UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Biologie cellulaire (CNU 65)
Formation Doctorale : Développement et adaptation des plantes : biologie moléculaire et Intégrative
Ecole Doctorale : Biologie des systèmes intégrés AGRONOMIE et ENVIRONNEMENT

Présentée et soutenue publiquement par

Julia REBOUILLAT

Le 31 mars 2006

ÉTUDE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE DU DEVELOPPEMENT RACINAIRE CHEZ LE RIZ (ORYZA SATIVA L. CV NIPPONBARE) : CRIBLAGE ET CARACTERISATION D'UNE COLLECTION DE LIGNEES D'INSERTION ENHANCER TRAP GAL4-UAS-GFP

JURY

Pascal Gantet	Professeur Université Montpellier II	Président
Thierry Desnos	Directeur de recherche CEA Cadarache	Rapporteur
Malcolm Bennett	Professeur Université Nottingham UK	Rapporteur
Laurent Laplaze	Chargé de recherche IRD Montpellier	Examinateur
Jean-Christophe Glaszmann	Directeur de recherche CIRAD	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

L'histoire débute en novembre 2001, au temps où il s'agissait de trouver un stage de recherche pour valider mon Diplôme d'Etudes Approfondies (à l'époque le nom de master de recherche n'existait pas encore). Je revenais d'un voyage à Madagascar où j'avais pu voir pour la première fois des cultures de riz en terrasse. Hélas à Paris le temps est gris et les recherches concernent *Arabidopsis* et le maïs. La première trop fondamentale à mon goût, le second plus grand que moi et pas séquencé... Alors que faire ?
Je décidai donc d'écrire à Jean-Christophe Glaszmann, puisque son nom appartenait au champ lexical de l'amélioration du riz. Ainsi, 4 ans plus tard, je tiens à vous remercier d'avoir répondu à mon courriel, et d'avoir accepté la charge de directeur de thèse.

Je remercie également Florent Maraux, sans qui cette thèse n'aurait peut être pas pu se faire, puisqu'il a contribué activement à la recherche du financement.

Christophe Périn arriva au CIRAD en juillet 2002, et hélas pour lui, il ne savait pas encore qu'il allait devoir supporter mes états d'âme pendant plus de 3 ans. Passionné par la biologie du développement, motivé par le nouveau challenge que le CIRAD lui a confié, et conquérant...en tout cas suffisamment pour entreprendre avec moi ce long parcours, il accepte la lourde responsabilité de m'accompagner au cours de ma thèse. Je te remercie de m'avoir coaché, d'avoir su m'enseigner l'humilité, la patience, la pertinence d'un discours scientifique et la différence entre discours politico-philosophique et scientifique. MERCI

Anne Diévart, quant à elle, arriva un peu plus tard. Apres un long séjour outre atlantique, elle apporta son expertise des LRR-Kinases, de la souris au riz en passant par *Arabidopsis* ! Je te remercie beaucoup, pour ta patience, tes encouragements, ta rigueur, ta passion, et pour ton aide précieuse. MERCI

Je tiens à remercier Emmanuel Guiderdoni, que l'on ne présente plus, pour sa patience, et sa présence à la tête de l'équipe à qui je souhaite de relever les défis passionnants à venir.

Merci à Malclom Bennett et Thierry Desnos, qui ont accepté la charge de rapporteurs ; Merci à Laurent Laplaze d'avoir bien voulu examiner ce travail ; et Merci à Pascal Gantet pour i) m'avoir permis de donner mon premier cours à la fac, et ii) pour avoir répondu présent pour la présidence du jury de thèse.

Merci, à Jacques Escoute et Jean-Luc Verdeil pour leurs précieux conseils en imagerie, et Merci à tous les riceteamiens qui ont accompagné de près ou de plus loin mes pérégrinations laborantines....

L'histoire ne serait pas complète si je ne citais que des scientistes... Car il y a bien évidemment toutes les personnes qui ont fourmillé dans les coulisses, et se trouvent hors champs aujourd'hui. Je parle de mes amis et de ma famille, qui ont su me soutenir, m'accompagner, m'écouter, me faire réfléchir, me faire mûrir, me faire confiance, et surtout me faire rire. Alors Merci encore pour votre empathie, et votre présence.

GLOSSAIRE

ADN-T : ADN de transfert

Anticline : se dit d'une division se faisant perpendiculairement au plan de la cellule.

Constitutif : un gène est dit « constitutif » lorsque son expression ne dépend d'aucun signal externe ou interne.

Croissance déterminée : développement défini dans le temps et limité par le potentiel génétique de la plante. Le fonctionnement du méristème de la fougère *Azolla* est limité à 50 divisions cellulaires ; au-delà la croissance de la plante n'est plus assurée. La croissance est déterminée.

Croissance indéterminée : développement non défini dans le temps. Les méristèmes racinaires du riz et d'*Arabidopsis* ont un fonctionnement continu assurant la croissance indéterminée de la plante.

Dédifférenciation : se dit d'une cellule spécialisée qu'un stimulus interne ou externe oblige à changer de spécialisation afin d'assurer la croissance et le développement d'un autre tissu.

Différenciation : une cellule se différencie lorsqu'elle s'engage dans un processus de spécialisation conduisant à un type cellulaire donné. Un ensemble de cellules de type cellulaire A constituera le tissu A.

Division formative : la division formative est une division qui permet de créer un nouveau type cellulaire. Une cellule mère de type A donne une cellule fille de type A et une cellule fille de type B.

Division proliférative : la division proliférative est une division qui permet la réplique d'une cellule à l'identique. Une cellule mère de type A donne deux cellules filles elles-mêmes de type A.

Inductible : Un gène dont l'expression est en partie dépendante d'un signal externe ou interne.

Méristème : amas organisé de cellules en division, à l'origine des organes. Un méristème est constitué de cellules indifférenciées ou souches assurant le renouvellement cellulaire, et de cellules en cours de différenciation assurant l'installation des tissus spécialisés.

Méristème fermé : un méristème est dit « fermé » lorsque les files cellulaires convergent en un point particulier au niveau de l'apex, le centre quiescent. Les tissus de la stèle, du cortex et de l'endoderme sont discrets dans un méristème fermé.

Méristème ouvert : un méristème est dit « ouvert » lorsque les files cellulaires ne convergent pas en un point particulier. Les tissus de la stèle, du cortex et de l'endoderme sont continus dans un méristème ouvert.

Péricline : se dit d'une division se faisant parallèlement au plan de la cellule.

Plasticité : Réponse physiologique d'un individu à une contrainte environnementale. C'est la capacité d'une plante à développer ses organes de manière à accéder aux ressources indispensables à sa croissance. La plasticité est dépendante du potentiel génétique G et des variables environnementales E : P = GxE

Système racinaire fasciculé : un tel système est constitué de nombreuses racines adventives de même ordre desquelles émergent des racines de second ordre qui peuvent donner elles-mêmes de racines d'ordre trois. Le riz possède un système racinaire fasciculé, on peut y observer des racines d'ordre cinq.

Système racinaire pivotant : un tel système racinaire est constitué d'une racine primaire ou principale de laquelle émergent des racines de deuxième ordre dites secondaires ou latérales. *Arabidopsis* possède un système racinaire pivotant.

PRINCIPALES ABREVIATIONS

ad : adventitious root, racine adventive
ae : aerenchyma, aerenchyme
CLSM : Confocal Laser Scanning Microscopy; microscope confocal
co : collumella, collumelle
cor : cortex
cr : crown root, racine coronaire
eb : embryonic root, racine embryonique
en : endodermis, endoderme
ep : epidermis, épiderme
ex :exodermis, exoderme
ez : elongation zone, zone d'élongation
GA : Gibberellic Acid, acide gibberellique
GFP : Green Fluorescent Protein
GRAS : Une famille de facteurs de transcription spécifiques aux plantes dont GAI, RGA, et SCR ont été les premiers membres isolés. La famille GRAS possède un rôle important dans divers processus de développement tels que la transmission de signaux, et le maintien du méristème (SCR et SHR).
GST : Gene Specific Tag; Etiquette gene-specifique, sequence partielle spécifique d'un gène donné utilisé par exemple pour inactiver spécifiquement son expression par exemple par RNA interférence
GUS : Beta-glucuronidase
AIA : acide indole-3-acetique
llr : large lateral root, racine latérale de grand diamètre à croissance indéterminée
lrc : lateral root cap, coiffe latérale
lrz : lateral root emergence zone, zone d'emergence des racines latérales
maz : maturation zone, zone de maturation
mp : metaphloem, métaphloème
mx : metaxylem, métaxylème
mz meristematic zone, zone méristématique
pe : pericycle, péricycle
pe1/pe2 : periclinal division, division péricline
ph : phloem, phloème
PI : propidium iodure, iodure de propidium
pp : protophloem, protophloème
pr : hair root, poil racinaire
px : protoxylem, protoxylème
QC : Quiescent Center, centre quiescent
QTL : Quantitative Trait Loci, locus à effet quantitatif
RAM : root apical meristem, méristème apical racinaire
rc : root cap, coiffe
rl : lateral root, racine latérale
SAM : shoot apical meristem, méristème apical de la tige
MAS : marker assisted selection, sélection assistée par marqueurs
sc : sclerenchyma, sclérenchyme
scu : scutellum
slm : small lateral root, petite racine latérale
sr : seminal root, racine, séminale
st : stele, stèle

TLSM : Two photon Laser Scanning Microscopy, microscope bi-photonique
xy : xylem, xylème

Conventions

Gène, allèle sauvage : *ABC* ou *ALPHABETICA*
Mutant : *abc* ou *alphabetica*
Protéine : ABC

PLAN DU MEMOIRE

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE I : LE RIZ ET LE DEVELOPPEMENT RACINAIRE

I- Quelles questions scientifiques pour la riziculture de demain ?

II- Le système racinaire du riz : origine et intérêt d'une grande diversité génétique et phénotypique

III- Morphologie et architecture comparées des systèmes racinaires d'Arabidopsis thaliana et d'Oryza sativa
- *Les différents types de racines et leur formation au cours du développement*
- *Système racinaire embryonnaire*
- *Système racinaire post-embryonnaire*

IV- Organisation cellulaire d'une racine de dicotylédone modèle Arabidopsis thaliana, et d'une racine de monocotylédone, modèle Oryza sativa
- *Différenciation tissulaire : description et fonction*
  - *Profil longitudinal*
  - *Profil radial*
- *Fonctionnement du méristème*

V- Génétique moléculaire du développement racinaire
- *Les bases moléculaires du maintien du méristème*
  - *Maintien du méristème apical (SAM) : Voie de signalisation CLAVATA/WUSCHEL*
  - *Maintien du méristème racinaire (RAM)*
- *Les bases moléculaires de la différenciation tissulaire*
  - *Formation du profil proximo-distal : rôle de l'auxine*
  - *Formation du profil radial : Création des différents types cellulaires le long d'un axe apical-basal*
  - *Formation du profil externe : présence ou absence de poils racinaires*
- *Les bases moléculaires de la plasticité : formation des racines latérales et adventives*

CHAPITRE II : BIOLOGIE CELLULAIRE DU DEVELOPPEMENT RACINAIRE DU RIZ: ORGANISATION DU MERISTEME ET DIFFERENCIATION TISSULAIRE

Article: CELLULAR BIOLOGY OF RICE ROOT DEVELOPMENT

CHAPITRE III : CRIBLAGE D'UNE COLLECTION DE LIGNEES D'INSERTION ENHANCER TRAP GAL4-UAS-GFP POUR DES EXPRESSIONS GFP TISSU-SPECIFIQUES

Article: SCREENING AND DEEP CHARACTERIZATION OF RICE (ORYZA SATIVA L. CV NIPPONBARE) ENHANCER TRAP LINES FOR ROOT SPECIFIC GENES

CHAPITRE IV : CARACTERISATION MOLECULAIRE, CELLULAIRE ET PHENOTYPIQUE DU MUTANT HAZAZEL

UN EXEMPLE D'UTILISATION DE LA COLLECTION DE LIGNEES ENHANCER TRAP RACINE SPECIFIQUE

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

INTRODUCTION GENERALE

Chez la plupart des animaux, le développement est essentiellement embryonnaire : un embryon possède tous les organes préformés avant la naissance de l'individu. Après la naissance il pourra rapidement acquérir la mobilité nécessaire pour se nourrir et se défendre. En revanche, chez les végétaux supérieurs, le développement est essentiellement post embryonnaire : l'embryon ne possède que les organes indispensables au démarrage de la vie de l'individu, ainsi que des réserves nutritives limitées. L'embryon végétal est composé d'organes (cotylédons et axe principal) assurant le développement de la plantule mais pas de la plante mature. Une fois ses réserves embryonnaires épuisées, la plante est entièrement soumise aux fluctuations environnementales. C'est pourquoi la plupart des végétaux doivent développer leur système racinaire pour capter les ressources hydrominérales, et pour s'ancrer dans leur substrat. Ils doivent également développer leur système aérien pour capter la lumière, le gaz carbonique et l'oxygène indispensable à la vie autotrophe. C'est dans ce contexte que la notion de plasticité phénotypique prend tout son sens : notamment, si les ressources hydrominérales ne sont pas suffisantes à proximité de la plante, le système racinaire se développe afin d'explorer une zone du sol plus éloignée. Les premières plantes terrestres possédaient uniquement un axe aérien mais ni feuille et ni racine. Il est maintenant admis que des algues vertes dichotomiques similaires à *Fritschiella*, *Rhynia* et *cooksonia* seraient à l'origine des racines (Kenrick, 2002). Les premières seraient apparues au milieu de la période silurienne, il y a près de 425 Millions d'années (http://scitec.uwichill.edu.bb/bcs/bl14apl/conq.htm). Certains branchements de l'algue se seraient ancrés dans le substratum, et auraient acquis la capacité d'absorber les nutriments, alors que d'autres branchements restés en surface, seraient à l'origine de l'appareil aérien photosynthétique.

La morphologie est une résultante de l'effet conjoint de l'environnement et du génome de l'individu. Ce sont les méristèmes qui sont à l'origine du développement post embryonnaire des végétaux. Ces unités de croissance sont les principaux points de contrôle de la morphogenèse adaptative, et font transiter les informations environnementales permettant l'adaptation à l'échelle de la plante entière (les feuilles peuvent également percevoir et faire transiter les informations). Les méristèmes sont des zones de divisions et de différenciations cellulaires intenses mises en place au cours de l'embryogenèse ou néoformés lors du processus de ramification et qui commencent à fonctionner après la germination. Le méristème apical de la partie aérienne (SAM : Shoot Apical Meristem), est à l'origine des organes aériens, alors que le méristème apical racinaire (RAM : Root Apical Meristem) produit les organes souterrains. Ces deux zones forment l'axe apical-basal de l'embryon végétal. Il existe également des méristèmes adventifs, latéraux, et secondaires à l'origine

notamment des racines adventives et latérales, des ramifications aériennes, et des inflorescences. L'initiation et le développement de ces unités de croissance sont essentiellement post-embryonnaires et leur mise en place et leur croissance conditionnelle assurent ainsi la plasticité de la plante en réponse à des fluctuations de son environnement.

OBJECTIFS DE LA THESE

La génétique moléculaire a révolutionné notre compréhension du développement des plantes. En effet, pendant longtemps la biologie du développement a été le domaine privilégié des botanistes et des physiologistes. De nombreuses études classiques ont été récemment revisitées grâce aux outils de la génétique moléculaire permettant aux scientifiques d'aborder l'analyse de processus biologiques jusque-là jugés trop complexes. La biologie moléculaire a produit une masse de données considérable ces dernières années, mais seule, elle est impuissante dans l'analyse de processus biologiques tels que le développement. C'est pourquoi on assiste aujourd'hui à une nouvelle approche intégrative de la biologie du développement, basée sur l'utilisation synergique de technologies récentes issues des développements de la biologie moléculaire, et de l'imagerie conjuguées à la puissance de la génétique moléculaire.

L'objectif de ce travail de thèse est d'initier la compréhension des mécanismes moléculaires du développement racinaire du riz *Oryza sativa* L. cv Nipponbare, plante modèle des monocotylédones, via la découverte de gènes clés impliqués dans le développement racinaire. Une cible plus spécifique concerne les gènes qui interviennent dans l'organisation cellulaire et le fonctionnement des méristèmes racinaires. Les données concernant le développement racinaire chez le riz et les monocotylédones sont parcellaires, en partie en raison de l'émergence récente du riz comme espèce modèle. L'approche retenue comprends donc trois volets ; une caractérisation extensive à l'échelle cellulaire du développement racinaire ; la recherche de lignées enhancer exprimant la GFP selon un profil racine et tissus spécifique ; enfin la recherche et la caractérisation d'un mutant affecté pour le développement racinaire.

Une synthèse bibliographique sur le développement racinaire dans le premier chapitre illustre les différences d'anatomie et de développement des systèmes racinaires d'*Arabidopsis thaliana*, plante modèle des dicotylédones et d'*Oryza sativa*, plante modèle des monocotylédones. Cette première partie fait le point des connaissances actuelles sur les mécanismes moléculaires et les gènes impliqués dans le développement racinaire. Les données concernant la biologie du développement racinaire chez le riz sont partielles et

parfois contradictoires en particulier concernant l'organisation et le fonctionnement des méristèmes. La deuxième partie décrit donc en détail la morphologie, l'anatomie racinaire ainsi que le fonctionnement détaillé des méristèmes racinaires du riz cv Nipponbare. Le troisième chapitre intitulé « Criblage d'une collection de lignées d'insertion enhancer trap Gal4-UAS-GFP pour des expressions GFP tissu spécifique» décrit le criblage d'une collection de lignées GFP spécifiques du système racinaire et leur caractérisation moléculaire et cellulaire. Enfin, les résultats préliminaires de la caractérisation moléculaire et phénotypique d'un mutant phénotypique isolé au cours de ce criblage sont présentés dans le quatrième et dernier chapitre.

CHAPITRE I

LE RIZ
ET
LE DEVELOPPEMENT RACINAIRE

I- Quelles questions scientifiques pour la riziculture de demain ?

Le riz, c'est la vie (slogan de la FAO pour 2004 l'année internationale du riz) est une réalité pour une partie importante de la population mondiale, et il est profondément ancré dans le patrimoine culturel de nombreuses sociétés. Il est l'aliment de base pour plus de la moitié de la population mondiale. Par exemple en Asie, plus de 2 milliards de personnes tirent 60 à 70% de leur apport énergétique du riz et de ses dérivés. En Afrique, il représente la source alimentaire en plus forte croissance et revêt une importance manifeste en matière de sécurité alimentaire dans un nombre croissant de pays à faible revenu et à déficit vivrier.

Les systèmes de production rizicoles et les opérations post-récoltes associées emploient près d'un milliard de personnes dans les zones rurales des pays en développement. Près des 4/5 du riz mondial est cultivé par de petits agriculteurs dans des pays en développement à faible revenu. Des systèmes de riziculture efficaces et productifs sont donc essentiels au développement économique et à une qualité de vie améliorée de la majorité de la population mondiale.

Les chiffres de la FAO montrent que d'ici 2030, la demande totale de riz sera de l'ordre de 800 millions de tonnes par an, soit une augmentation de 40% par rapport à la production annuelle de ces dernières années. Or l'augmentation du rendement ralentit et devient même inférieure à la croissance démographique. En effet, l'accroissement annuel de la production mondiale était de seulement 1,6% par an entre 1990 et 2002 comparée à 2,7% entre 1968 et 1990 (http://www.fao.org/rice2004/en/pdf/hossain.pdf). Si cette tendance persiste, la sécurité alimentaire de plusieurs pays en développement sera menacée dans les années à venir.

C'est pourquoi aujourd'hui la riziculture doit faire face à des obstacles considérables, parmi lesquels des taux de rendement en baisse, un épuisement des ressources naturelles, une pénurie de main-d'oeuvre, les déficiences institutionnelles et la pollution de l'environnement. La diversité des régions, des peuples, et des ressources ainsi que leur articulation au sein des systèmes de riziculture, exige une démarche diversifiée en matière de développement mondial de la riziculture. Ce développement doit prévoir une participation tant au niveau local qu'au niveau international (http://www.fao.org/rice2004/en/f-sheet/concept.pdf).

Pour assurer la sécurité alimentaire dans les pays en développement, la riziculture de demain devra faire face à de multiples contraintes, et la diminution des ressources en eau pourrait devenir l'un des principaux facteurs limitants (Frederiksen et al. 1993, Huang et al. 2002). Ainsi, une gestion de l'eau responsable est déterminante en matière de création de systèmes de production rizicole durables. Avec la contrainte hydrique, c'est le problème plus global de

l'acquisition des ressources qui se pose (Poorter and Nagel, 2000; Reich, 2001). Ce problème est d'autant plus marqué dans les zones rizicoles où les moyens technico-économiques ne permettent pas des pratiques culturales optimisant l'acquisition des ressources par la plante cultivée (apports d'intrants limités, compétition avec les adventices, Caton et al. 2003 ; Suzuki et al. 2002). Dans ce paysage agro-économique, la création de variétés de riz plus vigoureuses et performantes en termes d'absorption et de valorisation de l'eau (et des ressources en général) devient d'ores et déjà déterminante (Price et al., 2002a; Price et al., 2002b). De part sa fonction de prélèvement dans le milieu édaphique, le système racinaire vient donc prendre une place majeure dans l'amélioration variétale du riz.

II- Le système racinaire du riz : origine et intérêt d'une grande diversité génétique et phénotypique

Les pressions exercées au cours du processus de sélection naturelle ou de sélection artificielle et de domestication, tels que la sécheresse, la submersion, les inondations, les déficits en substances nutritives, les stress biotiques et les interventions de l'homme sont à l'origine de la grande diversité actuelle de variétés et d'écosystèmes de riz. Se fondant sur cette diversité, les agronomes et les écologistes ont proposé plusieurs systèmes de classification, dont la plus utilisée distingue cinq catégories en fonction des conditions hydriques de cultures : riz aquatique à variété pluviale, riz de submersion profonde, riz des zones humides à marée, riz pluvial, et riz irrigué. Au cours des années 1990, environ 11 % seulement du riz récolté au niveau mondial était un riz pluvial, dont la culture ne nécessite aucune submersion ; les récoltes restantes provenaient de systèmes utilisant des rizières artificielles.

Cette grande diversité dans les types cultivés reflète une grande diversité de stratégies d'acclimatation aux contraintes environnementales. Une constante se manifeste à travers la structure et la plasticité du sytème racinaire qui est lié à chaque type variétal. Par exemple, les riz de type pluvial ont une croissance racinaire qui s'accélère en conditions de stress hydrique modéré alors que la croissance racinaire des riz irrigués s'arrête rapidement dans des conditions de stress comparable. Au dela de la diversité, une connaissance approfondie des bases moléculaires du développement racinaire et de sa plasticité, est un prérequis indispensable à la création de nouvelles variétés. La sélection variétale en vue de la production d'architectures racinaires spécifiques constitutives ou inductibles est en effet extrêmement difficile et donc jusqu'à récemment est restée très limitée alors qu'elle présente

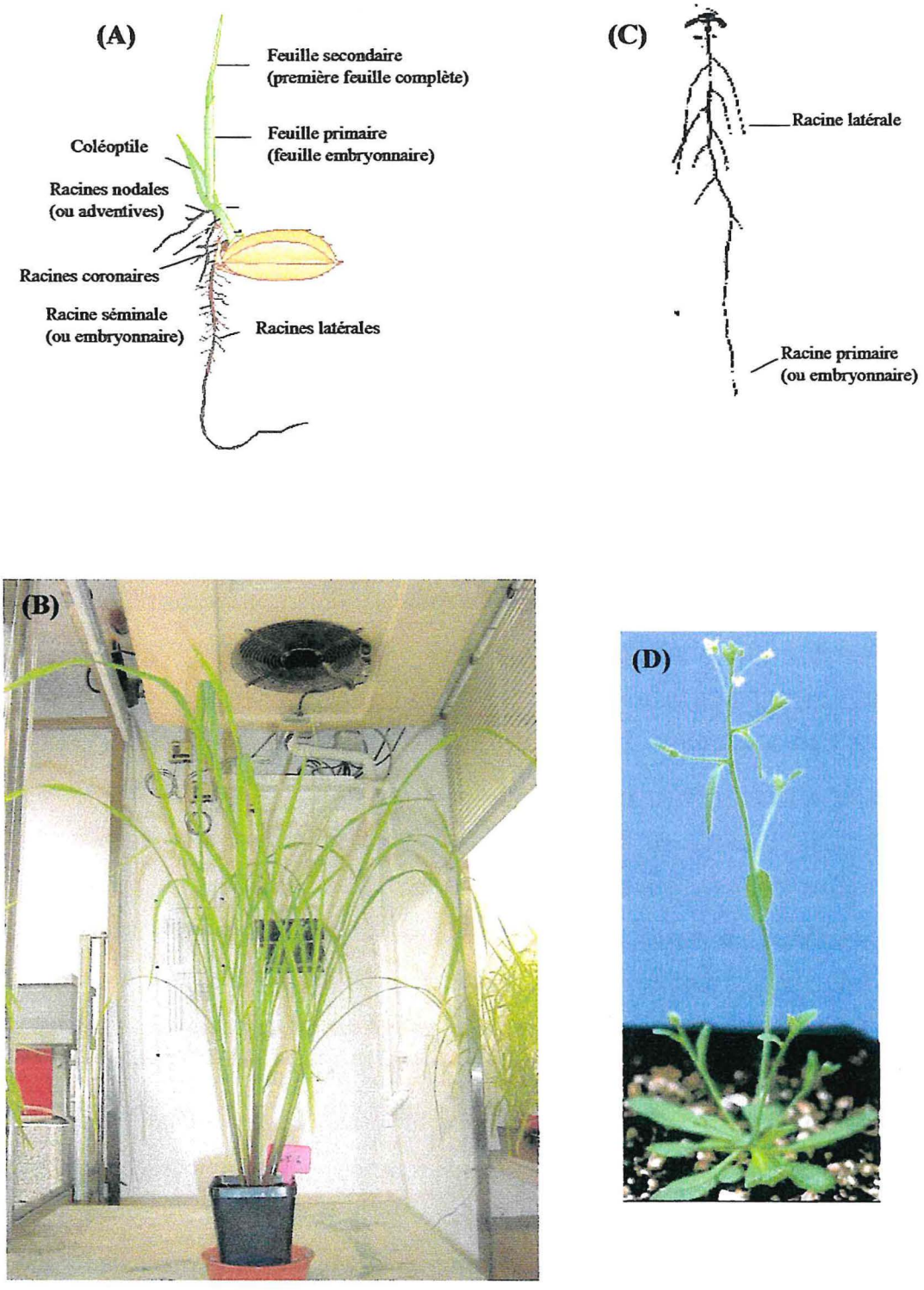


Figure I.1.a. (A) Plantule de riz; (B) Riz adulte; (C) Plantule d'Arabidopsis; (D) Arabidopsis adulte en fleurs.

un potentiel très important dans le contexte de la réduction des apports d'eau pour la culture du riz.

