2046.
- Mohapatra, S. S., Poole, R. J., and Dhindsa, R. S. (1988). Abscisic Acid-regulated gene expression in relation to freezing tolerance in alfalfa. *Plant Physiol.* 87, 468–473.
- Moradi, F., and Ismail, A. M. (2007). Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. *Ann. Bot.* 99, 1161–1173.
- Mori, I. C., Pinontoan, R., Kawano, T., and Muto, S. (2001). Involvement of Superoxide Generation in Salicylic Acid-Induced Stomatal Closure in *Vicia faba*. *Plant Cell Physiol.* 42, 1383–1388. doi:10.1093/pcp/pce176.
- Moriwaki, T., Yamamoto, Y., Aida, T., Funahashi, T., Shishido, T., Asada, M., et al. (2008). Overexpression of the *Escherichia coli* catalase gene, *katE*, enhances tolerance to salinity stress in the transgenic indica rice cultivar, BR5. *Plant Biotechnol. Rep.* 2, 41–46.
- Moshaei, M. R., Nematzadeh, G. A., Askari, H., and Nejad, A. S. M. (2014). Quantitative gene expression analysis of some sodium ion transporters under salinity stress in *Aeluropus littoralis*. *Saudi J. Biol. Sci.* 21, 394–399.
- Müller, A., and Weiler, E. (2000). Indolic constituents and indole-3-acetic acid biosynthesis in the wild-type and a tryptophan auxotroph mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211, 855–863.
- Munns, R., James, R. A., and Läuchli, A. (2006). Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.* 57, 1025–1043.
- Mustilli, A.-C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F., and Giraudat, J. (2002). Arabidopsis OST1 Protein Kinase Mediates the Regulation of Stomatal Aperture by Abscisic Acid and Acts Upstream of Reactive Oxygen Species Production. *Plant Cell* 14, 3089–3099. doi:10.1105/tpc.007906.
- Muto, H., Watahiki, M. K., Nakamoto, D., Kinjo, M., and Yamamoto, K. T. (2007). Specificity and similarity of functions of the Aux/IAA genes in auxin signaling of Arabidopsis revealed by promoter-exchange experiments among MSG2/IAA19, AXR2/IAA7, and SLR/IAA14. *Plant Physiol.* 144, 187–196.
- Nagpal, P., Walker, L. M., Young, J. C., Sonawala, A., Timpte, C., Estelle, M., et al. (2000). AXR2 Encodes a Member of the Aux/IAA Protein Family. *Plant Physiol.* 123, 563–574. doi:10.1104/pp.123.2.563.

- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., et al. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312, 436–439.
- Noiraud, N., Delrot, S., and Lemoine, R. (2000). The sucrose transporter of celery. Identification and expression during salt stress. *Plant Physiol.* 122, 1447–1455.
- O'Donnell, P. J., Schmelz, E. A., Moussatche, P., Lund, S. T., Jones, J. B., and Klee, H. J. (2003). Susceptible to intolerance – a range of hormonal actions in a susceptible Arabidopsis pathogen response. *Plant J.* 33, 245–257. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01619.x.
- Okumura, M., Inoue, S., Kuwata, K., and Kinoshita, T. (2016). Photosynthesis activates plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase via sugar accumulation in Arabidopsis leaves. *Plant Physiol.*, pp-00355.
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., and Tasaka, M. (2007). ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 118–130.
- Okushima, Y., Mitina, I., Quach, H. L., and Theologis, A. (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *Plant J.* 43, 29–46.
- Osaka, F., Saeki, M., Katayama, S., Aida, N., Toh-e, A., Kominami, K., et al. (2000). Covalent modifier NEDD8 is essential for SCF ubiquitin-ligase in fission yeast. *EMBO J.* 19, 3475–3484.
- Overvoorde, P., Fukaki, H., and Beeckman, T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001537.
- Panday, A., Sahoo, M. K., Osorio, D., and Batra, S. (2015). NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell. Mol. Immunol.* 12, 5–23.
- Paponov, I. A., Teale, W. D., Trebar, M., Blilou, I., and Palme, K. (2005). The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends Plant Sci.* 10, 170–177.
- Pardha Saradhi, P., Arora, S., Vani, B., and Puthur, J. (1996). Alteration in NAD<sup>+</sup>/NADH ratio regulates salt stress induced proline accumulation in *Vigna radiata*. *Proc.-Natl. Acad. Sci. INDIA Sect. B* 66, 89–100.
- Pareek, A., Sopory, S. K., Bohnert, H., and Govindjee eds. (2010). *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation*. Springer Netherlands Available at: [//www.springer.com/us/book/9789048131112](http://www.springer.com/us/book/9789048131112) [Accessed January 14, 2019].
- Park, C.-J., and Seo, Y.-S. (2015). Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones for plant immunity. *Plant Pathol. J.* 31, 323.
- Park, J., Kim, H., and Kim, J. (2002). Mutation in domain II of IAA1 confers diverse auxin-related phenotypes and represses auxin-activated expression of Aux/IAA genes in steroid regulator-inducible system. *Plant J.* 32, 669–683.
- Park, J.-E., Park, J.-Y., Kim, Y.-S., Staswick, P. E., Jeon, J., Yun, J., et al. (2007). GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 282, 10036–10046.
- Parry, G., Calderon-Villalobos, L., Prigge, M., Peret, B., Dharmasiri, S., Itoh, H., et al. (2009). Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 22540–22545.
- Parry, G., and Estelle, M. (2006). Auxin receptors: a new role for F-box proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 152–156.
- Parvin, K., Ahamed, K. U., Islam, M. M., and Haque, M. N. (2015). Response of tomato plant under salt stress: role of exogenous calcium. *J. Plant Sci.* 10, 222–33.
- Patade, V. Y., Bhargava, S., and Suprasanna, P. (2012). Transcript expression profiling of stress responsive genes in response to short-term salt or PEG stress in sugarcane leaves. *Mol. Biol. Rep.* 39, 3311–3318.

