



Master Biologie, Géoscience, Agronomie, Environnement

Spécialité : Biologie et Evolution des Plantes

Parcours : Biologie Fonctionnelle des Plantes

M2 Recherche

Année universitaire 2007-2008

Expression des gènes codant pour les invertases acides et les ASRs

chez six géotypes de riz soumis à un stress hydrique :

Implication potentielle dans la régulation du métabolisme carboné

Denis FABRE

UMR 1098 Développement et Adaptation des Plantes

UPR 59 Modélisation Intégrative

CIRAD – Montpellier



Soutenu le 09 octobre 2008

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette



Expression des gènes codant pour les invertases acides et les ASRs
chez six géotypes de riz soumis à un stress hydrique :
Implication potentielle dans la régulation du métabolisme carboné

Résumé :

Cette étude vise à quantifier la réponse au stress hydrique du niveau d'expression de deux familles de gènes chez six géotypes de riz (*Oryza sativa* L.) en phase végétative. Elle s'intègre dans un contexte scientifique plus large visant à explorer le rôle du métabolisme carboné dans la réponse morphogénétique et physiologique (relations sources-puits) du riz sous stress hydrique, pour ensuite en étudier la diversité génétique, notamment par étude d'association.

Une expérimentation sur six accessions de riz a été conduite en milieu contrôlé, pour notamment analyser l'expression des gènes candidats (par Q-PCR) de la famille ASR, facteurs de transcription régulés par l'ABA, et de la famille des invertases vacuolaires (VIN) et pariétales (CIN), dans les feuilles sources (matures) et puits (en expansion).

Un stress hydrique a été appliqué sur un lot de plantes à partir du stade 7 feuilles sur le brin maître, avec un suivi permanent et automatisé de l'humidité du sol et de la transpiration des plantes par gravimétrie.

Les résultats obtenus ont été confrontés de façon préliminaire à des données biochimiques et moléculaires acquises préalablement sur des expérimentations similaires, mais sur un seul géotype commun à cette étude. Ils suggèrent essentiellement que le niveau d'expression des gènes d'invertases pariétales et vacuolaires sous stress augmente de façon générale dans les organes puits. Cela a été interprété comme des mécanismes permettant de maintenir une activité au niveau des organes puits (invertases pariétales) et d'ajustement osmotique (invertase vacuolaire).

On constate aussi que les gènes *Asr* font l'objet d'une régulation du niveau d'expression en condition de stress hydrique, et notamment au niveau du type d'organe où l'on observe de forts contrastes.

Mots clés : Riz, *Oryza sativa* L., qRT-PCR, invertase pariétale, invertase vacuolaire, ASR

REMERCIEMENTS

Ces deux années passées à la découverte d'un « nouveau monde », celui de la biologie moléculaire, ont été une expérience professionnelle intense et unique, parfois pas évidente à gérer, mais qui resteront inoubliables par les nouvelles connaissances et méthodes acquises, ainsi que par l'opportunité des nombreuses rencontres effectuées.

Je profite de ces quelques lignes pour exprimer en particulier ma profonde et sincère gratitude à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail. J'oublierai inévitablement des noms, que ces personnes veuillent bien m'en excuser.

Merci tout d'abord à Françoise Dosba et à Emmanuel Guiderdoni, pour leur accueil au sein de l'UMR Développement et Adaptation des Plantes, et à Angélique d'Hont responsable de l'équipe Structure et Évolution des Génomes, pour m'avoir accueilli dans son équipe.

J'exprime toute ma reconnaissance vis-à-vis de mon encadrement direct : Dominique This et Delphine Luquet pour leur encadrement de grande qualité, qui m'ont orienté au cours de ce travail, avec tous les échanges riches, passionnés et fructueux, mêlant point de vue génétique et écophysiological, et toujours avec une grande disponibilité tout au long de ce travail.

Merci aussi à Michael Dingkuhn pour sa rigueur scientifique et la pertinence de ses remarques qui ont su maintenir ma réflexion dans une dimension logique et pratique, dans la manière de traiter les résultats.

Je remercie pour leur gentillesse et leur générosité toutes les personnes et collègues chercheurs, techniciens et doctorants du bâtiment 3 qui m'ont aidé et conseillé, et qui par leurs sourires ont largement agrémenté mes longues journées d'expérimentations. Un grand merci particulier à Giang Khong, doctorante, pour mes innombrables sollicitations. Ses conseils et suggestions m'ont été d'une aide précieuse.

Merci également à mes compagnons de bureau, Pierre et Romain de m'avoir supporté durant quelques mois, et aussi aux amis de tous les jours pour leur bonne humeur au quotidien et dans les moments de galères !

Merci enfin à tous les membres de mon équipe au Cirad, l'équipe Modélisation Intégrative (maintenant Aiva !) que je côtoie au quotidien, et pour tous vos conseils, votre soutien sans faille, et vos encouragements de tous les instants !

Encore MERCI à tous !

17 SEP. 2008

SOMMAIRE

1- Introduction.....	2
a- Les invertases :	3
b- Les Asr :	4
2- Résultats	8
2.1- Variation des Ct (Cycle Threshold) de l'Actine (référence) et des gènes étudiés : .	8
a- Variabilité des Ct actine	8
b- Variabilité des Ct gènes	8
2.2- Efficacité des PCR pour les gènes étudiés.....	9
2.3- Rapport des niveaux d'expression des gènes Asr en conditions de stress hydrique par rapport aux conditions témoins	9
2.4- Niveau d'expression des gènes d'invertases en condition de stress hydrique :	11
3- Discussion et perspectives	12
3.1- Analyse critique méthodologique de l'étude.....	12
a- Méthode de conduite de l'essai	12
b- Choix du gène de ménage	12
3.2- Comparaison des résultats obtenus à des études antécédentes.....	13
a- Comparaison des expressions de gènes invertases chez IR64	13
b- Interprétation générale de l'expression des gènes d'invertases et de leurs rôles dans le métabolisme des sucres :	14
3.3- Diversité d'expression des gènes Asr au sein de l'espèce	16
4- Matériels et méthodes.....	18
a- Matériel végétal et conduite de la culture	18
b- Extraction des ARN, purification et quantification	19
c- Transcription Inverse, synthèse des ADNc	20
d- Design et validation des amorces pour la qRT-PCR	20
e- Conditions et analyses par la PCR quantitative en temps réel	20
f- Traitement statistique des données	21

1- Introduction

Lors d'un stress hydrique, des espèces ou même des génotypes différents, soumis aux mêmes conditions de sol et de climat ne perçoivent pas le même niveau de sécheresse, et ne réagissent pas de façon identique. Des mécanismes d'évitement comme la fermeture stomatique, la réduction de la croissance des organes sont connus pour être régulés et coordonnés par des signaux hormonaux et chimiques (Wingler et al 2006, Tardieu et al 2005, Liu 2004, Yang et al 2003), intervenant à des pas de temps différents. Ces signaux jouent notamment sur la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de plusieurs gènes, conduisant à une régulation de la synthèse de protéines et d'osmolytes (Bonhert et al 1995). Il a été aussi montré que l'induction par le déficit hydrique dépend du stade de développement, de l'organe considéré (Vincent et al. 2005) et du génotype (de Vienne et al 1999 ; Riccardi et al 1998 et 2004 ; Salekdeh, 2002).

La signalétique de ces modifications est en elle-même complexe, en particulier parce que plusieurs signaux se superposent et s'entrecroisent comme l'acide abscissique (ABA), l'éthylène ou encore les sucres (Leon et Sheen 2003, Sharp 2002).

Dans ce contexte, comme dans le cas d'autres stress biotiques ou abiotiques, les plantes mettent en jeu, notamment, des mécanismes de régulation du métabolisme des sucres et de leur translocation, leur conférant une plasticité extraordinaire (Luquet et al. 2005 ; Dingkuhn et al. 2006). Chez la plupart des plantes supérieures, les sucres sont synthétisés dans les feuilles sources, transportés vers les tissus puits sous la forme de saccharose pour maintenir une activité métabolique et de croissance, ou encore stockés sous forme de saccharose et d'amidon (ou autres sucres complexes). Il est désormais montré que les sucres, notamment le saccharose et ses produits de clivage, constituent des signaux métaboliques essentiels qui affectent l'expression de différentes classes de gènes (Rolland et al 2002, Koch 1996) et sont fortement impliqués dans la régulation du développement (Wobus, 1999), notamment vis-à-vis du stress hydrique et l'ajustement osmotique (Ragonni et al 2007, Roitsch 2004). Cet ajustement est effectué via l'accumulation de solutés compatibles avec la vie de la cellule, ou osmo-protectants : Proline, glycine bêtaïne, polyols (mannitol, sorbitol), tréhalose, glucose, fructose, saccharose, fructanes (Abebe et al 2003, Garg et al 2002, Zhang et al 1999).

Les stimuli environnementaux permettent aussi à la plante de réguler la production de composés dans les organes source (feuilles matures) en fonction des besoins des organes puits (racines, feuilles immatures, organes juvéniles) (Waclawovsky et al. 2006). De ce fait, la

croissance et le développement des plantes s'accompagnent de changements dans les relations sources/puits (Stitt et al. 2007, Yang et al. 2003, Roitsch et al. 2000). Cela a été notamment étudié à des stades de développement avancés pour comprendre la contribution du métabolisme carboné dans la réduction du rendement sous stress hydrique (chez le riz, le soja, le maïs, cf. revue de Liu et al 2005). On constate toutefois que relativement peu d'études ont abordé les conséquences du stress hydrique au stade végétatif sur la dynamique des sucres, son rôle dans la régulation des relations source-puits et de l'ajustement osmotique, prenant en compte le niveau transcriptionnel de ces processus. Cela présente pourtant un réel intérêt agronomique pour la compréhension de la résistance à la sécheresse chez les plantes

Dans ce contexte, deux familles de gènes apparaissent particulièrement intéressantes : les invertases et les Asr. L'une est directement impliquée dans le métabolisme des sucres car codant pour des enzymes du métabolisme (invertases), l'autre intervenant plus en amont (Asr) codant pour des facteurs de transcription, régulant l'expression des gènes intervenant dans le métabolisme carboné.

a- Les invertases :

Les invertases sont des enzymes présentes chez la plupart des plantes sous de multiples formes, et sont classifiées suivant leur pH optimum (acide et neutre/alcaline), leurs différentes solubilités (soluble/insoluble) et leurs localisations cellulaires. Les formes pariétales et vacuolaires sont acides, la première étant insoluble et la seconde soluble. Elles sont responsables de l'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose. De ce fait, elles fournissent les sucres impliqués dans la signalisation, la régulation osmotique et des relations sources-puits, la protection des membranes. Ce sont des enzymes clés du métabolisme qui sont impliquées sous de multiples aspects dans le cycle de vie de la plante et dans sa réponse aux stimuli environnementaux. Les invertases, seules ou en combinaison avec des hormones de la plante, peuvent réguler à la fois la croissance et le développement des plantes, de l'expression du gène au partitionnement des sucres et aux réponses hormonales (Roitsch et al, 2004).

Chez le riz, il a été découvert 2 gènes d'invertases vacuolaires (*OsVIN1,2*), 9 gènes d'invertases pariétales (*OsCIN1-9*) et 8 gènes codant pour des invertases neutres (*OsNIN1-8*). (Ji et al, 2005).

Les invertases vacuolaires ont un pH optimum de 5.0-5.5, et sont localisées au niveau de la vacuole. Elles sont caractérisées par une partie N-terminale différente des invertases

pariétales. Les gènes d'invertases vacuolaires chez le riz (*OsVIN1,2*) ne sont pas spécifiques à certains organes contrairement aux invertases pariétales. Elles déterminent le niveau de saccharose stocké dans la vacuole, interviennent dans sa remobilisation lors des processus métaboliques et jouent probablement un rôle important dans les phénomènes de régulation source/puits pour les carbohydrates (Trouverie et al 2006). Il a été montré leur implication dans les phénomènes d'ajustement osmotique chez le maïs au niveau des feuilles sources (Trouverie et al.2003).

Les invertases pariétales, appelées aussi invertases extracellulaires, apoplasmiques ou périplasmiques, sont caractérisées par un pH optimum de 3.5-5.0 et un haut point isoélectrique.

Dans les organes en croissance (puits), elles ont un rôle important, en augmentant les mouvements entrants de carbohydrates et en maintenant un gradient de concentration de saccharose entre le phloème et les tissus puits (Cheng et al 1996 ; Sturm et al 1995) constituant ainsi une provision d'hexose dans ces cellules (Bonfig et al 2007 ; Liu et al 2004) par la création d'une force de puits.

Les gènes d'invertases pariétales, sont très spécifiques et exprimés uniquement dans certains tissus pour certaines d'entre elles (Cho et al 2005, Ji et al 2005). Elles interviennent probablement dans la régulation et le développement des organes, et de ce fait dans l'activité des puits (Bonfig et al 2007, Sherson et al 2003 ; Roitsch 2000).