L'utilisation de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* a considérablement accru nos connaissances dans la compréhension des mécanismes du développement racinaire. Aussi, dans les paragraphes qui suivent, nous présentons tout d'abord la morphologie et l'architecture comparée des deux plantes modèles *Arabidopsis thaliana* et *Oryza sativa*, puis l'organisation cellulaire de la racine via le fonctionnement du méristème apical racinaire, pour enfin faire un bilan des mécanismes moléculaires intervenant dans le développement du système racinaire. On notera qu'au début de cette thèse, la plupart des données existantes à ce sujet dans la littérature concernaient Arabidopsis. Les données sur le développement racinaire du riz sont partielles et souvent contradictoires ce qui explique la prévalence des descriptions du développement racinaire d'Arabidopsis dans les paragraphes suivants.

III- Morphologie et architecture comparées des systèmes racinaires d'*Arabidopsis thaliana* et d'*Oryza sativa*

Arabidopsis thaliana est la plante modèle pour l'étude de la génétique moléculaire du développement des dicotylédones. D'importants progrès ont été réalisés ces dernières années au niveau de l'identification des gènes contrôlant les étapes clés du développement racinaire. Le système racinaire des dicotylédones est organisé autour d'un pivot : la racine primaire est issue de l'embryon, et les racines secondaires émergent de cet axe primaire (Fig.I.1).

Le riz possède une architecture racinaire plus complexe que celle d'*Arabidopsis thaliana*. En effet, le système racinaire des monocotylédones est organisé autour de nombreuses racines « primaires », sur lesquelles sont branchées les racines secondaires. Une racine séminale (plusieurs chez d'autres monocotylédones comme le maïs) émerge de la graine, puis les racines nodales émergent à chaque nœud d'un phytomère, en suivant le rythme d'émission des feuilles (Schéma de Katayama 1951, cité par Hanada, 1993 ; Kawata 1980). Des racines latérales émergent de la racine séminale et des racines nodales. Les racines coronaires (qui sont aussi des nodales) de la plantule émergent du plateau de tallage juste après la racine séminale. Les racines nodales, coronaires sont toutes des racines adventives et nous considérerons dans la suite qu'il s'agit de termes synonymes pour désigner les racines adventives. Enfin, certaines racines latérales se ramifient à leur tour (on peut trouver des racines latérales de rang 5) (Hanada, 1993). Toutes ces racines possèdent des poils racinaires. Le système se complexifie encore lors de la ramification de la tige principale, chaque

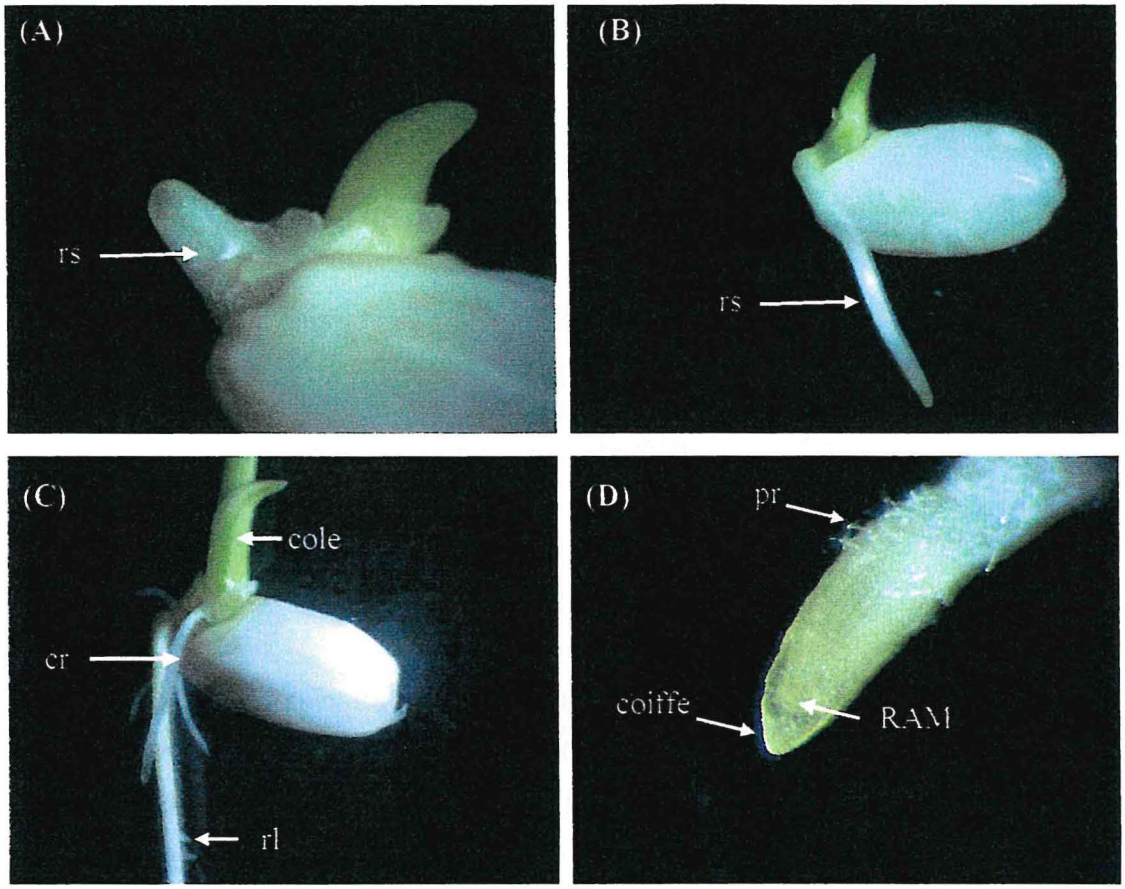


Figure I.1.b : Développement d'*Oryza sativa* cv Nipponbare sous loupe binoculaire et lumière blanche. (A) 1 jour après semis (grossissement 10x); (B) 2 jours après semis (grossissement 3x); (C) 4 jours après semis (grossissement 3x); (D) Apex racinaire (grossissement 10x). Cole : coléoptile; rs : racine séminale; cr : racine coronaire; rl : racine latérale; pr : poils racinaires. RAM : méristème racinaire.

ramification aérienne (talle) possédant ses propres racines nodales (dites adventives). L'ensemble forme un système racinaire fasciculé, à opposer au système racinaire d'*Arabidopsis thaliana* qualifié de pivotant.

Les différents types de racines et leur formation au cours du développement

Chez le riz et le maïs, le système racinaire post-embryonnaire devient la base du système racinaire, tandis que chez *Arabidopsis thaliana*, le système racinaire d'origine embryonnaire demeure dominant pendant tout le cycle de développement. En 1994, Feldman montrait que chez les monocotylédones, le développement des racines adventives *sensu stricto* n'était déclenché que par un facteur externe comme une blessure ou un traitement hormonal. Il suggérait que la formation des primordia était génétiquement déterminée, mais que leur vitesse d'élongation ne serait pas génétiquement programmée. Il a été récemment montré qu'un gène majeur, CRL1, était impliqué dans le développement des racines adventives (Inukai, et al. 2005); En effet l'isolement de mutants sans racines adventives mais possédant une racine séminale montre que les mécanismes moléculaires de formation de ces deux types racinaires sont génétiquement dissociables (Hochholdinger et al. 2004). Cependant, si la formation des primordia de racines adventives est sous contrôle génétique, l'émergence des racines quant à elle, est commandée par les conditions environnementales. En effet, l'apparition des racines adventives chez le riz est induite après immersion ou en réponse à l'éthylène (Mergemann et Sauter, 2000).

Système racinaire embryonnaire

La racine primaire des dicotylédones est interne à l'embryon, elle se développe à partir du méristème apical basal (Yamashita, 1991), et apparaît indispensable à la croissance au stade juvénile. Aux stades suivants, sa croissance s'arrête généralement (Feldman, 1994). La racine séminale des monocotylédones est également d'origine embryonnaire, son primordium émerge du nœud scutellaire au cours de la dernière phase de l'embryogenèse. Le nombre de racines séminales est un caractère polygénique et est très variable chez de nombreuses monocotylédones. Le riz, quant à lui, ne développe qu'une seule racine séminale. La racine séminale des monocotylédones et la racine primaire des dicotylédones sont équivalentes, nous emploierons donc systématiquement le terme plus générique de racine séminale (RS) par la suite pour éviter toute confusion.

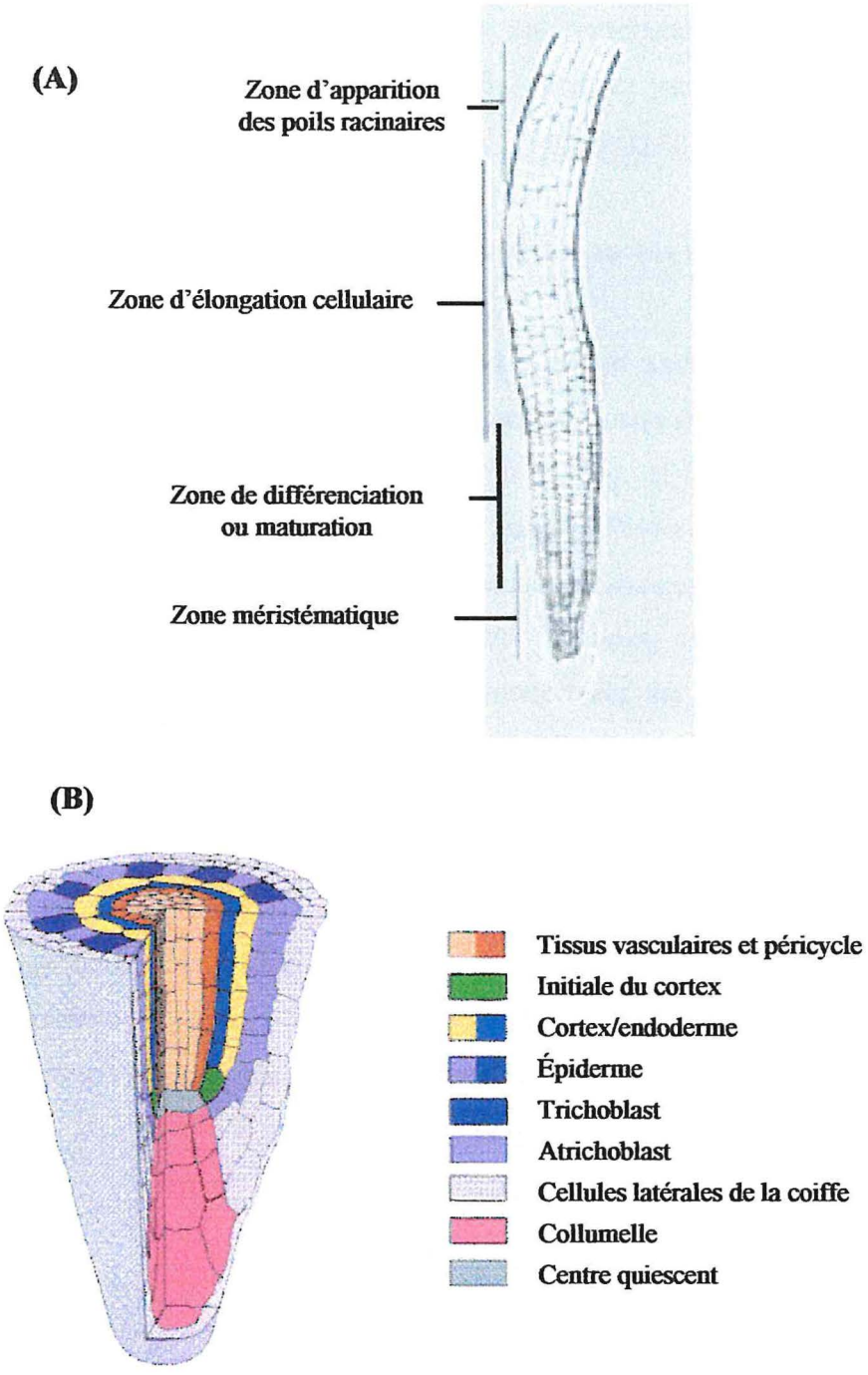


Figure I.2.a : Racine d'*Arabidopsis*. (A) Zone de développement de la racine, de bas en haut : zone méristématique, zone d'élongation et de maturation, et zone de différentiation des cellules épidermiques ou apparition des poils absorbants. (B) Vue écorchée d'un apex racinaire d'*Arabidopsis* : centre quiescent; cellules de la columelle; cellules latérales de la coiffe; atrichoblast; trichoblast; épiderme; cortex; endoderme; cellules initiales du cortex/endoderme; péricycle; faisceaux vasculaires (source : http://www.bio.uu.nl/mg/pd/)

Système racinaire post-embryonnaire

Les racines adventives sont initiées au niveau des nœuds de la tige et nommées « crown-root » en anglais lorsque le nœud est situé dans le sol. Quant aux racines qui se développent au niveau aérien, elles sont alors nommées « brace-root ». Ces racines nodales sont présentes en nombre variable. Elles apparaissent à chaque nœud de la tige et sont initiées au niveau des cellules internes du nœud. Le nombre et la taille de ces racines augmentent avec la position du nœud sur la tige. Les racines nodales représentent la charpente de l'architecture du système racinaire, elles améliorent la stabilité de la plante en croissance. Les racines nodales développent des racines secondaires : les racines latérales {(la formation des racines latérales se fait suivant un mécanisme bien décrit chez *Arabidopsis* par Laskowski et al. (1995), et Malamy et Benfey (1997)}. Ces racines latérales sont plus fines que les racines nodales (Peterson, 1991), et peuvent conduire à la formation de racines d'ordre secondaire et d'ordres supérieurs qui ont une grande importance dans l'architecture du système racinaire et sa plasticité (Lynch, 1995). Elles augmentent considérablement la surface d'absorption du système racinaire, et sont indispensables pour l'absorption des ressources hydrominérales. Les poils racinaires sont des extensions épidermiques formées aussi bien sur les racines embryonnaires que post-embryonnaires. Ils multiplient la surface d'échange du système racinaire, et améliorent ainsi l'absorption de l'eau et des nutriments (Gilroy et al. 2000).

IV- Organisation cellulaire d'une racine de dicotylédone modèle *Arabidopsis thaliana*, et d'une racine de monocotylédone modèle *Oryza sativa*

Différenciation tissulaire : description et fonction

Profil longitudinal

La croissance racinaire est acropète, les tissus sont d'autant plus âgés que l'on s'éloigne de l'extrémité de la racine. Cette dernière peut se décomposer en quatre zones de développement : La coiffe, la zone méristématique, la zone d'élongation, et la zone de maturation ou differenciation (Fig. I.2.a).

La coiffe protège le méristème apical des altérations physiques lorsque la racine pénètre dans le sol. Elle est initiée à partir de cellules spécialisées, les cellules initiales de la coiffe. Les cellules de la coiffe sont éliminées au fur et à mesure de la croissance. Ces cellules perçoivent la gravité et produisent des mucopolysaccharides aidant à la pénétration des racines dans le

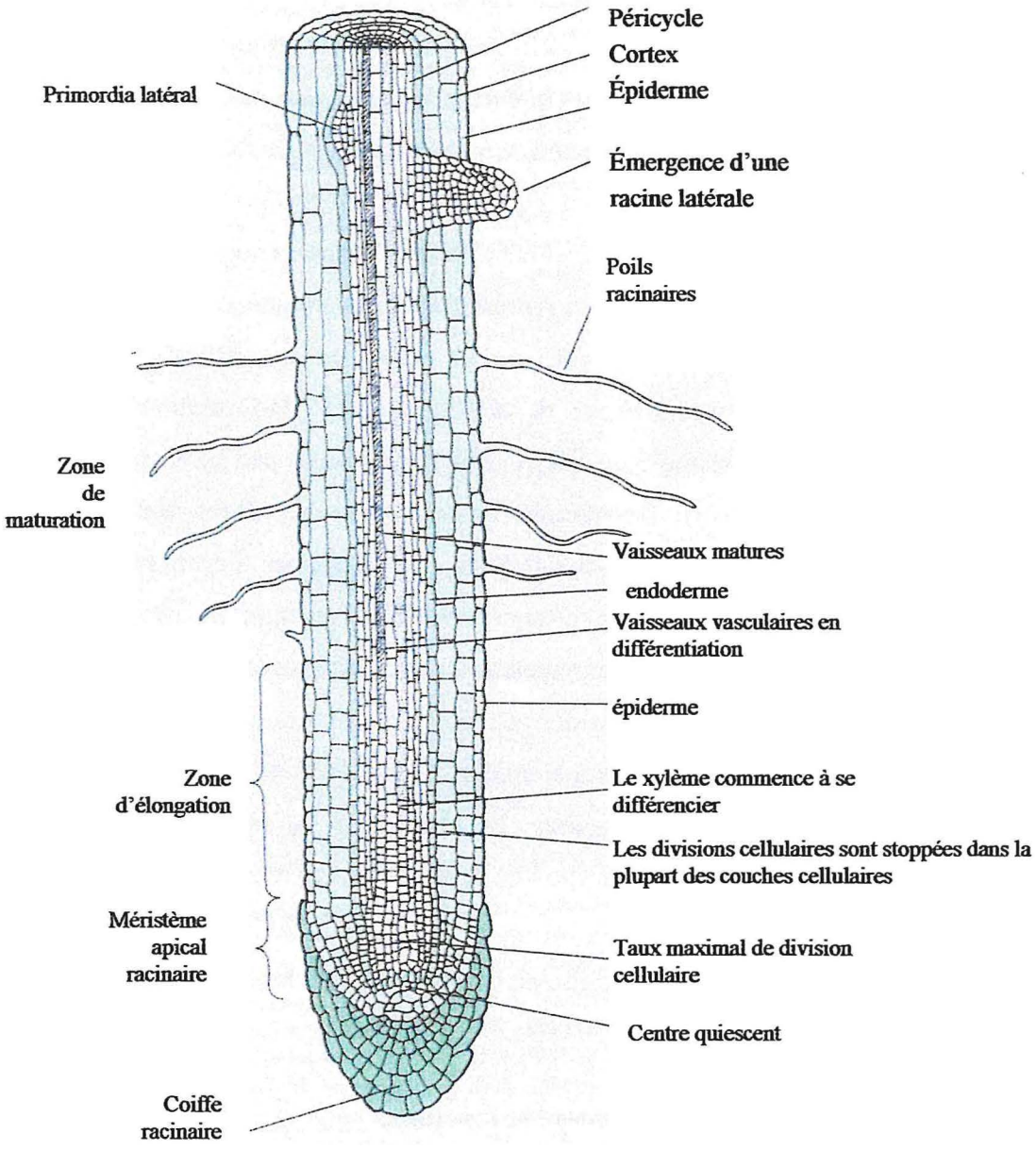


Figure I.2.b : Vue schématique de la racine primaire d'*Arabidopsis*. Coiffe, méristème apicale racinaire, zone d'élongation et de maturation. Les cellules méristématiques ont des petites vacuoles, s'allongent et se divisent rapidement pour générer des files cellulaires. Plus on s'éloigne de l'apex moins le taux de division cellulaire est élevé, les cellules s'allongent et se différentient en un type donné (d'après Plant Physiology 2nd Edition; Tail, and Zeiger).

sol.

La zone méristématique située juste derrière la coiffe, permet la croissance de la racine primaire.

La zone d'élongation est caractérisée par l'élongation rapide et intensive des cellules situées dans cette zone. Le rythme de division cellulaire est d'autant plus faible que l'on s'éloigne de la zone méristématique, jusqu'à atteindre zéro dans la zone de maturation. C'est dans cette dernière zone que les cellules deviennent matures, bien que leur différenciation ait débuté plus avant, ces deux dernières zones se chevauchant partiellement (Fig.1.2.a).

Le méristème apical racinaire n'est pas à l'origine de la croissance des racines latérales. En effet, celles-ci émergent via un méristème latéral issu de la division de quelques cellules données du péricycle mature (ou de l'endoderme dans certains cas). Les racines latérales sont structurées de la même manière qu'une racine primaire (4 zones de développement).

Profil radial

Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe quatre couches cellulaires : l'épiderme, le cortex, l'endoderme, et le péricycle qui sont organisées autour de la stèle située au centre de la racine comprenant les tissus vasculaires (Fig.I.2.b).

A l'exterieur, l'épiderme est constitué de deux types de cellules : les trichoblastes formant les poils racinaires (ou RH pour « root hair cells ») (Wada et al. 2002 ; Andeme-Onzighi et al. 2002; Mendozaet al. 2000; Berger et al. 1998; Potapov, 1976), et les atrichoblastes (ou NH pour « non-hair cells »).

Chez *Arabidopsis thaliana*, le cortex n'est constitué que d'une couche cellulaire (Benfey et al. 1993 ; Scheres et al. 1995). Chez le riz en revanche, le cortex est organisé en 4 sous couches : l'assise subéreuse exodermique, le parenchyme cortical externe, les lacunes aérifères (ou parenchyme aérifère), et le parenchyme cortical interne.

L'endoderme, chez *Arabidopsis thaliana* et chez le riz, est constitué de cellules aux parois étanchéifiées par la lignine et la subérine, formant la bande de Caspari.

Le péricycle est constitué de cellules pouvant initier la formation des racines latérales chez *Arabidopsis thaliana*, tandis que chez le riz elles peuvent également être initiées via les divisions des cellules de l'endoderme et du péricycle. Toutes les cellules de l'endoderme et du péricycle sont a priori capables d'en initier la formation, cependant il est couramment observé que seules celles situées près du xylème sont compétentes (Mc Cully, 1975).

Enfin, les tissus vasculaires sont composés du xylème et du phloème, qui transportent respectivement la sève brute et la sève élaborée. Chez les monocotylédones, les tissus

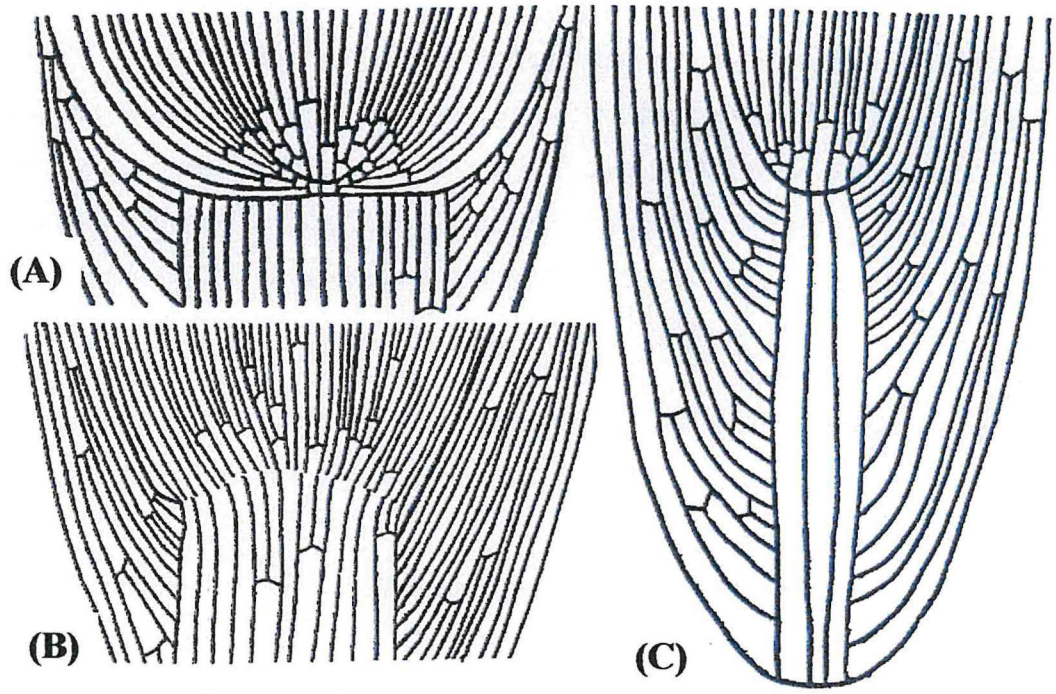


Figure I.3.a : Les différents types de méristèmes. (A) Fermé, (B) Ouvert, (C) Semi ouvert. (D'après Plant Root : The Hidden Half book. 3rd Edition., Yoav, Amram, and Uzi.)

conducteurs sont disposés de façon polyarche où le xylème alterne avec le phloème. Cet agencement est différent chez les dicotylédones, le phloème et le xylème sont disposés de façon diarche le long d'un axe central.

Fonctionnement du méristème

Le développement de l'embryon et des organes latéraux post embryonnaires se fait principalement via des divisions cellulaires symétriques et asymétriques dans différents endroits et plans, et par l'expansion de cellules dans les zones méristématiques. La connaissance de l'anatomie d'un méristème permet donc de prédire dans une certaine mesure son fonctionnement. L'organisation stéréotypée de la racine en tissus organisés en couches cellulaires concentriques suggère deux hypothèses pour le fonctionnement du RAM :

(i) Une cellule mère donne une descendance clonale de cellules filles de même spécificité, qui transmettront à leur tour cette spécificité. Cette hypothèse suggère que le destin cellulaire est précocement déterminé au cours du développement, ce mécanisme est nommé : origine clonale de l'identité cellulaire.

(ii) L'identité cellulaire est déterminée à chaque instant par la position qu'occupe la cellule dans la racine et n'est pas toujours corrélée avec l'origine cellulaire ; de nombreuses cellules changent leur identité lorsqu'elles se trouvent dans un nouveau contexte spatial même à des stades tardifs de développement, (Van den Berg al. 1995), ce qui peut être nommé : origine positionnelle de l'identité cellulaire.

A l'heure actuelle seule la théorie positionnelle est compatible avec les données observées et permet d'expliquer le fonctionnement du RAM et la mise en place des différents tissus racinaires.