- Pattanagul, W., and Thitisaksakul, M. (2008). Effect of salinity stress on growth and carbohydrate metabolism in three rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance.
- Pattison, R. J., Csukasi, F., and Catalá, C. (2014). Mechanisms regulating auxin action during fruit development. *Physiol. Plant.* 151, 62–72. doi:10.1111/ppl.12142.
- Pauwels, L., Inzé, D., and Goossens, A. (2009). Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends Plant Sci.* 14, 87–91. doi:10.1016/j.tplants.2008.11.005.
- Pedrosa, A. M., Martins, C. de P. S., Gonçalves, L. P., and Costa, M. G. C. (2015). Late Embryogenesis Abundant (LEA) Constitutes a Large and Diverse Family of Proteins Involved in Development and Abiotic Stress Responses in Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osb.). *PLOS ONE* 10, e0145785. doi:10.1371/journal.pone.0145785.
- Peralta, I. E., Knapp, S., and Spooner, D. M. (2005). New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Syst. Bot.* 30, 424–434.
- Perl, A., Perl-Treves, R., Galili, S., Aviv, D., Shalgi, E., Malkin, S., et al. (1993). Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu, Zn superoxide dismutases. *Theor. Appl. Genet.* 85, 568–576.
- Pierre-Jerome, E., Moss, B. L., and Nemhauser, J. L. (2013). Tuning the auxin transcriptional response. *J. Exp. Bot.* 64, 2557–2563.
- Prasad, T. K. (1996). Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant J.* 10, 1017–1026.
- Priest, H. D., Filichkin, S. A., and Mockler, T. C. (2009). Cis-regulatory elements in plant cell signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 643–649.
- Qin, X., and Zeevaart, J. A. (1999). The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 15354–15361.
- Qin, X., and Zeevaart, J. A. D. (2002). Overexpression of a 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Gene in *Nicotiana glauca* Increases Abscisic Acid and Phaseic Acid Levels and Enhances Drought Tolerance. *Plant Physiol.* 128, 544–551. doi:10.1104/pp.010663.
- Qiu, Q.-S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S., and Zhu, J.-K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 8436–8441.
- Rabbani, M. A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M. A., Katsura, K., Ito, Y., et al. (2003). Monitoring Expression Profiles of Rice Genes under Cold, Drought, and High-Salinity Stresses and Abscisic Acid Application Using cDNA Microarray and RNA Gel-Blot Analyses. *Plant Physiol.* 133, 1755–1767. doi:10.1104/pp.103.025742.
- Rahnama, H., Vakilian, H., Fahimi, H., and Ghareyazie, B. (2011). Enhanced salt stress tolerance in transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.) expressing a bacterial mtID gene. *Acta Physiol. Plant.* 33, 1521–1532.
- Rai, A. K., and Takabe, T. (2006). *Abiotic stress tolerance in plants*. Springer.
- Raskin, I. (1992). Role of Salicylic Acid in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 439–463. doi:10.1146/annurev.pp.43.060192.002255.
- Reddy, A. R., Chaitanya, K. V., and Vivekanandan, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* 161, 1189–1202.

- Reed, J. W. (2001). Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* 6, 420–425. doi:10.1016/S1360-1385(01)02042-8.
- Reinhardt, D., Pesce, E.-R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., et al. (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* 426, 255–260. doi:10.1038/nature02081.
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., and Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* 16, 1616–1626. doi:10.1101/gad.1004402.
- Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B., and Bartel, D. P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110, 513–520.
- Ribaut, J.-M., Betran, J., Monneveux, P., and Setter, T. (2009). “Drought tolerance in maize,” in *Handbook of maize: its biology* (Springer), 311–344.
- Riechmann, J. L., and Ratcliffe, O. J. (2000). A genomic perspective on plant transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 423–434.
- Rodríguez-Rosales, M. P., Gálvez, F. J., Huertas, R., Aranda, M. N., Baghour, M., Cagnac, O., et al. (2009). Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant Signal. Behav.* 4, 265–276.
- Rogg, L. E., Lasswell, J., and Bartel, B. (2001). A gain-of-function mutation in IAA28 suppresses lateral root development. *Plant Cell* 13, 465–480.
- Roitsch, T. (1999). Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 198–206.
- Rolland, F., Moore, B., and Sheen, J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14, S185–S205.
- Rouse, D., Mackay, P., Stirnberg, P., Estelle, M., and Leyser, O. (1998). Changes in Auxin Response from Mutations in an AUX/IAA Gene. *Science* 279, 1371–1373. doi:10.1126/science.279.5355.1371.
- Roy, B., and Basu, A. K. (2009). *Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants: Breeding and Biotechnology*. New India Publishing.
- Saddam, S., Bibi, A., Sadaqat, H., and Usman, B. (2014). Comparison of 10 sorghum (*Sorghum bicolor* L.) genotypes under various water stress regimes. *J Anim Plant Sci* 24, 1811–1820.
- Sade, N., Gebretsadik, M., Seligmann, R., Schwartz, A., Wallach, R., and Moshelion, M. (2010). The role of tobacco Aquaporin1 in improving water use efficiency, hydraulic conductivity, and yield production under salt stress. *Plant Physiol.* 152, 245–254.
- Saeidi, M., and Abdoli, M. (2015). Effect of drought stress during grain filling on yield and its components, gas exchange variables, and some physiological traits of wheat cultivars. *J. Agric. Sci. Technol.* 17, 885–898.
- Sagar, M., Chervin, C., Mila, I., Hao, Y., Roustan, J.-P., Benichou, M., et al. (2013). Sl-ARF4, an Auxin Response Factor involved in the control of sugar metabolism during tomato fruit development. *Plant Physiol.*, pp-113.
- Sah, S. K., Reddy, K. R., and Li, J. (2016). Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Front. Plant Sci.* 7. doi:10.3389/fpls.2016.00571.
- Saini, S., Sharma, I., Kaur, N., and Pati, P. K. (2013). Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant Cell Rep.* 32, 741–757.
- Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohigashi, H., Ohta, D., Sakata, K., et al. (2004). Arabidopsis CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiol.* 134, 1439–1449.

- Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K., et al. (2006). Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 18, 1292–1309.
- Santino, A., Taurino, M., Domenico, S. D., Bonsegna, S., Poltronieri, P., Pastor, V., et al. (2013). Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. *Plant Cell Rep.* 32, 1085–1098. doi:10.1007/s00299-013-1441-2.
- Sauer, M., Robert, S., and Kleine-Vehn, J. (2013). Auxin: simply complicated. *J. Exp. Bot.*, ert139. doi:10.1093/jxb/ert139.
- Schmitt, F.-J., Renger, G., Friedrich, T., Kreslavski, V. D., Zharmukhamedov, S. K., Los, D. A., et al. (2014). Reactive oxygen species: re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Bioenerg.* 1837, 835–848.
- Schruff, M. C., Spielman, M., Tiwari, S., Adams, S., Fenby, N., and Scott, R. J. (2006). The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of Arabidopsis links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development* 133, 251–261.
- Schulz, P., Herde, M., and Romeis, T. (2013). Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development. *Plant Physiol.* 163, 523–530.
- Scott, J. W. (1989). Micro-Tom-a miniature dwarf tomato. *Agric. Exp. Stn. Inst. Food Agric. Sci. Univ. Fla. Circ.* 370, 1–6.
- Seki, M., Ishida, J., Narusaka, M., Fujita, M., Nanjo, T., Umezawa, T., et al. (2002). Monitoring the expression pattern of around 7,000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Funct. Integr. Genomics* 2, 282–291. doi:10.1007/s10142-002-0070-6.
- Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E., and Dixon, K. (2000). Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regul.* 30, 157–161. doi:10.1023/A:1006386800974.
- Seo, J.-S., Joo, J., Kim, M.-J., Kim, Y.-K., Nahm, B. H., Song, S. I., et al. (2011). OsBHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice. *Plant J.* 65, 907–921. doi:10.1111/j.1365-3113X.2010.04477.x.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., and Tal, M. (2001). Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiol. Plant.* 112, 487–494.
- Sharma, P., and Dubey, R. S. (2005). Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regul.* 46, 209–221.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., and Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 2012.
- Shi, H., Lee, B., Wu, S.-J., and Zhu, J.-K. (2003). Overexpression of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in Arabidopsis thaliana. *Nat. Biotechnol.* 21, 81–85.
- Shi, J.-H., and Yang, Z.-B. (2011). Is ABP1 an auxin receptor yet? *Mol. Plant* 4, 635–640.
- Shibasaki, K., Uemura, M., Tsurumi, S., and Rahman, A. (2009). Auxin response in Arabidopsis under cold stress: underlying molecular mechanisms. *Plant Cell* 21, 3823–3838.
- Shikanai, T., Takeda, T., Yamauchi, H., Sano, S., Tomizawa, K.-I., Yokota, A., et al. (1998). Inhibition of ascorbate peroxidase under oxidative stress in tobacco having bacterial catalase in chloroplasts. *FEBS Lett.* 428, 47–51.