Les gènes *OscIN(3,6,7)* ne seront pas analysés dans notre étude, car ils sont respectivement spécifiques des organes reproducteurs et des racines (Cho et al 2005 ; Ji et al 2005)

Les invertases neutres sont aussi appelées alcalines ou cytoplasmiques en raison de leur pH optimum (6.8-8.0) et localisation cellulaire. Leur activité enzymatique, généralement faible, fait que ce type d'invertase a été moins étudié que les autres, du moins chez le riz. Nous ne les analyserons pas dans cette étude. On trouve néanmoins chez la canne à sucre des travaux intéressants sur son implication dans le métabolisme des sucres (Siswoyo et al 2007 ; Batta et al.2007 ; Rossouw et al. 2007)

b- Les *Asr* :

Les *Asr* (abscisic acid-, stress- and ripening-induced ; Iusem et al 1993) sont des gènes qui répondent aux stress abiotiques tels que le déficit hydrique, la salinité, le froid et la lumière limitante (Riccardi et al 1998; Vaidyanathan et al 1999, Maskin et al 2001; Kawasaki et al

2001; Wang et al 2003a). La plupart des *Asr* se trouvent régulés par l'ABA. Les différents gènes *Asr* identifiés chez la plupart des espèces présentent généralement une nomenclature de type *Asr1*, 2,... mais la phylogénie de ces gènes ne permet pas d'établir de relation d'orthologie entre monocotylédone et dicotylédone.

La protéine ASR1 a été décrite pour la première fois chez la tomate comme une protéine induite par l'ABA, le stress et le mûrissement du fruit (Iuseum et al 1993). Les protéines ASR sont hydrophiles, de petite taille et largement répandues dans le règne végétal (à l'exception notable d'*Arabidopsis thaliana* et probablement des *Brassicaceae* en général). Leur fonction demeurerait méconnue jusqu'à ces dernières années (Carrari et al 2004).

De récents résultats ont montré :

- qu'une ASR de tomate est capable à l'état dimérique de se fixer à l'ADN par un processus dépendant du Zn^{2+} (Kalifa et al 2004)
- qu'une ASR de baie de raisin est co-réglée par l'ABA et les sucres, et qu'elle contrôle l'expression d'un homologue de transporteur d'hexoses en se fixant sur son promoteur (Cakir et al 2003)
- que la surexpression du gène *Asr1* de maïs (*ZmASR1*) affecte la sénescence foliaire (Jeanneau et al 2002) et le rendement en grains en conditions de sécheresse.

De façon générale les protéines ASRs sont localisées au niveau du noyau où elles régulent des promoteurs spécifiques (Wang et al 2005, Yang et al 2005). Les ASRs agissent probablement comme facteurs de transcription qui auraient pour cibles les gènes codant pour des transporteurs d'hexoses et répondant à l'ABA. La plupart des ASRs, étant eux-mêmes induits par l'ABA et régulant des gènes impliqués dans le transport des sucres et la réponse à l'ABA, d'autres auteurs positionnent les ASRs dans un « dialogue croisé » entre hormones et sucres, en réponse au stress hydrique (Finkelstein et Gibson 2002). Ces protéines établiraient un lien entre le métabolisme des sucres et la signalétique de l'ABA (Cakir et al 2003)

Chez la tomate, il a été montré par *Northern Blot* que les deux gènes *Asr1* et *Asr4*, sont fortement exprimés dans les feuilles (matures ou sources) en conditions de stress hydrique (Maskin et al 2001 ; Doczi et al 2005). Des travaux récents suggèrent aussi que la protéine ASR1, chez la tomate, aurait une activité chaperonne à l'état monomérique et cytosolique, qui protégerait et stabiliserait d'autres protéines contre les phénomènes de dénaturation lors de stress thermiques (Konrad, et al 2008).

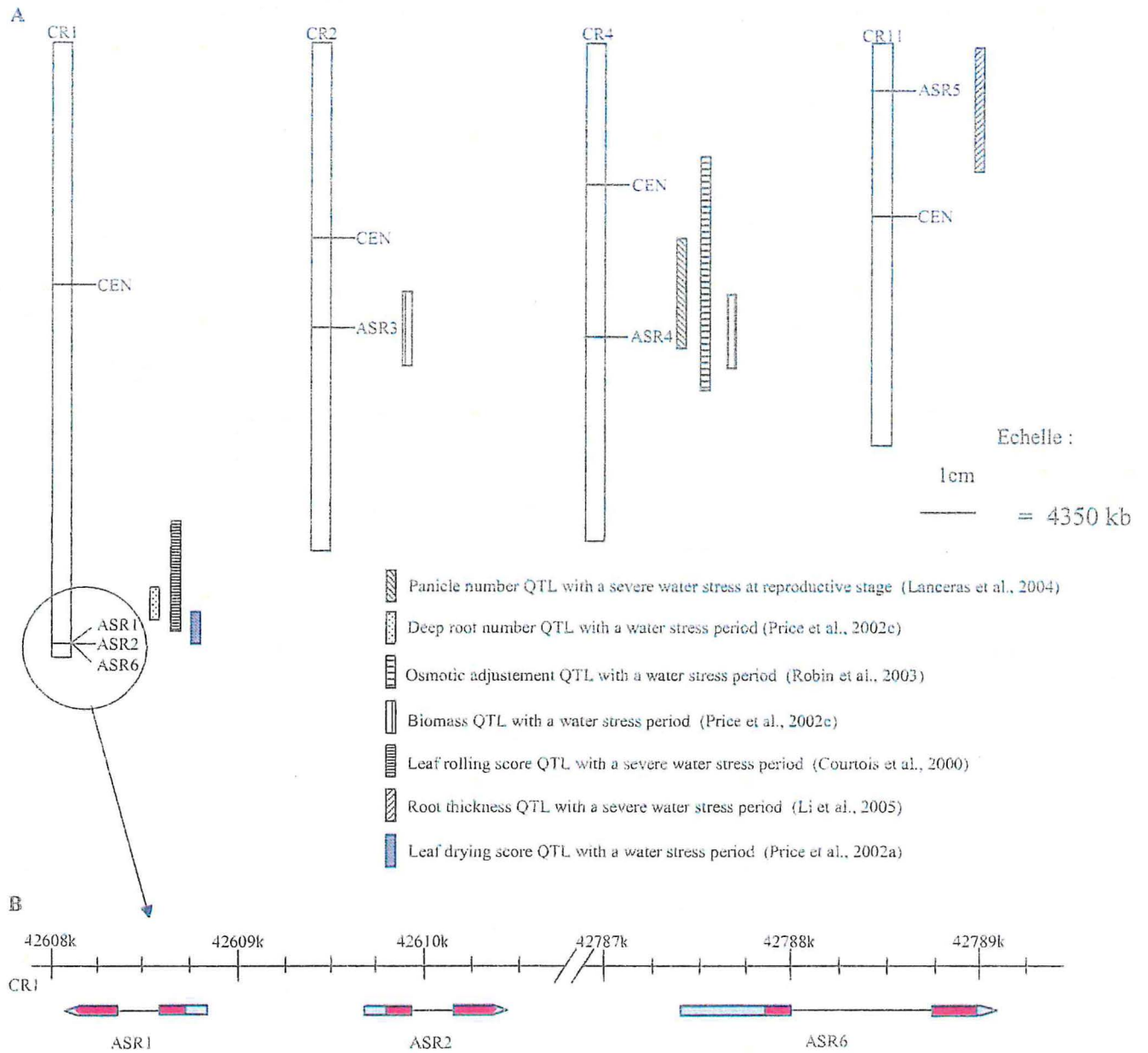


FIGURE 1

Distribution génomique de la famille des gènes ASR. (d'après Philippe et al., article en préparation)

A : Localisation chromosomique des gènes ASR et leur colocalisation avec des QTL en condition de stress hydrique sont indiqués.

B : Zoom sur la localisation des ASR 1, 2 et 6 sur le chromosome 1.

L'unité est en kilobase.

Les ASRs chez le riz :

Très peu de données sont disponibles dans la littérature concernant les ASRs du riz. Toutefois, les études *in-silico* sur le génome du riz dénombrent 6 gènes d'Asr. Ces derniers sont positionnés sur des chromosomes différents (1,2,4 et 11). Deux classes d'ASR peuvent être établies :

- les ASR courtes (ASR1, 2, 3 et 5)
- les ASR longues (ASR4 et 6)

Asr1 et *Asr2* sont localisés en tandem et ont la même longueur d'intron (ce qui représente probablement une duplication récente du gène), alors qu'*Asr6* se situe à un peu plus de 200kb de la paire *Asr1-Asr2* sur le chromosome 1. Un seul gène d'Asr se trouve sur les chromosomes 2, 4 et 11 (Figure 1B).

La protéine ASR4 est hautement divergente des autres ASRs, et se trouve être la plus grande de cette famille (229 acides aminés).

On note qu'ASR1 et 2 sont des protéines similaires avec 73,7% d'identité. ASR3 est proche d'ASR5 avec 58,6% d'identité.

Des informations préliminaires sur l'expression et le rôle de chaque membre de la famille des gènes *d'Asr* durant un stress hydrique peuvent être apportées par leur colocalisation avec des QTLs connus, impliqués dans le stress hydrique.

Une macro Excel développée pour la comparaison de données publiées sur le riz (J.F Rami, B. Courtois, CIRAD, données non publiées) a permis une identification de plusieurs QTLs impliqués dans la tolérance au stress hydrique à proximité de locus d'Asr (Figure 1A). Il apparaît que des QTLs impliqués dans l'enracinement profond et l'enroulement des feuilles, sont situés à proximité des *Asr1*, 2 et 6. Un autre QTL pour l'épaisseur des racines sous stress hydrique contient *Asr5* dans son intervalle de confiance, et un autre intervenant dans la biomasse foliaire en conditions de stress hydrique est centré sur le locus d'*Asr3*. Enfin un cluster de QTLs pour le nombre de panicules, la biomasse sous stress et l'ajustement osmotique, colocalise avec *Asr4*.

La base de données génétique TIGR pour le riz (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=rice>), révèle un grand nombre d'ESTs (Expressed Sequence Tag) issus de plusieurs banques d'ADNc, présentant au moins 98% d'identités de séquence nucléotidique avec les différents gènes d'Asr. Seulement 7 ESTs présentent une homologie avec *Asr1* et 3 (pour les feuilles en condition de stress hydrique). Par contre, 90 ESTs

correspondant au gène *Asr2* ont été identifiées au niveau des feuilles, mais pas spécifiquement en condition de stress hydrique.

Un grand nombre d'EST ont été identifiés pour *Asr 3, 4, 5* et *6* (respectivement 97, 179, 1109 et 111) dans différentes conditions, incluant du matériel végétal qui a subi un stress hydrique (respectivement (1, 5, 4 et 3). Tous les gènes semblent être exprimés au niveau des feuilles et des racines, sauf *Asr2* qui n'est pas exprimé au niveau des racines.

À notre connaissance, aucune étude à ce jour n'a analysé l'expression de ces gènes chez différents génotypes de riz, pour comprendre la régulation des relations sources/puits, notamment en phase végétative.

Le présent travail s'intègre dans une étude visant à mieux comprendre les adaptations phénotypiques (physiologiques, morphologiques, métaboliques) et moléculaires du riz, face à un déficit hydrique intervenant pendant la phase végétative.

Cette étude intégrative est basée sur une expérimentation commune faisant intervenir plusieurs équipes du Cirad.

Dans ce contexte mon travail s'est focalisé sur la partie moléculaire et a été réalisé au sein de l'UMR DAP ('Développement et Adaptation des Plantes', lieu de mon stage), avec l'objectif principal de caractériser et déterminer le niveau d'expression, dans les feuilles sources et puits, de gènes candidats supposés être liés à la tolérance à la sécheresse (famille *ASR* (1,2,3,4,5,6), facteurs de transcriptions régulés par l'ABA), et à la gestion physiologique des sources et puits métaboliques (famille *OsVIN* (1,2), codant l'invertase vacuolaire et *OsCIN* (1,2,5,8) codant l'invertase pariétale). Cette étude porte sur 6 génotypes contrastés au niveau morphogénétique et représentant une partie de la diversité d'*Oryza Sativa*.

Le second objectif de cette étude était de mettre en relation les différences d'expressions observées au niveau des organes (feuilles) sources et puits, avec la dynamique des teneurs en sucres (analyse menée parallèlement par l'UPR59 'modélisation intégrative' sur le même dispositif). Nos résultats ont été confrontés de façon préliminaire à des données obtenues lors de travaux antérieurs conduits par l'UPR59 et l'UMR DAP (travaux de S.Elbelt, J. Morriggi et D.Merceron, 2006), ayant analysé respectivement l'expression des gènes *OsVIN* et *OsCIN*, et l'accumulation des sucres, dans des conditions similaires d'expérimentation, mais sur un seul génotype (IR64, commun à notre étude). Ces expérimentations seront appelées dans la suite de notre étude exp.1 (analyse des gènes + sucres) et exp.2 (analyse des sucres uniquement). Par cette approche nous visons une meilleure compréhension des processus métaboliques de régulation des relations source-puits au stade végétatif chez le riz.

2- Résultats

2.1- Variation des Ct (Cycle Threshold) de l'Actine (référence) et des gènes étudiés :

a- Variabilité des Ct actine

A la suite des analyses de Q-PCR nous nous sommes intéressés à vérifier le comportement du gène rapporteur choisi. Un « bon » gène de référence est un gène qui n'est pas induit par le traitement que l'on fait subir pour mesurer la variation du gène cible. Effectuer une correction à partir d'un gène de référence permet d'éliminer les effets de fluctuation.

Pour l'ensemble des analyses effectuées nous avons obtenu les Ct actine moyens suivants (+/- écarts-types).

	Sources	Puits
Témoins	29,8 (+/- 2,1)	25,9 (+/- 2,9)
Stressés	30,4 (+/- 2,2)	27,8 (+/- 2,9)

Les résultats d'analyse des rapports d'expression par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$, bien que séparant les organes sources des organes puits, sont directement influencés par des variations éventuelles du gène rapporteur. Dans notre cas, **l'actine se révèle relativement stable pour les organes sources, mais plus fluctuante pour les organes puits**, d'où un risque de surexpression de nos résultats dans le dernier cas.