Au cours de la croissance racinaire, les nouvelles cellules proviennent du méristème situé à l'extrémité de la racine. Il existe plusieurs types de méristèmes selon les espèces. Leur fonctionnement et leur structure peuvent être de deux types : fonctionnement déterminé ou indéterminé, structure fermée ou ouverte. Les méristèmes apicaux caulinaire et racinaire des fougères et autres plantes vascularisées primitives, ont une seule et grande cellule apicale au centre du méristème apical. Cette cellule apicale est la seule source de l'ensemble des types cellulaires racinaires (Tail et Zeiger, 1998) qui sont générés par des divisions periclines successives sur toutes les faces de cette unique cellule apicale. *Azolla* est une fougère illustrant le premier type de méristème. La racine d'*Azolla* ne se développe pas tout au long de

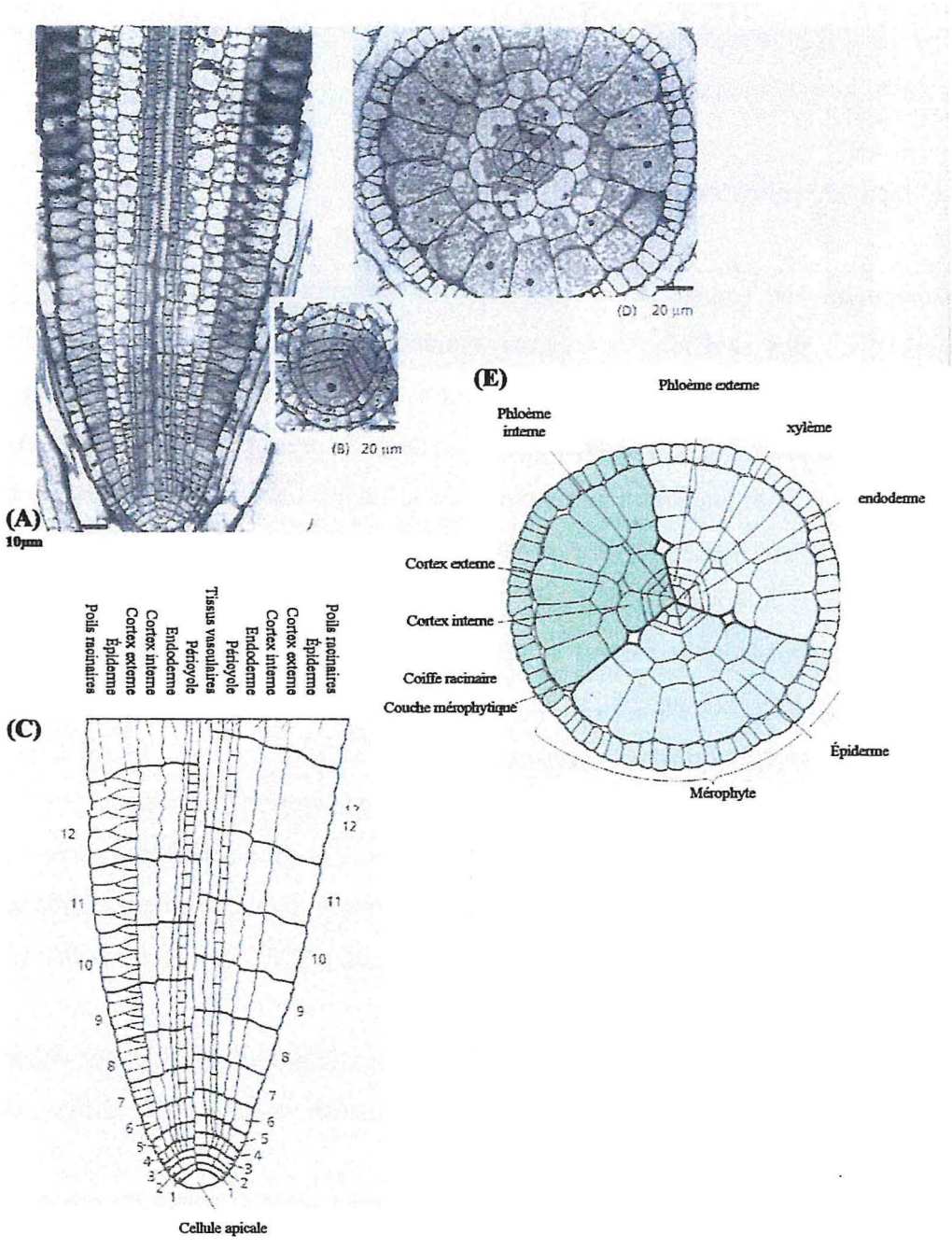


Figure I.3.b : Apex de la fougère d'eau *Azolla pinnata*. (A) Coupe longitudinale de racine; (B) Cellule apicale en division donnant des files des cellules triangulaires appelées mérophytes; (C) Diagramme des 12 mérophytes formées de chaque côté de la racine; (D) Les divisions supplémentaires de chaque mérophyte suivent également un profil définit pour générer des types cellulaires spécialisés; (E) Diagramme de (D) (d'après Plant Physiology 2nd Edition; Tail, and Zeiger).

la vie de la plante, la croissance de son méristème est génétiquement déterminée. En effet, la cellule apicale est programmée pour ne se diviser qu'entre 50 et 55 fois. L'origine de toutes les cellules différenciées peut être retrouvée très précisément (Fig I.3.b).

Arabidopsis thaliana et le riz appartiennent aux plantes possédant des méristèmes racinaires au fonctionnement indéterminé (à l'exception d'un type racinaire chez le riz. cf. chapitre II) et de structure fermée : la file de cellules constituant le cylindre central converge vers un pôle au niveau de l'apex. En d'autres termes les tissus de la stèle, du cortex et de l'endoderme sont discrets dans un méristème fermé alors que ces mêmes tissus sont continus dans un méristème ouvert (Fig.I.3.a). Les cellules localisées à l'extrémité apicale des files cellulaires sont à l'origine des différents types cellulaires, ce sont les cellules initiales. Chez *Arabidopsis thaliana*, on dénombre quatre types de cellules initiales. Chez les monocotylédones, et notamment chez le riz, leur nombre est fréquement considéré comme supérieur bien qu'aucune estimation ne soit disponible. Leur nombre peut atteindre 800 à 1200 chez le maïs (Jiang et al. 2003).

Le centre quiescent (QC) est la zone centrale où le taux de mitose est le plus faible, et correspond à un réservoir de cellules assurant à la fois la régénération du méristème, lorsque l'apex racinaire est abîmé, et sa persistance au cours du développement. En effet, des travaux ont montré que l'expression d'un marqueur du cycle cellulaire identifiant les cellules en mitose (le gène *CDC2*), est quasi-absente du centre quiescent (Umeda et al. 1999 ; Doerner, 1998). De plus, Doerner (1998) a montré que le QC est la zone assurant le renouvellement des cellules initiales. En effet, l'ablation laser des cellules du centre quiescent provoque l'arrêt des divisions et la différenciation des cellules initiales. Le centre quiescent maintiendrait ainsi les cellules proximales dans un état indifférencié (inhibition de la différenciation) et assurerait ainsi le fonctionnement du RAM indéfiniment.

Le signal de dédifférenciation pourrait être constitué d'une concentration locale et maximale en auxine au niveau du QC. Le marqueur DR5::GUS, qui représente un marqueur indirect de la concentration en auxine, a une coloration GUS maximale au niveau du QC (Holding et al. 2002 ; Doerner, 1998). L'auxine influence la localisation des cellules souches. Depuis l'embryogenèse, la réponse maximale de la région distale à l'auxine maintient cette localisation des cellules souches (Sabatini et al. 1999 ; Friml et al. 2003). Les mutants de réponse ou de transport d'auxine montrent des phénotypes racinaires mutants, et l'application exogène d'auxine induit la formation de cellules souches ectopiques (Sabatini et al. 1999 ; Friml et al. 2002). Le gène MONOPTEROS (MP) code un membre des facteurs de réponse à l'auxine (ARFs), pouvant se lier aux promoteurs des gènes inductibles par l'auxine et étant

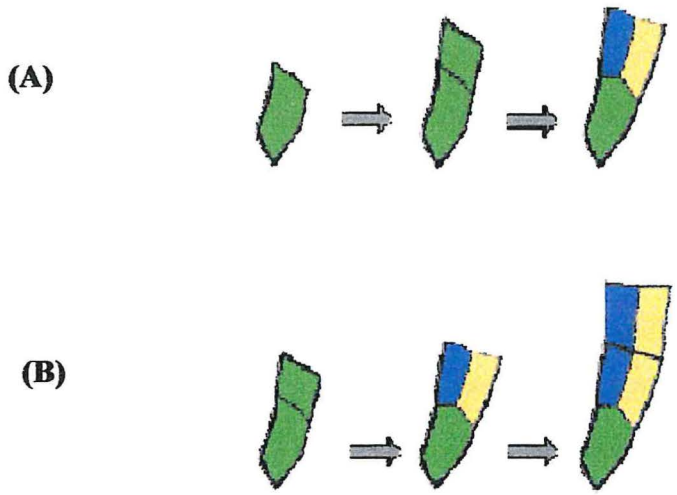


Figure I.4. : L'initiale du cortex est la cellule la plus basale des tissus embryonnaires chez *Arabidopsis thaliana* (A). C'est la cellule qui va se diviser en une cellule fille « supérieure » qui donnera en se divisant les premières cellules du cortex et de l'endoderme, alors que la cellule « inférieure » restera indifférenciée. (B) La cellules fille initiale va se diviser de façon asymétrique pour donner les cellules à l'origine du cortex et de l'endoderme.
(source : http://www.bio.uu.nl/mg/pd/)

donc indispensables à la formation de la racine embryonnaire (Berleth et Jürgens 1993; Hardtke et Berleth 1998 ; Ulmasov et al. 1999). Plusieurs autres gènes impliqués dans la signalisation d'auxine ont été également impliqués dans ce processus (Hamann et al. 1999; Hamann et al. 2002; Hobbie et al. 2000 ; Hellmann et al. 2003). Ainsi, l'auxine est indispensable aussi bien à l'organisation cellulaire de la racine embryonnaire qu'à la localisation des cellules souches et au développement des racines post-embryonnaires. Il reste cependant que, les facteurs de transcription qui agissent en aval de l'auxine dans la formation des profils cellulaires n'ont pas été identifiés.

L'information de position provient également des zones matures et maintient les cellules initiales dans un état de pré-différenciation. En effet, Scheres (1997, 2000) montre que l'ablation d'une cellule initiale corticale ou endodermique mène à la dédifférenciation de la cellule voisine.

Ces cellules initiales vont subir des divisions cellulaires. Il existe deux types de divisions cellulaires : la division proliférative permet d'augmenter le nombre de cellules présentant une même identité cellulaire, une cellule mère donne alors deux cellules sœurs identiques, tandis que la division formative d'une cellule mère donne deux cellules aux destinées cellulaires différentes. Ce dernier type de division peut être anticline (transversale) ou péricline (longitudinale). La division formative anticline donne une cellule fille indifférenciée, qui se divise ensuite de manière péricline et donne deux cellules d'identité cellulaire distinctes. La figure I.4 schématise la différenciation du cortex et de l'endoderme chez *Arabidopsis thaliana* illustrant ces différents types de divisions cellulaires.

Si l'anatomie cellulaire du méristème permet dans une certaine mesure de prédire et de comprendre son fonctionnement, il n'en reste pas moins qu'il est le terrain de processus physiologiques et moléculaires interactifs, jeux subtils impliquant balance hormonale et niveaux d'expression des gènes.

V- Génétique moléculaire du développement racinaire

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, l'observation de l'anatomie cellulaire peut nous aidez à comprendre la structure de l'organe, et par conséquent la structure de la plante. La spécialisation fonctionnelle se fait d'abord au niveau cellulaire pour se faire au niveau tissulaire. En effet, dès que les cellules sortent de la zone méristématique, elle s'allongent et se spécialisent en fonction de la position qu'elles occupent les unes par rapport

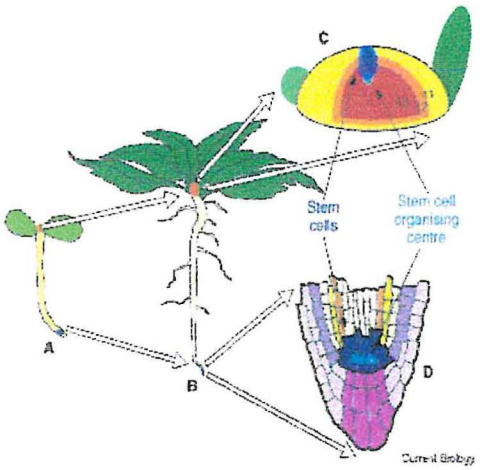


Figure I.5.a. : Structure et fonction des méristèmes au cours du développement d'*Arabidopsis*. (A) Activation du SAM à la germination, qui initie la croissance post embryonnaire et l'organogenèse. (B) Le SAM génère tous les tissus aériens, tandis que du RAM se développe la racine primaire. (C) Dans le SAM les cellules sont organisées en couches externes de la tunique et en couches internes de corpus. Chez beaucoup d'espèces, dont *Arabidopsis*, la tunique se compose de deux couches de cellules d'origine différente, appelées L1 et L2 où les divisions cellulaires sont exclusivement anticlinales tandis qu'en dessous de la tunique, dans le corpus ou couche L3, les divisions cellulaires ne sont pas strictement orientées. Un deuxième niveau d'organisation divise le SAM en zone centrale (CZ) contenant la population de cellules qui ne se divisent que très rarement, et en zone périphérique (PZ) où les cellules se divisent plus fréquemment et sont à l'origine du développement des organes latéraux. (D) Les cellules initiales se trouvent autour du centre quiescent, qui les maintient à l'état indifférencié. (Doerner, 2003)

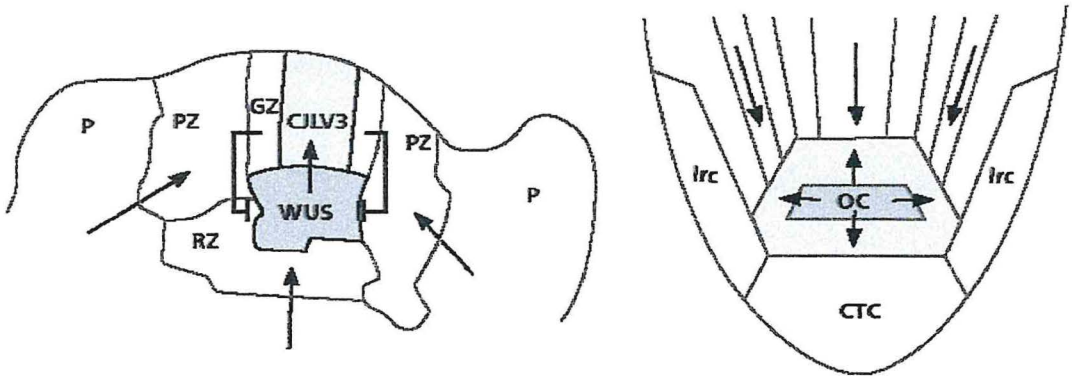


Figure I.5.b. : Dans le SAM, le centre d'organisation où WUS est exprimé, favorise la différentiation des cellules au-dessus de lui. Alternativement l'action de CLV3 via CLV1 dans les cellules souches, donne le signal d'arrêt de l'expression de WUS. De la même manière dans le RAM, il a été démontré que le centre quiescent favorisait l'activité des cellules initiales l'entourant (modifié de Lenhard et Laux, de 1999).

aux autres. Les tissus différenciés sont formés par ces assemblages de cellules spécialisées. Aussi dans ce paragraphe, nous tenterons de présenter de quelles manières les cellules s'engagent vers un type cellulaire particulier, acquièrent leur spécialisation, et forment un tissu dédié à une fonction. Quels sont donc les mécanismes impliqués dans la différenciation cellulaire ? Ces dix dernières années ont vu s'accroître de manière spectaculaire les connaissances des mécanismes moléculaires du développement des plantes. En effet la génétique moléculaire d'*Arabidopsis thaliana* a permis de faire des progrès considérables en moins d'une dizaine d'années.

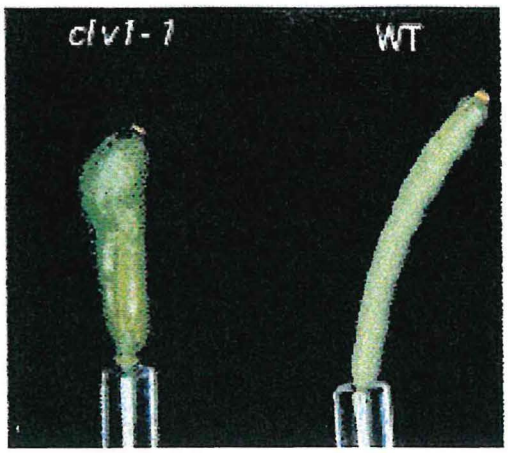
C'est le méristème apical caulinaire (SAM) qui a été le plus étudié pour la compréhension des mécanismes moléculaires de développement chez les plantes, alors qu'une communauté scientifique plus restreinte étudie la structure et le fonctionnement du méristème apical racinaire (RAM) (Fig. I.5). De ce fait, les mécanismes moléculaires de maintien du méristème, et de différenciation cellulaire sont mieux connus pour le SAM que pour le RAM. Mais parce qu'il existe des similitudes de fonctionnement entre ces deux types de méristèmes, la synthèse suivante, non exhaustive, tente de décrire les principaux mécanismes de maintien des cellules souches et de différenciation cellulaire à l'aide des résultats les plus significatifs pour les deux types de méristèmes.

Les bases moléculaires du maintien du méristème

Maintien du méristème apical (SAM) : Voie de signalisation CLAVATA/WUSCHEL

Les mutants d'*Arabidopsis thaliana* qui ne possèdent pas ou peu de cellules souches ou qui les accumulent de manière ectopique, ont permis de découvrir une voie de signalisation impliquée dans le maintien des cellules à l'état indifférencié dans le SAM. Les mutations de perte de fonction aux locus *CLAVATA* (*CLV1*, *CLV2* et *CLV3*) provoquent l'accumulation progressive de cellules souches indifférenciées lors du développement, l'augmentation de la taille moyenne du méristème, et l'augmentation du nombre d'organes floraux qui donnent à la silique un aspect bombé et une forme caractéristique de « club » d'où le nom *clavata* qui signifie « club » en latin (Clark et al, 1993; Clark et al, 1995; Kayes et Clark, 1998 et Fig. I.6). L'analyse génétique de ces mutants a montré que CLV1, CLV2 et CLV3 fonctionnent ensemble de façon à limiter la taille de la population de cellules souches dans le SAM et dans les méristèmes floraux, bien que certaines « CLV2-like proteins » soit également impliquées dans d'autres aspects du développement, notamment la résistance aux pathogènes. Les trois gènes *CLV* ont été clonés. *CLV1* code pour un recepteur « Leucine Rich-Repeat Receptor-

Figure I.6. : Silique d'*Arabidopsis*. Type sauvage (wt). Mutant *clv1* silique en forme de club. D'après Clark 2001



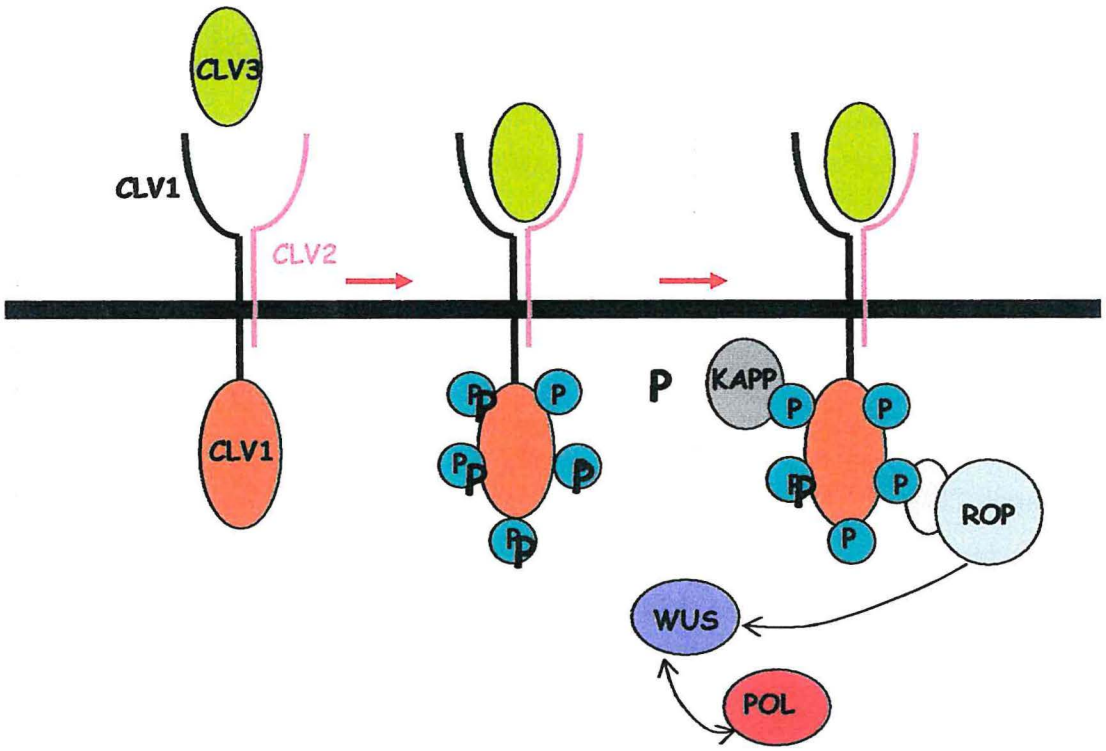


Figure I.7. : CLV3 se lie au domaine extracellulaire de l'hétérodimère formé par CLV1/CLV2. La liaison du ligand provoque l'autophosphorylation de CLV1, qui recrute alors des composants comme KAPP et ROP. La cascade signalétique mène à la répression de l'expression de WUS. POL agit comme régulateur négatif de la voie de signalisation, en aval de CLV1 (modifié de Clark 2001).

Like Kinase (LRR-RLK) (Clark et al, 1997). *CLV2* code pour une « LRR receptor-like protein » (LRR-RLP) avec une queue cytoplasmique courte, et pas de domaine kinase (Jeong et al, 1999). Enfin *CLV3* code pour une petite protéine sécrétée (Fletcher et al, 1999). *CLV3* est exprimé dans la population de cellules souches dans la zone centrale du méristème, c'est-à-dire principalement dans les couches L1 et L2, alors que CLV1 est trouvé la plupart du temps dans la couche L3 (Fig. I.5.a). *CLV2* est exprimé dans tout le méristème ainsi que dans d'autres tissus, conformément au domaine d'action plus large de ce gène. Via des approches génétiques, il a été suggéré que CLV3 fonctionne comme ligand de CLV1 qui forme avec CLV2 un complexe multimerique (Trotochaud et al, 1999; Rojo et al, 2002) (Fig. I.7).

Une autre composante clé du maintien du SAM est *WUSCHEL* (*WUS*), qui code un facteur de transcription putatif à homeodomaine (Mayer et al, 1998). WUS favorise l'activité des cellules souches au cours du développement : le SAM et les méristèmes floraux des mutants *wus* s'arrêtent de fonctionner prématurément après la formation de quelques primordia latéraux (Laux et al, 1996). Après l'embryogenèse, *WUS* est exprimé dans une zone cellulaire se trouvant sous le domaine d'expression de *CLV3* et chevauchant partiellement le domaine d'expression de *CLV1* dans les cellules L3, formant ce qui a été appelé le centre organisateur (OC). Les doubles mutants *clv wus* ont le même phénotype que les mutants simples *wus*, ce qui indique que WUS pourrait agir en aval de CLV (Schoof et al, 2000). De plus, dans les mutants *clv3* la zone d'expression de WUS s'étend vers le haut et latéralement, alors que pour les plantes surexprimant CLV3, la forme des méristèmes est la même que pour les mutants *wus*, et les ARNm de *WUS* ne sont pas détectés (Brand et al, 2000). Ceci suggère que la voie *CLAVATA* réprime *WUS in vivo*. L'expression du gène *WUS* sous le contrôle du promoteur *CLV1* recrée la zone d'expression de la protéine WUS observée dans les mutants *clv1*, et montre le même phénotype que *clv*, suggérant que l'accumulation de cellules souches dans les mutants *clv1* n'est qu'une conséquence de la surexpression de WUS. Ces résultats montrent l'existence d'une boucle de rétrocontrôle négatif, où CLV3 agit depuis les cellules souches pour réguler négativement l'expression de WUS, tandis que WUS depuis le centre organisateur active l'expression de CLV3 au centre du SAM. Dans ce système, c'est la balance entre WUS et CLV3 qui contrôle la taille de la population de cellules souches.

Des résultats récents mettent en évidence que la voie de signalisation *CLV* dans le maintien des méristèmes est conservée chez d'autres espèces. Le mutant de maïs *fasciated ear2* (*fea2*), possède des SAM et méristèmes floraux plus grands que les types sauvages, ainsi qu'une prolifération massive des inflorescences. La structure de la protéine FEA2 est très proche de « CLV2 LRR-RLP-like protein » d'*Arabidopsis thaliana*, et cette protéine est localisée au

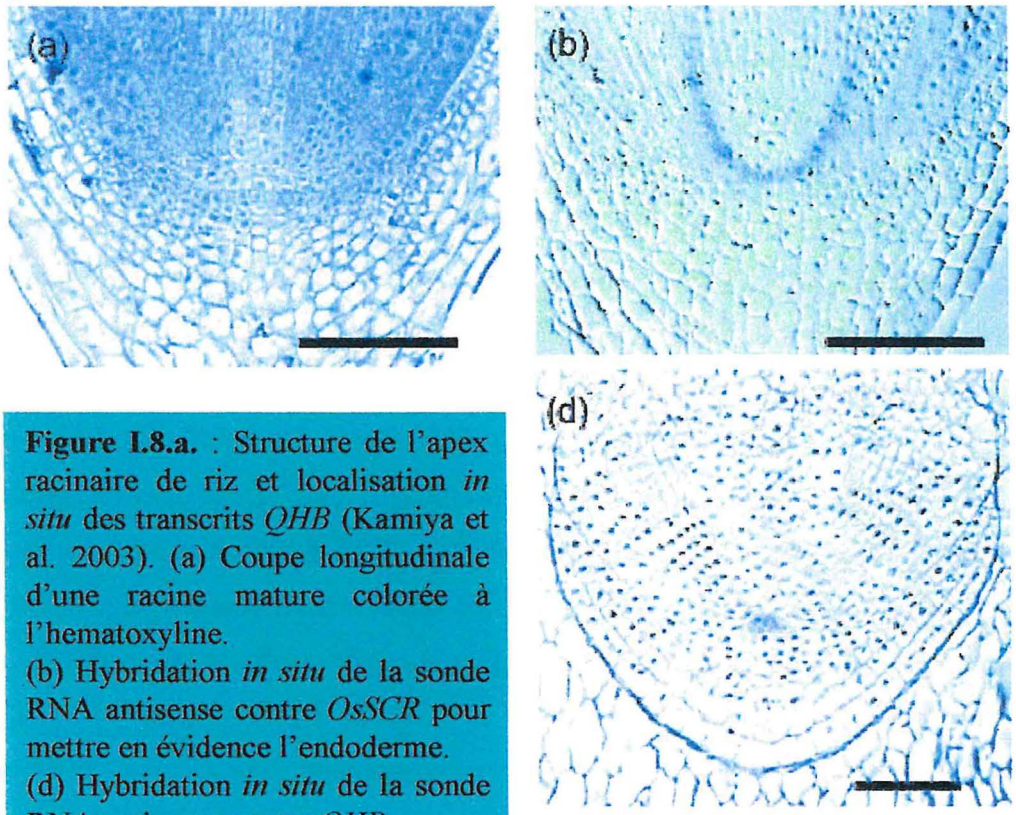


Figure I.8.a. : Structure de l'apex racinaire de riz et localisation *in situ* des transcrits *QHB* (Kamiya et al. 2003). (a) Coupe longitudinale d'une racine mature colorée à l'hematoxyline.
(b) Hybridation *in situ* de la sonde RNA antisense contre *OsSCR* pour mettre en évidence l'endoderme.
(d) Hybridation *in situ* de la sonde RNA antisense contre *QHB*.
Échelle = 100 µM.