- Shin, S.-Y., Kim, M.-H., Kim, Y.-H., Park, H.-M., and Yoon, H.-S. (2013). Co-expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase from *Brassica rapa* effectively confers tolerance to freezing-induced oxidative stress. *Mol. Cells* 36, 304–315.
- Silva, M. de A., Jifon, J. L., Da Silva, J. A., and Sharma, V. (2007). Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Braz. J. Plant Physiol.* 19, 193–201.
- Silva-Ortega, C. O., Ochoa-Alfaro, A. E., Reyes-Agüero, J. A., Aguado-Santacruz, G. A., and Jiménez-Bremont, J. F. (2008). Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 82–92.
- Simova-Stoilova, L., Vaseva, I., Grigorova, B., Demirevska, K., and Feller, U. (2010). Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 200–206. doi:10.1016/j.plaphy.2009.11.003.
- Singh, K. B., Foley, R. C., and Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 430–436.
- Singh, N. K., LaRosa, P. C., Handa, A. K., Hasegawa, P. M., and Bressan, R. A. (1987). Hormonal regulation of protein synthesis associated with salt tolerance in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 739–743.
- Sparks, E., Wachsman, G., and Benfey, P. N. (2013). Spatiotemporal signalling in plant development. *Nat. Rev. Genet.* 14, 631–644.
- Stals, H., and Inzé, D. (2001). When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci.* 6, 359–364.
- Stepanova, A. N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L. M., Xie, D.-Y., Doležal, K., et al. (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133, 177–191.
- Stone, S. L., Braybrook, S. A., Paula, S. L., Kwong, L. W., Meuser, J., Pelletier, J., et al. (2008). Arabidopsis LEAFY COTYLEDON2 induces maturation traits and auxin activity: implications for somatic embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 3151–3156.
- Stowe-Evans, E. L., Harper, R. M., Motchoulski, A. V., and Liscum, E. (1998). NPH4, a conditional modulator of auxin-dependent differential growth responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 118, 1265–1275.
- Sui, N., Yang, Z., Liu, M., and Wang, B. (2015). Identification and transcriptomic profiling of genes involved in increasing sugar content during salt stress in sweet sorghum leaves. *BMC Genomics* 16. doi:10.1186/s12864-015-1760-5.
- Sun, J., Qi, L., Li, Y., Chu, J., and Li, C. (2012). PIF4-mediated activation of YUCCA8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating Arabidopsis hypocotyl growth. *PLoS Genet* 8, e1002594.
- Swamy, P., and Smith, B. (1999). Role of abscisic acid in plant stress tolerance. *Curr. Sci.* 76, 1220–1227.
- Szemenyei, H., Hannon, M., and Long, J. A. (2008). TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science* 319, 1384–1386.
- Szöllösi, R. (2014). “Superoxide dismutase (SOD) and abiotic stress tolerance in plants: an overview,” in *Oxidative Damage to Plants* (Elsevier), 89–129.
- Takahashi, H. (2013). Auxin biology in roots. *Plant Root* 7, 49–64.
- Tan, B. C., Schwartz, S. H., Zeevaart, J. A., and McCarty, D. R. (1997). Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 12235–12240.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L. I. A., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C. V., Estelle, M., et al. (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 640–645.

- Tao, Y., Ferrer, J.-L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J. A., et al. (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* 133, 164–176.
- Tatematsu, K., Kumagai, S., Muto, H., Sato, A., Watahiki, M. K., Harper, R. M., et al. (2004). MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16, 379–393.
- Thameur, A., Ferchichi, A., and López-Carbonell, M. (2011a). Quantification of free and conjugated abscisic acid in five genotypes of barley (*Hordeum vulgare* L.) under water stress conditions. *South Afr. J. Bot.* 77, 222–228. doi:10.1016/j.sajb.2010.08.004.
- Thameur, A., Ferchichi, A., and López-Carbonell, M. (2011b). Quantification of free and conjugated abscisic acid in five genotypes of barley (*Hordeum vulgare* L.) under water stress conditions. *South Afr. J. Bot.* 77, 222–228.
- Thitisaksakul, W. P. M. (2008). Effect of salinity stress on growth and carbohydrate metabolism in three rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance. *Indian J. Exp. Biol.* 46, 736–742.
- Thompson, A. J., Andrews, J., Mulholland, B. J., McKee, J. M. T., Hilton, H. W., Horridge, J. S., et al. (2007). Overproduction of Abscisic Acid in Tomato Increases Transpiration Efficiency and Root Hydraulic Conductivity and Influences Leaf Expansion. *Plant Physiol.* 143, 1905–1917. doi:10.1104/pp.106.093559.
- Thompson, A. J., Jackson, A. C., Parker, R. A., Morpeth, D. R., Burbidge, A., and Taylor, I. B. (2000). Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 42, 833–845.
- Tian, C., Muto, H., Higuchi, K., Matamura, T., Tatematsu, K., Koshiba, T., et al. (2004). Disruption and overexpression of auxin response factor 8 gene of *Arabidopsis* affect hypocotyl elongation and root growth habit, indicating its possible involvement in auxin homeostasis in light condition. *Plant J.* 40, 333–343.
- Tian, Q., and Reed, J. (1999). Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* SHY2/IAA3 gene. *Development* 126, 711–721.
- Tian, Q., and Reed, J. W. (2001). Molecular links between light and auxin signaling pathways. *J. Plant Growth Regul.* 20, 274–280.
- Tian, X., Wang, Z., Li, X., Lv, T., Liu, H., Wang, L., et al. (2015). Characterization and Functional Analysis of Pyrabactin Resistance-Like Abscisic Acid Receptor Family in Rice. *Rice* 8. doi:10.1186/s12284-015-0061-6.
- Tiwari, S. B., Hagen, G., and Guilfoyle, T. (2003). The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* 15, 533–543.
- Tiwari, S. B., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J. (2004). Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* 16, 533–543.
- Tiwari, S. B., Wang, X.-J., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J. (2001). AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell* 13, 2809–2822.
- Tran, L.-S. P., and Pal, S. (2014). *Phytohormones: a window to metabolism, signaling and biotechnological applications*. Springer.
- Tromas, A., Paponov, I., and Perrot-Rechenmann, C. (2010). AUXIN BINDING PROTEIN 1: functional and evolutionary aspects. *Trends Plant Sci.* 15, 436–446.
- Tromas, A., Paque, S., Stierlé, V., Quettier, A.-L., Muller, P., Lechner, E., et al. (2013). Auxin-Binding Protein 1 is a negative regulator of the SCFTIR1/AFB pathway. *Nat. Commun.* 4.