Pour savoir si cette variation était importante, nous avons effectué un test de comparaison de moyennes (test de Student, seuil $\alpha = 0.05$) entre les traitements et pour chaque organe, en intégrant l'ensemble des accessions et des gènes étudiés. Celui-ci a montré qu'il **n'y avait pas de différence significative du Ct actine entre les 2 traitements, et pour chacun des organes.**

Nous avons poussé l'analyse en effectuant des analyses de variance (ANOVA) et tests de comparaison de moyennes sur chacune des plaques de Q-PCR (c'est à dire pour chacun des gènes étudiés). Cette analyse n'a pas non plus révélé de différence de Ct actine significative entre les traitements et génotypes.

b- Variabilité des Ct gènes

La valeur des Ct pour chaque gène est dépendante de la quantité d'ARNm correspondante, et ceci de façon inversement proportionnelle.

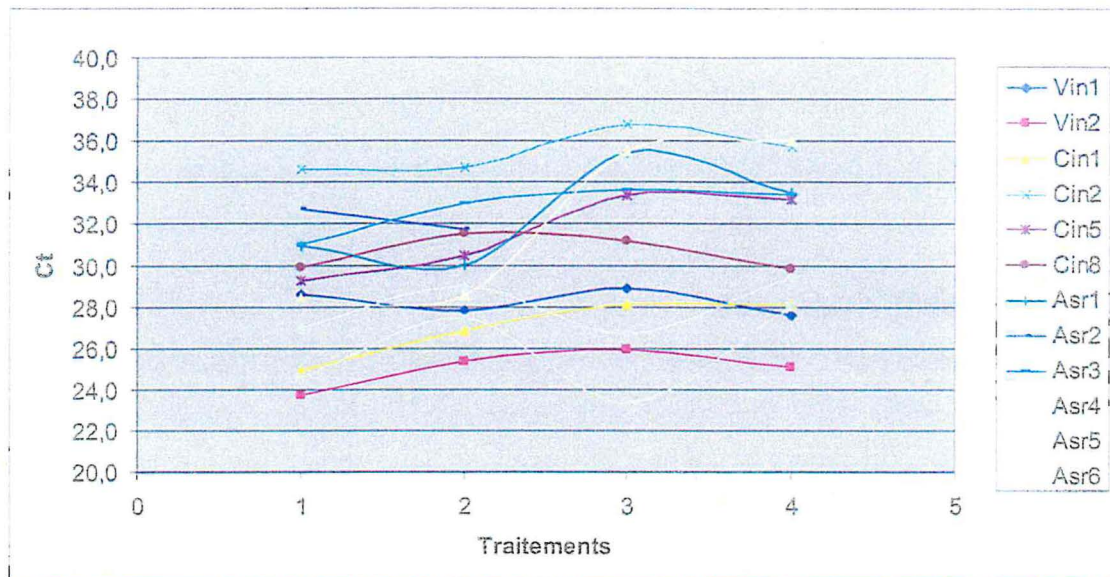


FIGURE 2

Variabilité des Ct des différents gènes suivant le traitement et le type d'organe, pour le génotype Dom Zard.

Traitement 1 = Organe Source (Témoin)

Traitement 3 = Organe Puits (Témoin)

Traitement 2 = Organe Source (Stress)

Traitement 4 = Organe Puits (Stress)

Gène	Vin1	Vin2	Cin1	Cin2	Cin5	Cin8	Asr1	Asr2	Asr3	Asr4	Asr5	Asr6	Actine
Efficacité PCR	2,1	2,04	1,9	2,2	1,95	2	2,9	1,95	1,92	2,1	1,95	2,1	2,1

TABLEAU 1 : Efficacité PCR des différents gènes étudiés

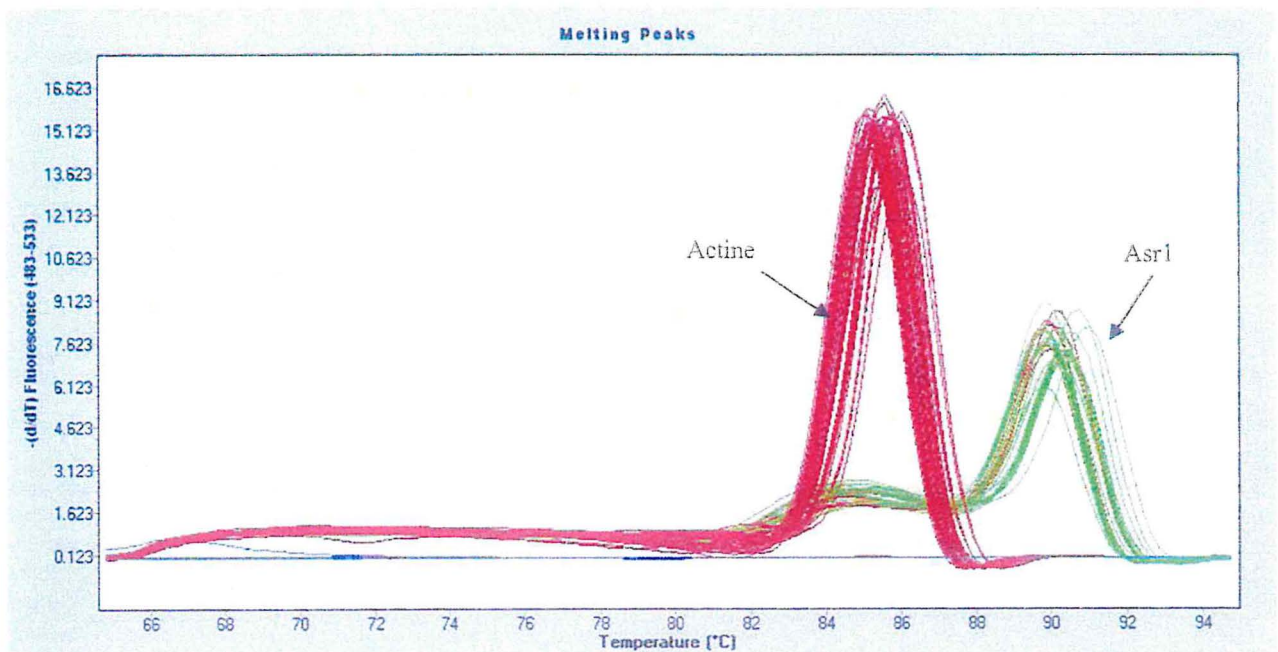


FIGURE 3 : Courbes de fusion des gènes Asr1 et actine, obtenue en fin de qRT-PCR

Nous avons noté que parmi les gènes étudiés, et quasi systématiquement pour chacun des génotypes, traitements et organes :

- OsVIN2 est le plus représenté en termes de quantité d'ARNm (Ct le plus faible, en moyenne 26,4)
- OsCIN2 est le moins représenté en termes de quantité d'ARNm (Ct le plus élevé, en moyenne 36,1)

Un test de Student au seuil $\alpha = 0.05$ a montré que cette différence est significative.

Le reste des gènes présentent des valeurs de Ct variables, fluctuants suivant les génotypes, traitements ou organes étudiés, avec des valeurs se situant entre les deux valeurs extrêmes ci-dessus. La figure 2 montre les résultats obtenus pour le génotype Dom Zard.

2.2- Efficacité des PCR pour les gènes étudiés

L'efficacité de la PCR pour chaque gène a été estimée à l'aide d'une série de dilutions au $\frac{1}{2}$ (de 20 à 320x)

Les résultats sont mentionnés dans le tableau ci-contre (Tableau 1).

Dans l'ensemble, les efficacités sont proches de 2 sauf pour le gène Asr1 dont l'efficacité mesurée est de 2,9.

Une correction du rapport tel que mentionnée par Pfaffl (2001) a été appliquée pour essayer de tenir compte de l'efficacité réelle, même si les résultats obtenus pour ce gène sont à relativiser.

Les courbes de fusion réalisées en fin de qRT-PCR ont permis de vérifier que la mesure de fluorescence effectuée correspondait bien à la détection de l'amplicon recherché.

Celle du gène Asr1 montre un léger épaulement, traduisant la présence d'un second produit PCR minoritaire (Figure 3)

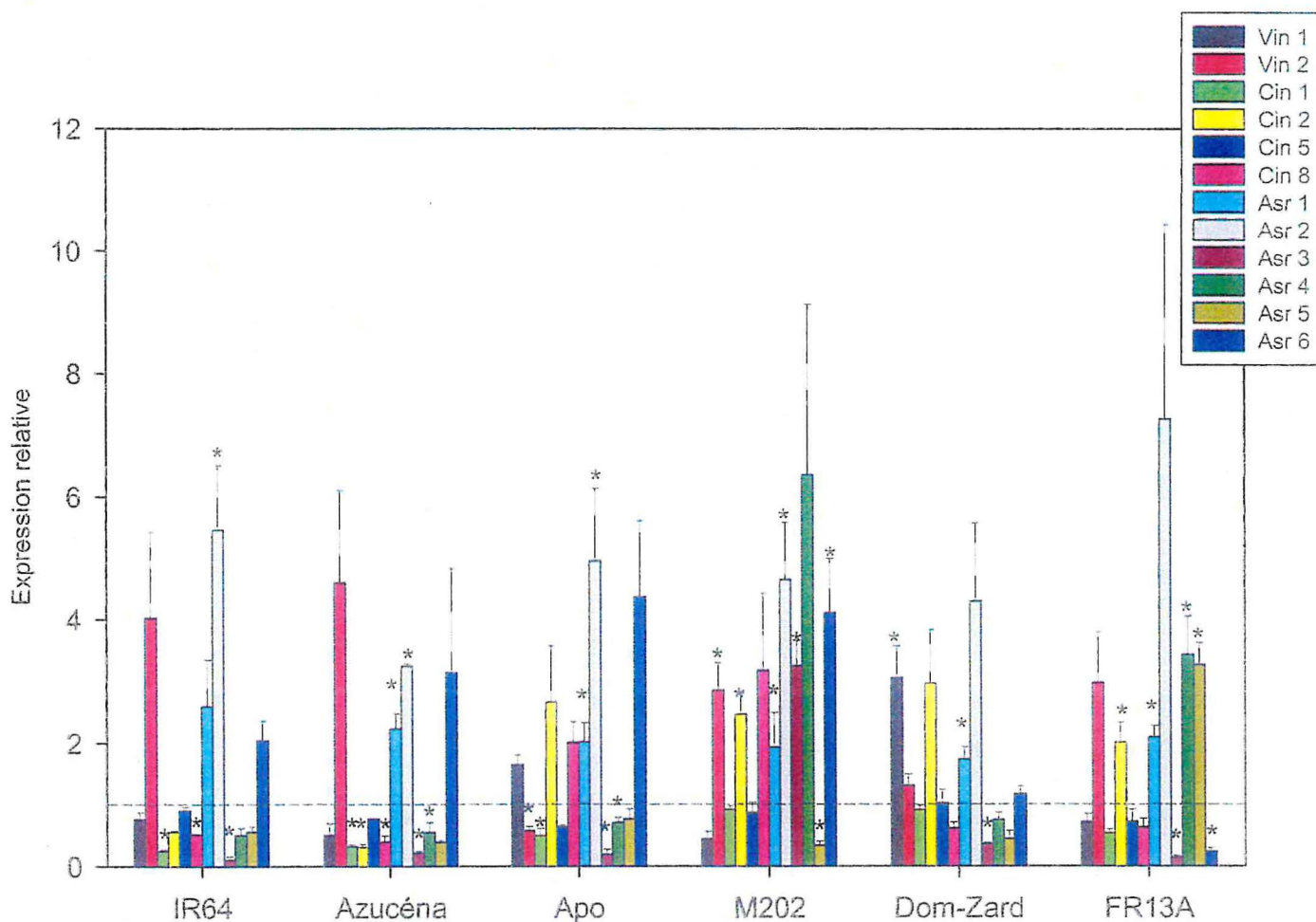
2.3- Rapport des niveaux d'expression des gènes Asr en conditions de stress hydrique par rapport aux conditions témoins

Les rapports d'expressions relatives ont été calculés en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Par souci de facilité la lecture, l'ensemble des résultats pour chaque gène et génotype a été synthétisé sous forme de tableau et histogramme, en séparant les organes sources des organes puits. Les graphiques détaillés des rapports d'expressions figurent sous les tableaux (tableaux 2 et 3)

Feuilles Sources	Gène											
	Vin1	Vin2	Cin1	Cin2	Cin5	Cin8	Asr1	Asr2	Asr3	Asr4	Asr5	Asr6
Génotype												
G1 IR64 (Indica)	↔	↔	↓ 0.24	(↓) 0.55	↔	↓ 0.51	(↑)	↑ 5	↓ 0.1	(↓) 0.49	↔	(↑) 2.1
G4 APO (Indica)	(↑) 1.64	↓ 0.57	↓ 0.48	↔	↔	(↑) 2.0	↑ 2.1	↑ 4.9	↓ 0.19	↓ 0.70	↔	(↑) 4.36
G2 Azucena (Jap.Trop.)	(↓) 0.49	(↑) 4.6	↓ 0.51	↓ 0.51	↔	↓ 0.59	↑ 2.2	↑ 3.24	↓ 0.21	↓ 0.54	(↓) 0.38	↔
G7 M202 (Jap.Temp)	(↓) 0.43	↑ 3.85	↔	↑ 2.46	↔	↔	↑ 1.93	↑ 4.64	↑ 3.24	↔	↓ 0.33	↑ 4.1
G8 Dom-Zard (Basmati)	↑ 3.04	↔	↔	(↑) 2.96	↔	(↓) 0.61	↑ 1.72	↔	↓ 0.35	↔	(↓) 0.44	↔
G12 FR13A (Aus Boro)	↔	(↑) 2.98	(↓) 0.53	↑ 2.0	↔	↔	↑ 2.0	↔	↓ 0.13	↑ 3.42	↑ 3.26	↓ 0.22

↑ Sur-expression significative P<0.05
 ↓ Sous-expression significative P<0.05
 () Tendance incertaine 0.05<P<0.1
 ↔ Pas d'effet significatif
 ∅ Pas de signal d'expression (ainsi que chez les témoins)
 (⊙) Pas de signal d'expression (mais présent faiblement chez témoins)



Niveaux d'expression des gènes étudiés en conditions de stress hydrique, dans les feuilles sources

TABLEAU 2 (en haut) : Tableau résumant les effets observés sur le graphique ci-dessous.