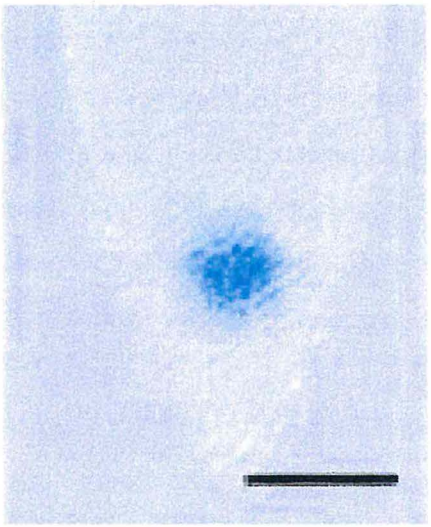


Figure I.8.b. : Coloration GUS de l'apex d'un transformant de riz porteur du promoteur de *QHB* (Kamiya et al., 2003)

niveau de la membrane cellulaire (Taguchi-Shiobara et al, 2001). De même chez le riz, le mutant *floral organ number (fon1)* est muté dans le gène *FON1* qui exprime un CLV1-like qui a récemment été cloné (Suzaki et al. 2004). Ceci suggère que les composantes de la voie de signalisation *CLV* sont également présentes chez les monocotylédones, et implique une probable conservation de cette voie de maintien des méristèmes chez les angiospermes (Sharma and Fletcher, 2002).

Une voie de signalisation apoplastique pour le maintien du RAM :
CLV1 code pour un récepteur « Leucine Rich-Repeat Receptor-Like Kinase (LRR-RLK). *CLV2* code pour une « LRR receptor-like protein » (LRR-RLP) avec une queue cytoplasmique courte. *CLV3* code pour une petite protéine sécrétée servant de ligand dans cette voie de signalisation CLAVATA/WUSHEL . Figure I.7.

Maintien du méristème racinaire (RAM)

De nombreux résultats suggèrent maintenant qu'il existe une voie de signalisation du type *CLAVATA* au niveau du RAM. En effet, il a été mis en évidence récemment des gènes intervenant plus spécifiquement dans le maintien du RAM. La famille des gènes *WOX* y est impliquée (WOX : WUSHEL related homeobox). STIMPY (également nommé WOX9) est susceptible d'agir dans le méristème en maintenant la division des cellules et en empêchant leur différenciation prématurée. Les mutants *stimpy* retrouvent le type sauvage lorsqu'il est ajouté du saccharose au milieu de culture. Aussi Wu et al. (2005) concluent que *STIMPY* identifie une nouvelle voie génétique intégrant des signaux développementaux dont certains participant à la commande du cycle cellulaire. L'expression de WOX5 quant à elle prouve que l'identité du centre quiescent est initiée très tôt dans la cellule de l'hypophyse, et renforce les similitudes moléculaires et développementales entre les cellules souches du SAM et du RAM (Haecker et al. 2004).

Kamiya et al. (2003) montrent également chez le riz qu'une protéine qu'ils nomment quiescent-center-specific homeobox (QHB) est analogue à WUS dans sa structure et est exprimée spécifiquement dans le QC du RAM du riz (Fig. I.8). Les mutants surexprimant la protéine ne produisent pas de racines coronaires mais développent de multiples SAM avec des feuilles malformées, ce qui suggère l'implication de *QHB* dans la spécification du RAM. On note cependant que la surexpression de QHB n'a pas été limitée spécifiquement aux cellules méristématiques du RAM et que les auteurs n'observent pas de phénotype particulier de perte de fonction lorsque *QHB* est muté. Ces résultats suggèrent néanmoins que le gène homeobox

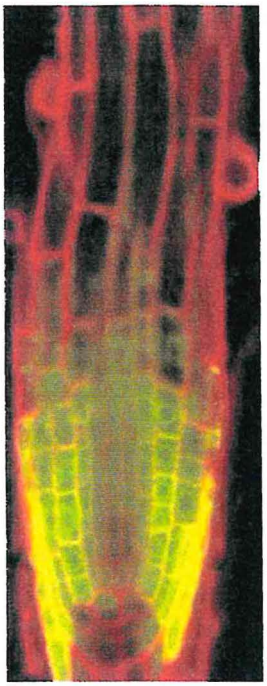


Figure I.9.a. : Apex racinaire d'*Arabidopsis*. L'expression pRCH1::CLE19 induit l'arrêt des divisions cellulaires, cependant le centre quiescent et les cellules initiales ne sont pas affectées (Casamitjana-Martínez et al. 2003).

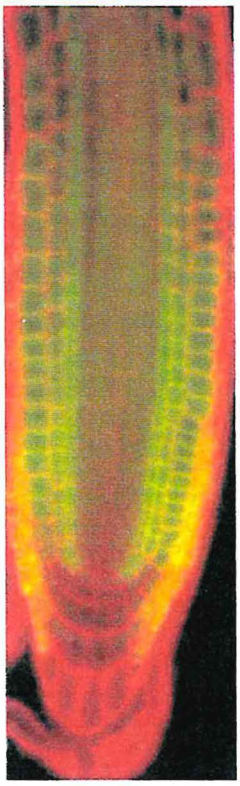


Figure I.9.b. : Marquage GFP du domaine d'expression de ROOT CLAVATA HOMOLOGUE1 RCH1 dans l'apex racinaire d'*Arabidopsis* (Casamitjana-Martínez et al. 2003).

QHB est impliqué dans les spécifications et le maintien des cellules souches (cellules du QC) dans le RAM du riz, par un mécanisme semblable à celui de WUS dans le SAM d'*Arabidopsis thaliana* (Fig. I.8). QHB est l'orthologue de WOX5, également spécifiquement exprimé dans le QC chez *Arabidopsis thaliana.*

Comme décrit ci-dessus, la surexpression de protéines CLV3-like limite la taille du SAM. Le RAM possède également un organisateur de cellules souche nommé *CLE19*, codant pour une protéine homologue de CLV3. La surexpression localisée dans la racine de CLE19 (sous contrôle d'un promoteur spécifique *RCH1*) limite la taille du RAM en induisant la différenciation ou en réprimant la division cellulaire dans le méristème, et ce sans affecter les spécifications de QC et le statut de cellules souches à l'état indifférencié (Fig. I.9). Ces observations renforcent l'hypothèse selon laquelle CLE19, et d'autres membres putatifs de la famille CLE activent localement les récepteurs endogènes d'une voie CLV-like impliquées dans le maintien du RAM (Casamitjana-Martínez et al. 2003). Les mêmes auteurs décrivent également deux autres gènes : *RCH1* et *RCH2* pour *ROOT CLAVATA1 HOMOLOGUE* 1 et 2, qui sont spécifiquement exprimés dans la racine d'*Arabidopsis thaliana,* de la partie proximale du méristème à la zone d'élongation. Cela suggère un rôle dans la communication de cellule à cellule dans cette zone. *RCH1* et *RCH2* codent pour des protéines LRR-LRK. Cependant, les observations des mutants *rch1*, *rch2* et *rch1rch2* n'indiquent aucun phénotype, suggérant un niveau élevé de redondance dans cette famille. Les auteurs n'excluent pas l'existence d'autres voies de signalisation activées par la surexpression de protéines CLE dans la racine.

D'ailleurs, il a été montré très récemment chez *Arabidopsis thaliana* que l'application *in vitro* de peptides possédant le motif conservé CLE, provoquait un phénotype au niveau du RAM sur le type sauvage *Ler*, et les mutants *clv1* et *clv3*. Alors que cette même application de peptides CLE chez le mutant *clv2* ne provoque aucun phénotype (Fiers et al. 2005). CLV2 serait alors impliqué dans la perception du signal des protéines à motif CLE dans la racine. Ceci suggère que CLV3, CLE19, et CLE40 pourraient inhiber la communication intercellulaire au niveau du RAM en interagissant avec le récepteur CVL2 (ou en le saturant), menant ainsi à la consommation du RAM.

Ces derniers résultats sous-tendent qu'il existe une voie de signalisation du type *CLAVATA/WUSCHEL* au niveau du RAM. Cependant, d'autres mécanismes moléculaires pourraient être impliqués dans le maintien du RAM.

En effet, Sabatini et al. (2003) montrent le rôle de *SCARECROW* (*SCR*) dans le maintien des cellules souches à l'état indifférencié. Le mutant *scr-1* ne possèderait pas de centre quiescent

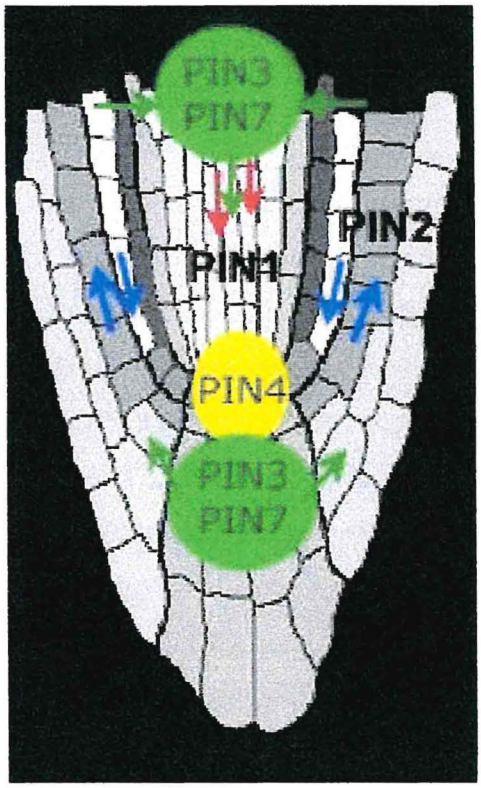


Figure I.10. : Schématisation des flux d'auxines dans l'apex racinaire *d'Arabidopsis* (http://www.bio.uu.nl). Les principaux gènes de la famille *PIN* sont représentés. Ils codent pour des protéines transmembranaires et facilitent l'efflux d'auxines en formant une boucle de régulation.

proprement dit et n'assurerait pas le maintien des cellules initiales de la columelle. De plus, 8 jours après germination, les auteurs observent une diminution significative de la taille du méristème ainsi qu'un arrêt de croissance, confirmant le rôle de SCR dans le maintien du méristème apical racinaire. *SCHIZORIZA* (*SCZ*) agirait de la même manière que *SCR* au niveau du maintien du RAM. Chez les mutants *scz*, les initiales subissent des divisions périclines supplémentaires, provoquant des couches cellulaires surnuméraires. Les plans de divisions sont altérés au niveau du RAM comparé au type sauvage. Mylona et al. (2002) montrent ainsi que SCZ est indispensable dans le processus de répression des divisions périclines dans le RAM, maintenant ainsi les initiales à l'état indifférencié.

Par ailleurs, les gènes *PLETHORA* (*PLT*) ont pour fonction de définir la position des cellules du centre quiescent (Aida et al, 2004). PLT est exprimé en particulier dans le RAM ; les mutants *plt* ont une croissance racinaire extrêmement réduite ainsi qu'un faible nombre de cellules méristématiques comparés au type sauvage, ce qui souligne l'importance de PLT dans le fonctionnement du RAM. En revanche le phénotype mutant possède de nombreuses racines latérales, ce qui met en évidence le fait que les gènes *PLT* ne sont pas indispensables à la mise en place des primordia latéraux, et suggère que les mécanismes de fonctionnement des méristèmes latéraux sont indépendants de ceux des méristèmes apicaux. PLT1 et PLT2 semblent indispensables pour l'élaboration du profil de division et le maintien des cellules souches dans le RAM.

Ces données montrent que les mécanismes de maintien du RAM sont complexes et que plusieurs voies de natures différentes y sont impliquées. Une voie de communication cellulaire symplastique (mouvements de cellule à cellule), et une probable voie de signalisation apoplastique (interactions cellule à cellule via un récepteur) sont impliquées dans ces mécanismes de maintien.

Deux voies de signalisation pour le maintien du RAM :

Une voie symplastique : SCR, SCZ ou encore PLT sont impliqués dans le maintien des cellules à l'état indifférencié ; assurant la présence d'un réservoir de cellules.

Une voie apoplastique : similaire à la voie de signalisation *CLAVATA/WUSHEL* identifiée dans le SAM.

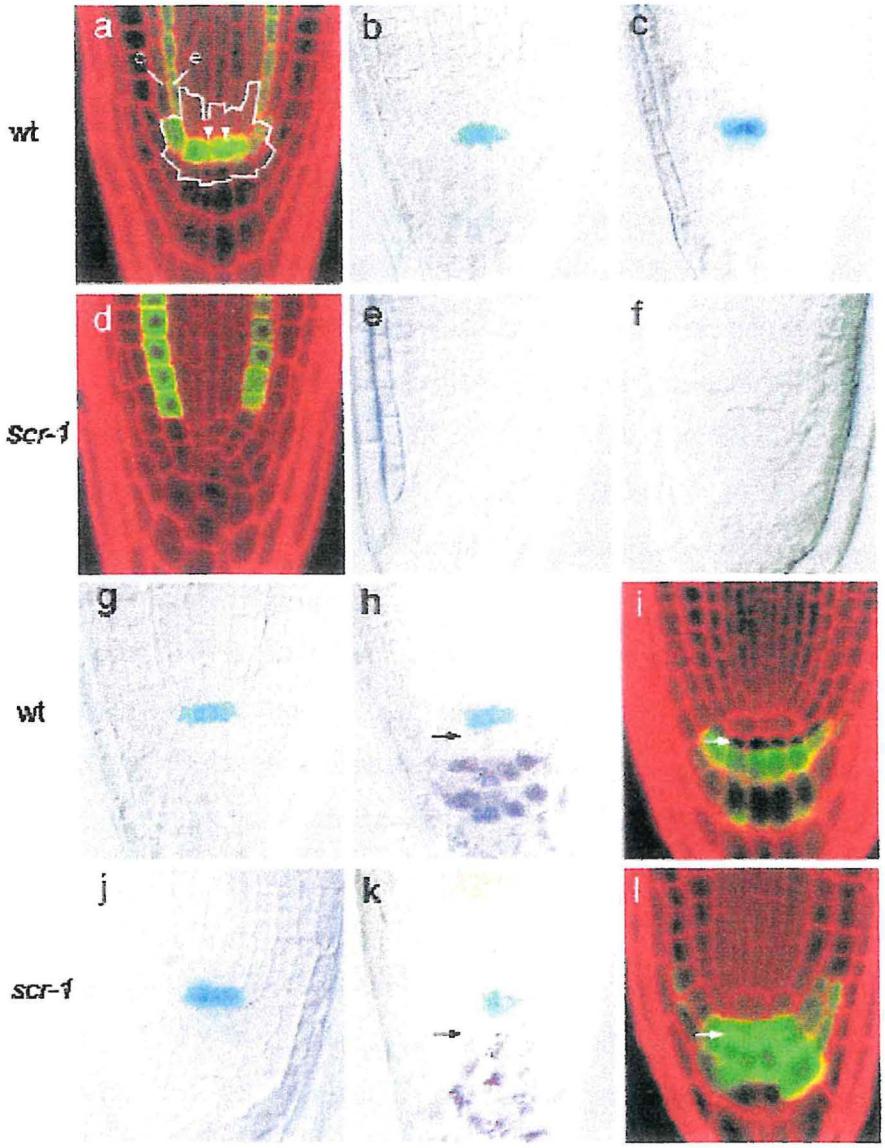


Figure I.11.a. : Anomalie au niveau de l'identité du centre quiescent et de l'activité des initiales de la columelle chez le mutant *scr-1*. (*a-c,g-i*) Type sauvage (wt). (*d-f,j-l*) *scr-1*. (*a*) expression SCR::GFP chez le sauvage (wt). La ligne blanche inclue les initiales autour du centre quiescent (flèches). c, cortex; e, endoderme. (*d*) expression SCR::GFP chez *scr-1*. (*b,e*) expression QC25. (*c,f*) expression QC46. L'absence du marqueur d'expression dans le centre quiescent chez *scr-1* (*d-f*) indique l'anomalie d'identité du centre quiescent. (*g,j*) expression QC184 chez *scr-1*. (*h,k*) Le double marquage du centre quiescent et des cellules différentiées de la columelle par QC184 et le marquage des amyloplastes, montrent l'anomalie des initiales de la columelle (flèches) chez *scr-1* (Sabatini et al. 2003).

Les bases moléculaires de la différenciation tissulaire

Formation du profil proximo-distal : rôle de l'auxine

De nombreuses études, utilisant *Arabidopsis thaliana* comme modèle d'étude, ont montré que les transporteurs d'auxines sont nécessaires à la formation du pôle racinaire, et au maintien de l'organisation de la racine.

L'auxine principale est l'acide indole-3-acetique (IAA) qui est synthétisé au niveau des régions méristématiques dans le SAM puis transporté vers les apex racinaires. Un défaut au niveau du mouvement directionnel de l'auxine ou un traitement auxinique entraîne des sévères anomalies de développement (Firml, et al. 2003). Cette activité de transport est associée à la famille AUX1/LAX (amino-acid permease-like proteins) chez *Arabidopsis thaliana* (Parry et al. 2001 ; Swarup and Bennett 2003 ; Swarup et al. 2004). Les mutants *aux1* montrent un gravitropisme réduit et une baisse du transport d'IAA dans les racines et les jeunes feuilles (Bennett et al. 1996 ; Marchant et al. 1999).

Les protéines PIN ont également un rôle essentiel dans le flux d'auxine. Ce sont des protéines membranaires indispensables au transport polarisé des auxines. Chez *Arabidopsis thaliana*, chaque membre de la famille PIN montre un profil d'expression tissu spécifique unique, et les mutations *pin* entraînent des phénotypes correspondant à une perte du transport polarisé d'auxine (Blilou et al. 2005 ; Benkova et al. 2003 ; Galweiler et al. 1998 ; Chen et al. 1998 ; Muller et al. 1998).

PIN1 est localisé dans le xylème, et est essentiel au transport basipète de l'IAA dans les organes aériens et au transport acropète dans les tissus racinaires (Blilou et al. 2005 ; Galweiler et al. 1998 ; Friml et al. 2002). Les mutants *pin1* voient leur transport basipète d'auxines réduit dans les inflorescences et absent dans les tissus vasculaires (Okada et al. 1991 ; Bennett et al. 1995).

PIN2/AGRAVITROPIC1 (AGR1)/ETHYLENE INSENSITIVE ROOT1 (EIR1) est localisé au niveau apical des cellules corticales racinaires et au niveau basal des cellules épidermiques racinaires, ainsi PIN2 est impliqué dans la redistribution d'auxine. La famille PIN est aussi impliquée dans le gravitropisme racinaire (Firml et al. 2004 ; Shin et al. 2005 ; Ottenschlager et al. 2003). Les mutants *pin2/agr1* affichent des phénotypes de croissance agravitropique ainsi qu'un transport basipète racinaire de l'auxine réduit (Ottenschlager et al. 2003 ; Chen et al. 1998 ; Muller et al. 1998 ; Shin et al. 2005).

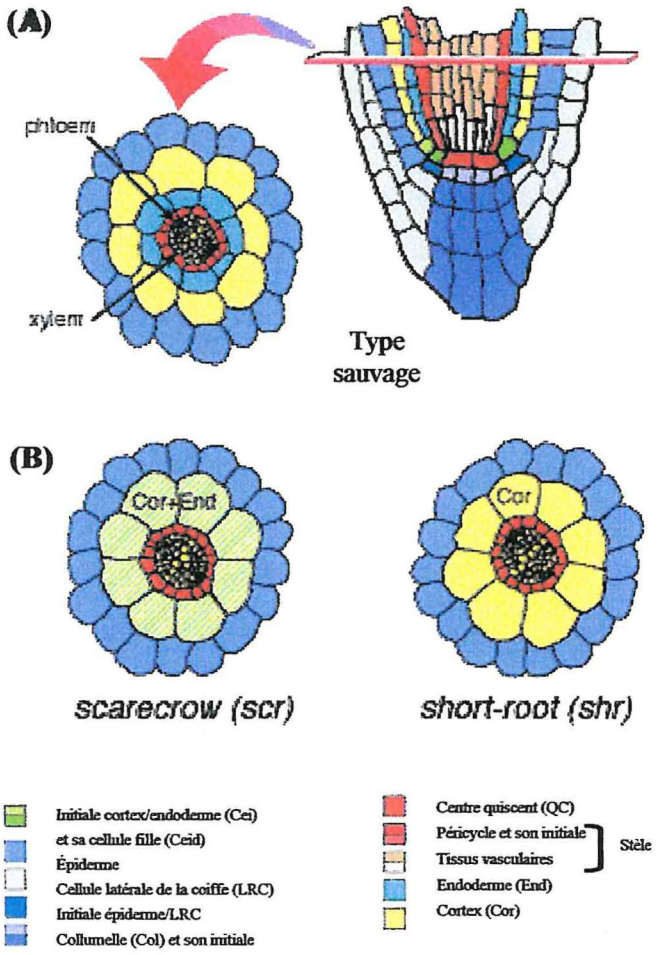


Figure I.11.b. : Schémas des types sauvages et des mutants *scarecrow* et *short-root*. (A) Schématisation d'une coupe transversale et longitudinale de racine sauvage d'*Arabidopsis* (Dolan et. al 1993). (B) Anomalies dans le profil radial des mutants *scr* et *shr* (Adapté de Nakajima et al. 2001).

PIN3 a un rôle dans la redistribution latérale de l'auxine ; il possède donc une fonction dans le gravitropisme et les phototropismes, et est localisé dans les cellules épidermiques de la partie aérienne, la columelle et le péricycle (Firml et al. 2002). Les mutants *pin3* ont une croissance et des réponses tropiques réduites.

La fonction de PIN4 se trouve au niveau de l'établissement du puits d'auxine sous le centre quiescent du RAM (Firml et al. 2002).

PIN7 joue un rôle dans la formation et le maintien du gradient d'auxine apical-basal indispensable à l'établissement d'une polarité embryonnaire et au transport acropète d'auxine dans la racine (Firml et al. 2003 ; Blilou et al. 2005). L'analyse des mutants simples et combinés *pin1, pin2, pin3, pin4,* et *pin7* suggère que les membres de la famille PIN fonctionnent en synergie pour diriger le flux et le reflux d'auxine dans les tissus racinaires (Fig. I.10).

Formation du profil radial : Création des différents types cellulaires le long d'un axe apical-basal

La caractérisation de mutants possédant une couche cellulaire indifférenciée à la place de l'endoderme et du cortex chez les types sauvages d'*Arabidopsis thaliana* (Di Laurenzio et al. 1996) et du riz (Kamiya et al. 2003), a permis l'identification de deux gènes impliqués dans l'organisation interne des tissus racinaires : *SHORTROOT* (*SHR*), et *SCARECROW* (*SCR*) (Wysocka-Diller et al. 2000) (Fig. I.11). Le gène *SCR* code un facteur putatif de transcription de la famille GRAS (Di Laurenzio et al. 1996) qui est exprimé pendant l'embryogenèse au niveau des cellules qui deviendront le QC, après quoi son expression se prolonge dans les cellules initiales pour la formation et la différenciation du cortex et de l'endoderme (Wysocka-Diller et al 2000); Ce profil d'expression persiste dans la racine primaire. Chez les mutants *scr-1*, la division asymétrique d'une des deux cellules filles de l'initiale du cortex/endoderme ne se produit pas, formant une couche cellulaire indifférenciée. SCR s'exprime dans les cellules initiales, corticales, et endodermiques, et est nécessaire à la formation de l'endoderme (Pysh et al. 1999). De plus, chez *scr-1* les cellules de la région du QC ont une forme anormale et les racines cessent leur croissance précocement (Scheres et al. 1995; Di Laurenzio et al. 1996). Sabatini et al. (2003) montrent que ces effets ne sont pas provoqués par l'anomalie de différenciation cortex/endoderme mais reflètent plus le rôle indispensable de SCR dans les cellules du QC pour la spécialisation et le maintien des cellules initiales. Quant à SHR, un autre membre de la famille GRAS, il interviendrait d'une part dans la spécialisation de l'endoderme et d'autre part dans l'activation transcriptionnelle de *SCR*

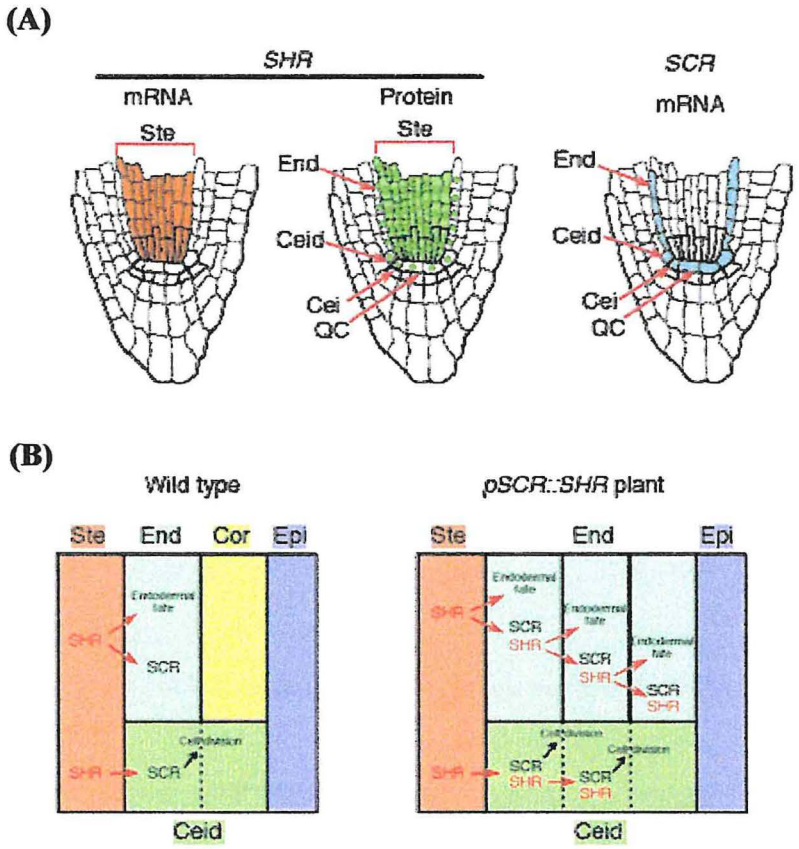


Figure I.11.c. : Étapes de mise en place des tissus du cortex chez *Arabidopsis*. (A) Localisation de l'ARNm de *SHR* (gauche), protéine SHR (milieu), et ARNm de *SCR* (droite) dans le RAM (Di Laurenzio et al., 1996; Helariutta et al., 2000; Wysocka-Diller et al., 2000; Nakajima et al., 2001). (B) Mécanismes de signalisation intercellulaire pour la formation du profil radial de la racine sauvage (gauche) et de la racine transgénique pSCR::SHR (droite) (Nakajima et al., 2001). Chez les racines sauvages (gauche), la protéine SHR est produite dans la stèle et se déplace dans la couche unicellulaire adjacente probablement via les plasmodesmes (flèches rouges). Dans cette couche adjacente, SHR active la transcription de SCR qui est indispensable pour la division asymétrique de l'initiale cortex/endoderme (Ceid), induisant alors la séparation du cortex et de l'endoderme. Dans la région mature, SHR est localisée dans la couche cellulaire adjacente induisant la différentiation de l'endoderme. Chez les plantes pSCR::SHR (droite), SHR est interprété par la cellule comme un signal de production supplémentaire de la protéine SHR. Ceci entraînant la production de couches cellulaires surnuméraires indifférenciées.

responsable de la division des cellules initiales. SCR est exprimé dans ces cellules avant la division (Fig. I.11). L'expression ectopique de SHR sous contrôle d'un promoteur de *SCR* créée des couches surnuméraires de cellules corticales entre le tissu vasculaire et les cellules du péricycle. L'ARN *SHR* n'est trouvé qu'au niveau du péricycle et des tissus vasculaires internes.