- Trujillo, L., Sotolongo, M., Menendez, C., Ochogavia, M., Coll, Y., Hernandez, I., et al. (2008). SodERF3, a novel sugarcane ethylene responsive factor (ERF), enhances salt and drought tolerance when overexpressed in tobacco plants. *Plant Cell Physiol.* 49, 512–525.
- Tuteja, N. (2007). Abscisic Acid and Abiotic Stress Signaling. *Plant Signal. Behav.* 2, 135–138.
- Ulmasov, T., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J. (1999a). Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 5844–5849.
- Ulmasov, T., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J. (1999b). Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J.* 19, 309–319.
- Ulmasov, T., Liu, Z.-B., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J. (1995). Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell* 7, 1611–1623.
- Umezawa, T., Okamoto, M., Kushiro, T., Nambara, E., Oono, Y., Seki, M., et al. (2006). CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 46, 171–182.
- Upreti, K. K., and Sharma, M. (2016). "Role of Plant Growth Regulators in Abiotic Stress Tolerance," in *Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops*, eds. N. K. S. Rao, K. S. Shivashankara, and R. H. Laxman (Springer India), 19–46. doi:10.1007/978-81-322-2725-0\_2.
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., et al. (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* 11, 1743–1754.
- Van Ha, C., Le, D. T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Sulieman, S., Tran, U. T., et al. (2013). The Auxin Response Factor Transcription Factor Family in Soybean: Genome-Wide Identification and Expression Analyses During Development and Water Stress. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* 20, 511–524. doi:10.1093/dnares/dst027.
- Van Oostende, C. (2006). Analyse quantitative des réponses précoces à l'auxine dans une suspension de cellules de tabac.
- Vanneste, S., and Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136, 1005–1016.
- Venis, M. A., Napier, R. M., and Briggs, W. R. (1995). Auxin receptors and auxin binding proteins. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14, 27–47.
- Verbruggen, N., and Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35, 753–759.
- Verma, D., Singla-Pareek, S. L., Rajagopal, D., Reddy, M., and Sopory, S. (2007). Functional validation of a novel isoform of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from *Pennisetum glaucum* for enhancing salinity tolerance in rice. *J. Biosci.* 32, 621–628.
- Verma, K., Mehta, S., and Shekhawat, G. (2013). Nitric oxide (NO) counteracts cadmium induced cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species (ROS) in *Brassica juncea*: cross-talk between ROS, NO and antioxidant responses. *Biometals* 26, 255–269.
- Verma, V., Ravindran, P., and Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol.* 16, 86. doi:10.1186/s12870-016-0771-y.
- Vinocur, B., and Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 123–132.
- Virlouvet, L. (2012). Identification et caractérisation de gènes impliqués dans la variation de caractères quantitatifs affectés par la sécheresse chez le maïs.

- Wan, X.-R., and Li, L. (2006). Regulation of ABA level and water-stress tolerance of Arabidopsis by ectopic expression of a peanut 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347, 1030–1038.
- Wang, B., Lüttge, U., and Ratajczak, R. (2004a). Specific regulation of SOD isoforms by NaCl and osmotic stress in leaves of the C 3 halophyte Suaeda salsa L. *J. Plant Physiol.* 161, 285–293.
- Wang, C., Yang, A., Yin, H., and Zhang, J. (2008). Influence of water stress on endogenous hormone contents and cell damage of maize seedlings. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 427–434. doi:10.1111/j.1774-7909.2008.00638.x.
- Wang, F.-Z., Wang, Q.-B., Kwon, S.-Y., Kwak, S.-S., and Su, W.-A. (2005a). Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *J. Plant Physiol.* 162, 465–472. doi:10.1016/j.jplph.2004.09.009.
- Wang, H., Huang, Z., Chen, Q., Zhang, Z., Zhang, H., Wu, Y., et al. (2004b). Ectopic overexpression of tomato JERF3 in tobacco activates downstream gene expression and enhances salt tolerance. *Plant Mol. Biol.* 55, 183–192. doi:10.1007/s11103-004-0113-6.
- Wang, H., Jones, B., Li, Z., Frasse, P., Delalande, C., Regad, F., et al. (2005b). The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell* 17, 2676–2692.
- Wang, H., Jones, B., Li, Z., Frasse, P., Delalande, C., Regad, F., et al. (2005c). The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell* 17, 2676–2692.
- Wang, H., Wang, H., Shao, H., and Tang, X. (2016). Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology. *Front. Plant Sci.* 7, 67.
- Wang, J.-W., Wang, L.-J., Mao, Y.-B., Cai, W.-J., Xue, H.-W., and Chen, X.-Y. (2005d). Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 2204–2216.
- Wang, S., Bai, Y., Shen, C., Wu, Y., Zhang, S., Jiang, D., et al. (2010). Auxin-related gene families in abiotic stress response in Sorghum bicolor. *Funct. Integr. Genomics* 10, 533–546. doi:10.1007/s10142-010-0174-3.
- Wang, S., Tiwari, S. B., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J. (2005e). AUXIN RESPONSE FACTOR7 restores the expression of auxin-responsive genes in mutant Arabidopsis leaf mesophyll protoplasts. *Plant Cell* 17, 1979–1993.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., and Altman, A. (2004c). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9, 244–252.
- Wang, Y., Mopper, S., and Hasenstein, K. H. (2001). Effects of Salinity on Endogenous Aba, Iaa, Ja, and Sa in Iris hexagona. *J. Chem. Ecol.* 27, 327–342. doi:10.1023/A:1005632506230.
- Wang, Y., Wisniewski, M., Meilan, R., Uratsu, S. L., Cui, M., Dandekar, A., et al. (2007). Ectopic expression of Mn-SOD in Lycopersicon esculentum leads to enhanced tolerance to salt and oxidative stress. *J Appl Hortic* 9, 3–8.
- Wang, Y., Ying, Y., Chen, J., and Wang, X. (2004d). Transgenic Arabidopsis overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. *Plant Sci.* 167, 671–677.
- Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V., and Sah, S. K. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop J.* 4, 162–176. doi:10.1016/j.cj.2016.01.010.
- Watahiki, M. K., and Yamamoto, K. T. (1997). The massugu1 mutation of Arabidopsis identified with failure of auxin-induced growth curvature of hypocotyl confers auxin insensitivity to hypocotyl and leaf. *Plant Physiol.* 115, 419–426.