FIGURE 4 (en bas) : Rapports d'expression mesurés dans les feuilles sources par qRT-PCR et normalisés par rapport à l'actine en utilisant la méthode $\Delta\Delta CT$. La ligne en pointillé représente un rapport d'expression égal à 1 (Pas de changement entre témoin et stressé). Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type de la moyenne.

Les différences significatives par rapport au témoin sont indiquées par * (p<0.05)

Au niveau des feuilles sources (tableau 2 et figure 4), on observe une tendance générale à la **surexpression pour les gènes Asr1, Asr2 et Asr6**, (respectivement 2, 4.5 et 3.5 fois plus en moyenne par rapport au témoin) et une **sous-expression des gènes Asr3, Asr4 et Asr5** sur le même tissu (respectivement 5, 2 et 2.5 fois moins en moyenne par rapport au témoin).

Toutefois, **certaines exceptions** sont à noter comme pour Asr6 chez le génotype FR13A qui présente une tendance significativement inverse (4.5 fois sous exprimé), pour Asr3 chez M202 et pour Asr4 et Asr5 chez FR13A (respectivement 3.2, 3.4 et 3.2 fois surexprimés).

Au niveau des feuilles puits (tableau 3 et figure 5), Asr1 et Asr3 sont respectivement 2.5 et 3.3 fois **surexprimés** en moyenne (**dont une forte pondération pour Asr3 chez le génotype FR13A**), tandis qu'Asr4 et Asr5 sont 4 et 3 fois **sous-exprimés** en moyenne par rapport au témoin.

Il est intéressant de noter le comportement particulier des **Asr2 et Asr6** : **ils ne sont pas exprimés** ni dans les plantes témoins, ni dans les plantes stressées, **pour les génotypes IR64 et Azucéna**, mais sont exprimés très faiblement dans les témoins (mais toujours pas dans les stressés) pour le génotype M202.

On ne détecte pas de trace d'expression d'Asr2 au niveau des deux conditions (témoins, stressés) dans le génotype Dom-Zard, mais en revanche il y a une expression (chez les plantes témoins et stressées) d'Asr6 chez ce même génotype.

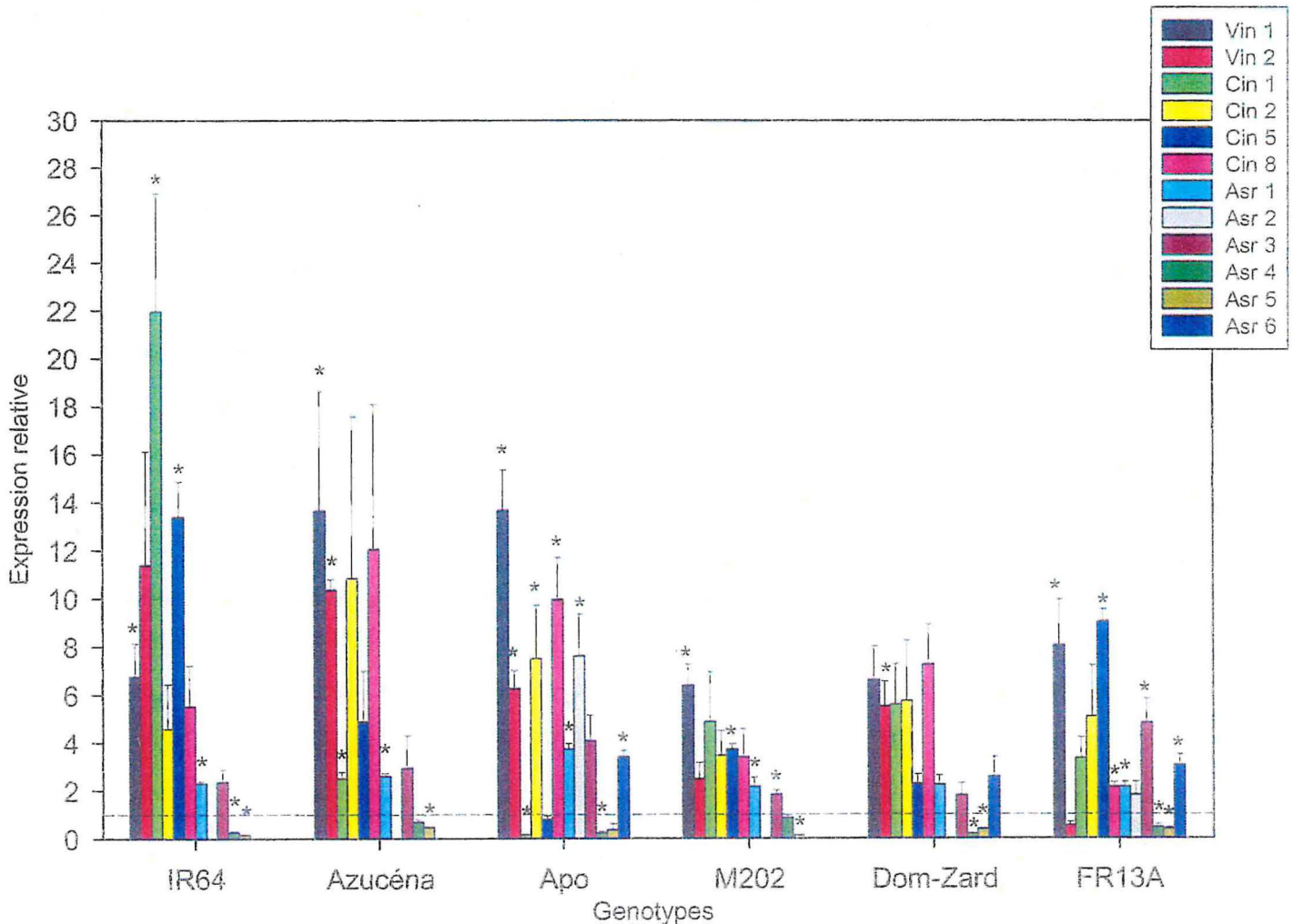
En revanche, on note une augmentation significative d'Asr6 (surexpression) chez APO et FR13A (3.4 et 3 fois) sous stress.

Asr1 est finalement le **seul gène systématiquement surexprimé, quel que soit le génotype considéré et le compartiment considéré (source, puit)** et Asr2 est celui qui présente les rapports d'expression les plus contrastés.

De façon préliminaire, à la vue de ces premiers résultats, on constate que **les gènes Asr font l'objet d'une régulation du niveau d'expression sous conditions de stress hydrique**, largement dépendante du stade de développement et du statut trophique des feuilles (sources ou puits). On constate par ailleurs, pour l'ensemble des gènes Asr étudiés, une certaine variabilité génétique au niveau des rapports d'expression et du sens de la régulation lors de l'application du stress.

Feuilles Puits	Gène											
	Vin1	Vin2	Cin1	Cin2	Cin5	Cin8	Asr1	Asr2	Asr3	Asr4	Asr5	Asr6
G1 IR64 (Indica)	↑↑ 6.7	(↑↑) 11	↑↑ 21	↔	↑↑ 13.3	(↑↑) 5.5	↑↑ 2.3	∅	(↑↑) 2.3	↓↓ 0.25	↓↓ 0.14	∅
G4 APO (Indica)	↑↑ 13.6	↑↑ 6.2	↓↓ 0.14	↑↑ 7.4	↔	↑↑ 9.9	↑↑ 3.7	↑↑ 7.6	(↑↑) 4	↓↓ 0.2	(↓↓) 0.35	↑↑ 3.4
G2 Azucena (Jap.Trop.)	↑↑ 13.6	↑↑ 10.3	↑↑ 2.49	↔	(↑↑) 4.8	(↑↑) 12	↑↑ 2.4	∅	↔	↔	↓↓ 0.45	∅
G7 M202 (Jap.Temp)	↑↑ 6.3	↔	↔	(↑↑) 3.4	↑↑ 3.7	↔	↑↑ 2.1	(∅)	↑↑ 1.83	↔	↓↓ 0.12	(∅)
G8 Dom-Zard (Basmati)	(↑↑) 6.6	↑↑ 5.5	↔	↔	↔	(↑↑) 7.2	(↑↑) 2.2	∅	↔	↓↓ 0.17	↓↓ 0.36	↔
G12 FR13A (Aus Boro)	↑↑ 8	↔	(↑↑) 3.3	↔	↑↑ 9	↑↑ 2.1	↑↑ 2.13	↔	↑↑ 4.8	↓↓ 0.43	↓↓ 0.38	↑↑ 3

↑↑ Sur-expression significative P<0.05
 ↓↓ Sous-expression significative P<0.05
 () Tendence incertaine 0.05<P<0.1
 ↔ Pas d'effet significatif
 ∅ Pas de signal d'expression (ainsi que chez les témoins)
 (∅) Pas de signal d'expression (mais présent faiblement chez témoins)



Niveaux d'expression des gènes étudiés en conditions de stress hydrique, dans les feuilles puits

TABLEAU 3 (en haut) : Tableau résumant les effets observés sur le graphique ci-dessous.

FIGURE 5 (en bas) : Rapports d'expression mesurés dans les feuilles puits par qRT-PCR et normalisés par rapport à l'actine en utilisant la méthode $\Delta\Delta CT$. La ligne en pointillé représente un rapport d'expression égal à 1 (Pas de changement entre témoin et stressé). Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type de la moyenne.

Les différences significatives par rapport au témoin sont indiquées par * ($p < 0.05$)

2.4- Niveau d'expression des gènes d'invertases en condition de stress hydrique :

Au niveau des feuilles sources (tableau 2, figure 4), les résultats sont assez variables. En effet, si l'on s'en tient uniquement aux effets purement significatifs ($P < 0.05$), seuls les génotypes IR64, APO (Indica tous les deux) et Azucéna, présentent **une sous-expression** des invertases en général.

- Pour IR64 : OsCIN1 et 8 sous exprimés 4 et 2 fois
- Pour APO : OsVIN2 et OsCIN1 sous exprimés 2 fois environ
- Pour Azucéna : OsCIN1, 2 et 8 sous exprimés 3 fois environ

Les autres génotypes (M202, Dom-Zard et FR13A) montrent des surexpressions de ces gènes:

- Pour M202 : OsVIN2 et OsCIN2 surexprimés 2.5 fois en moyenne
- Pour Dom-Zard : OsVIN1 surexprimé 3 fois
- Pour FR13A : OsCIN2 surexprimé 2 fois

Parmi les génotypes, **le groupe des Indica, représenté par IR64 et APO, est celui pour lequel les gènes d'invertases sont sous exprimés de façon significative dans les feuilles sources.**

Parfois, la variabilité importante entre répétitions biologiques (notamment au niveau du génotype FR13A) a pu masquer partiellement un effet qui pourrait être significatif. De ce fait, si l'on regarde l'ensemble des ratios d'expressions au travers des génotypes par type de gène, la plupart des invertases se trouvent sous-exprimées (hormis OsVIN2). Ce constat n'est que visuel (tableau 2, bas), mais mérite d'être souligné.

Au niveau des feuilles puits (tableau 3, figure 5), on constate une **forte augmentation générale de l'expression des invertases**, sauf pour OsCIN1 dans le génotype APO (7 fois moins exprimé que le témoin).

On constate de nombreux effets significatifs :

- Pour IR64 : OsVIN1 et OsCIN1 et 5 sont surexprimés 7 et 21, 13 fois respectivement
- Pour APO : OsVIN1,2 et OsCIN2,8 sont surexprimés 14, 6 et 7,10 fois respectivement
- Pour Azucéna : OsVIN1,2 et OsCIN1 sont surexprimés 14, 10 et 2.5 fois respectivement
- Pour M202 : OsVIN1 et OsCIN5 sont surexprimés 6 et 4 fois respectivement

- Pour Dom-Zard : OsVIN2 est surexprimé 5.5 fois
- Pour FR13A : OsVIN1 et OsCIN5,8 sont surexprimés 8, 9 et 2 fois respectivement

De façon générale, le gène **OsVIN1** est celui qui est statistiquement le plus souvent et fortement surexprimé au travers des génotypes et des gènes (9.6 fois en moyenne par rapport au témoin).

3- Discussion et perspectives

3.1- Analyse critique méthodologique de l'étude

a- Méthode de conduite de l'essai

Il est important de noter que nous parlons ici d'une valeur moyenne de FTSW pour l'ensemble de nos génotypes (FTSW 0.40). En effet, cette expérimentation qui intégrait plusieurs génotypes a révélé une réelle difficulté d'avoir un échantillonnage homogène (c'est-à-dire des plantes ayant une même FTSW, donc un niveau de stress hydrique similaire), en raison des variabilités de croissance et de morphologie entre cultivars, certains épuisant les réserves en eau plus rapidement que d'autres de par leurs transpirations foliaires différentes. Nous avons effectué nos prélèvements à une même date (correspondant à un stress intermédiaire), ce qui fait que nous n'avons pas toujours la même valeur de FTSW entre plantes. Celle-ci variait de 0.30 à 0.55 en moyenne, entre génotypes.