Formation du profil externe : présence ou absence de poils racinaires

La caractérisation de mutants possédant des cellules épidermiques indifférenciées a permis de définir des gènes responsables de la différenciation, et de l'identité cellulaire au niveau de l'épiderme : trichoblastes et atrichoblastes. Cette identité est régulée par une cascade de régulateurs de transcription. Plusieurs gènes ont été identifiés : *WEREWOLF* (*WER*) codant pour une protéine MYB et nécessaire pour le développement des atrichoblastes ; *GLABRA2* (*GL2*) (Ito et al. 2002) régulée par *WER* et intervenant dans le développement des atrichoblastes (régulateur négatif de la formation de poils racinaires), *TRANSPARENT TESTA GLABRA* (*TTG*) (Larkin et al. 1994 ; Leon-Kloosterziel et al. 1994; Lin et al. 2001; Dolan et al. 1998; Masucci et al. 1996) comme les deux précédents code pour un régulateur négatif du développement des trichoblastes, cependant il semble fonctionner de manière indépendante. Enfin, *CAPRICE* (*CPC*) (Costa et al. 2003 ; Schiefelbein 2003; Wada et al., 2002 ; Lee et al. 2002 ; Lin et al, 2001 ; Dolan et al. 2001 ; Wada et al. 1997) code un régulateur positif de la formation des poils racinaires, et il est probable que le rapport WER : CPC conditionne l'identité cellulaire de l'épiderme : Un rapport élevé induit la transcription de *GL2* et contribue à l'absence de poils racinaire, alors qu'un rapport faible, contribue à la formation de trichoblastes (Fig. I.12). Jusque là, les mécanismes de signalisation cellulaire impliqués dans la mise en place du profil épidermique (trichoblastes et atrichoblastes) étaient plutôt de nature symplastique (communication via des mouvements de cellule à cellule). Très récemment, Kwak et al. (2005) ont mis en évidence une voie de signalisation apoplastique (interaction cellule à cellule via un récepteur) impliquée dans ces mêmes mécanismes. En effet, les auteurs montrent que le gène *SCRAMBLED* (*SCM*) permet aux cellules épidermiques de détecter leur position pour acquérir le type cellulaire approprié. Le mutant *scm* ne possède pas de phénotype visible mais le profil épidermique est désorganisé au niveau cellulaire (Fig. I.13). Le gène *SCM* code pour une protéine LRR-LRK, un récepteur intramembranaire présent à la surface de toutes les cellules épidermiques et captant les signaux de position des cellules adjacentes.

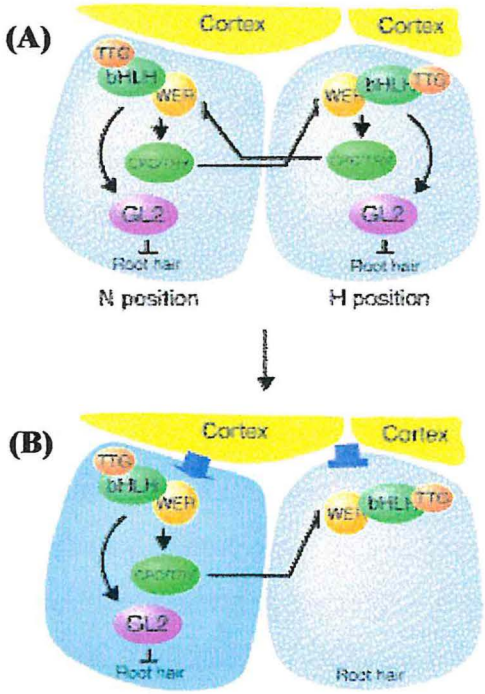


Figure I.12. : Modèle de la mise en place du profil épidermique des racines d'*Arabidopsis* (Adapté de Schiefelbein 2003). (A) Cellules possédant le même potentiel de développement, (B) Cellules ayant déjà adopté un type cellulaire particulier. Dans la racine, les signaux de position renseignent la cellule sur les mécanismes à mettre en route pour l'adoption du type cellulaire. Une cellule épidermique en position H (chevauchant deux cellules corticales) adopte invariablement le type cellulaire trichoblast, tandis que les cellules épidermiques en position N (contre une seule cellule corticale) adopte le type cellulaire atrichoblast.

Les bases moléculaires de la plasticité : formation des racines latérales et adventives

La plasticité est la capacité d'une plante à développer ses organes de manière à accéder aux ressources indispensables à sa croissance. La plasticité est dépendante du potentiel génétique et des variables environnementales ; Il a d'ailleurs été mis en évidence durant ces dix dernières années le rôle important joué par de nombreux gènes constitutifs et inductibles.

La plasticité du système racinaire est assurée principalement par les racines latérales et adventives, qui représentent la plus grand part du système racinaire des céréales. Comparées au niveau de connaissances de la compréhension des mécanismes de développement de la partie aérienne, les connaissances des mécanismes moléculaires du développement des racines latérales et adventives chez les monocotylédones sont plus limitées. Hochholdinger et al. (2004) ont montrés qu'il existe un contrôle génétique indépendant chez les monocotylédones des mécanismes de formation des racines séminales et adventives.

Récemment, un gène constitutif majeur contrôlant la formation des racines adventives chez le riz a été identifié. *CROWNROOTLESS1* (*CRL1*) code pour un membre de la famille de protéines ASYMMETRIC LEAVES2/LATERAL ORGAN BOUNDARIES, et est exprimé au niveau des primordia des racines latérales et adventives, des primordia de talles, des tissus vasculaires et du scutellum (Liu et al. 2005; Inukai et al. 2005). Il existe deux allèles de ce gène : *CRL1* et *ADVENTITIOUS ROOTLESS1* (*ARL1*). Le mutant *crown rootless1* (*crl1*) ne développe pas de racines coronaires, et présente un phénotype mutant auxine dépendant au niveau du système racinaire. La mutation CRL1 provoque une diminution du nombre de racines latérales, due à une insensibilité à l'auxine dans la formation des racines latérales, un gravitropisme racinaire altéré. Les auteurs concluent que *CRL1* code pour un régulateur positif pour la formation des racines latérales et coronaires et que son expression est directement régulée par un AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) (Inukai, et al. 2005). L'expression d'ARL1 est dépendante de la présence d'auxine et d'éthylène, d'où un profil cellulaire qui se superpose à celui de l'auxine (Liu et al. 2005). CRL1/ARL1 serait un acteur dans la réponse à l'auxine impliqué dans la voie de signalisation de dédifférenciation cellulaire, et induirait les divisions des cellules du péricycle situées face à un pôle de xylème.

Le domaine LOB est également impliqué dans la formation constitutive des racines latérales chez *Arabidopsis thaliana*. En effet, Laplaze et al. (2005) montrent chez *Arabidopsis thaliana* que le promoteur du gène *LBD16* pour LOB-domain protein 16 est exprimé dans un nombre

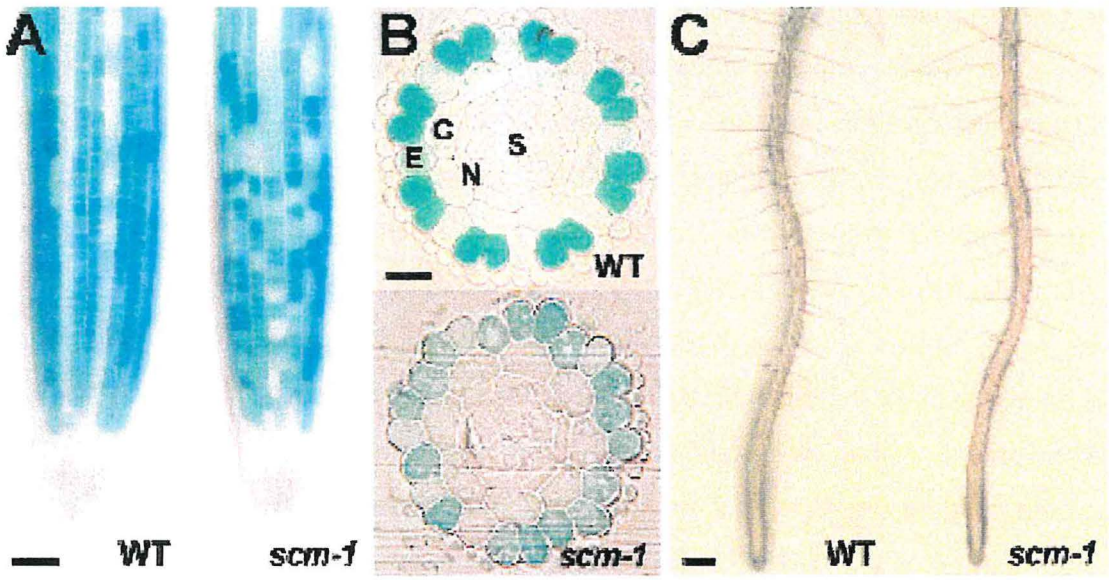


Figure I.13. : Identification du mutant *scrambled* (*scm*) Kwak et al. 2005. (A) Expression du gène rapporteur GL2::GUS au cours du développement racinaire. La mutation *scm-1* désorganise le profil normal d'expression de GL2 dans les files cellulaires. Les poils racinaires ne sont pas visibles dans la zone de développement habituelle; Échelle : 50 µm. (B) Expression du gène rapporteur GL2::GUS en coupe transversale. Les coupes ont été faites dans les zones méristématiques racinaires du sauvage (WT) et du mutant *scm-1* portant le transgène GL2::GUS. E, épiderme; C, cortex; N, endoderme; S, stèle. Échelle : 25 µm. (C) Racines de plantules sauvage et de mutant *scm-1*. Échelle : 200 µm.

limité de cellules du péricycle face aux pôles de xylème. Ils montrent également que l'introduction du gène de la toxine diphtérique sous contrôle de l'enhancer trap et du promoteur *LBD16* stoppe totalement le développement des racines latérales suggérant que seules quelques cellules données sont capables d'initier le développement des primordia latéraux. Cette étude montre de façon élégante le potentiel d'utilisation des lignées enhancer trap Gal4-UAS-GFP qui peuvent être utilisées pour identifier des gènes d'intérêt et/ou des éléments de régulation sur la base d'observations *in vivo* de profils d'expression GFP.

Les principales variables environnementales étudiées pour la plasticité du système racinaire sont les éléments minéraux (plus particulièrement l'azote et le phosphate) et l'eau. Nous ne ferons pas ici la liste exhaustive des nombreux gènes responsables de la plasticité et inductibles par l'environnement (Voir Misson et al., 2005 pour une liste exaustive). Ces gènes peuvent être impliqués dans divers processus tels que la signalisation, le transport, l'acquisition et/ou le stockage de ces éléments minéraux et de l'eau.

ANR1 semble être essentiel à la réponse architecturale du système racinaire à la concentration en nitrates (Zhang and Forde, 1998 ; Zhang and Forde, 2000). En effet, les mutants *anr1* ne répondent plus à une concentration élevée en nitrates par une prolifération de racines latérales observées chez le type sauvage. Quant à NRT2.1, il interagit avec la présence d'azote au niveau de l'initiation des racines latérales chez *A. thaliana*. Le nombre de racines latérales augmente chez le mutant *lin1* (porteur d'une mutation dans NRT2.1). Little, et al. (2005) concluent que NRT2.1 est un répresseur de l'initiation des racines latérales et qu'il agit soit en détectant la présence de nitrates, soit comme un transporteur du signal responsable de la coordination du développement du système racinaire face à l'environnement. Remans et al. (2006) confirment le rôle stimulateur de NRT2.1 dans le développement des racines latérales en réponse à la concentration de nitrate dans le milieu de culture.

L'étude de la réponse du système racinaire au Fer et au phosphate, éléments non mobiles dans le sol, a également permis de mettre en évidence des gènes impliqués dans l'architecture racinaire, notamment dans la densité de poils racinaires participant directement à l'augmentation de la surface d'acquisition (Gilroy and Jones, 2000 ; Schmidt et al., 2000 ; Ma et al., 2001). Les mutants *pdr2* présentent un phénotype racines courtes, caractéristique d'un déficit en phosphate (Ticconi, et al. 2004). Ce phénotype serait causé par l'inhibition sélective de divisions cellulaires dans le méristème apical racinaire provoquant la mort des cellules. PDR2 est impliqué dans le développement du système racinaire au niveau du point de contrôle de sensibilité au phosphate. Sa fonction est indispensable au maintien de l'activité

méristématique, et permet l'ajustement de l'architecture racinaire afin de maximiser l'acquisition du phosphate.

La compréhension des bases moléculaires de la plasticité du système racinaire des plantes est partielle et n'a démarré que récemment. La structure de la racine elle-même est très strictement contrôlée, mais le nombre, le placement, et la direction de croissance de chaque type racinaire dans le système est très variable, et ce même parmi les plantes génétiquement identiques. Cette plasticité phénotypique racinaire fournit une large gamme de possibilités à la plante, lui permettant d'optimiser sa croissance en fonction des signaux et informations provenant de son environnement, comprenant le sol mais également, les parties aériennes (voir Malamy, 2005 pour revue).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aida, M., D. Beis, et al. 2004. The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell* **119**(1): 109-20.

Aiken R.M., and Smucker A.J.M., 1996. Root system regulation of whole plant growth. *Annu. Rev. Phytopathol.* Vol. 34 : 325-346.

Andeme-Onzighi, C., M. Sivaguru, et al. 2002. The reb1-1 mutation of Arabidopsis alters the morphology of trichoblasts, the expression of arabinogalactan-proteins and the organization of cortical microtubules. *Planta* **215**(6): 949-58.

Berleth, T. and Jürgens, G., 1993. The role of the *monopteros* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* **118**, pp. 575–587.

Benfey, P. N., P. J. Linstead, et al. 1993. Root development in Arabidopsis: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* **119**(1): 57-70.

Benkova, E., M. Michniewicz, et al. 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**(5): 591-602.

Bennett, M. J., A. Marchant, et al. 1996. Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**(5277): 948-50.

Berger, F., C. Y. Hung, et al. 1998. Control of cell division in the root epidermis of Arabidopsis thaliana. *Dev Biol* **194**(2): 235-45.

Blilou, I., J. Xu, et al. 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* **433**(7021): 39-44.

Brand, U., J. C. Fletcher, et al. 2000. Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* **289**(5479): 617-9.

Caton, BP., A.E. Cope, and M. Mortimer, 2003. Growth traits of diverse rice cultivars under severe competition: implications for screening for comtetitiveness. *Field Crop Research* 83:157-172.

Casamitjana-Martinez, E., H. F. Hofhuis, et al. 2003. Root-specific CLE19 overexpression and the sol1/2 suppressors implicate a CLV-like pathway in the control of Arabidopsis root meristem maintenance. *Curr Biol* **13**(16): 1435-41.

Chen, R., P. Hilson, et al. 1998. The arabidopsis thaliana AGRAVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25): 15112-7.

Clark, S. E., M. P. Running, et al. 1993. CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis. *Development* **119**(2): 397-418.

Clark, S. E., S. E. Jacobsen, et al. 1996. The CLAVATA and SHOOT MERISTEMLESS loci competitively regulate meristem activity in Arabidopsis. *Development* **122**(5): 1567-75.

Clark, S. E., R. W. Williams, et al. 1997. The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Cell* **89**(4): 575-85.

Cnops G., Wang X., et al., 2000. TORNADO1 and TORNADO2 are required for the specification of radial and circumferential pattern in the *Arabidopsis* root. *Dev.* Vol. 127 : 3385-3394.

Costa, S. and L. Dolan 2000. Development of the root pole and cell patterning in Arabidopsis roots. *Curr Opin Genet Dev* **10**(4): 405-9.

Costa, S. and L. Dolan 2003. Epidermal patterning genes are active during embryogenesis in Arabidopsis. *Development* **130**(13): 2893-901.

Dingkuhn, M. 1996. Modelling concepts for the phenotypic plasticity of dry matter and nitrogen partitioning in rice. *Agricultural Systems* 52:383-397.

Di laurenzio L., Wysocka-Diller et al., 1996. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* **86** : 423-433.

Doerner, P. 1998. Root development: quiescent center not so mute after all. *Curr Biol* **8**(2): R42-4.

Doerner, P. 2003. Plant meristems: a merry-go-round of signals. *Curr Biol* **13**(9): R368-74.

Dolan, L. and S. Costa 2001. Evolution and genetics of root hair stripes in the root epidermis. *J Exp Bot* **52**(Spec Issue): 413-7.

Dolan, L., P. Linstead, et al. 1998. Cell fate in plants. Lessons from the Arabidopsis root. *Symp Soc Exp Biol* **51**: 11-7.

Esau K., 1977. Plant Anatomy. 2nd Ed. New Yoek; John Wiley and Sons.

Feldmann L., 1984. Regulation of root development. *Ann. Rev. Pant. Physiol.* Vol 35: 223-242.

Feldmann L., 1994. The maize root. In : Freeling M., Walbot V., eds. The Maize Handbook; Springer-Verlag : 29-37.

Fiers, M., E. Golemiec, et al. 2005. The 14-Amino Acid CLV3, CLE19, and CLE40 Peptides Trigger Consumption of the Root Meristem in Arabidopsis through a CLAVATA2-Dependent Pathway. *Plant Cell* **17**(9): 2542-53.

Friml, J., E. Benkova, et al. 2002. AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis. *Cell* **108**(5): 661-73.

Friml, J. and K. Palme 2002. Polar auxin transport--old questions and new concepts? *Plant Mol Biol* **49**(3-4): 273-84.

Friml, J., J. Wisniewska, et al. 2002. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* **415**(6873): 806-9.

Friml, J., A. Vieten, et al. 2003. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* **426**(6963): 147-53.

Friml, J., X. Yang, et al. 2004. A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* **306**(5697): 862-5.

Fletcher, J. C., U. Brand, et al. 1999. Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. *Science* **283**(5409): 1911-4.

Galway M.E., Masucci J.D., et al., 1994. The TTG gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root. *Dev. Biol.* Vol. 166 : 740-754.

Galweiler, L., C. Guan, et al. 1998. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science* **282**(5397): 2226-30.

Gilroy S., and Jones D.L., 2000. Through form to function : root hair development and nutrient uptake. *TIPS* **5** : 56-60.

Haecker, A., Gross-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M. and Laux, T. (2004). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in Arabidopsis thaliana. *Development* **131**, 657-68.

Hamann, T., Mayer, U. and Jürgens, G., 1999. The auxin-insensitive *bodenlos* mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the *Arabidopsis* embryo. *Development* **126**, pp. 1387–1395.

Hamann, T., E. Benkova, et al. 2002. The Arabidopsis BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev* **16**(13): 1610-5.

Hanada K., 1993. 2. Morphology and development of vegetative organs. 4. Tillers. In : Matsuo T., Hashikawa K., (Eds). Science of the rice plant. Vol. I. Morphology. Tokyo : Food and Agricultural Policy Research Center. 222-258.

Hardtke, C., Ckurshumova, W., et al., 2004. Overlapping and non-redundant functions of the *Arabidopsis* auxin response factors *MONOPTEROS* and *NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4*. *Development* **131**, pp. 1089–1100.

Helariutta Y., Fukaki H., Wysocka-Diller J.W., Nakajima K., Jung J., Sena G., Hauser M.T., and Benfey P.N., 2000. The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signalling. *Cell* Vol. 101 : 555-567.

Hellmann, H., Hobbie, L., et al., 2003. *Arabidopsis AXR6* encodes CUL1 implicating SCF E3 ligases in auxin regulation of embryogenesis. *EMBO J.* **22**, pp. 3314–3325.

Hetz W., Hochholdinger F., Schwall M., and Feix G., 1996. Isolation and characterisation of *rtcs*, a mutant deficient in the formation of nodal roots. *Plant J.* Vol. 10 : 845-857.

Hobbie, L., McGovern, M., Hurwitz, L.R., Pierro, A., Liu, N.Y., Bandyopadhyay, A. and Estelle, M., 2000. The *axr6* mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene involved in auxin response and early development. *Development* **127**, pp. 23–32.

Hochholdinger F., and Feix G.,1998. Early postembryonic root formation is specifically affected in the maize mutant *lrt1*. *Plant J.* Vol. 16 : 247-255.

Hochholdinger F., Park W.J., and Feix G., 2001. Cooperative action of SLR1 and SLR2 is required for lateral root-specific cell elongation in maize. *Plant Physiol.* Vol. 125 : 1529-1539.

Hochholdinger, F., Woll, K., Sauer, M. and Dembinsky, D., 2004. Genetic dissection of root formation in maize (*Zea mays*) reveals root-type specific developmental programmes. *Ann Bot (Lond)* **93**, 359-68.

Holding, D. R. and P. S. Springer 2002. The vascular prepattern enhancer trap marks early vascular development in arabidopsis. *Genesis* **33**(4): 155-9.

Inukai, Y., T. Sakamoto, et al. 2005. Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *Plant Cell 17*(5): 1387-96.

Ito, M., Y. Sato, et al. 2002. Involvement of homeobox genes in early body plan of monocot. *Int Rev Cytol* **218**: 1-35.

Itoh H. Shimada A., et al. 2005. Overexpression of GRAS protein lacking the DELLA domain confers altered gibberellin responses in rice. *Plant J.* **44**, 669-79.

Jeong, S., A. E. Trotochaud, et al. 1999. The Arabidopsis CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *Plant Cell* **11**(10): 1925-34.

Jiang, K., Y. L. Meng, et al. 2003. Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment. *Development* **130**(7): 1429-38.

Jones M.A., Shen J.J., Fu Y., Li H., Yang Z., and Grieson C.S., 2002. The Arabidopsis *Rop2* GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *Plant Cell* Vol. 14(4) : 763-776.

Kamiya, N., J. Itoh, et al. 2003. The SCARECROW gene's role in asymmetric cell divisions in rice plants. *Plant J* **36**(1): 45-54.

Kamiya, N., H. Nagasaki, et al. 2003. Isolation and characterization of a rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *Plant J* **35**(4): 429-41.

Kawata S., Katano M., and Yamakazi K., 1980. The growing directions and the geotropic responses of rice crown roots. *Japan.. Crops Sci.*, Vol 49 : 301-310.

Kayes, J. M. and S. E. Clark 1998. CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in Arabidopsis. *Development* **125**(19): 3843-51.

King J.J., Stimart D.P., Fisher R.H., and Bleecker A.B., 1995. A mutation altering auxin homeostasis and plant morphology in *Arabidopsis*. *Plant Cell* Vol. 7(12) : 2023-2037.

Kwak, S. H., R. Shen, et al. 2005. Positional signaling mediated by a receptor-like kinase in Arabidopsis. *Science* **307**(5712): 1111-3.

Kenrick, P. 2002. The Origin of Roots. *in Plant Roots : The hidden half.* (3ème Ed. Waisel. Y., Eshel. A., Kafkafi., U.).

Laplaze, L., B. Parizot, et al. 2005. Gal4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* **56**(419): 2433-42.

Larkin, J. C., D. G. Oppenheimer, et al. 1994. Roles of the GLABROUS1 and TRANSPARENT TESTA GLABRA Genes in Arabidopsis Trichome Development. *Plant Cell* **6**(8): 1065-1076.

Laskowski M.J., Williams M.E., Nusbaum H.C., and Sussex I.M., 1995. Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Dev.* Vol. 121 : 3303-3310.

Laux, T., K. F. Mayer, et al. 1996. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development* **122**(1): 87-96.

Lee M.M., and Schiefelbein J., 1999. WEREWOLF, a MYB-related protein in Arabidopsis, is a positional-dependant regulator of epidermal cell patterning. *Cell* Vol. 99 : 473-483.

Lee, M. M. and J. Schiefelbein 2002. Cell pattern in the Arabidopsis root epidermis determined by lateral inhibition with feedback. *Plant Cell* **14**(3): 611-8.

Lenhard, M. and T. Laux, 1999. Shoot meristem formation and maintenance. *Curr Opin Plant Biol* **2**(1): 44-50.

Leon-Kloosterziel, K. M., C. J. Keijzer, et al. 1994. A Seed Shape Mutant of Arabidopsis That Is Affected in Integument Development. *Plant Cell* **6**(3): 385-392.

Lin, Y. and J. Schiefelbein 2001. Embryonic control of epidermal cell patterning in the root and hypocotyl of Arabidopsis. *Development* **128**(19): 3697-705.

Little D.Y, Rao H., Oliva S. et al, 2005. The putative high affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 12 (38):1393-8.

Liu, H., S. Wang, et al. 2005. ARL1, a LOB-domain protein required for adventitious root formation in rice. *Plant J* **43**(1): 47-56.

Luquet, D., B. Zhang, et al., 2005. Phenotypic plasticity of rice seedlings: case of phosphorus deficiency. *Plant Production Science* 8:145-151

Lynch J., 1995. Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol.* Vol. 109 : 7-13.