- Weijers, D., Schlereth, A., Ehrismann, J. S., Schwank, G., Kientz, M., and Jürgens, G. (2006). Auxin triggers transient local signaling for cell specification in Arabidopsis embryogenesis. *Dev. Cell* 10, 265–270.
- Wilmoth, J. C., Wang, S., Tiwari, S. B., Joshi, A. D., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., et al. (2005). NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *Plant J.* 43, 118–130.
- Woodward, A. W., and Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* 95, 707–735.
- Wright, A. D., Moehlenkamp, C. A., Perrot, G. H., Neuffer, M. G., and Cone, K. C. (1992). The maize auxotrophic mutant orange pericarp is defective in duplicate genes for tryptophan synthase beta. *Plant Cell* 4, 711–719.
- Xia, J., Zeng, C., Chen, Z., Zhang, K., Chen, X., Zhou, Y., et al. (2014). Endogenous small-noncoding RNAs and their roles in chilling response and stress acclimation in Cassava. *BMC Genomics* 15, 634.
- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H., and Zhu, J.-K. (2001). The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* 13, 2063–2083.
- Xiong, L., and Zhu, J. (2001). Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiol. Plant.* 112, 152–166.
- Xu, J., Tian, Y.-S., Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Zhu, B., Jin, X.-F., et al. (2010). AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in Arabidopsis. *Planta* 231, 1251–1260.
- Xu, Y., Hu, W., Liu, J., Zhang, J., Jia, C., Miao, H., et al. (2014). A banana aquaporin gene, MaPIP1; 1, is involved in tolerance to drought and salt stresses. *BMC Plant Biol.* 14, 1.
- Xue, Z.-Y., Zhi, D.-Y., Xue, G.-P., Zhang, H., Zhao, Y.-X., and Xia, G.-M. (2004). Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na<sup>+</sup>. *Plant Sci.* 167, 849–859.
- Yamamoto, Y., Kamiya, N., Morinaka, Y., Matsuoka, M., and Sazuka, T. (2007). Auxin biosynthesis by the YUCCA genes in rice. *Plant Physiol.* 143, 1362–1371.
- Yamasaki, K., Kigawa, T., Seki, M., Shinozaki, K., and Yokoyama, S. (2013). DNA-binding domains of plant-specific transcription factors: structure, function, and evolution. *Trends Plant Sci.* 18, 267–276.
- Yang, J. H., Han, S. J., Yoon, E. K., and Lee, W. S. (2006). 'Evidence of an auxin signal pathway, microRNA167-ARF8-GH3, and its response to exogenous auxin in cultured rice cells.' *Nucleic Acids Res.* 34, 1892–1899. doi:10.1093/nar/gkl118.
- Yang, S. H., and Zeevaert, J. A. (2006). Expression of ABA 8'-hydroxylases in relation to leaf water relations and seed development in bean. *Plant J.* 47, 675–686.
- Yang, X., Lee, S., So, J., Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Ge, L., et al. (2004). The IAA1 protein is encoded by AXR5 and is a substrate of SCFTIR1. *Plant J.* 40, 772–782.
- Yang, Z., Cao, S., Zheng, Y., and Jiang, Y. (2012). Combined Salicylic Acid and Ultrasound Treatments for Reducing the Chilling Injury on Peach Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 60, 1209–1212. doi:10.1021/jf2041164.
- Ye, N., Jia, L., and Zhang, J. (2012). ABA signal in rice under stress conditions. *Rice* 5, 1. doi:10.1186/1939-8433-5-1.
- Yin, Y.-G., Kobayashi, Y., Sanuki, A., Kondo, S., Fukuda, N., Ezura, H., et al. (2009). Salinity induces carbohydrate accumulation and sugar-regulated starch biosynthetic genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. 'Micro-Tom') fruits in an ABA- and osmotic stress-independent manner. *J. Exp. Bot.*, erp333.

- Yokoi, S., Quintero, F. J., Cubero, B., Ruiz, M. T., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., et al. (2002). Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the salt stress response. *Plant J.* 30, 529–539.
- Yong, B., Wang, X., Xu, P., Zheng, H., Fei, X., Hong, Z., et al. (2017). Isolation and Abiotic Stress Resistance Analyses of a Catalase Gene from *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *BioMed Res. Int.* 2017. doi:10.1155/2017/6847532.
- Yoon, J. Y., Hamayun, M., Lee, S.-K., and Lee, I.-J. (2009). Methyl jasmonate alleviated salinity stress in soybean. *J. Crop Sci. Biotechnol.* 12, 63–68. doi:10.1007/s12892-009-0060-5.
- Zarafshar, M., Akbarinia, M., Askari, H., Hosseini, S. M., Rahaie, M., Struve, D., et al. (2014). Morphological, physiological and biochemical responses to soil water deficit in seedlings of three populations of wild pear (*Pyrus boissieriana*).
- Zažimalová, E., Murphy, A. S., Yang, H., Hoyerová, K., and Hošek, P. (2010). Auxin transporters—why so many? *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001552.
- Zeng, H., Xu, L., Singh, A., Wang, H., Du, L., and Poovaiah, B. (2015). Involvement of calmodulin and calmodulin-like proteins in plant responses to abiotic stresses. *Front. Plant Sci.* 6.
- Zhang, G., Chen, M., Li, L., Xu, Z., Chen, X., Guo, J., et al. (2009). Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *J. Exp. Bot.*, erp214.
- Zhang, H.-X., Hodson, J. N., Williams, J. P., and Blumwald, E. (2001). Engineering salt-tolerant Brassica plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 12832–12836.
- Zhang, J., Jia, W., Yang, J., and Ismail, A. M. (2006). Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Res.* 97, 111–119.
- Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 49.
- Zhao, Y. (2014). Auxin biosynthesis. *Arab. Book American Soc. Plant Biol.* 12.
- Zhao, Y., and Srivastava, D. (2007). A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem. Sci.* 32, 189–197.
- Zhou, J., Wang, X., Jiao, Y., Qin, Y., Liu, X., He, K., et al. (2007). Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle. *Plant Mol. Biol.* 63, 591–608. doi:10.1007/s11103-006-9111-1.
- Zhou, Y., Zhang, Y., Wang, X., Cui, J., Xia, X., Shi, K., et al. (2011). Effects of nitrogen form on growth, CO<sub>2</sub> assimilation, chlorophyll fluorescence, and photosynthetic electron allocation in cucumber and rice plants. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 12, 126–134.
- Zhu, J.-K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 247.
- Zhu, J.-K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 441–445.
- Zhu, J.-K., Liu, J., and Xiong, L. (1998). Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* 10, 1181–1191.
- Zouine, M., Fu, Y., Chateigner-Boutin, A.-L., Mila, I., Frasse, P., Wang, H., et al. (2014). Characterization of the tomato ARF gene family uncovers a multi-levels post-transcriptional regulation including alternative splicing. *PLoS One* 9, e84203.

Zouine, M., Maza, E., Djari, A., Lauvernier, M., Frasse, P., Smouni, A., et al. (2017). TomExpress, a unified tomato RNA-Seq platform for visualization of expression data, clustering and correlation networks. *Plant J.* 92, 727–735. doi:10.1111/tpj.13711.