Pour des études de phénotypage à grande échelle, nous préconisons, même si cela est plus lourd à mettre en place, un échantillonnage « au cas par cas », c'est-à-dire, lorsqu'une plante donnée a atteint la valeur de FTSW souhaitée, ce qui permettra une meilleure exploitation des résultats.

b- Choix du gène de ménage

Les variations de Ct actine que nous avons observées au niveau des organes puits, bien que non significatives, suggèrent que **l'actine n'est peut-être pas le meilleur gène de ménage** dans le cas d'expérimentations analysant différents compartiments, **même s'il s'agit d'un organe foliaire dans les deux cas**. Il conviendra pour des études de ce type à tester préalablement différents gènes de ménage sur les différents tissus d'intérêt, et garder celui qui sera le plus stable.

Le choix d'incorporer d'autres gènes rapporteurs (EF-1 alpha, Tubuline) sur une même plaque de Q-PCR a été envisagé, mais vu le nombre de génotypes et de gènes à analyser, cela n'était pas concevable dans le temps imparti.

3.2- Comparaison des résultats obtenus à des études antérieures

Afin d'avoir une meilleure compréhension des processus de régulation du métabolisme carboné et des relations source-puits au stade végétatif chez le riz sous stress hydrique, il est nécessaire d'avoir une vision intégrative des processus impliqués, du gène et son expression au comportement phénotypique (morphogénétique, physiologique), d'évitement ou de tolérance au stress. Pour cela, nous avons confronté les présents résultats à des analyses de sucres réalisées en 2006 (exp.1 et exp.2), sur le même type d'expérimentation, mais sur un seul génotype IR64 (hormis le compartiment « racine » analysé).

Nous avons ainsi pu confronter nos résultats d'analyse d'expression de gènes d'invertases (prélevés sur du matériel végétal ayant un niveau moyen de stress intermédiaire d'environ FTSW = 0.40), aux résultats des analyses de sucres sur des plants prélevés à des niveaux de stress intermédiaire (FTSW=0.30-0.35) et sévère (FTSW=0.09-0.16). (Lors des expérimentations exp.1 et exp.2.)

Les résultats des analyses de sucre exp.1 et exp.2 sont présentés en annexes. (Annexe 1 et 2)

a- Comparaison des expressions de gènes invertases chez IR64

Nous comparerons dans un premier temps nos résultats sur le génotype IR64 à ceux de l'exp.1 (FTSW 0.30), où des expressions de gènes d'invertases avaient été réalisées. La méthode de détection utilisée alors était la PCR semi-quantitative. Les résultats d'expressions obtenus lors de l'exp.1 sont présentés en annexe. (Annexe 3)

Les gènes OsCIN1, 2, 5 et 8 ainsi que OsVIN1, 2 ont été exprimés dans les organes sources/puits dans les deux expérimentations, excepté pour OsCIN2 qui n'était pas exprimé dans les feuilles matures dans exp.1. Dans notre expérimentation, OsCIN2 est bien présent dans ce même compartiment, mais en quantité faible (Ct élevé), probablement parce que le pouvoir résolutif de la méthodologie employée (qRT-PCR) est plus grand.

Au niveau des feuilles sources, on remarque une **sous expression générale** pour toutes les invertases à l'exception de OsVIN2 dans exp.1 ($P > 0.05$). Cette sous expression était significative ($P < 0.05$) pour OsVIN1 dans exp.1, et pour OsCIN1,8 dans notre expérimentation. (4 et 2 fois respectivement)

En revanche, au niveau des feuilles puits, nous observons un résultat opposé : tous les **gènes d'invertases étaient généralement surexprimés** lors du stress, sauf OsCIN2 dans exp.1 ($P < 0.05$). Cette surexpression était significative ($P < 0.05$) pour le reste des gènes dans exp.1. **Dans notre expérimentation, cette surexpression est significative pour OsCIN1, 5, 8 et OsVIN1.** (21, 13, 5.5 et 6.7 fois respectivement).

On remarque que le **rapport d'expression est particulièrement fort au niveau des organes puits**, moins au niveau des organes sources. Cela est confirmé chez IR64, mais de façon générale aussi, pour les autres génotypes.

b- Interprétation générale de l'expression des gènes d'invertases et de leurs rôles dans le métabolisme des sucres :

Les expérimentations précédentes (exp1 et 2) ont révélé que l'application d'un stress hydrique chez le riz au stade jeune avait pour conséquence une augmentation progressive du glucose dans les feuilles sources.

Dans les feuilles puits, la forte concentration initiale mesurée à stress modéré est suivie d'une diminution significative lors d'un stress fort. À l'opposé, **l'amidon**, sucre de réserve, voyait sa concentration diminuer dans les feuilles sources et augmenter dans les feuilles puits. On constate une claire distinction de fonctionnement entre ces deux compartiments.

La concentration en saccharose était en revanche remarquablement stable dans les feuilles sources, même en condition de stress, avec une augmentation progressive dans les feuilles puits.

Au niveau des feuilles puits, les fortes variations de concentration en glucose observées (dans le cas où il soit apoplastique), peuvent peut-être s'expliquer par l'activité des invertases pariétales.

Ji et al (2005) ont montré que l'activité des OsCIN dans les tissus en croissance apporte aux cellules les hexoses nécessaires à leur croissance. Ce processus est connu pour être régulé par une signalétique via le saccharose (Bonfig et al 2007, Waclawovsky et al 2006, Heyer 2004).

La surexpression des OsCIN enregistrée au niveau des organes puits lors d'un stress modéré **peut expliquer cette augmentation de la teneur en glucose** (de façon transitoire mais significative avant de chuter de façon brutale avec un fort stress hydrique dans les exp1 et 2). Cette **surexpression est possiblement déclenchée par le saccharose** dont la concentration augmente lors du stress. Cette **augmentation de saccharose pourrait constituer un signal**

contribuant à l'augmentation massive de l'expression de certains gènes invertases (OsCIN1, 5, 8, OsVIN1, 2), OsCIN2 n'étant que très faiblement exprimé et faiblement présent en quantité d'ARNm (Ct élevé). Cette surexpression est associée à une augmentation transitoire de la teneur en glucose, avant d'observer une chute brutale, se rapportant probablement à une synthèse d'amidon telle qu'observée, comme sucre de réserve.

Également, des processus d'ajustement osmotique intracellulaires ont probablement contribué à une accumulation d'hexose de façon transitoire (Rognoni et al 2007, Prioul, 2006). Une étude de Trouverie et al (2006), a montré qu'une augmentation d'hexoses dans les feuilles sources du maïs coïncidait avec une augmentation de l'activité des invertases vacuolaires (IVR2) et de l'expression des gènes correspondants. Nous obtenons une tendance similaire à l'augmentation de OsVIN1 et 2 dans notre étude pour les feuilles puits uniquement. Ces résultats suggèrent une forte implication des gènes OsVIN1, 2 dans l'ajustement osmotique, notamment des feuilles puits, au moins jusqu'à un niveau de stress modéré.

Parallèlement, nous interprétons la baisse de la concentration en amidon dans les feuilles sources comme un épuisement des réserves, et l'accumulation d'hexose résultante contribuant à maintenir la turgescence des cellules par ajustement osmotique (Rognoni et al 2007, Liu et al 2004). L'accumulation d'hexose est probablement due à la mobilisation des sucres de réserves.

La concentration en saccharose dans les feuilles sources demeure constante, elle est apparemment fortement régulée. Cela pourrait permettre de maintenir une charge du phloème, processus qui est génétiquement régulé par un signal intercellulaire dépendant de la teneur en saccharose (Vaughn et al. 2002)

Chez le génotype IR64, et de façon générale pour les autres génotypes étudiés dans la présente étude (vu les résultats d'expressions similaires obtenus), **les feuilles puits** (en opposition aux feuilles sources), **surexpriment les gènes OsCIN1, 5, 8 et OsVIN1 et 2, en condition de sécheresse**. Ce phénomène constitue probablement une réponse de la plante pour protéger prioritairement les organes en croissance, à travers le maintien des processus morphogénétiques (OsCIN) et de l'ajustement osmotique (OsVIN).

Ces résultats semblent cohérents avec le fait que les feuilles puits augmentent leurs réserves en amidon en conditions de sécheresse, à l'opposé des feuilles sources.

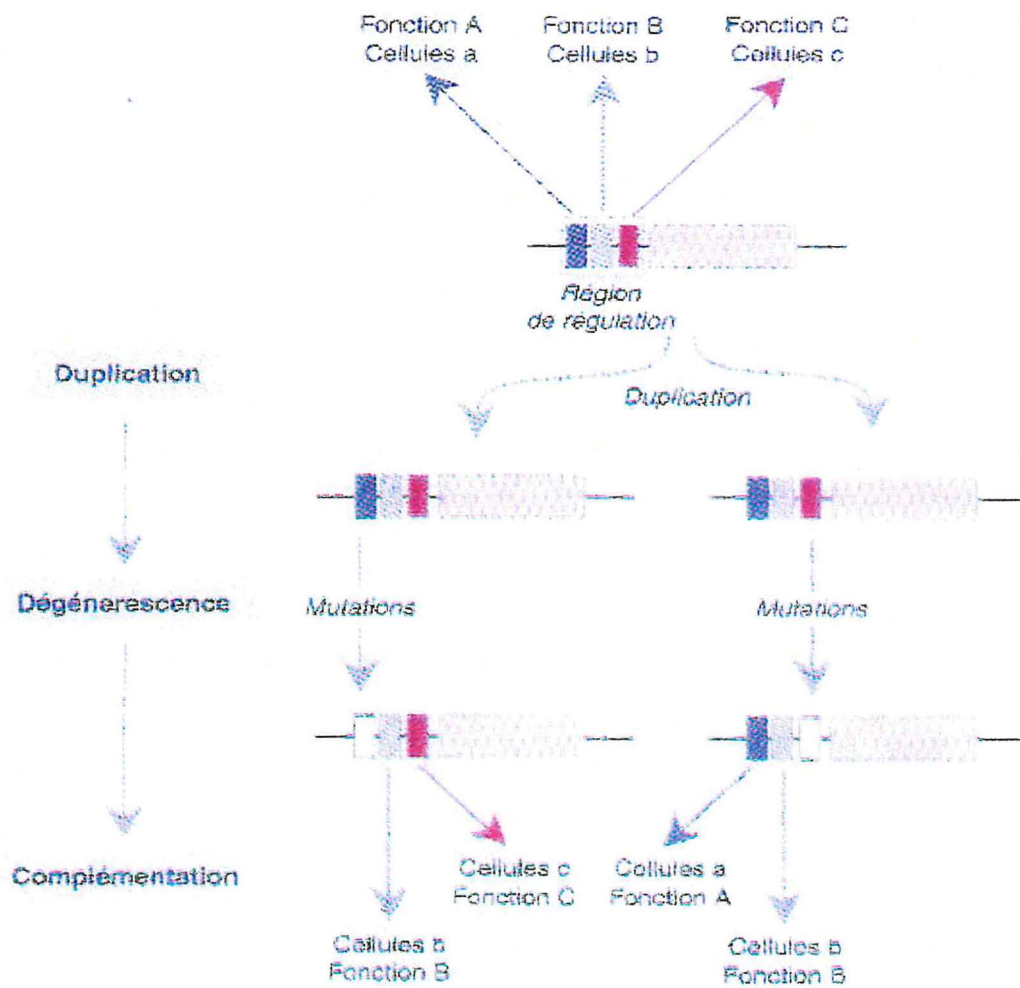


FIGURE 6 :

Modèle DDC (Duplication - Dégénérescence - Complémentation) proposé par Force et al., en 1999

D'autres recherches seraient intéressantes à mener sur ces relations notamment en incluant les compartimentations (apoplastique et symplastique), l'activité enzymatique et l'expression de gènes associés aux enzymes comme la Sucrose Phosphate Synthase (SPS), la Sucrose Synthase (SuSy), et les amylases intervenant dans le métabolisme du saccharose et de l'amidon (Yang et al 2003, 2002).

Les résultats obtenus au niveau des gènes invertases ont apporté des confirmations, mais aussi certains nouveaux éléments de réponse dans la connaissance de la diversité génétique existante dans l'adaptation du riz au stress hydrique pendant la phase végétative, mettant en jeu le métabolisme carboné. Le présent travail était centré sur les résultats afférents directement à l'expression de gènes sur le métabolisme des sucres. Il s'agira à court terme de les intégrer davantage avec d'autres niveaux d'études (écophysiologique, morphogénétique) abordés dans le même contexte expérimental et sur les mêmes génotypes. Ce type d'approche intégrative, réalisé sur le génotype IR64 uniquement, et appuyé par les résultats obtenus lors de cette étude, a donné lieu à une publication aujourd'hui acceptée.

Luquet, D., A. Clément-Vidal, D. This, **D. Fabre**, N. Sonderegger, M. Dingkuhn.

"Orchestration of transpiration, growth and carbohydrate dynamics in rice during a dry-down cycle. *Functional Plant Biology*" (accepté). (2008)

3.3- Diversité d'expression des gènes *Asr* au sein de l'espèce

De nombreux gènes, (dont les *Asr* à la vue de nos résultats), ont des expressions spécifiques à un type cellulaire et/ou un stade de développement. Ces spécificités sont dues à des régions régulatrices placées en amont du gène et indépendantes les unes des autres, permettant à chacune de diriger l'expression du gène à des lieux et/ou temps différents.