Ma Z., Bielenberg D.G., et al. 2001. Regulation of root hair density by phophorus avaibility in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Envir.* 24: 458-467.

Malamy J.E., and Benfey P.N., 1997. Organisation and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* Vol. 124 : 33-44.

Malamy, J. E. 2005. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ* **28**(1): 67-77.

Marchant, A., J. Kargul, et al. 1999. AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *Embo J* **18**(8): 2066-73.

Masucci J.D. and Schiefelbein J.W., 1996. The *rhd6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin- and ethylene-associated process. *Plant Physiol.* Vol. 106: 1335-1345.

Mayer, K. F., H. Schoof, et al. 1998. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* **95**(6): 805-15.

McCully M.E., 1999. Roots in soil : unearthing the complexities of roots and their rhizospheres. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol. 50 : 695-718.

Mendoza, L. and E. R. Alvarez-Buylla 2000. Genetic regulation of root hair development in Arabidopsis thaliana: a network model. *J Theor Biol* **204**(3): 311-26.

Misson J., Raghothama K.G., et al. 2005. A genome-wide transcriptional analysis using Arabidopsis thaliana Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(33): 11934-9.

Muller, A., C. Guan, et al. 1998. AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *Embo J* **17**(23): 6903-11.

Mylona, P., P. Linstead, et al. 2002. SCHIZORIZA controls an asymmetric cell division and restricts epidermal identity in the Arabidopsis root. *Development* **129**(18): 4327-34.

Okada, K., J. Ueda, et al. 1991. Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of Arabidopsis Floral Bud Formation. *Plant Cell* **3**(7): 677-684.

Ottenschlager, I., P. Wolff, et al. 2003. Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2987-91.

Parry, G., A. Delbarre, et al. 2001. Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation aux1. *Plant J* **25**(4): 399-406.

Peterson R.L., 1991. Adapatation to root structure in relation to biotic and abiotic factors. *Can. J. Bot.* Vol. 70 : 661-675.

Poorter, H., and O. Nagel. 2000. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO2, nutrients and water: a quantitative review. Australian *Journal of Plant Physiology* 27:595-607.

Potapov, N. G. and V. N. Filippenko 1976. Formation of root hairs by the wheat Triticum Vulgare Host. Trichoblasts. *Acta Biol* **27**(2-3): 81-91.

Price, A.H., J. Townend, et al. 2002a. Mapping QTLs associated with drought avoidance in upland rice grown in Philippines and West Africa. *Plant Molecular Biology* 48:683-695.

Price, A.H., K.A. Steele, et al. 2002b. Upland rice grown in soil-filled chambers and exposed to contrasting water-deficit regimes. I. Root distribution, water use and plant water status. *Field Crops Research* 76:11-24.

Pysh L.D., Wysocka-Diller J.W., Camilleri C., Bouchez D., and Benfey P.N., 1999. The GRAS gene family in *Arabidopsis* : sequence characterisation and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J.* Vol. 18 (1) : 111-119.

Reich, P.B. 2001. Root-shoot relations: optimality in acclimation and adaptation or the "emperor's new clothes" ?, p. 205-220, *In* E. Y. a. K. U. Weisel Y, ed. Plant roots, the hidden half. Marcel Dekker, New York.

Remans T., Nacry P, Pervent M, et al, 2006. A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to N limitation in Arabisopsis thaliana. *Plant Physiol.* Epub ahead of print.

Ren, Z. H., J. P. Gao, et al. 2005. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat Genet* **37**(10): 1141-1146.

Rojo, E., V. K. Sharma, et al. 2002. CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the Arabidopsis CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell* **14**(5): 969-77.

Sabatini, S., Beis, et al. 1999. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* **99**, pp. 463–472.

Sabatini, S., R. Heidstra, et al. 2003. SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes Dev* **17**(3): 354-8.

Scheres. B., Di Laurenzio L., et al. 1995. Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* **125** : 2283-2289.

Scheres, B. 1997. Cell signaling in root development. *Curr Opin Genet Dev* **7**(4): 501-6.

Scheres, B. 2000. Non-linear signaling for pattern formation? *Curr Opin Plant Biol* **3**(5): 412-7.

Schiefelbein J.W. and Benfey P.N., 1991. The development of plant roots : new approaches to underground problems. *Plant Cell.* Vol. 3 : 1147-1154.

Schiefelbein, J. 2003. Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot. *Curr Opin Plant Biol* **6**(1): 74-8.

Schmidt W. Tittel J., and Schikora A. 2000. Roles of hormones in the induction of Fe deficiency reponses in Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* 122: 1109-1118.

Schoof, H., M. Lenhard, et al. 2000. The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems in maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* **100**(6): 635-44.

Sharma, V. K. and J. C. Fletcher 2002. Maintenance of shoot and floral meristem cell proliferation and fate. *Plant Physiol* **129**(1): 31-9.

Shin, H., H. S. Shin, et al., 2005. Complex regulation of Arabidopsis AGR1/PIN2-mediated root gravitropic response and basipetal auxin transport by cantharidin-sensitive protein phosphatases. *Plant J* **42**(2): 188-200.

Suzaki, T., M. Sato, et al. 2004. The gene FLORAL ORGAN NUMBER1 regulates floral meristem size in rice and encodes a leucine-rich repeat receptor kinase orthologous to Arabidopsis CLAVATA1. *Development* **131**(22): 5649-57.

Suzuki, T., T. Shiraiwa, and T. Horie. 2002. Competitiveness of four rice cultivars against Barnyardgrass, Echinochloa oryzicola Vasing, with reference to root and shoot competition. *Plant Production Science* 5:77-82

Swarup, R. and M. Bennett 2003. Auxin transport: the fountain of life in plants? *Dev Cell* **5**(6): 824-6.

Taguchi-Shiobara, F., Z. Yuan, et al. 2001. The fasciated ear2 gene encodes a leucine-rich repeat receptor-like protein that regulates shoot meristem proliferation in maize. *Genes Dev* **15**(20): 2755-66.

Taiz L., and E. Zeiger, 1998. Plant Physiology. 2nd Edition.

Ticconi C.A., Delatorre C.A., et al. 2004. Arabidopsis pdr2 reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root developement. *Plant J.* 37(6):801-14.

Trotochaud, A. E., T. Hao, et al. 1999. The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. *Plant Cell* **11**(3): 393-406.

Ulmasov, T., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J., 1999. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, pp. 5844–5849.

Umeda, M., C. Umeda-Hara, et al. 1999. Differential expression of genes for cyclin-dependent protein kinases in rice plants. *Plant Physiol* **119**(1): 31-40.

Van den Berg, C., V. Willemsen, et al. 1995. Cell fate in the Arabidopsis root meristem determined by directional signalling. *Nature* **378**(6552): 62-5.

Van den Berg, C., V. Willemsen, et al. 1997. Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* **390**(6657): 287-9.

Wada, T., T. Kurata, et al. 2002. Role of a positive regulator of root hair development, CAPRICE, in Arabidopsis root epidermal cell differentiation. *Development* **129**(23): 5409-19.

Wada, T., T. Tachibana, et al. 1997. Epidermal cell differentiation in Arabidopsis determined by a Myb homolog, CPC. *Science* **277**(5329): 1113-6.

Wen T-J., and Schnable P.S., 1994. Analyses of mutants of three genes that influence root hair development in *Zea mays* (Gramineae) suggest that root hairs are indispensable. *Am. J. Bot.* Vol. 81 : 833-843.

Wright, S.D., and K.D.M. McConnaughay. 2002. Interpreting phenotypic plasticity : the importance of ontogeny. *Plant Species Biology* 17:119-131

Wu, X., T. Dabi, et al. 2005. Requirement of homeobox gene STIMPY/WOX9 for Arabidopsis meristem growth and maintenance. *Curr Biol* **15**(5): 436-40.

Wysocka-Diller, J. W., Y. Helariutta, et al. 2000. Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* **127**(3): 595-603.

Xu, M., L. Zhu, et al. 2005. A PIN1 Family Gene, OsPIN1, Involved in Auxin-Dependent Adventitious Root Emergence and Tillering in Rice. *Plant Cell Physiol.*

Yamashita T., 1991. Ist die primaerwurzel bei samenpflanzen exogen oder endogen ? *Beitr. Bio. Pflanzen.* Vol. 66 : 371-391.

Zhang and Forde, 1998. An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Sciences* 279 (5349):407-9.

Zhang and Forde, 2000. Regulation of Arabidopsis root development by nitrate avaibility. *J. Exp. Bot.* 51(342) :51-9.

CHAPITRE II

BIOLOGIE CELLULAIRE DU DEVELOPPEMENT RACINAIRE DU RIZ: ORGANISATION DU MERISTEME ET DIFFERENCIATION TISSULAIRE

Il y a une dizaine d'années maintenant que le développement racinaire des plantes est étudié de manière approfondie, via des stratégies de génétique directe et inverse, et via l'étude de mutants du développement (Dolan et al. 1993 ; Benfey et al. 1994 ; Scheres et al. 1994 ; Jiang and Feldman 2003 pour revue). Les caractéristiques d'*Arabidopsis thaliana*, son petit génome, son court cycle de développement, et sa facilité de manipulation, en ont fait la plante modèle des dicotylédones. L'émergence du riz comme plante modèle et son importance de premier plan pour assurer la sécurité alimentaire des pays en dévelopment permet d'envisager le transfert de ces connaissances acquises chez Arabidopsis vers le riz. Le riz est également un pont naturel vers d'autres céréales, telles que le maïs et le blé, qui à l'instar du riz sont des plantes à haute valeur alimentaire et économique.

Depuis la mise à disposition de la séquence complète du génome du riz à la communauté internationale, de nombreuses études de biologie du développement ont été initiées. Cependant, s'il existe des données sur le développement de cette monocotylédone modèle, elles sont parfois partielles et quelques fois contradictoires d'une étude à l'autre.

L'objectif de ce travail, était d'initier une analyse du développement racinaire du riz à l'échelle cellulaire et moléculaire et plus particulièrement concernant les aspects de fonctionnement/maintien du méristème et de différenciation cellulaire. L'approche retenue pour explorer ces mécanismes de développement consistait à cribler une collection de lignées d'insertion enhancer trap Gal4-UAS-GFP et à rechercher des mutants affectés dans le développement racinaire. Néanmoins, il n'existe que peu de travaux concernant la biologie cellulaire du développement racinaire chez le riz. Les quelques études disponibles sont fragmentaires et aucun travail approfondi concernant le fonctionnement des méristèmes racinaires qui puisse nous servir de référence n'a été publié jusqu'à ce jour. En conséquence, le chapitre suivant, synthètise les données que nous avons obtenues afin de mettre en place un référentiel de développement, morphologique et anatomique, chez la variété de riz *Oryza sativa* cv. Nipponbare. Ce référentiel met en évidence des différences de structures et de fonctionnement importantes entre les deux plantes modèles et donc entre les monocotylédones et les dicotylédones. Au delà de sa fonction d'article de référence, ce travail à permis de souligner les points communs et les différences entre le développement racinaire d'*Arabidopsis thaliana* et le riz et à permis de dégager des questions et des hypothèses pour les futures études comparatives du développement racinaires chez les plantes (approche evolution-développement ou evo-devo).

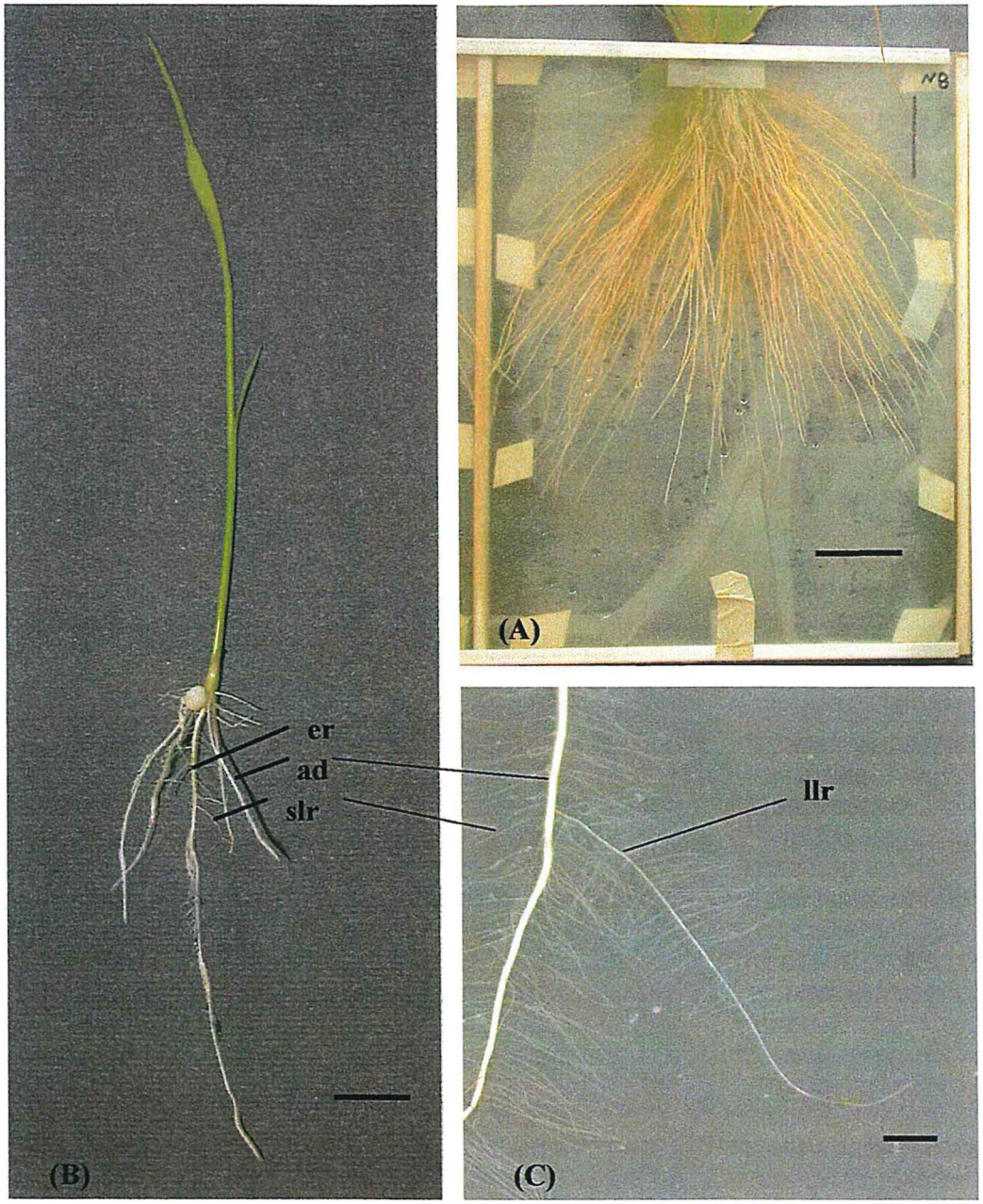


Figure II.1 : Root architecture (A) Rice root morphology 40 days after germination at the adult stage. (B) Rice root morphology at the seedling stage 1 week after germination. (C) Detail of an adventitious root. Er, embryonic root; ad, adventitious root; llr, large lateral root; slr, small lateral root; scale bars (A) 5 cm, (B, C) 1 cm

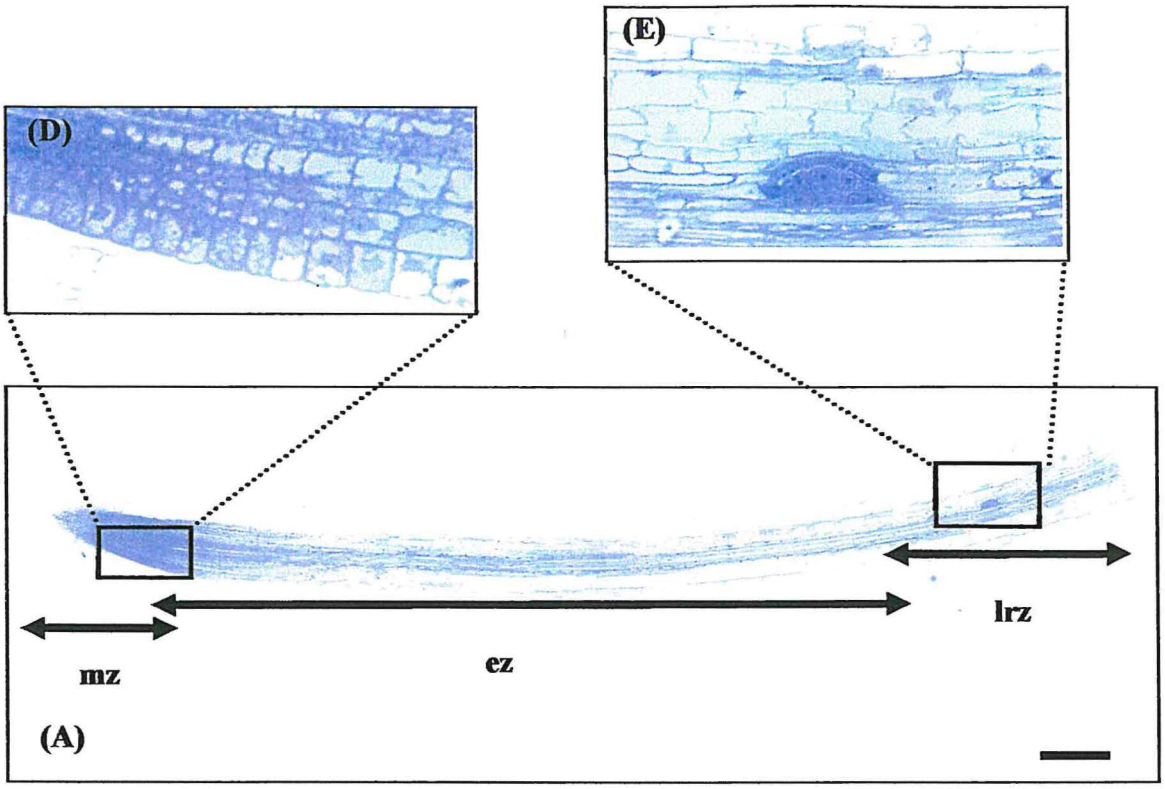
CELLULAR BIOLOGY OF RICE ROOT DEVELOPMENT

J. Rebouillat[1], JL. Verdeil[2], J. Escoute[2], G. Giese[3], A. Dievart[1], E. Guiderdoni[1] and C. Périn[1]

[1] CIRAD, UMR PIA 1096, TA 40/03 Avenue Agropolis 34398 Montpellier Cedex 5, France
[2] CIRAD, UMR BEPC, Avenue Agropolis 34398 Montpellier Cedex 5, France
[3] Max-Planck-Institut fur Medizinische Forschung, Heidelberg, Germany

ABSTRACT

Rice root morphology, anatomy and meristem structure is described using classical and advanced histological techniques. Root architecture in rice is complex with two types of primary roots, embryonic root and adventitious roots. Two different types of branching roots can be found on primary roots and one type, the large lateral root, can also bear higher order of ramification. Radial anatomy is typical of a semiaquatic plant with specialized tissues, arenchyma and sclerenchyma layers, and allowing root growth in flooding conditions. The ground tissue system is made of four tissues: exodermis, sclerenchyma layer, cortex and endodermis. Central cylinder organisation is typical of a monocotyledon with a polyarch structure of several xylem vessels that alternate with phloem. Each protophloem vessel sieve is associated with two companion cells and the metaphloem vessel forming a characteristic symmetrical pattern see in many cereals. Longitudinal organization of the roots reveals a closed meristem type, where the root cap, stele and ground tissues are discrete and converge to the putative quiescent center. Root cap is made of columella and lateral root cap cells arising from two independent groups of cell initials. The epidermis and all the ground tissues, from the epidermis to the endodermis come from a unique concentric cell layer of initials. After the first periclinal division that generate epidermis and endodermis, endodermis will undergo several rounds of asymmetric periclinal divisions to generate all the ground tissues layers. Differences in cortical cell layers between all root types can be easily explained by a difference in number of asymetric periclinal cell division of endodermis initial. Lateral root initiation starts nearby a metaxylem pole and arise from the pericycle and the endodermis. Small lateral root cap derives from endodermis cells while small lateral ground and stele root tissues derive from the pericyle. We re-examine root morphology and anatomy for the four root types classically found in rice. Their root meristem structures were carefully examined using classical or advanced histology technology. A model for rice root meristem development is proposed with a description and ontogenesis of all root tissues.



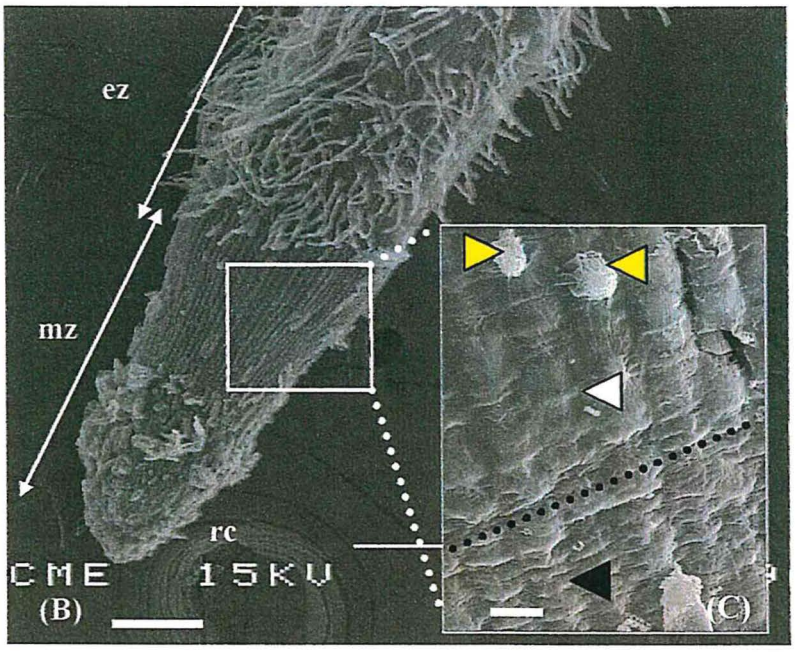


Figure II.2 : Root morphology. (A) Panoramic reconstruction of an embryonic root 2mm longitudinal section stained with Naphtol blue black. The root apex can be subdivided in a meristematic zone (mz), an elongation zone (ez) and a zone of lateral root emergence (lrz) (B) Scanning electronic microscopy view of an embryonic root tip. The root cap covers the proximal root meristematic zone followed by the distal meristematic zone where cell divisions are still active. Root hairs emergence start soon after cell elongation. (C) An enlargement of the elongation zone starting zone. The dotted line materializes epidermal cell elongation starting point. Black filled arrow show a wrinkled cell wall before elongation and white arrow an epidermal cell starting to elongate. Yellow arrows show two root hairs starting to emerge from trichoblasts cells. (D) A detail of the beginning elongation zone. (E) The first lateral root primordia with three layers clearly visible. rc, root cap; Scale bars (A) 125 µm, (B) 100 µm, (C) 10 µm. All roots came from one week old seedlings.

INTRODUCTION

Formation, maintenance and development of new organs or cell types during the whole plant life depend mainly on the activity of specialized plant sectors, the root and shoot meristems. An understanding of the working meristems is crucial to a complete and integrative comprehension of plant development. Root meristem structure is made of few tissues with predictable cell divisions. A small number of stem cells produce all the cell types that subsequently undergo differentiation. In the dicotyledonous model plant *Arabidopsis thaliana* (Benfey and Schiefelbein, 1994; Dolan et al., 1993; Malamy and Benfey, 1997), a deep characterisation of root meristem was undergone during the last 10 years (for a review see Benfey and Scheres, 2000). These studies provide a simple and elegant model to study molecular genetics of root development (Dolan et al., 1993) in other species, mostly for dicotyledons.

Rice has recently emerged as the model monocotyledonous system for analysing the more complex but colinear genomes of cereals and grasses with the completion of its publicly released genome sequence by the International Rice Genome Sequencing Project (IRGSP, 2005). Rice has become a model plant for cereal genomics (Paterson et al., 2004; Paterson et al., 2003) particularly because of its compact genome (430 Mb), the smallest among graminaceous crops, and the availability of vast genetic and molecular resources like for four independent sequences of its full genome (Barry, 2001; Goff et al., 2002; IRGSP, 2005; Yu et al., 2002), extensive mutant insertional librairies (Hirochika et al., 2004; Miyao et al., 2003; Sallaud et al., 2004) and a collection of cell specific GFP enhancer trap lines (Johnson et al., 2005).