# Annexes



## Annexe 1

## Données d'expression RNAseq extraites de la plateforme TomExpress

	RIO tomato plants	GRANDERIO control tomato to <i>P.synrigae</i>	GRANDERIO leaves exposed to <i>P.putida</i>	GRANDE tomato leaves exposed to <i>P.fluorescens</i>	RIO GRANDE tomato leaves exposed to <i>A.tumefasciens</i>	RIO GRANDE tomato leaves exposed Flagellin	CLN2777A tomato control plants	CLN2777A tomato exposed to YCV
<i>SI-ARF1</i>	0,2732	0,2394	0,3743	0,3076	0,274	0,3095	0,4074	0,295
<i>SI-ARF2A</i>	0,5404	0,3959	0,3208	0,3575	0,6185	0,3031	0,3766	0,3227
<i>SI-ARF2B</i>	0,1982	0,1385	0,1336	0,1375	0,1867	0,143	0,1075	0,0988
<i>SI-ARF3</i>	0,1208	0,1258	0,1143	0,1104	0,1284	0,1063	0,0823	0,103
<i>SI-ARF4</i>	0,1415	0,09	0,0529	0,0728	0,1772	0,0444	0,3429	0,1845
<i>SI-ARF5</i>	0,0097	0,0102	0,0056	0,0061	0,0107	0,0043	0,136	0,0474
<i>SI-ARF6A</i>	0,0587	0,0505	0,0548	0,0669	0,0508	0,0789	0,0469	0,0288
<i>SI-ARF6B</i>	0,1641	0,1247	0,1364	0,1546	0,1478	0,1322	0,0363	0,0394
<i>SI-ARF7A</i>	0,112	0,086	0,0704	0,0855	0,1127	0,0776	0,083	0,0823
<i>SI-ARF7B</i>	0,1164	0,0937	0,0671	0,0942	0,116	0,0893	0,0509	0,0673
<i>SI-ARF8A</i>	0,3882	0,5074	0,2481	0,2766	0,3797	0,2815	0,2728	0,254
<i>SI-ARF8B</i>	0,0539	0,0615	0,0372	0,0439	0,0518	0,0339	0,2788	0,1072
<i>SI-ARF9A</i>	0,0028	0,0025	0,0019	0,0019	0,0031	0,0011	0,0551	0,0236
<i>SI-ARF9B</i>	0,0499	0,0373	0,0281	0,0334	0,0427	0,0249	0,0314	0,0245
<i>SI-ARF10A</i>	0,0884	0,0588	0,071	0,0865	0,0915	0,0626	0,0497	0,0516
<i>SI-ARF10B</i>	0,0142	0,0071	0,0074	0,0087	0,011	0,0072	0,0103	0,0123
<i>SI-ARF16A</i>	0,066	0,0418	0,0339	0,0489	0,0594	0,0361	0,1024	0,0797
<i>SI-ARF16B</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>SI-ARF17</i>	0,0171	0,0076	0,0081	0,0111	0,0221	0,0072	0,0167	0,0149
<i>SI-ARF18</i>	0,1557	0,1865	0,1854	0,1524	0,1445	0,248	0,4036	0,3645
<i>SI-ARF19</i>	0,1007	0,0759	0,0636	0,0722	0,0835	0,0865	0,054	0,0697
<i>SI-ARF24</i>	0,0712	0,0786	0,0649	0,0725	0,0624	0,0592	0,0487	0,0385

## Annexe 2

### Séquence codante et séquence protéique relatives à l'ARF4

#### Séquence codante de *SIARF4*

>Solyc11g069190.1.1 Auxin response factor 4 (AHRD V1 \*\*\*\* Q2LAI9\_SOLLC); contains Interpro domain(s) IPR011525 Aux/IAA-ARF-dimerisation IPR003340 Transcriptional factor B3

```
ATGGAAATGATCTGAATCATGCATTAGTGAGTGAAGTGGAGAAGAATGTATGTTGTAATGAAGAATGTGATAAAGGGGGTGGTGGGGTGTG
TTAATTGCTCTTTGTACACTTCCACTACTTCTTCTTGTCTTCAAATGTATCTTCACTTCTTCACTTGTCTTACCTCAATTTATAAAGAGCTTTGG
CATGCTTGTGCTGGTCTCTTACTAGTTTACCCAAGAAAGGAAATGTAGTGGTTTATTTCCCTCAAGGTCATATGGAAGAAGCTGTTTCTGCTTTT
CCATTTTCACTGTCAAGATTGATTTACCAACTTTTGGTCTTCCAGCCTCAGATCTTCTGTAGAGTGGAAAGATGTCCAATTGCTTGCAAAATAAGGAA
AATGATGAGGTGTATACACAGCTCACTTCTTCTTCCCTTCCAGAGTCAATGGCTATAAGCTTAGAGGGGAAAGAACATGAAGATTCCGGGACGG
ATGAGGAAGGGAATGGAGTCAATCCAGGAAATCAGCTTCTCACATGTTCTGTAAAACGCTGACTGCTTCGGATACCACCACCCATGGTGGCTT
TTCAGTTCCTCGTGCAGCTGAAGACTGCTTCCCTTCTGGATTACAAAGAGCAAAGACCTCACAGGAGCTAATGTAAAGGATCTGCACG
GAGTAGAGTGGAAATTCGTGCACATTTATAGAGGCCAGCCAAGGCGACATTTGCTCACTACTGGATGGAGTATCTTTGTCAGCCAAAAGAATCTT
GTCTCAGGGGATGCAGTTCTTCTTGTAGGGGAGAAGGTGGAATCTCAGACTGGGAATAAGAAGAGCTGCAAGACCTAGAAATGGGCTTCTG
AATCGATAATCAAAGTCAATATTCTGGACCGATGTTCTTCTGTCAGTTGCTACAGCCCTATCAGCAAAGAGCACTTTCCATGTTTTCTATAGCC
CAAGGGCAAGTATGCTGATTTCTGTTGACCTTACCAAAAGTACGTGAAAAGCCATCAACTCTCGGATTCCTGTTGGGACAAGATTTAAAATGAAA
TTTGATTTGGATGATTACCTGAAAGAAGGTACAGCGGTGTAGTACTGGGATAAGCGATATGGATCCCTTTAGATGGCCCAACTCTAAATGGA
GATGCTTGTATGGTGCAGATGGGATGAAGATATAATGAGTAAATCATCAGGAACGGGTTTCTCTTGGGAAATGATTCTTCACTTTTCTTACCACCA
CTGAGCATTCACTCTCACCAGACTGAAGAACTGCGGACTAGTCAGCAGGCACCATAGTACTGGACAGCCATTTTGTGAGGGGAGTGTCTC
TTTTAGACTTTGAGGAGTCAATAAGATCCTCAAGGCTTTGCAAGGTCAGAAAATTTAGGCTGTATACCTCCCTATGGTTGTGATAAAACCA
GTCCGCCCACTGGATTTTCGAGCTGCAAAGAGTAGCTCGTCACAATCTCATGCCAAATGGTGTAGAGAACATTATTGTTGGTACTTTGTGAAAAC
TCAGCTCCAACAACCTACACAGGCTTTCTGGAATCCAATAGGTTTCCAAGGCTTTGCAAGGTCAGAAAATTTGCTCGTTGAGATCCCTTACTG
GAAAAGGTGATGTTAATTTGGTGTCTGGGGAAAACCTGAAATTTGGTTGCAATGTTTTCGGCACATATCAGAGGCCGAGAGCCAATTTCTATCCT
CTCGCTTCTGAAGGGCGAGGAATGTGTTTTACCTTACAATGCGATGTATAGAGCTGGACAAGATCCCGTGGTCCCTCTACAGTACTAATTT
CCAAAAGAAAAATCTACCTTGAACAGAAATCAATCCAAAATGTGGTTAGGAGGGAAGAAGTTGGAATGCCAAAAGTTTGTAAATGAGCAGAG
GCCACCGAGATGCTAAAGTGTCCATTCCAGAGAACCATTCAAGAAATGAAAATGACGACTCCTCAATGCACAGGCTCCATGTAAACTGTTTG
GCTTTTCTTGACGAAAGAACCATCTACTCTAGCTCGCAGAGTCTGTTAAGAGGAGCTGTACTAAGGTTCAAAAACAAGGCAGCTTGGTTGGA
CGAGCCATGATCTCTCGAGATTGAATGGCTATGACGACTTGTGTTGAGTTGGAGAGGCTTTTCAACATGGAAGACCTCTTAAGAGATCCCAA
CAAGGGGTGGCGAATCTGTACTGACAGTGAGAAATGACATGATGGTTGTGCGGAGATGATCCATGGCATGAGTTCTGTGAGGTAGTATCCAAG
ATCCATATATACACTCAAGAAGAAGTGGAGAAAATGACTATTGAGGGGATCAGCGATGACACTCAAAGTTGTTTGGAGGAGGCACCAGCAATC
ATGGATGTCTCAAAGTCTTTCAGTTGGCCAGCCTGATTATCTCAAAGTGAATCAGGATTTGA.
```