Nous constatons que les gènes *Asr1* et *2*, étant localisés en tandem sur le chromosome 1, et ayant des protéines similaires avec 73,7% d'identité, peuvent avoir été affecté par un phénomène de duplication au cours de l'évolution de l'espèce, mais aussi des céréales. Le fait que ces gènes se trouvent surexprimés dans les feuilles sources, et présentent une régulation différente dans les feuilles puits lors du stress hydrique, trouve peut-être une explication à travers le modèle DDC (Duplication – Dégénérescence – Complémentation), proposé par Force et al. en 2000 (figure 6).

Ce modèle suggère que la préservation des gènes dupliqués n'est pas uniquement dépendante de l'acquisition de nouvelles fonctions, mais aussi de la répartition des fonctions d'origine.

Cette sous-fonction serait due à des mutations (dégénérescence) survenant dans la région régulatrice, de façon à ce que les deux copies soient nécessaires pour obtenir le profil d'expression (complémentation) du gène d'origine. Deux gènes peuvent ainsi présenter des profils d'expressions différents, mais complémentaires, tout en restant tous deux nécessaires pour remplir les fonctions exercées par le gène unique avant sa duplication. De la même façon, chacun des gènes dupliqués peut prendre une partie des fonctions biochimiques et cellulaires du gène ancestral. Ainsi, les deux nouveaux gènes doivent être conservés.

Dans le cadre de notre étude, les gènes Asr1 et Asr2 pourraient se trouver concernés par ce type d'évolution.

La comparaison de plusieurs accessions dans une étude d'expression permet de mettre en évidence des différences génotypiques sur leur comportement face au stress hydrique.

Nous remarquons ainsi que le génotype FR13A est le seul dans notre étude qui présente un sens d'expression souvent opposé par rapport aux autres génotypes, au niveau des Asr4, 5 et 6 dans les feuilles sources, et Asr6 dans les feuilles puits. Il apparaît curieusement que ce génotype est un riz adapté à la culture de contre-saison, cultivé pendant les périodes hivernales, et tolérant à la submersion, contrairement aux autres génotypes. La différence de comportement de ce génotype mériterait d'être analysée plus avant, en analysant par exemple si ces observations se généralisent aux variétés appartenant au même groupe génétique.

Cette expérimentation nous a permis d'avoir une première vue de la diversité d'expression des Asr au cours d'un stress hydrique chez le riz. Essayer de mettre en relation ces résultats avec ceux des invertases ou du métabolisme carboné nous paraît prématuré, vu le peu de connaissances accumulées sur la fonction des Asr chez le riz.

Toutefois, il apparaît clair que les gènes Asr font l'objet d'une régulation du niveau d'expression en condition de stress hydrique, et notamment au niveau du type d'organe où l'on observe de forts contrastes.

En parallèle à ce travail, différents haplotypes ont été identifiés pour différentes Asr (travaux de thèse de Romain Philippe), mais nos travaux n'ont pas permis de mettre en évidence un lien entre diversité haplotypique et diversité d'expression.

Des études complémentaires intégrant une diversité plus large et un nombre plus important de génotypes permettraient sans doute d'élargir les connaissances sur les fonctions probables de ces gènes chez le riz (étude de QTL et génétique d'association). De même, les techniques

d'hybridation *in-situ* nous apporteraient des informations complémentaires sur leur localisation précise.

Ce genre d'étude montre en outre l'intérêt d'une démarche conjointe d'analyse moléculaire (expression de gènes) à d'autres types d'analyses (physiologique, morphologique, métabolique), pour appréhender ainsi toute la complexité du monde végétal, relation indispensable pour avoir une bonne compréhension de la plante.

4- Matériels et méthodes

a- Matériel végétal et conduite de la culture

Six génotypes de riz contrastés ont été sélectionnés au sein d'une collection de référence internationale (collection du Generation Challenge Program). Ce choix permet de disposer d'informations précises sur les polymorphismes des gènes candidats étudiés chez ces 6 variétés, et d'informations sur le critère de la teneur en amidon des tiges (phénotypage de 200 variétés mené récemment par CIRAD / IRRI au champ aux Philippines).

Six lots de semences, IR64 et APO (*Oryza sativa* L. *ssp Indica*), Azucena (*Oryza sativa* L. *ssp Japonica Tropical*), M202 (*Oryza sativa* L. *ssp Japonica Tempéré*), DomZard (*Oryza sativa* L. *ssp Sadri Basmati*) et FR13A (*Oryza sativa* L. *ssp Aus Boro*) en provenance de l'IRRI (International Rice Research Institute, Philippines) ont été utilisées.

Les graines ont été mises en étuve de germination durant 5 jours à 33°C. (Photo 1a et b). Elles ont été transplantées après 2 jours dans des pots de 1 litre remplis avec 1kg de terre prélevée sur le domaine de Lavalette (site expérimental de Montpellier SupAgro), préalablement stérilisée pendant 48h à 90°C. Cette terre à dominante argileuse, bien caractérisée, permet une bonne rétention de l'eau et l'installation progressive du stress hydrique.

Les pots ont été disposés aléatoirement sur 3 tablards (nos 3 répétitions biologiques), en serre contrôlée (photo 2a et b) au niveau température (21°C nuit, 28°C jour) et humidité relative (80%). Des lampes au sodium maintenaient un éclairage minimum de 600 μ mol.m².s, de façon à avoir également une photopériode de 14H00. Les conditions environnementales ont été vérifiées tout au long de l'expérimentation par enregistrement via data logger (CR10X Campbell Scientific).

Les plantes ont été irriguées à l'eau distillée puis avec de la solution nutritive une fois par semaine (type Hoagland). À partir de la feuille 7 apparue sur le brin maître, un groupe de plante a été mis en stress avec coupure de l'alimentation en eau. Un autre groupe de plantes maintenu en condition d'irrigation optimale constituait les témoins.

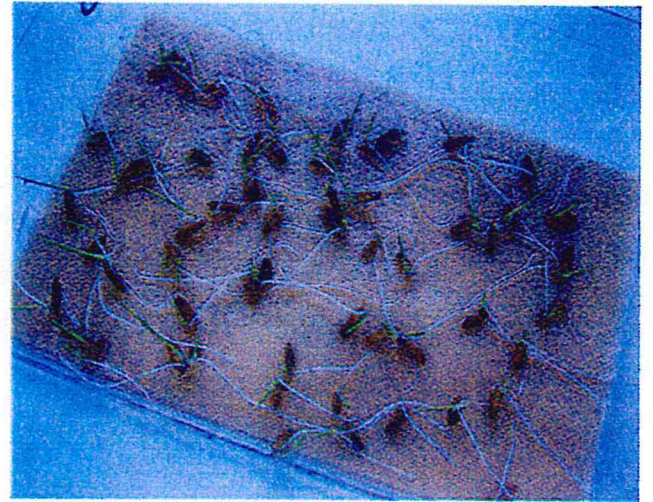
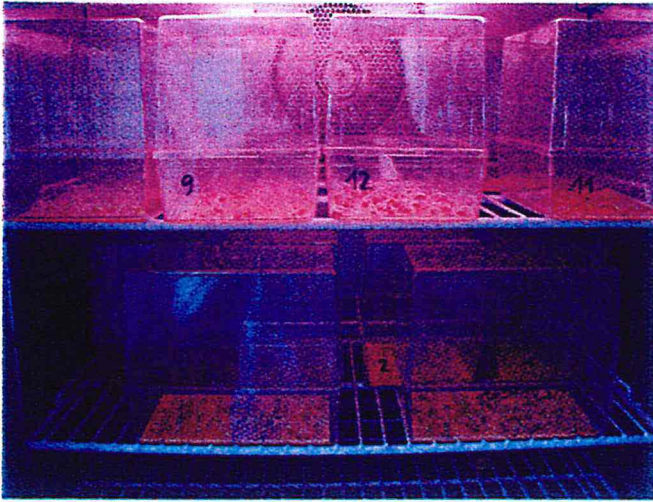


Photo 1 a, b :
Mise des graines à l'étuve de germination



Photo 2 a, b :
Pots disposés sur trois tablards de façon aléatoire, constituant nos 3 répétions biologiques.

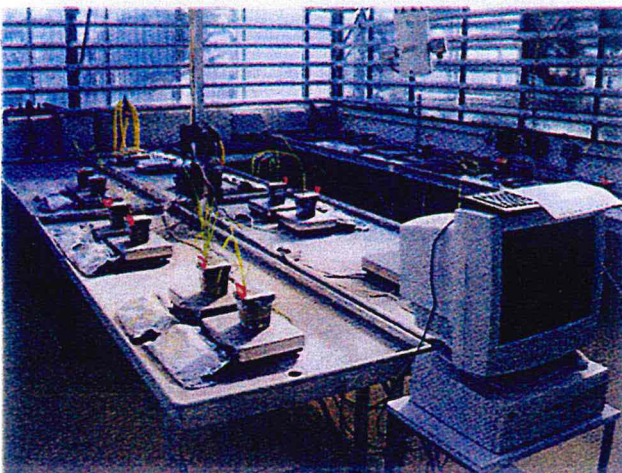


Photo 3 a, b :
Les pots des plants stressés ont été enveloppés de cellophane et mis sur balance pour suivre la FTSW.

À ce stade 7 feuilles, le système racinaire occupe la totalité du volume de sol du pot, condition nécessaire pour calculer la fraction d'eau transpirable du sol (FTSW). Les pots des plants stressés ont été enveloppés de cellophane, pour éviter les pertes par évaporation de l'eau du sol et écoulement. Ce groupe de plantes a été placé sur une série de balances (Ohaus, DP15) multiplexées à un ordinateur, afin de suivre de façon automatique par gravimétrie la cinétique d'assèchement du sol par la transpiration de la plante, et pouvoir ainsi évaluer leur FTSW (photo 3a et b).

Le concept de FTSW, réduisant la variabilité des observations lorsque l'on étudie des populations hétérogènes, est une méthodologie standard pour caractériser des différences variétales dans des expérimentations d'adaptation à la sécheresse (Liu et al.2005), et pour le phénotypage et recherche en génomique (Reymond et al.2004).

$$FTSW = \frac{ASW}{TTSW}$$

ASW = Teneur en eau disponible du sol (g)

TTSW = Humidité à capacité au champ (HCC) – Humidité à pF 4.2 (point flétrissement)

Son évolution représente la disponibilité réelle d'eau du sol pour la plante. Elle varie de 1 dans les conditions d'hydratation optimale à 0 en cas de sécheresse extrême (sans unités).

Généralement il est acquis que la transpiration décroît linéairement après une valeur critique (aux alentours de 0,66 dans le cas du riz) (Dingkuhn et al.1999).

A une valeur de FTSW moyenne de 0.40 pour l'ensemble de nos génotypes (stress intermédiaire), nous avons prélevé, séparément pour les trois répétitions biologiques, les feuilles matures (sources) et les feuilles en croissance (puits), après dissection pour ces dernières d'une partie de la gaine. Les échantillons ont immédiatement été congelés dans l'azote liquide, avant d'être stockés au congélateur -80°C.

b- Extraction des ARN, purification et quantification

Après broyage au mortier dans l'azote liquide de 150mg de matériel végétal, nous avons procédé à l'extraction des ARN totaux par la méthode au Trizol, suivant les recommandations du fabricant (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Les échantillons ont été traités à la DNase (kit Promega RQ1 RNase-free DNase), puis la quantité des ARNm isolés, pour chaque échantillon, a été déterminée au spectrophotomètre UV à 260 et 280 nm (A260/80 proche de la valeur 2, A260 = 40µg/ml), Beckman-Coulter™ gmbH DU-530.

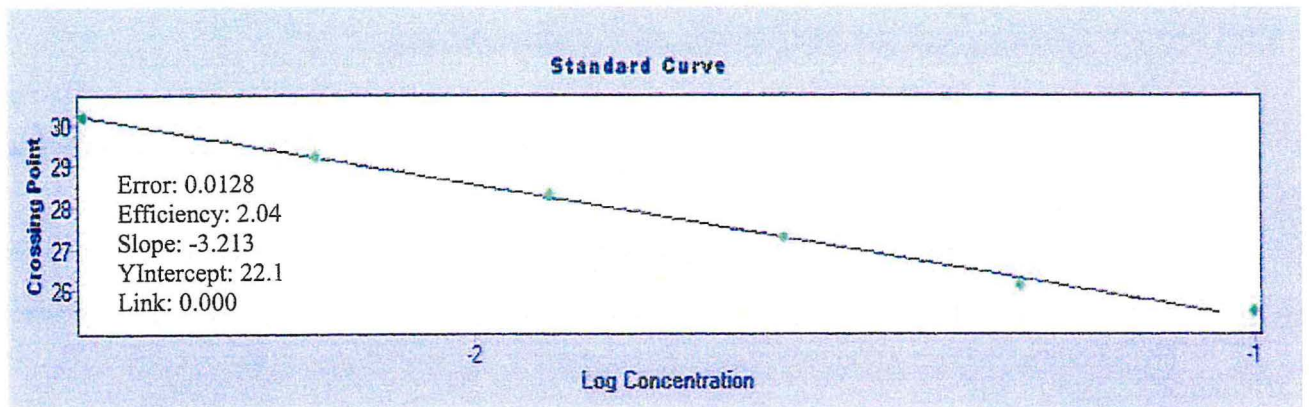
TABLEAU 4 :

Séquence des amorces utilisées pour la PCR quantitative. (Base de données TIGR)