Rice root system performs many essential adaptive functions including water and nutrient uptake and root architecture profoundly affects the plant capacity to take up nutrients and water. Rice plant has a fibrous root system with specific cellular adaptation to growth in flooding conditions. Specific root architecture is a key for its adaptation to broad environnemental conditions from irrigated to upland agricultural conditions. So, it is not a surprise that extensive works have been done to study the variability of root characteristics in *O. sativa* and to identify QTLs controlling morphology and distribution of root systems (Kamoshita et al., 2002; Li et al., 2005; Shimizu et al., 2004; Zheng et al., 2003; Zheng et al., 2000). These studies are a critical starting point for any rice breeding program but on the other hand there is only few papers dealing with rice root development at the cellular level. Some studies have been initiated to elucidate genetics control of root systems in maize and rice

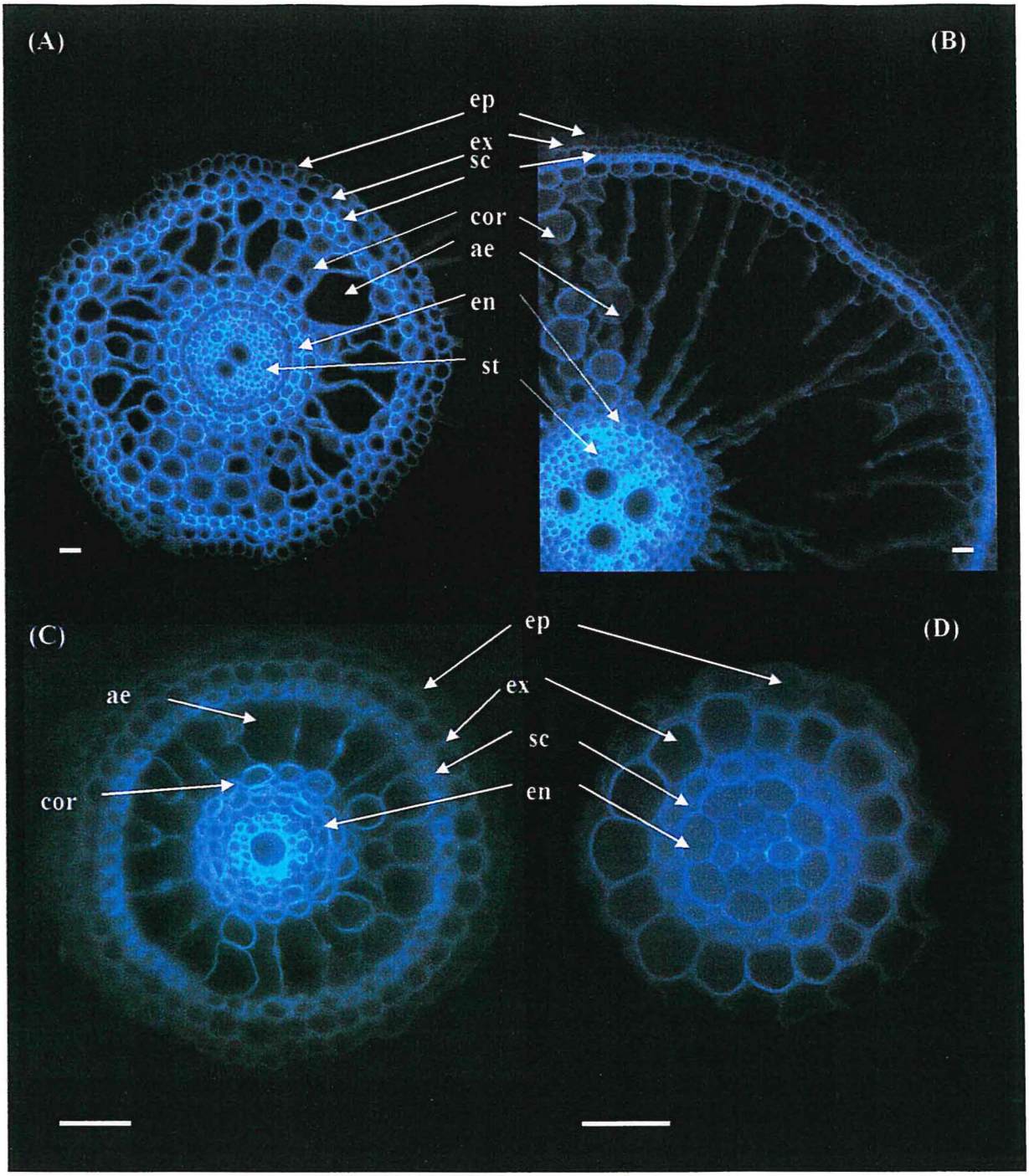


Figure II.3: Comparative radial anatomy of an embryonic, an adventitious, a large lateral and a small lateral root. (A) Embryonic root transverse section ~1.5 cm from the root tip. (B) Adventitious root transverse section ~6 cm from the root tip. (C) Large lateral root transverse section ~2 cm from the root tip. (D) Small lateral root transverse section of small lateral root. Pictures are not at the same scale. Scale bars, 50µm. All observations were made under UV illumination. Adventitious and large lateral roots came from 40 days old plants while embryonic and small lateral roots came from on week old seedlings.

(Hochholdinger et al., 2004a; Hochholdinger et al., 2004b; Inukai et al., 2005; Kamiya et al., 2003a; Kwon et al., 2005; Liu et al., 2005) and rice root meristem structure is partially described by some authors but with contradictory conclusions. Worse, most of the work concerning rice root meristem is hardly accessible for any non Japanese reader. Nevertheless, (Itoh et al., 2005) described recently rice crown root staging and development based on previous published work. Contrary to the author's claims, no conclusions about rice root meristems structures and initials cells divisions could be derived from the pictures/data coming with their descriptions. A clear and deep characterization of rice root meristem structure and its behaviour is nevertheless a prerequisite for molecular genetics of rice root development. We re-examine root morphology and anatomy for the four root types classically found in rice. Their root meristem structures were carefully examined using classical or advanced histology technology. A model for rice root meristem development is proposed with a description and ontogenesis of all root tissues.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and growth conditions

Rice plants (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) were used for the analyses. The plants were grown in the greenhouse or in the phytotron at 30°C (day :12h) and 24°C (night : 12h).

Fixation of samples

Sampled roots were fixed for 1 hour under vacuum and thereafter for 8 hours at 4°C in fixation buffer (4% paraformaldehyde, 0.1 M phosphate buffer pH7). Samples were then dehydrated through a graded ethanol series (30%, 70% and 100% v/v) over a period of 2 hours, at which point they were stored at 4°C were necessary.

Scanning electron microscopy

For scanning electron microscopy (SEM), roots were passed through three changes of absolute ethanol, critical point dry mounted on stubs and coated with platinum in a Baltec SCD 50 Sputter coater. Samples were visualized with a JEOL 6300F scanning electron microscope at 20 kV.

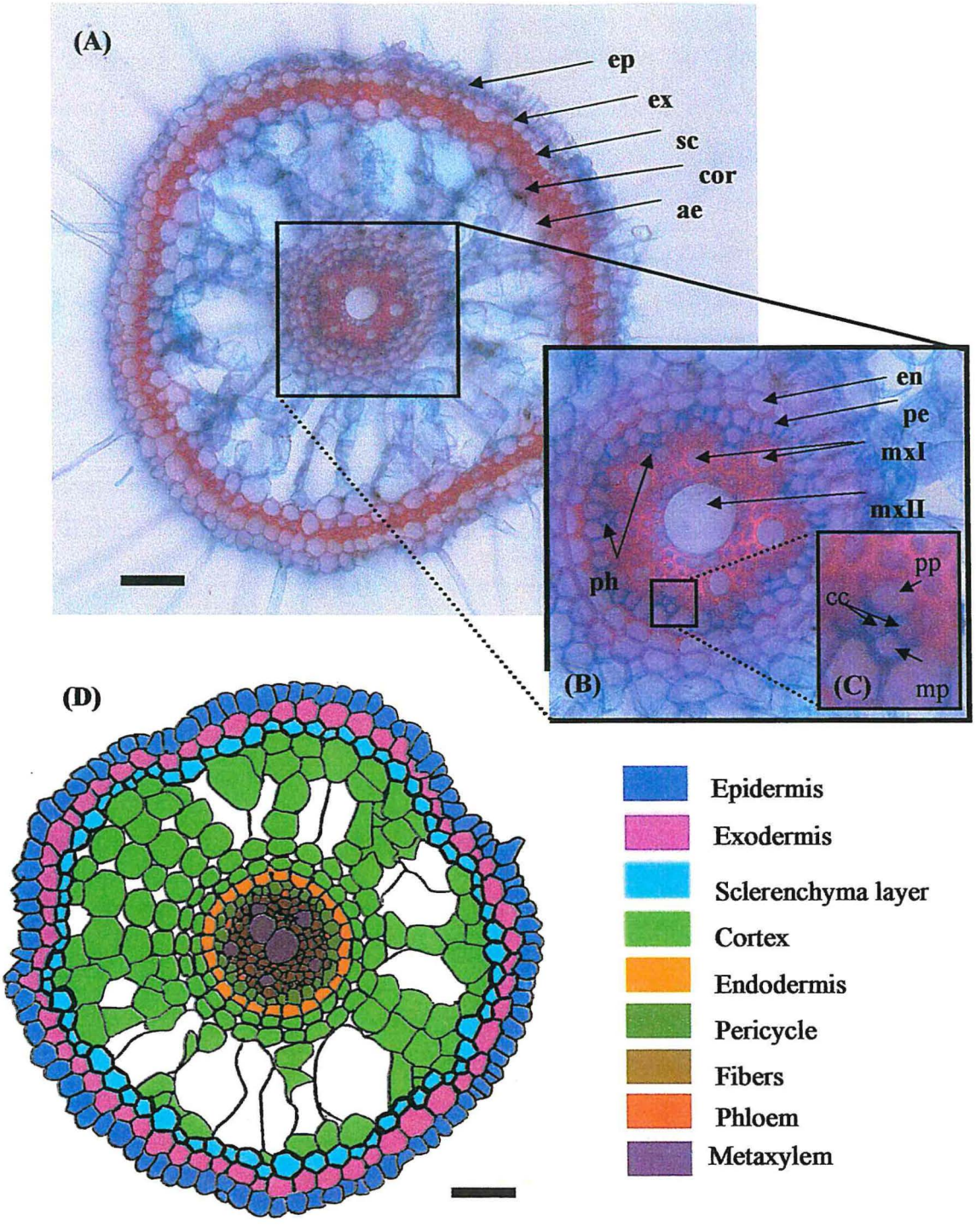


Figure II.4: Radial anatomy of an embryonic root. (A) Transverse section of an embryonic root, ~2 cm from the root tip, stained with fasga. Lignins are stained in red while celluloses are stained in blue. (B) Enlargement of the root stele. (C) Detail of phloeme vessels. (D) A schematic view of embryonic root transverse organisation. Cell types are color coded as defined in the figure. Ep, epidermis; ex, exodermis; sc, sclerenchyma layer; co, cortex; ae, arenchyma lacunae; en, endodermis; pe, pericycle; pm, peripheral metaxylem; cm, central metaxylem; pp, protophloem; cc, companion cells; mp, metaphloem. Scale bar 50µm. All roots came from one week old seedlings.

Histological studies and light microscopy

Epifluorescence microscopy: roots were embedded in agarose (4%) and transversally sectioned at 40 μm thickness using a HM 650V vibratome (MICROM®). The slides were observed under UV light using a DMRXA (Leica®) microscope with a dichroic LP 425 filter.
Light microscopy: for histological analysis, samples were transferred to 100% butanol for 2 days and embedded in Technovit resin using a previously described protocol (Buffard et al., 1992). Blocks were sectioned at 3.5 μm thickness using a HISTORANGE microtome 7 and disposable steel knife. The staining was performed using Toluidine blue (0.05%) (pH=4.5), or doubled stained in periodic acid-shiff (PAS) and naphthol blue -black (NBB). Soluble and insoluble proteins were stained in blue specifically with NBB (Fisher, 1968) and polysaccharides were stained in red with PAS (Martoja and Martoja, 1967). Finally we performed a Fasga staining at 50°C. Reagent used contained safranin (0.05%) in combination with alcian blue (0.1%). Safranin is a red basic cationic dye staining lignified tissues in blue whereas none lignified tissues are stained in blue by alcian blue (an acidic anionic dye).
The slides were observed by light microscopy DMRX A (Leica®) using 10X, 20X power and photos were taken using a Canon® digital camera and a Sony color video and the software OpenLab (Improvision® UK)

Two photon Laser Scanning Microscopy (TLSM)

Root tips were dipped into Propidium Iodide (PI) at 10μg/ml during 10 mn then briefly washed with distilled water three times. Root tips were included in low melting agarose at a 0.5% then mounted between a slide and a cover slip of 170μm±1μm. Optical views were recovered using a Leica LSM 510 TLSM equipped with a chameleon laser at an excitation wavelength of 780 nm. The PI emission was collected with a bypass of 570- 640 nm using 2 External Non Descanned Detector (ENND), one was up the samples and one down. Both channels were then overlaid to create composite images. All images were processed using Zeiss LSM5 software.

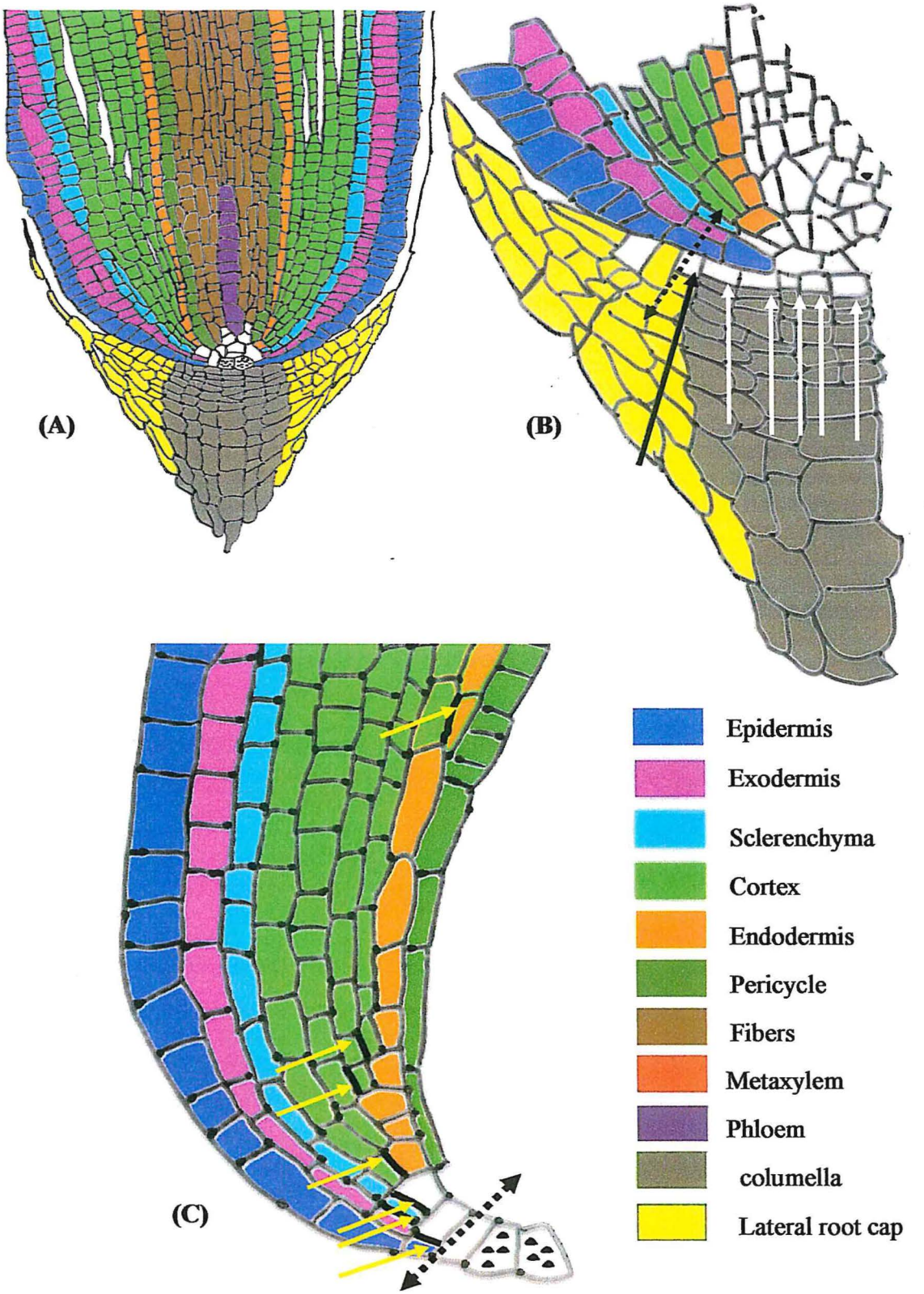


Figure II.5: Median longitudinal view of an embryonic root tip and cell division pattern inside the root meristem.

Figure II.5: (A) Schematic median longitudinal view of an embryonic root tip. Cell types are color coded according to the figure. (B) Divisions of the root cap initials. Columella initials nearby the quiescent center (filled with dots) are regenerated through a first anticlinal division (white arrows) whereas lateral root cap initials undergo a first anticlinal division (dotted double arrows) followed by several periclinal (dark arrows) and anticlinal divisions increasing the number of cell layers in the root cap. (C) Divisions of the epidermis-endodermis initial. Dotted double arrow describes the first anticlinal division, nearby the quiescent center (dark dots), that regenerates the initial and produce the epidermis-endodermis derivate initial. Seven successive asymmetrical periclinal cell divisions follow the first anticlinal division and generate successively, epidermis/endodermis, the sclerenchyma layer, the exodermis and 5 layers of cortex.

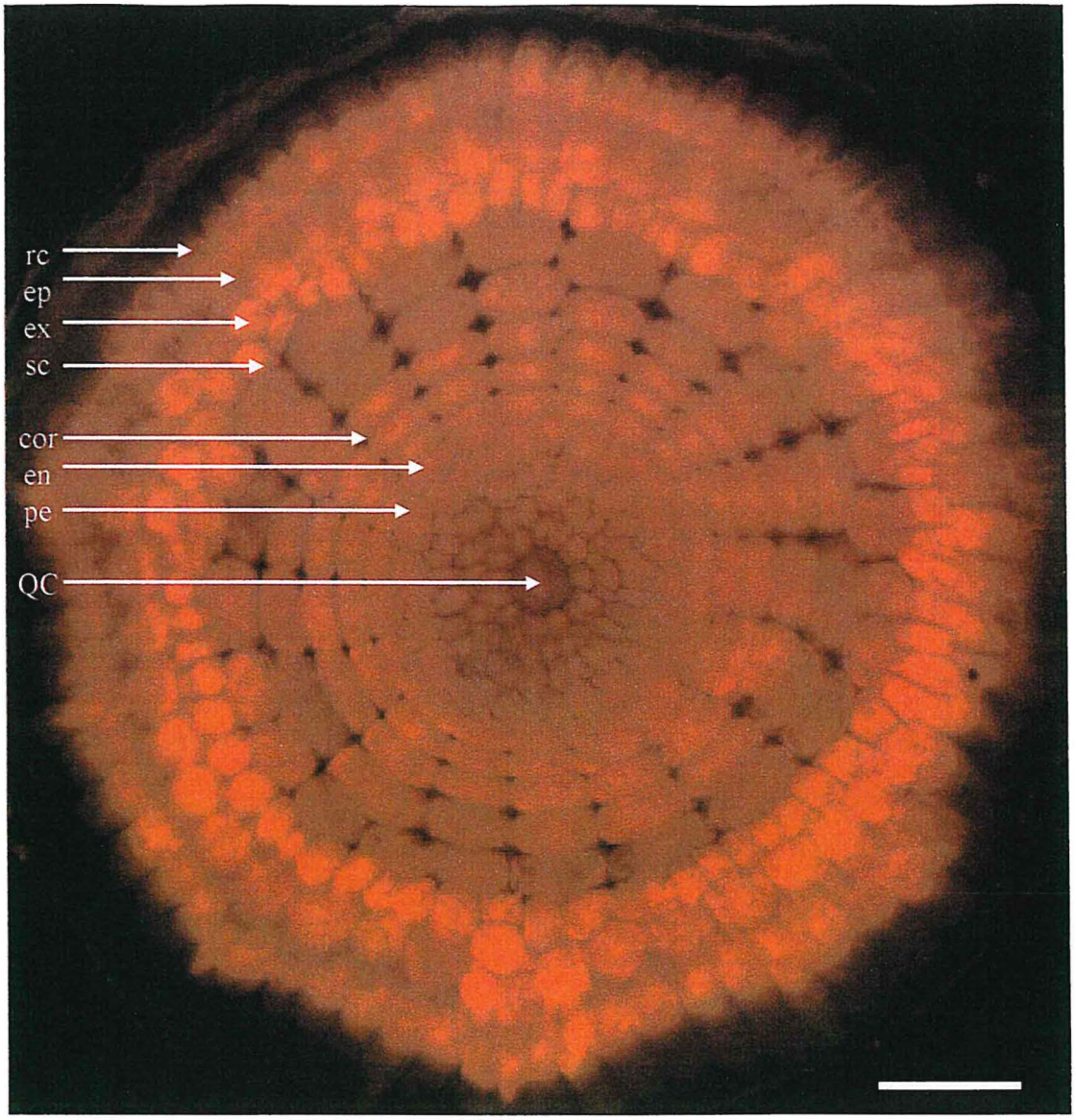


Figure II.6: transverse section just behind the putative quiescent cells. PI stained. rc: root cap; ep: epidermis; ex: exodermis; sc: sclerenchyma; cor: cortex; en: endodermis; pe: pericycle; QC: quiescent center. Transversal view of a seminal root using a confocal microscope under UV illumination. Scale bar : 50µm

RESULTS

Root architecture

Root architecture in rice is complex with two types of primary roots, embryonic root and adventitious roots (Figure II.1A). First of all, the embryonic root emerges by breaking the coleorhyza and is visible one day after germination (Figure II.1B). Its function is mainly restricted to the seedling phase of rice development. First, two or 3 days after germination, five coleoptilar adventitious roots emerge from the coleoptile by breaking the sheath (Figure II.1B). Later, nodal adventitious roots emerge from node on the main stem and on tillers (Figure II.1A). Root emergence go acropetaly on the stem and tiller during successive leaf emergence. The mature root architecture is then made of numerous post-embryonic adventitious roots, forming a fibrous root system. For example, more than one hundred adventitious roots are formed 40 days after germination for the Nipponbare cultivar growing in hydroponics conditions (Figure II.1A). Two different types of branching roots can be found on embryonic and adventitious roots (Figure II.1C). Thin small lateral roots with a determined growth are far the most numerous. Few large lateral roots thinner in diameter than primary roots (Figure II.1C) can also be observed. Large lateral roots have an indeterminate growth and can also bear small lateral roots (Figure II.1C).

Root morphology

A 2mm longitudinal section of an embryonic root, broadly divided in three zones, namely meristematic, elongation and lateral root emergence, is shown in Figure II.2A. The Naphtol blue black staining stains specifically mitotic active cells. The meristematic zone, deeply stained, spans about 300μm and can again be divided in two regions. The distal region of 150μm, covered by the root cap, contains initial cells and the quiescent center. Peripheral cells sloughed off the root cap are visible on Figure II.2B. The proximal region of 150μm where cell divisions are still active ends when root hairs start to emerge and cells start to elongate. The separation between meristematic and elongation zones is clearly visible on the Scanning Electron Microscopy (SEM) picture (Figure II.2B & II.2C) an also on Figure II.2D. In the meristematic zone, epidermal cell walls seem wrinkled compared to these cells in the elongation zone (Figure II.2B & II.2C). Root hair emergence starts soon after epidermal cell elongation (Figure II.2B & II.2C). The elongation zone, evaluated using epidermal cell length

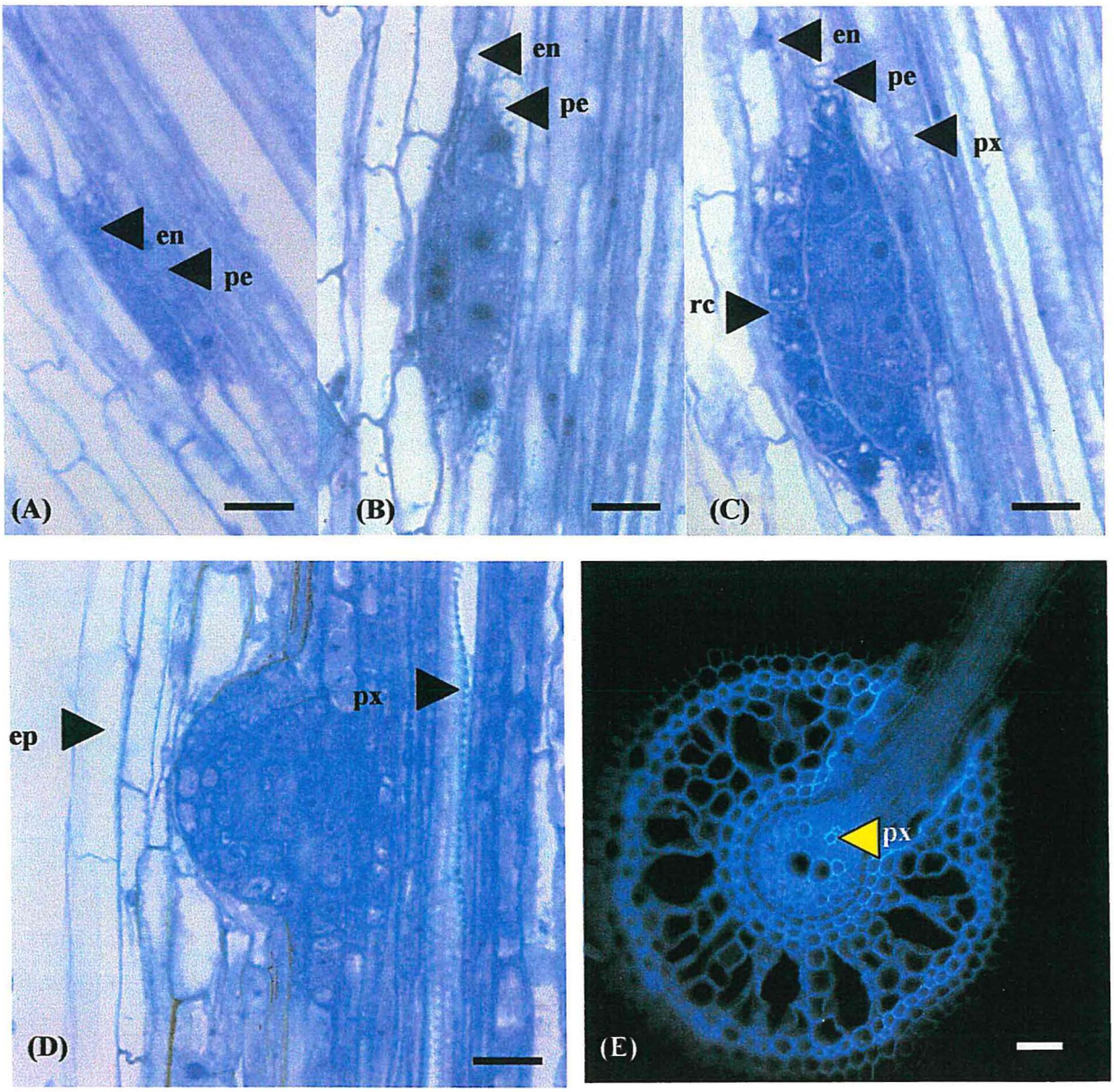


Figure II. 7: Small lateral root origin and pattern of root meristem initials divisions.

as a marker, spans 1250 μm (Figure II.2A). In the third zone, the first lateral root primordia are visible at ~1.5 mm from the root tip (Figure II.2E). Morphology of other root types is quite similar to the embryonic root. Adventitious mature root is the largest one with a diameter of ~1700μm, then come the embryonic root with a diameter of ~800μm followed by the large lateral root with a diameter of ~370μm and the smallest is the small lateral root with a diameter of only ~160μm, so a ratio of 10 between an adventitious root and a small lateral root. Variations in adventitious roots can be observed and mainly depend on stem position of emergence.

Root anatomy

Radial anatomy is typical of a semi aquatic plant with specialized tissues allowing root growth in flooding conditions. Transverse section through an embryonic root tip shows clear separation between three tissue systems (Figure II.3A), the epidermal tissue system, the ground tissue and finally the central cylinder. Radial anatomy of adventitious roots (Figure II.3B) and large lateral roots (Figure II.3C) are very similar of the embryonic root whereas small lateral roots have a much simpler internal structure. Figure 3 displayed a comparative view of radial structure for an embryonic root (Figure II.3A), an adventitious root (Figure II.3B), a large lateral root (Figure II.3C) and a small lateral root (Figure II.3D) using auto-fluorescence of root cell walls under UV illumination. Pictures are not on the same scale (Bar, 50μm).