#### Séquence protéique de *SIARF4*

>Solyc11g069190.1.1 Auxin response factor 4 (AHRD V1 \*\*\*\* Q2LAI9\_SOLLC); contains Interpro domain(s) IPR011525 Aux/IAA-ARF-dimerisation IPR003340 Transcriptional factor B3

```
MEIDLNHALVSEVEKNVCCNEEDKGGGGCVNCSLYTSTSSCSSNVSSSSSLALTSIYKELWHACAGPLTSLPKKGNVVVYFPQGHMEEAVSAFPFS
PVKIDLPTFGLQPIFCRVEDVQLLANKENDEVYQLTLLPLPESMAISLEGKEHEDSGTDEEGNGVNPNGKSAASHMFKTLTASDTHHGGFVPRRAA
EDCFPLDYKEQRPSQELIAKDLHGVEWKFRHIYRQPRRHLLTTGWSIFVSQKNLVSGDAVLFRLRGEENLRLGIRRAARPRNGLPESIIKSQYSGPDV
LSSVATALSAKSTFHVFYSPRASHADFVVPYQKYVKAINSRIPVGRFKMKFDLDDSPERRYSGVVTGISDMDPFRWPNKWRCLMVRWDEDIMSNH
QERVSPWEIDSSVSLPLSIQSSPRLKCLRSTQQAPSVLDSHFAGGSALLDFEESIRSSKVLQGGQENLGLISPPYGC DKPVRPLDFELQVVARHNLMPNGV
ENIIVGDFVKTQPPTTYTGFLSNRFPKVLQGGQEICSLRSLTGKGDVNFAGWGKPEFGCNVFGTYQRPRANFYPLASEGARNVFLPYNAMYRAGQDPV
VPSYSTNFQRENPTLNQNSIQNVVREEVGMKPFVNEQRPPEMSKVSIPENHFKNENDDSFNAQAPCKLFGFSLTKEPSTPSSQSSGKRSC TKVHKQGS
VGRAIDL SRLNGYD DLLVELERLFNMEDLLRDPNKGWRILYTDSENDMMVVGDDPWHEFCEVVKIHIYQEEVKEKMTIEGISDDTQSCLEEA AIMD
VSKSSSVGQDSSPTVIRI*
```

---

## Annexe 3

### Technique de coloration GUS des explants végétaux

#### Objet et principe de la technique :

La technique a pour objectif de visualiser l'expression spatio-temporelle du gène codant pour la  $\beta$ -glucuronidase sous le contrôle d'un promoteur d'intérêt. Elle consiste en une incubation des tissus transformés dans un tampon contenant du 5-Bromo-4 chloro-3-indetyl Glucuronide (X-Gluc), substrat de la  $\beta$ -Glucuronidase utilisé comme gène rapporteur. Le produit de la réaction enzymatique est un composé coloré bleu qui permet de visualiser, après décoloration des tissus, l'expression du gène rapporteur.

#### Mode opératoire :

Le mode opératoire consiste en une immersion des explants dans la solution X-Gluc dont la concentration est comprise entre 0,3 et 0,5 mg/ml. Cette dernière est obtenue en diluant la solution concentrée de X-Gluc dans un volume bien déterminé de la solution tampon.

Plusieurs infiltrations sous vide doivent être réalisées : 2 fois pendant 5 min puis une fois pendant 15 min avant de procéder à une incubation du matériel végétal à 37°C pendant 6 à 16H.

Après incubation, les explants sont décolorés en les mettant en contact avec de l'éthanol à 50%, à 75% et à 95%.

#### - Préparation de la solution concentrée de X-Gluc :

Dissoudre la poudre X-Gluc dans du Dimethylsulfofide (DMSO, sous la hôte de façon à obtenir une concentration finale de 100mg/ml. Une fois préparée, la solution concentrée de X-Gluc est conservée à -20°C, à l'obscurité.

#### - Préparation de la solution tampon :

La solution tampon (pH=7,2) est préparée à partir de :

- 100 ml du tampon phosphate à pH 7,2 obtenu par mélange de 68,4 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> avec 31,6 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- 20 ml EDTA à 0,5 M.
- 1 ml de Triton x100.
- 879 ml d'eau bi-distillée.

Une fois préparée, cette solution est conservée jusqu'à utilisation à -4°C.

---

## Annexe 4

### La PCR quantitative

#### Principe et objectif de la technique :

La PCR quantitative est une technique qui permet l'analyse du niveau d'expression de gènes d'intérêt de façon quantitative dans des échantillons donnés par rapport à un gène de référence non régulé ubiquitaire. Elle se base sur l'utilisation d'un marqueur fluorescent « Syber Green » qui permet la quantification de l'amplicon formé, proportionnel à la quantité de transcrits initialement présents.

Ceci est réalisé en deux étapes :

- L'optimisation des concentrations en ADNc et en amorces.
- L'analyse du niveau de l'expression des gènes d'intérêt.

#### 1- Détermination des concentrations optimales en ADNc et en amorces :

Les concentrations optimales en ADNc et en amorces requises pour la PCR quantitative sont déterminées suivant les résultats de tests réalisés au préalable. Pour nos amplifications, nous avons jugé approprié d'utiliser une dilution de l'ordre de 1/25 pour les ADNc (annoté par  $C_2$ ) et de 1/5 pour les amorces des gènes SI-ARFs étudiés ( $P_2$ ).

Pour le contrôle « Actine », les amorces doivent être diluées pour avoir une concentration  $P_2$  (1/25).

#### 2- Préparation du Mix PCR :

Le Mix PCR comprend :

- 5  $\mu$ l Power SYBR Green PCR master mix.
- 0,5  $\mu$ l ADNc ( $C_{opt} = C_2$ ).
- 2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.
- 2,5  $\mu$ l amorces ( $P_{opt} = P_2$ ).

En pratique, on prépare les mixes à  $C_{opt}$  sans les amorces: on distribue 7,5  $\mu$ l dans chaque puit et on ajoute 2,5  $\mu$ l de solution d'amorces à  $P_{opt}$ .