Gène	chrom	N°Locus	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	cDNA	genomic
OsCIN1	2	Os02g33110	AGTGCCCGACTTCTTTCCGTTG	ACATACCGCTCCGTACCTTGTT	156	156
OsCIN2	4	Os04g33740	TGTTCTTCAGGGTGTTCAAG	GCACGCCTTTCTCCAGCC	220	614
OsCIN5	1	Os01g73580	CGAGCGACATAAACGGTTGTTGG	GCTTGGTCCATCCCTCAGGTAA	158	158
OsCIN8	9	Os09g08072	CGTTCGGGCTCCTCGTAATG	CGTTCTCAGCGATATGGTTT	205	273
OsVIN1	4	Os04g45290	CGACGGCAACCTTACAACCTTCT	ACTCGTAGATGGCTTTGGTGGGA	236	573
OsVIN2	2	Os02g01590	TCCGCTACGACTGGGGCAAG	GCGTCTCCACCTCCTCCACC	195	1217
Actine	1	Os01g73310	GCTGAGTGGAGGCACAACAATG	TGAGAGAAGCCAGGATAGACCC	154	154
OsAsr1	1	Os01g72900	GAAGCACAAGGCGAAGAAGGAAC	AGTAAGTAGTGATAGGGTAGGTAG	175	129
OsAsr2	1	Os01g72910	CGGTCGCACAAGATGAAGGAAG	GCACGAATGGATGGGATGGAT	149	148
OsAsr3	2	Os02g33820	GGCACAAGGTGAAGGAGGAGGT	CCGTTTCGTTCTTTCGTTTCATTC	151	108
OsAsr4	4	Os04g34600	AGAGGCACCAGGCGAAGAAGG	ATGGATCATCAGCCGAAGAGG	235	194
OsAsr5	11	Os11g06720	ACCACCACCTGTTCCACCACAAG	CTTCGCCTCGTGCTTCTCATACA	234	309
OsAsr6	1	Os01g73250	ACCGTGGACGAGTGCTACGAGA	CCTGCGAGTGCATGGAGTTGTT	175	

FIGURE 5 :

Courbe étalon (régression linéaire) obtenue (dans le cas du gène Vin2), après une série de dilutions croissantes, pour le calcul des efficacités PCR



Une vérification de l'homogénéité des échantillons a été effectuée par migration sur gel d'agarose à 1,5% en tampon TAE (Tris-Acetate 40mM, Acétate de sodium 20mM, EDTA 1mM, pH8.0)

c- Transcription Inverse, synthèse des ADNc

2µg d'ARN totaux ont été mélangés avec tampon de réaction 10x, 0,5mM de dNTP, 1µM d'hexamères aléatoires, 20 unités d'inhibiteur de RNase et 200 unités de transcriptase inverse (Fermentas, RevertAid™ M-MuLV RT) dans un volume final de 20µl. Le mix réactionnel a été incubé pendant 60mn à 42°C, puis pendant 10mn à 70°C pour stopper la réaction.

d- Design et validation des amorces pour la qRT-PCR

Les séquences des amorces ont été définies en utilisant les logiciels VectorNTI (<http://invitrogen.com>) et Oligo6 (Molecular Biology Insight Inc), et synthétisés par Operon Biotechnologies, gmbH (Cologne, Allemagne). (Tableau 4)

Des critères de sélections rigoureux ont été utilisés : Tm de 60°C +/- 2°C, longueur de l'amplicon PCR allant de 180 à 400 paires de bases (pb) maximum (principalement dans la région 3'UTR), longueurs des amorces de 20pb +/- 5pb, et un rapport Guanine-Cytosine de 45 à 85%.

La spécificité de la séquence d'amorce obtenue a été testée par BLAST sur la base de données TIGR en utilisant le logiciel OryGenes DB. (<http://valois.cirad.fr/OryGenesDB/cgi-bin/form.pl?type=blast>)

Pour notre étude, nous avons choisi l'actine1 (Os05g36290.1) comme gène rapporteur (choix basé sur des données publiées sur riz indiquant une bonne stabilité de l'expression de ce gène au niveau des feuilles notamment (Caldana et al. 2007, Kim et al. 2003), ainsi que pour rester en adéquation avec les expérimentations initiées en 2006, et pouvoir établir un parallèle.

e- Conditions et analyses par la PCR quantitative en temps réel

Les analyses de qRT-PCR ont été effectuées sur un LightCycler-480 (Roche Molecular Biochemicals). Un mélange réactionnel de 15µl contenant 3µl d'ADNc dilués 50x (2ng/µl), 15µl d'amorces spécifiques sens et antisens (5µM), 3µl d'eau Merck, et 7,5µl de mix SYBR Green (Taq incluse dans le mix) (Roche applied Biosystem), a été utilisé pour suivre l'amplification de chaque ADNc.

Nous avons systématiquement inclus des témoins contrôles négatifs (eau) lors des analyses, et chaque plaque comportait une amplification d'actine et une amplification d'un gène candidat pour chaque échantillon analysé.

Les conditions d'analyses étaient les suivantes :

Phase de dénaturation pendant 5mn à 95°C, suivis par 45 cycles de 20s à 95°C, puis 15s à 60°C et 20s à 72°C. Après les 45 cycles, la spécificité de l'amplification par le tracé des courbes de fusion, a été testée par chauffage de 65 à 95°C avec une augmentation progressive de la température de 0,11°C/sec.

L'analyse des données a été réalisée en utilisant le logiciel LightCycler 480 (version 1.5). Les rapports d'expressions relatives ont été calculés en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$, où ΔCt représente Ct gène étudié – Ct actine, et $\Delta\Delta Ct$ représente le ΔCt du gène étudié – la moyenne des ΔCt des témoins bien irrigués (Livak et Schmittgen, 2001)

La formule du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ suppose que l'efficacité des PCR du gène d'intérêt et du gène de référence soit environ égale à 2. Cette hypothèse n'est pas toujours vérifiée et peut entraîner une source d'erreur importante. Il convient en pratique de calculer l'efficacité des PCR puis d'utiliser une formule similaire à celle du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ mais tenant compte des efficacités réelles des PCR qui est la suivante:

$$R = \frac{N'1}{N'2} = \frac{E(Ct_{gène2} - Ct_{gène1})}{F(Ct_{ref2} - Ct_{ref1})}$$

Où E est l'efficacité de la PCR du gène d'intérêt et F l'efficacité de la PCR du gène de référence (actine). (Pfaffl et al, 2001)

Nous avons effectué pour cela une série d'analyse sur des échantillons de dilution croissante (1/2) pour obtenir une courbe étalon correspondant à chaque couple d'amorces utilisé (spécifique du locus d'intérêt. Les Ct (Cycle Threshold) sont placés sur une échelle logarithmique et l'équation de la régression linéaire passant par ces points donne l'efficacité (le coefficient directeur). (Figure 5)

f- Traitement statistique des données

Tous les résultats ont fait l'objet de traitements statistiques. Le logiciel Statistix (version 8, Analytical Software, Tallahassee, USA) a été utilisé pour les ANOVA et le post-test de Bonferroni appliqué au seuil $\alpha = 0.05$, pour les comparaisons de moyenne. Dans le cas de comparaison deux à deux, le test de Student au seuil $\alpha = 0.05$ a été utilisé.

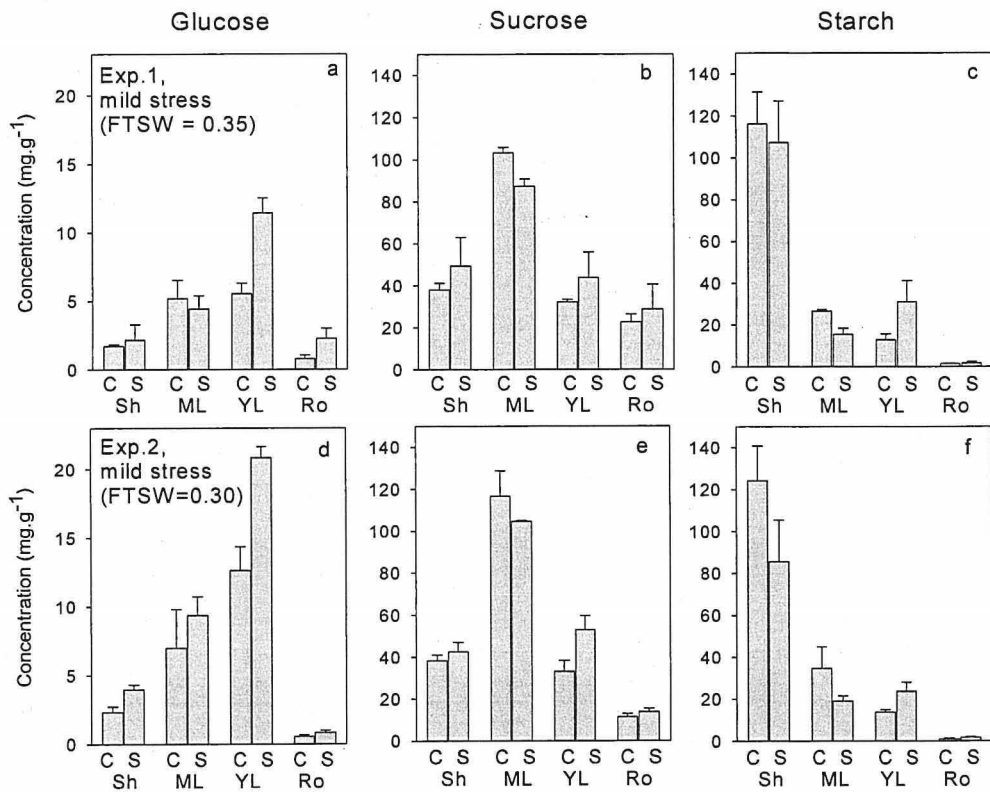
Sur les graphiques, les barres d'histogrammes représentent la moyenne des rapports d'expression pour les trois répétitions biologiques normalisées par rapport aux plants témoins (rapport égal à 1). Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM)

Références Bibliographiques :

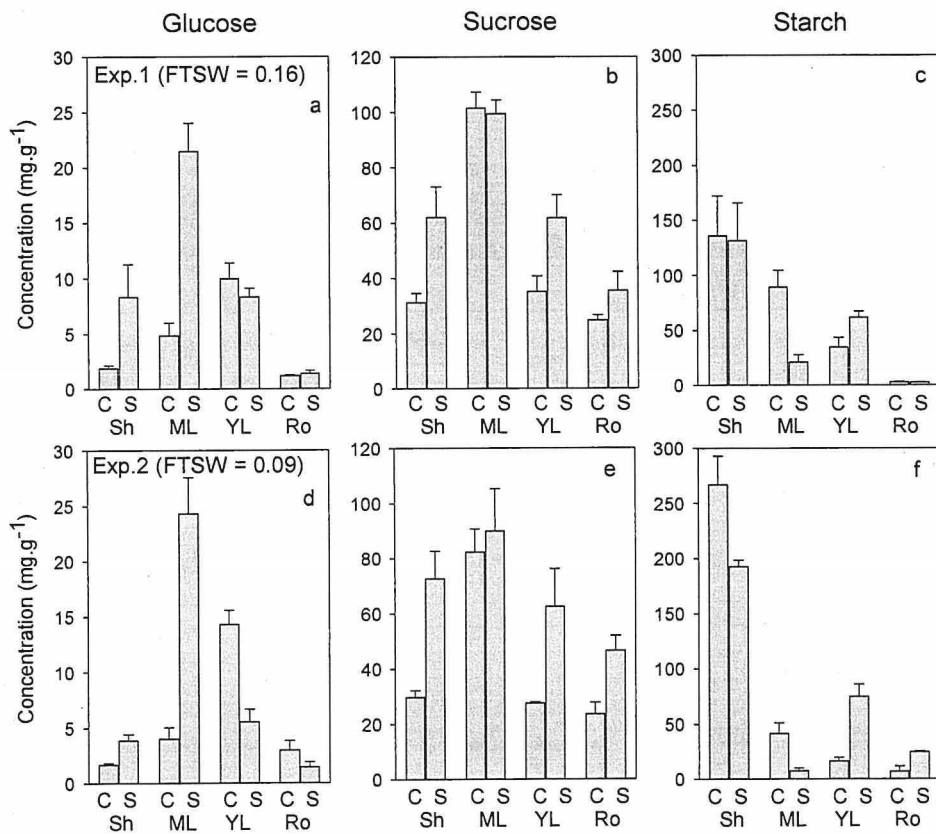
- . Black CC, Loboda T, Chen JQ, Sung SJS (1995) Can sucrose cleavage enzymes serve as markers for sink strength and is sucrose a signal molecule during plant sink development. *American Society of Plant physiologists*, 49-64.
- . Bonfig KB, Berger S, Fatima T, Gonzalez MC, Roitsch T (2007) Metabolic control of seedling development by invertases. *Functional Plant Biology* **34**, 508–516.
- . Carrari F, Alisdair R.F, Norberto D (2004) Heard it through the grapevine ? ABA and sugar cross-talk : the ASR story. *Plant Science* Vol9, N°2
- . Casadebaig P, Debaeke P, Lecoeur J (2008) Thresholds for leaf expansion and transpiration response to soil water deficit in a range of sunflower genotypes. *European Journal of Agronomy* **28**, 646-654.
- . Cikos S, Bukovska A, Koppel J (2007) Relative quantification of mRNA: Comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC molecular Biology* 8:113
- . Cho J.-I, Lee S.-K, Ko S, Kim H.-K, Jun S.-H, Lee Y.H, Bhoo S.H, Lee K.-W, An G, Hahn T.-R, Jeon J.-S (2005) Molecular cloning and expression analysis of the cell-wall invertase gene family in rice. *Plant Cell Rep* 24:225-236
- . Dingkuhn M, Luquet D, Kim HK, Tambour L, Clément-Vidal A (2006) Ecomeristem, a Model of Morphogenesis and Competition among Sinks in Rice: 2. Simulating Genotype Responses to Phosphorus Deficiency. *Functional Plant Biology* **33**, 325-337.
- . Dingkuhn M, Luquet D, Clément-Vidal A, Tambour L, Kim HK, Song YH (2006a) Is plant growth driven by sink regulation? Implications for crop models, phenotyping approaches and ideotypes. In Press. In 'Gene-Plant-Crop relations Congress'. Wageningen. (Ed. WUR)
- . Elbelt S (2006) mémoire M1. Variation d'expression des genes d'invertase du riz au cours d'un stress hydrique. Université Montpellier 2.
- . Frankel N, Carrari F, Hasson E, Iusem N (2006) Evolutionary history of the Asr gene family. *Gene* **378** : 74-83
- . Ji X, Raveendran M, Oane R, Ismail A, Lafitte R, Bruskiewich R, Cheng SH, Bennett J (2005b) Tissue-specific expression and drought responsiveness of cell-wall invertase genes of rice at flowering. *Plant Molecular Biology* **59**, 945–964.
- . Ji X, Van den Ende W, Van Laere A, Cheng S, Bennett J (2005a) Structure, Evolution, and Expression of the Two Invertase Gene Families of Rice. *J Mol Evol* **60**, 615-634.
- . Jian B, Liu B, Bi Y, Hou W, Wu C, Han T (2008) Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. *BMC Molecular Biology* 9:59

- . Kim JY, Mahe' A, Brangeon J, Prioul JL (2000) A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiology* **124**, 71–84.
- . Koch K. (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant biology* **7**: 235-246
- . Liu F, Andersen MN, Jacobsen SE, Jensena CR (2005a) Stomatal control and water use efficiency of soybean (*Glycine max* L. Merr.) during progressive soil drying. *Environmental and Experimental Botany* **54**, 33-40.
- . Liu F, Jensen CR, Andersen MN (2005b) A review of drought adaptation in crop plants: changes in vegetative and reproductive physiology induced by ABA-based chemical signals. *Australian Journal of Agricultural Research* **56**, 1245-1252.
- . Liu F, Jensen CR, Andersen MN (2004a) Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development: its implicaton in altering pod set. *Field Crop Research* **86**, 1-13.
- . Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. *Method* **25**, 402-408.
- . Luquet D, Dingkuhn M, Kim HK, Tambour L, Clément-Vidal A (2006) EcoMeristem, a Model of Morphogenesis and Competition among Sinks in Rice. 1. Concept, Validation and Sensitivity analysis. *Functional Plant Biology* **33**, 309-323.
- . Luquet D, Zhang B, Dingkuhn M, Dexet A, Clément-Vidal A (2005a) Phenotypic plasticity of rice seedlings: case of phosphorus deficiency. *Plant Production Science* **8**, 145-151.
- . Maskin L, Maldonado S, Iusem N (2007) Tomato leaf spatial expression of stress-induced Asr genes. *Mol.Biol.Rep.* DOI 10.1007/s11033-007-9114-2
- . Maskin L, Gudesblat G, Moreno J, Carrari F, Frankel N, Sambade A, Rossi M, Iusem N (2001) Differential expression of the members of the Asr gene family in tomato *Plant Science* **161** : 739-746
- . Pfaffl M (2001) A new mathématique model for relative quantification in real-time RT-PCR *Nucleic Acids Reasearch* Vol.29, N°9
- . Pelleschi S, Guy S, Kim J-Y, Pointe C, Mahé A, Barthes L, Leonardi A, Prioul J-L (1999) Ivr2, a candidate gene for a QTL of vacuolar invertase activity in maize leaves. Gene- specific expression under water stress. *Plant Molecular Biology* **39**: 373-380
- . Reymond M, Muller B, Tardieu F (2004) Dealing with the genotypeXenvironment interaction via a modelling approach: a comparison of QTLs of maize leaf length or width with QTLs of model parameters. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2461-2472

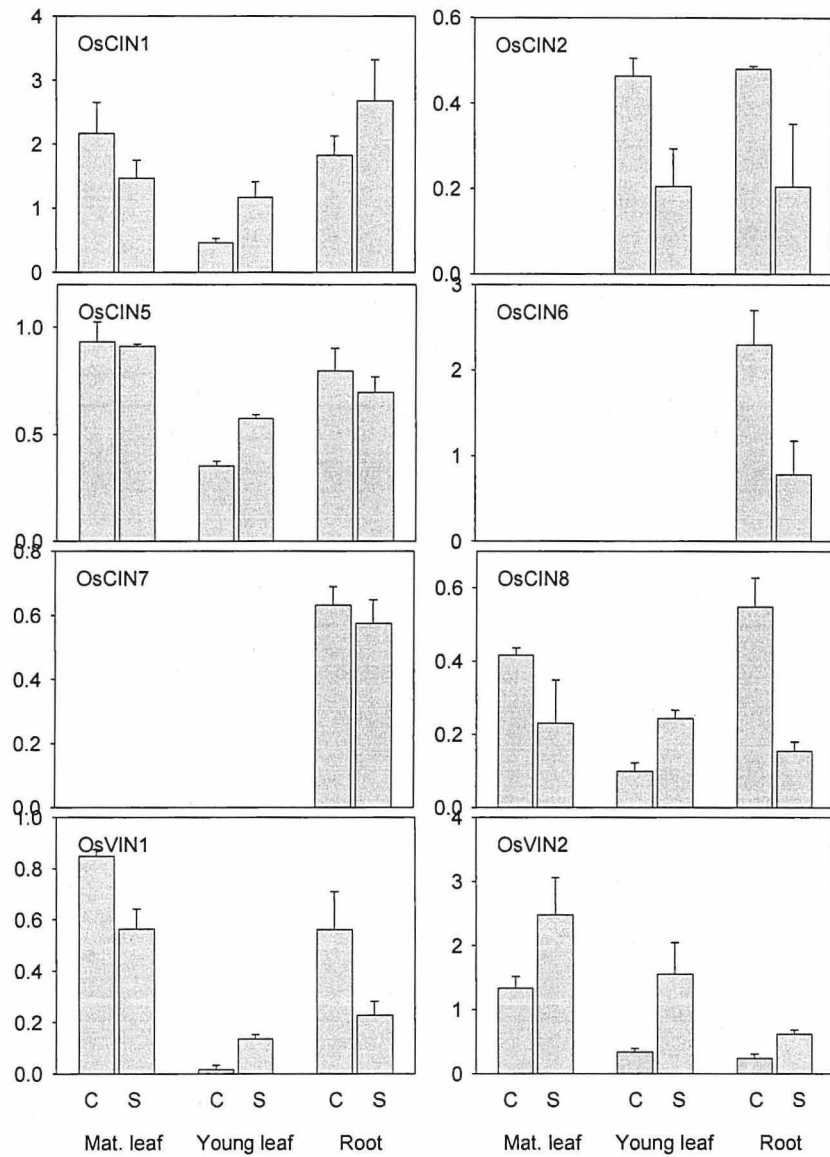
- . Rognoni S, Teng S, Arru L, Smeekens SCM, Perata P (2007) Sugar effects on early seedling development in Arabidopsis. *Plant Growth Regul* **52**, 217–228.
- . Roitsch T, Ehne R, Goetz M, Hause B, Hofmann M, Krishna Sinha A (2000) Regulation and function of extracellular invertase from higher plants in relation to assimilate partitioning, stress responses and sugar signalling. *Aust. J. Plant Physiol* **27**, 815–825.
- . Roitsch T, Gonzales M (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* **9**, 606-613.
- . Sherson SM, Alford HL, Forbes SM, Wallace G, Smith SM (2003) Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **54**:525-531
- . Tardieu F, Reymond M, Muller B, Granier C, Simonneau T, Sadok W, Welcker C (2005) Linking physiological and genetic analyses of the control of leaf growth under changing environmental conditions. *Australian Journal of Agricultural Research* **56**, 937-946.
- . Trouverie J, Prioul JL (2006) Increasing leaf export and grain import capacities in maize plants under water stress. *Functional Plant Biology* **33**, 209-218.
- . Trouverie J, Thévenot C, Rocher JP, Sotta B, Prioul JL (2003) The role of abscisic acid in the response of a specific vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2177-2186.
- . Vaidyanathan R, Kuruvilla S, Thomas G (1998) Characterization and expression pattern of an abscisic and osmotic stress responsive gene from rice *Plant Science* **140** : 21-30
- . Waclawovsky AJ, Loureiro ME, Freitas Rd, Rocha Cd, Cano MA, Fontes EP (2006) Evidence for the sucrose-binding protein role in carbohydrate metabolism and transport at early developmental stage. *Physiologia Plantarum* **128**, 391-404.
- . Winger A, Purdy S, MacLean JA, Pourtau N (2006) The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **57**, 391–399,.
- . Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q, Liu L (2003b) Activities of enzymes involved in sucrose-to-starch metabolism in rice grain subjected to water stress during grain filling. *Field Crop Research* **81**, 69-81.



Annexe 1 :
Teneur moyenne en sucre chez IR64 (glucose, saccharose (sucrose), et amidon en mg/g de matière sèche) dans les gaines (Sh), feuilles mature (source) (ML), feuilles jeunes (puits) (YL), racine (Ro), contrôle (C) et plantes stressé (S) pour un **niveau de stress intermédiaire** (23 jours après germination pour exp.1 et 29 jours après germination pour exp.2)



Annexe 2 :
Teneur moyenne en sucre chez IR64 (glucose, saccharose (sucrose), et amidon en mg/g de matière sèche) dans les gaines (Sh), feuilles mature (source) (ML), feuilles jeunes (puits) (YL), racine (Ro), contrôle (C) et plantes stressé (S) pour un **niveau de stress élevé**.



Annexe 3 :

Niveau d'expression moyen des gènes d'invertases vacuolaires (OsVIN#) et pariétales (OsCIN#) chez IR64, (exprimé par rapport à l'actine), mesuré par PCR semi-quantitative, lors de exp.1 (à FTSW = 0.30). L'absence de barre indique qu'il n'y a pas eu d'expression de détectée.

C = traitement Contrôle
 S = traitement Stress

Mat.leaf = feuilles source
 Young Leaf = feuilles puits
 Root = racine

Résumé :

Cette étude vise à quantifier la réponse au stress hydrique du niveau d'expression de deux familles de gènes chez le riz (*Oryza sativa* L.) en phase végétative. Elle s'intègre dans une démarche scientifique plus large visant à explorer le rôle du métabolisme carboné dans la réponse morphogénétique et physiologique (relations sources-puits) du riz sous stress hydrique, pour ensuite en étudier la diversité génétique et le déterminisme fonctionnel par étude d'association. Une expérimentation sur six accessions de riz a été conduite en milieu contrôlé, pour notamment analyser par qRT-PCR l'expression des gènes candidats de la famille ASR, facteurs de transcription régulés par l'ABA, et de la famille des invertases vacuolaires (VIN) et pariétales (CIN), dans les feuilles sources (matures) et puits (en expansion). Un stress hydrique a été appliqué sur un lot de plantes à partir du stade 7 feuilles apparues sur le brin maître, avec un suivi permanent et automatisé de l'humidité du sol et de la transpiration des plantes par gravimétrie. Un autre lot a été maintenu en condition irriguée, pour calculer le rapport d'expression entre les deux conditions hydriques pour chaque gène. Les résultats obtenus ont été confrontés de façon préliminaire à des données biochimiques et moléculaires acquises préalablement sur des expérimentations similaires, mais sur un seul génotype commun à cette étude : le niveau d'expression des gènes d'invertases pariétales et vacuolaires sous stress hydrique augmente de façon générale dans les organes puits ; cela a été interprété comme l'expression d'un mécanisme de protection et de maintenance d'une activité au niveau des organes puits (invertases pariétales) et d'ajustement osmotique (invertase vacuolaire). Les gènes *Asr* font également l'objet d'une régulation du niveau d'expression en conditions de stress hydrique, largement dépendante du stade de développement et du statut trophique des feuilles (sources ou puits).

Mots clés : Riz, *Oryza sativa* L., qRT-PCR, invertase pariétale, invertase vacuolaire, ASR

Abstract :

This study aims to quantify, during rice (*Oryza sativa* L.) vegetative phase, the expression level of two genes families in response to water stress. It is part of a broader scientific approach, exploring the role of carbon metabolism in rice morphogenetic and physiological (source-sink relation) response under water stress in order to ultimately study its genetic basis and diversity, based on associations studies.

An experiment was conducted on six rice accessions in a controlled environment, for analyzing gene expression (by qRT-PCR) of the ASR family, transcription factors regulated by ABA, and the vacuolar invertase family (VIN) and cell-wall invertase (CIN), in sources leaves (mature) and sinks leaves (expanding).

Water stress was applied by stopping irrigation once leaf-7 had appeared on the main stem, with continuous soil moisture and plant transpiration monitoring by automated gravimetric method. Other plants were kept well irrigated to enable calculating expression level ratio between both water treatments for each gene.

The results were preliminarily confronted to biochemical and molecular data previously acquired on similar experiments, but on a single genotype common to this study.

The results suggest that expression levels of cell-wall and vacuolar invertase genes under stress increased in sink leaves. This was interpreted as a mechanism to protect and maintain sink activity (cell-wall invertases) and osmotic adjustment (vacuolar invertases).

Asr genes are also subject to expression regulation under water deficit, largely dependent on the developmental stage and leaf trophic status (sources or sinks).

Keywords: Rice, *Oryza sativa* L., qRT-PCR, cell-wall invertase, vacuolar invertase, ASR.