### 3- Analyse des résultats Q-PCR :

Avant de procéder à l'analyse des résultats, il est impératif de vérifier la reproductibilité technique pour les 3 répétitions en regardant les courbes d'amplification. En principe, elles doivent être superposées. Par contre, si l'une s'écarte de plus d'un demi-cycle (Ct) au niveau du seuil, elle doit être éliminée.

Le traitement des résultats se fait comme suit :

- Calcul de la moyenne des Ct pour chaque groupe de répétition technique, y compris pour les amorces contrôles « Actine ».
- Soustraction de la valeur moyenne de Ct de celle du contrôle « Actine » pour un gène donné pour un ADNc donné ( $\Delta Ct$ ).
- Calcul du  $\Delta \Delta Ct$  qui correspond à la différence entre le  $\Delta Ct$  de la condition (Stress) et le  $\Delta Ct$  de la référence pour chaque répétition biologique.
- Détermination de la valeur du Fold Change qui correspond à :  $2^{\Delta \Delta Ct}$ .
- Calcul de la valeur du  $\text{Log}_{10}$  (Fold Change).

## Annexe 5

### Composition des milieux MS (Murashige & Skoog, 1962) et MS/2

Macroéléments	MS	MS/2
	mg/l	mg/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	825
KNO <sub>3</sub>	1900	950
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	440	220
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	370	185
KH <sub>2</sub> , PO <sub>4</sub>	170	85
Micro-éléments	mg/l	mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,10	3,10
MnSO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O	8,45	8,45
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	4,30	4,30
KI	0,42	0,42
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,13	0,13
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,01	0,01
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,01	0,01
Solution Fe-EDTA	mg/l	mg/l
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8
Na <sub>2</sub> - EDTA	37,3	37,3

## Annexe 6

### Composition de la solution nutritive (BROUGHTON et DILLWORTH) modifié

Solution mère	M	g/l
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	2M	294
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1M	136
MgSO <sub>4</sub>	0,5M	123
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5M	87
MnSO <sub>4</sub>	2mM	0,34
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4mM	0,247
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1mM	0,288
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,4mM	0,100
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,2mM	0,048
CoSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2mM	0,056
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O		7,45
Na <sub>2</sub> - EDTA		5,57

## Résumé

La croissance et le développement des plantes sont souvent entravés par une multitude de stress environnementaux. La compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires déployés par les plantes en réponse à ces stress est cruciale pour l'amélioration de la survie et du rendement des plantes. L'auxine joue un rôle prépondérant dans la croissance et le développement des plantes et dans l'interaction des plantes avec leur environnement. Cependant, son implication dans le processus de réponse des plantes aux stress abiotiques reste peu étudiée. Les facteurs de réponse à l'auxine sont des facteurs clés dans la voie de signalisation auxinique. Ces facteurs de transcription assurent l'activation ou la répression des gènes de réponse à l'auxine.

Afin de mieux comprendre l'implication de l'auxine dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques, une analyse d'expression des *ARFs* en réponse aux stress a été réalisée chez la tomate. L'analyse *in silico* des données RNAseq extraites de la plate-forme « TomExpress » a montré que l'expression de plusieurs *ARFs* est régulée en réponse à une infection de type bactérienne ou virale. L'analyse *in silico* des promoteurs des 22 *ARFs* a révélé que ces régions présentent plusieurs éléments cis-régulateurs spécifiques à la réponse aux stress biotiques et abiotiques. Par ailleurs, l'analyse par PCR quantitative de l'expression des *ARFs* en conditions de stress salin, hydrique et d'hypoxie a révélé que la majorité de ces gènes s'expriment de manière différentielle dans les tissus foliaires et racinaires.

Une analyse fonctionnelle du gène *SIARF4* a été réalisée en vue d'évaluer son implication dans la réponse aux stress hydrique et salin. Cette étude a montré que la sous-expression de *SIARF4* résulte en un meilleur développement racinaire, une accumulation importante des sucres solubles et une teneur élevée en chlorophylle en conditions de stress. Les plantes transgéniques sous exprimant le gène *SIARF4* (*ARF4-as*) présentent un enroulement des feuilles, une faible conductance stomatique associée à une nette augmentation de la teneur relative en eau et à une hausse de la teneur en ABA. Chez ce mutant, l'augmentation de la teneur en ABA est positivement corrélée avec l'activation des gènes de biosynthèse et la répression des gènes de catabolisme de cette hormone. Par ailleurs, l'expression des gènes codant pour les antioxydants est induite de manière significative chez les plantes *ARF4-as*. Ainsi, les données présentées dans ce travail suggèrent fortement l'implication de l'auxine dans la réponse aux stress abiotiques et soulignent l'implication de l'*ARF4* en tant qu'acteur clé dans l'acquisition de la tolérance au stress salin et hydrique.

**Mot-clés:** Auxine, Facteurs de réponse à l'auxine, *ARF4*, stress salin, stress hydrique, *Solanum lycopersicum*, tolérance.

## Abstract

Survival biomass production and crop yield are heavily constrained by a wide range of environmental stresses. Understanding physiological and molecular basis of plant response and tolerance to environmental stresses is important to improve plant survival, crop yield and quality. Auxin plays an important role in plant growth, development and interaction with encountering environment. By contrast, its role in stress responses remains so far poorly studied. Auxin Response Factors play a key role in auxin signaling pathway by ensuring the transcriptional activation or repression of auxin-responsive genes.

As a mean to gain more insight on auxin involvement in a set of biotic and abiotic stress responses in tomato, the present study uncovers the expression pattern of *SIARF* genes in tomato plants subjected to biotic and abiotic stresses. *In silico* mining of the RNAseq data available through the public TomExpress web platform, identified several *SIARFs* as responsive to various pathogen infections induced by bacteria and viruses. Accordingly, sequence analysis of the 5' regulatory region of these *SIARFs* revealed the presence of several *cis*-acting elements associated with biotic and abiotic stress response. Moreover, quantitative qPCR expression analysis revealed that many *SIARFs* were differentially expressed in tomato leaves and roots under salt, drought and flooding stress conditions.

Functional analysis of *SIARF4* gene was performed in order to evaluate its involvement in plant response to salt and drought stresses. Our results showed that the down-regulation of this gene improves tomato tolerance to salt and drought stress by promoting root development and density, increasing soluble sugars content and maintaining chlorophyll content at high levels in stress conditions. Besides that, *ARF4-as* plants displayed a leaf curl phenotype, a low stomatal conductance coupled with an increase in leaf relative water content and ABA content under normal and stressful conditions. This increase in ABA content was correlated with the activation of ABA biosynthesis genes and the repression of ABA catabolism genes. *cat1*, *Cu/ZnSOD* and *mdhar* genes were upregulated in *ARF4-as* plants suggesting that *ARF4-as* mutant is more tolerant to salt and water stress. The data presented in this work strongly support the involvement of auxin in stress responses and underlines the involvement of *ARF4* as a key actor in tomato tolerance to salt and drought stresses.

**Keywords:** Auxin, auxin response factors, *ARF4*, salt stress, drought stress, *Solanum lycopersicum*, tolerance.