The epidermal monolayer is made of two cell types; trichoblasts bearing unicellular root hairs and atrichoblasts (Figure II.2B). We failed to find any regular pattern of root hair emergence on epidermal cells. The ground tissue system is made of four tissues: exodermis, sclerenchyma, cortex and endodermis (Figure II.4A). Except the cortex, exodermis, sclerenchyma and endodermis are monolayer tissues in rice root. Epidermis, exodermis and sclerenchyma are found in all the root types. Beneath epidermis, the exodermis is the outermost protective layer when epidermis collapses in old roots. The sclerenchyma differentiates as a highly lignified layer deeply stained in red by fasga (Figure II.4A). The cortex is composed of 4 to 5 cortical cell layers in embryonic roots, which will differentiate in aerenchyma with intercellular spaces developing into large lacunae. Cortex organisation is comparable between embryonic roots, adventitious roots, and large lateral roots except a difference in cortex cell number/layers: from 3 for a large lateral root (Figure II.3C), to 5 for

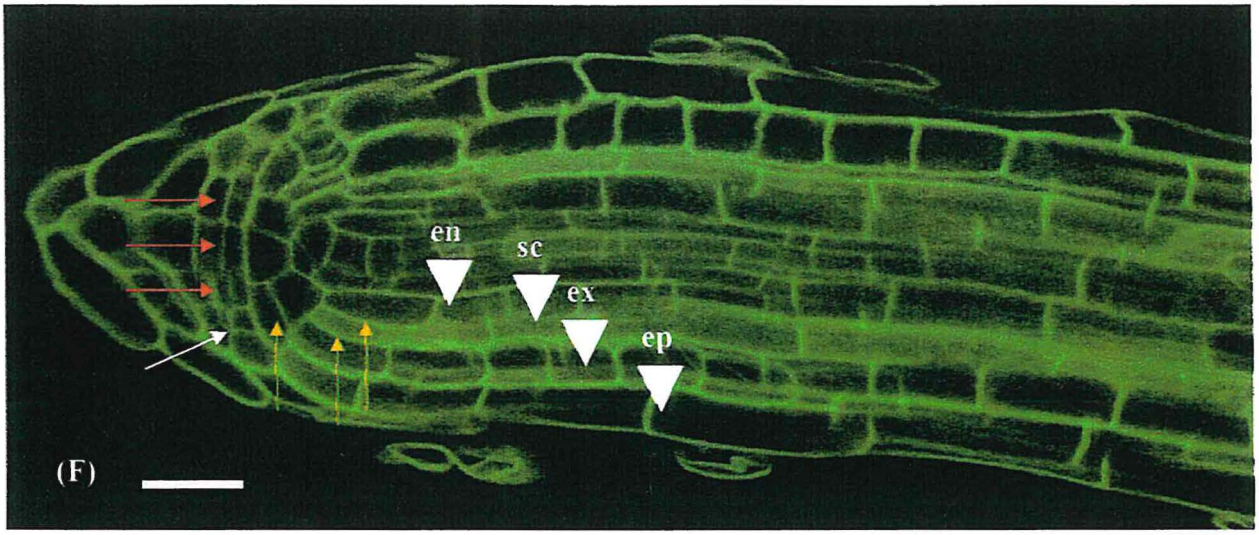


Figure II. 7: Small lateral root origin and pattern of root meristem initials divisions. (A) First anticlinal cell division visible in the pericycle and the endodermis. (B) A more advanced stage where two additional anticlinal division of the inner cell layer are visible. (C) Periclinal divisions inside the lateral root primordium giving rise to two inner cell layers. (D) At later stage, almost all the future lateral root cell layers are visible, the lateral root is ready to emerge. (E) A transverse section of an embryonic root through a lateral root showing vascular connection between the primary and the secondary root. (F) A median longitudinal view of a small lateral root. Initials cell divisions for the columella cells (red arrows), the lateral root cap cells (white arrow), and the epidermis-endodermis (yellow arrows) are shown. en, endodermis; pe, pericycle; rc, future root cap; px, protoxylem; sc, sclerenchyla layer ; ex, exodermis ; ep, epidermis. Longitudinal section of embryonic roots stained with Naphtol blue black (A, B, C ,D). Transverse section of an embryonic root illuminated under UV (F). Median longitudinal view of a small lateral root using a two-photon microscope under UV illumination. Scale bars (A, B, C, D, F) 25 µm, (E) 50 µm.

an embryonic root (Figure II.3A) and to 10 for a mature adventitious root (Figure II.3B). Small lateral roots do not have any cell layer between endodermis and sclerenchyma and then do not have any aerenchyma (Figure II.3D). Finally, the innermost cell layer of the ground tissue system is the endodermis. These cells contain casparian strip made of suberin extending around the cell. Endodermal cells represent a resistant apoplastic barrier to water and nutrition flow and are necessary to insure selectivity of transfer through symplast across passage cells.
Central cylinder organisation is typical of a monocotyledon with a polyarch structure of several xylem vessels that alternate with phloem (Figure II.4B). Xylem form ridges with the youngest vessels called protoxylem extending through the pericyle. In the embryonic root, one or two big metaxylem vessels are found in the middle of the stele surrounded by 6 to 8 smaller metaxylem vessels. This polyarch structure of xylem vessels is also visible in the other root types with one or two big central metaxylem vessels in large lateral roots (Figure II.3C) and four or five vessels in adventitious roots (Figure II.3B). Central metaxylem vessels are surrounded by 9 to 12 metaxylem vessels in adventitious roots and 4 to 5 in large lateral roots. Small lateral roots do not have central metaxylem vessels but possess 2 to 3 metaxylem vessels.
Phloem alternate with xylem vessels. The number of phloem vessels is 2 for small lateral roots, 4 for large lateral roots, 6 to 7 for embryonic roots and 10 to 11 for adventitious roots. Phloem is composed of several cell types: metaphloem first differentiates followed by the protophloem and its two companion cells (Figure II.4C). Each protophloem vessel sieve is associated with two companion cells and the metaphloem vessel forming a characteristic symmetrical pattern (Figure II.4C). Space between xylem and phloem is filled with sclerenchyma fibres (Figure II.4B). All the central cylinder cells are circumvented by pericycle defined as the delimitating layer. A common cylinder central organisation is found between embryonic roots, adventitious roots and large lateral roots but the number of cell layers in the stele is increasing from small roots to large ones. The Figure II.4D summarizes the typical radial anatomy of an embryonic rice root. Rice, as most of the monocotyledons does not have secondary growth.

Root meristem organization and origin of root cell files

Longitudinal organization of the roots reveals a closed meristem type, where the root cap, stele and ground tissues are discrete (Figure II.5A) and converge to the putative quiescent center. Cell files can be traced back to a small group of initials. Initials are arranged in three

tiers giving rise to root tissues. A first tier, made of lateral root cap and columella initial cells, produces the root cap. The second tier is made of epidermis/endodermis initial cells. Finally, the last tier is made of stele initials cells (Figure II.5).

A set of 22 independent longitudinal section as well as 5 three dimensional reconstruction of entire embryonic root meristem were used to analyse relationship of cell files to each other and predict origins of all cell files. Root cap is made of columella and lateral root cap cells arising from two independent groups of cell initials. The columella cells are produced through periclinal divisions of columella initials (Figure II.5B, white arrows) whereas the lateral root cap cells are produced first by an anticlinal division of lateral root cap initials (Figure II.5B, dotted arrow) followed by additional rounds of periclinal/anticlinal divisions (Figure II.5B, dark arrows). A similar pattern of root cap development is seen in all root types. Production of root cap cell is then independent of other tissues. This observation explains why the root cap fully surrounds the meristematic zone (Figure II.2B) and open root cap feature is classically observed in numerous monocotyledons.

All the ground tissues, from the epidermis to the endodermis come from a unique concentric cell layer of initials. A first anticlinal cell division (Figure II.5C, dotted arrow), close to the putative quiescent center, generate two daughter cells. The first one regenerates the initial. The daughter cell, endodermis initial, will produce all the ground tissues after 7 to 8 asymetric periclinal divisions (Figure II.5C, yellow arrows). The first asymmetric periclinal division will produce epidermis and endodermis. The external epidermis cells repeat their anticlinal division but without any additional pericinal division forming a monolayer. After the first periclinal division that generate epidermis and endodermis, endodermis will undergo several rounds of asymmetric periclinal divisions to generate successively, exodermis, sclerenchyma, and all the cortex layers (Figure II.5C). Differences in cortical cell layers between adventitious roots, embryonic roots, large lateral roots and small lateral roots can be easily explained by a difference in number of asymetric periclinal cell division. Seven to 8 periclinal divisions of endodermis initials are visible for an embryonic root against 15 to 16 for an adventitious root, 5 for a large lateral root and 3 for small lateral roots. The quiescent center is very small with 2 and 4 quiescent cells for a small lateral root and an embryonic root apex respectively. The quiescent center is surrounded by several coronary of meristematic cells. These meristematic cells are clearly visible (Figure II.6) with isodiametric shape and high nucleus cytoplasm ratio.

Internal organisation of stele initials, is shown in figure displaying a transverse section just behind the putative quiescent cells (Figure II.6). Large cells with thin cell wall slightly stained

surrounded by four layers of meristematic cells clearly recognizable. These meristematic cells are smaller, with small vacuoles and not differentiated. These initials undergo anticlinal divisions to regenerate initials and produce daughter cells that will later differentiate into xylem and phloem. Central metaxylem cells differentiate first just upstream the central cells after the first anticlinal division of its initials. Concentric metaxylem vessels appear later, followed by protoxylem and last by phloem.

Development of small lateral roots

Embryonic roots of rice seedlings were stained and observed to follow early steps of small lateral root development. Figure II.7A shows the earliest evidence of lateral root initiation follow by several periclinal and anticlinal divisions (Figure II.7B & II.7C) until root emergence by breaking all the tissues distal from the endodermis (Figure 7D). Lateral root initiation already start nearby a metaxylem I pole (Figure II.7C & II.7D & II.7E). Small lateral root vascular connection to an embryonic root is shown on Figure II.7E.

Synchronously, one cell from the pericycle and one cell from the endodermis undergo a first anticlinal division (Figure II.7A). Several anticlinal divisions occur in both layers (Figure II.7B) to increase the number of cells in small lateral root primordium. Small lateral root cap derives from endodermis cells while small lateral ground and stele root tissues derive from the pericyle. In later stages, (Figure II.7D) the number of layers in small lateral root primordium increase by successive periclinal divisions in the pericyle derived layer (Figure II.7B). In Figure II.7D, the root primordium is almost ready to emerge from the embryonic root.

A longitudinal section of a small lateral root apex using a multiphoton microscope is shown in Figure II.7F. Three periclinal divisions sequentially give rise to: epidermis, exodermis, sclerenchyma and the endodermis like in embryonic root (Figure II.7F, yellow arrows) but with no additional cortex layers that differentiate as aerenchyma in all other root types. Lateral root meristem works similary as for other root types and all initials divisions previously described for an embryonic root meristem were recovered: periclinal divisions for columella initials (red arrows, Figure II.7F), anticlinal divisions for lateral root cap divisions (white arrow, Figure II.7F), periclinal divisions for epidermis to endodermis formation (yellow arrows, Figure II.7F).

DISCUSSION

Like in other cereals, root architecture in rice is a complex system with extensive post-embryonic root architecture made of four root types (Hochholdinger et al., 2004a). An embryonic primary root is first visible 2 days after rice seed germination. Embryonic root is functionally important during early step of plant development in rice and cereals. Few weeks after germination, the post-embryonic roots ensure most of water and nutrition absorption. Adventitious roots emergence goes acropetaly and the mature rice root system is mainly made of adventitious roots with a very complicated age distribution depending on the node origin of each adventitious root. Nodal root primordia appear on the ground meristem just adjacent to peripheral vascular on the stem and are established before emergence of leaves on the stem (Itoh et al., 2005). All root types bears root hairs.

In contrast with *Arabidopsis thaliana* where adventitious roots are rarely formed (Konishi and Sugiyama, 2003; Sorin et al., 2005; Takahashi et al., 2003), monocot species (Hochholdinger et al., 2004a) and particularly rice form a massive post-embryonic fibrous root system. Numerous studies have been initiated to identify genes involved in adventitious root primordia formation and emergence in monocotyledons. Several root specific mutants have been identified in maize and rice (Hochholdinger et al., 2004b), without adventitious root or without embryonic root. Mutant without adventitious root but with a normal embryonic root were isolated suggesting that independent mechanisms exist for embryonic and adventitious root initiation. *crl1* and *arl1* rice mutants are defective in adventitious root formation (Inukai et al., 2005; Liu et al., 2005). Indeed, both mutants are allelic. *Crl1/arl1* encodes a LOB family transcription factor and its expression is regulated by an auxin through an AUX/IAA transcription factor. *crl1* mutants develop a normal embryonic root but did not form any adventitious root primordium, indicating that CRL1 is a master gene for adventitious root primordium formation. Adventitious root primordia formation is under genetic control and belongs to a normal developmental process while emergence is controlled by environmental conditions. Adventitious root emergence is induced in rice following submergence (Mergemann and Sauter, 2000). Moreover, emergence of the roots is dependent on flooding of the plant and is mediated by ethylene action (Mergemann and Sauter, 2000). Root growth was preceded by the induced death of epidermal cells of the node external to the tip of the root primordium (Mergemann and Sauter, 2000; Steffens and Sauter, 2005).

First and higher order of root ramification in rice is also partially responsible of the fibrous architecture of the root system. Clearly, rice lateral roots belong to two different anatomical types and can appear in any primary root, including embryonic and adventitious roots. Higher order of ramification can also be observed in large lateral roots in soil or in some cultivars growing in hydroponics conditions for example in cultivar Azucena (our unpublished results). Small lateral roots are growth determined and never bear lateral roots while all other root types have an undetermined growth and bear numerous lateral roots, suggesting a different function for these two types of lateral root. Moreover, small lateral roots are the only rice root type without aerenchyma and then probably poorly adapted to flooding condition, a feature that can possibly explain their determined growth. In *Arabidopsis thaliana*, there is also high order of lateral root formation but to our knowledge, they are all very similar in morphology and anatomy to the primary root (Casimiro et al., 2003; Dolan et al., 1993). Root ramification in *A. thaliana* seems to be a reiteration of the primary root development. *A. thaliana* lateral roots arise first by a set of asymmetric anticlinal divisions in pericycle founder cells adjacent to the xylem poles (Casimiro et al., 2003; Dolan et al., 1993; Malamy and Benfey, 1997). Lateral roots in rice arise from anticlinal symmetrical divisions in pericycle and endodermis adjacent to the metaxylem poles as in many monocotyledons like maize for instance (Hochholdinger et al., 2004b). Lateral root cap cells originate then back to endodermis while ground tissues and stele originate back to pericycle.

Radial anatomies of rice and *A. thaliana* have a typical organisation for respectively a monocotyledon and a dicotyledon. Rice roots have also some cellular specificity due to its adaptation to flooding conditions. First, in comparison with *A. thaliana*, after epidermis, rice has two additional tissues, namely exodermis and a heavily lignified sclerenchyma layer. The epidermis can eventually collapse when roots age and exodermis will play an epidermis-like water and nutrient absorption function. The remaining exodermis is then sustained by the heavily lignified sclerenchyma layer. This layer could have a function to limit oxygen and gas diffusion from the root to limit anoxia stress, an anatomical adaptation shared with many aquatic plants. Rice roots contain a number of cortex cell layers ranging from 0 to 12, respectively for small lateral, large lateral, embryonic and adventitious roots that will differentiate in aerenchyma while *A. thaliana* contains only one cortex cell layer. Aerenchyma is regarded as a tissue useful in gas exchanges from the shoot and as a reservoir of oxygen required for root respiration in flooding conditions. Development of arenchyma is classically observed in several aquatic plants species and can be also induced by submergence or anoxia in maize (Subbaiah and Sachs, 2003). Nevertheless, aerenchyma in rice belongs to a normal

developmental process while in maize it depends on environmental conditions and is under the control of ethylene (Subbaiah and Sachs, 2003). The mature vascular cylinder of rice, as described for other monocotyledons, is polyarch, with alternation of phloem and metaxylem vessels. Except for small lateral roots, all root types contains variable number of central metaxylem vessels, from 1 in embryonic and large lateral roots, to 4-6 in adventitious root. Phloem is composed of several cell types: metaphloem first differentiates followed by the protophloem and its two companion cells. Each protophloem vessel sieve is associated with the two companion cells and the metaphloem vessel forming a characteristic symmetrical pattern.

Root meristem organisations in *Arabidopsis thaliana* and rice are similar but not identical. Both meristems belong to the closed meristem type with initial cell layers surrounding a quiescent center and arranged in three tiers. A quiescent center made of 4 cells seems present in rice. QHB is specifically expressed in these three to four cells of the RAM (Kamiya et al., 2003b) QHB is the ortholog of WOX5 also specifically expressed in the QC of *A. thaliana* RAM (Haecker et al., 2004). OsSCR expression overlaps QHB expression in these cells (Kamiya et al., 2003a) suggesting that these cells form the quiescent center. Differences observed in cell expression pattern of QHB in embryogenesis and adventitious roots primordia suggest differences in the formation of these two types of roots (Kamiya et al., 2003b). OsSCR is involved in asymmetrical division to generate separate endodermal and cortical cell lineage. The continuous endodermal OsSCR expression correlates well in rice with the function proposed for AtSCR in *A. thaliana* (Di Laurenzio et al., 1996). Expression pattern of rice OsSHR is different than in *A. thaliana*. AtSHR (Helariutta et al., 2000) is expressed only in stele region while OsSHR is expressed in stele but also in endodermis and in one cortex cell layer (Kamiya et al., 2003a) suggesting different molecular mechanisms between rice and *A. thaliana* for cortex formation. Moreover, the additional periclinal divisions that increase the number of cortical cell layers in rice underline another difference during ground tissues formation with *A. thaliana*. Recently, it was demonstrated that when *A. thaliana* primary root ages, there is a second periclinal division that give rise to a second layer of cortex (Paquette and Benfey, 2005). This process seems under GA, SCR and SHR control. It would be interesting to verify if GA could also affect the number of endodermis periclinal divisions and affect the number of cortical cell layers in several rice root types. Since several GA biosynthesis and GA perception mutants are available in rice (Eckardt, 2002; Sakamoto et al., 2004), this question should be addressed in a near future as well as the function of OsSCR and OsSHR.

Except for the columella cell initials that present a similar behaviour, initials divisions and cell origins are different in *A. thaliana* and rice. Columella cells come from periclinal divisions of one concentric initial layer in *A. thaliana* and rice. Lateral root cap cells are produced through a first periclinal division of a common epidermis/lateral root cap initial in *A. thaliana* (Dolan et al., 1993). While in rice, lateral root cap formation results of cell division in an independent concentric layer of initials. Epidermis initials result of a periclinal division of a single epidermis/endodermis initial in rice. This common initial produce all ground cell layers in all rice root types, from epidermis to endodermis. Endodermis is established after the first periclinal division that gave rise to the epidermis. Variations in the number of successive periclinal divisions of the endodermis easily explains the variable number of cortical cell layers in rice root types, ranging from zero, for a small lateral root, to 12 for an adventitious root. The missing cortex layers in small lateral roots are always correlated with missing aerenchyma suggesting a specific cell specification of cortex to aerenchyma.

Evolutionary developmental biology (evo-devo) studies how developmental genetic pathways diversify to give rise to different morphologies and ultimately to different functions (Irish and Benfey, 2004). Monocotyledons and dicotyledons have evolved separately during the last 150 million year (Chaw et al., 2004; Wolfe et al., 1989) and a number of morphological and physiological characteristics are highly specialized in monocotyledons. Roots of monocotyledon have a high number of cellular specializations in comparison with dicotyledon (Hochholdinger et al., 2004a) and in our paper we demonstrated in details that was especially the case between rice and *A. thaliana*.

But how the master genes for root development are conserved between monocotyledons and dicotyledons? Our work is the first step towards comparative genetics of root development between monocotyledons and dicotyledons. Based on the full genome availability of rice and *Arabidopsis thaliana*, the next step will be to predict which root developmental genes are conserved or not. *In silico* approaches like phylogenomics (Eisen and Fraser, 2003; Sjolander, 2004; Zmasek and Eddy, 2002) will help to predict orthologs relationships and species specific subfamilies expansion given some insight into molecular aspect of root morphology divergences between both species. Comparative molecular genetics between Rice and *Arabidopsis thaliana* roots is then the ideal system to study and identify conservation or divergence of developmental genetic pathways and their repercussion in root morphology.

Nous avons revisité l'organisation et la morphologie du système racinaire, et l'anatomie des différents types de racines chez le riz, en les comparant aux résultats décrits chez *Arabidopsis thaliana* et en utilisant à la fois l'histologie classique et les nouvelles techniques d'imagerie cellulaire. Des zones d'ombre et des données contradictoires existant dans la littérature, cette étude de biologie cellulaire de la racine de riz était à notre sens un prérequis pour diriger par la suite la stratégie d'étude au niveau moléculaire. Alors que le système racinaire de la plante modèle des dicotylédones, *Arabidopsis thaliana*, est bien décrit et connu, celui de la plante modèle des monocotylédones, *Oryza sativa*, l'est beaucoup moins. Le système racinaire du riz et des céréales est fasciculé, et formé de nombreuses racines d'origine post embryonnaire formant un système complexe, fibreux et dense, ce qui le différencie du système pivotant d'origine embryonnaire d'*Arabidopsis*.

A l'échelle cellulaire, les racines de riz possèdent des couches cellulaires supplémentaires comparées aux racines d'*Arabidopsis*. Par exemple, alors qu'une seule couche corticale est généralement observée chez *Arabidopsis*, le nombre de couches corticales dans les racines de riz peut être important (>10). On note également des couches cellulaires chez le riz qui n'existent pas chez *Arabidopsis*, comme le sclérenchyme, l'exoderme et le cortex qui se différencie très rapidement en aérenchyme. La présence de ces tissus spécialisés souligne l'adaptation du riz à des conditions semi-aquatique, et explique en partie sa tolérance à la submersion. Ce travail a permis de mettre en évidence les caractéristiques anatomiques communes existant entre les divers types de racines chez le riz. La structure des méristèmes de tous les types racinaires peuvent se ramener à un seul modèle ou seules diffèrent les nombres de cellules initiales et de divisions augmentant le nombre de couches (divisions périclinales). Les racines diffèrent donc entre elles notamment par le nombre de couches de cellules corticales. Le nombre de couches corticales pour les slr est de zéro, ou seules trois divisions périclinales de l'initiale produisent l'épiderme, l'exoderme, le sclérenchyme et l'endoderme, couches cellulaires communes à tous les types racinaires. Cette absence de cortex est à l'origine de l'absence de tout aérenchyme chez les slr mais est peut-être également à l'origine de l'absence de ramification. Ces différences anatomiques, en particulier entre les deux types de racines latérales, sont probablement liées à une différence de fonction. Une hypothèse de travail préliminaire pourrait être de considérer que les slr ont essentiellement une fonction d'absorbtion à courte distance alors que les llr permettent d'exploiter les ressources hydro-minérales à une distance plus importante et augmenterait significativement le volume de sol exploré. Il sera alors intéressant de mener des études plus

détaillées sur la base de ces hypothèses. Par exemple, l'étude des réponses adaptatives de racines individuelles, et/ou du système racinaire dans sa globalité face à un environnement changeant pourra alors mettre en évidence ces liens de structure-fonction pour ces différents types racinaires. Enfin, l'origine de ces racines latérales est clairement différente entre Arabidopsis et le riz. Si seules les cellules du péricycle sont à l'origine des racines latérales chez Arabidopsis, chez le riz comme chez d'autres monocotylédones ce sont des cellules du péricycle et de l'endoderme qui participent à la formation des primordia des racines latérales.

De nombreuses hypothèses de travail peuvent être formulées sur la base de ce travail mais il reste maintenant à passer à l'étape de validation. Des données d'analyse fonctionnelle d'orthologues de gènes d'*Arabidopsis* impliqués dans le maintien du centre quiescent (QHB orthologue de WOX5) et dans la spécification tissulaire (SCARECROW et SHORTROOT) commencent à être acquises sur le riz ; Elles font également ressortir des similitudes et des différences au niveau des mécanismes de fonctionnement cellulaire avec la dicotylédone modèle. Une étude plus systématique de la fonction des orthologues riz/arabidopsis permettra de préciser à quel niveau sont situés les différences et les convergences pour le développement racinaire entre monocotylédones et dicotylédones.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Barry, G. F. (2001). The use of the Monsanto draft rice genome sequence in research. *Plant Physiol* **125**, 1164-5.

Benfey, P. N. and Scheres, B. (2000). Root development. *Curr Biol* **10**, R813-5.

Benfey, P. N. and Schiefelbein, J. W. (1994). Getting to the root of plant development: the genetics of Arabidopsis root formation. *Trends Genet* **10**, 84-8.

Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G. and Bennett, M. J. (2003). Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci* **8**, 165-71.

Chaw, S. M., Chang, C. C., Chen, H. L. and Li, W. H. (2004). Dating the monocot-dicot divergence and the origin of core eudicots using whole chloroplast genomes. *J Mol Evol* **58**, 424-41.

Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M. G., Feldmann, K. A. and Benfey, P. N. (1996). The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell* **86**, 423-33.

Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K. and Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* **119**, 71-84.

Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T. H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H. et al. (2002). A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. japonica). *Science* **296**, 92-100.

Haecker, A., Gross-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M. and Laux, T. (2004). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in Arabidopsis thaliana. *Development* **131**, 657-68.

Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M. T. and Benfey, P. N. (2000). The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. *Cell* **101**, 555-67.

Hirochika, H., Guiderdoni, E., An, G., Hsing, Y. I., Eun, M. Y., Han, C. D., Upadhyaya, N., Ramachandran, S., Zhang, Q., Pereira, A. et al. (2004). Rice mutant resources for gene discovery. *Plant Mol Biol* **54**, 325-34.

Hochholdinger, F., Park, W. J., Sauer, M. and Woll, K. (2004a). From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals. *Trends Plant Sci* **9**, 42-8.

Hochholdinger, F., Woll, K., Sauer, M. and Dembinsky, D. (2004b). Genetic dissection of root formation in maize (Zea mays) reveals root-type specific developmental programmes. *Ann Bot (Lond)* **93**, 359-68.

Inukai, Y., Sakamoto, T., Ueguchi-Tanaka, M., Shibata, Y., Gomi, K., Umemura, I., Hasegawa, Y., Ashikari, M., Kitano, H. and Matsuoka, M. (2005). Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *Plant Cell* **17**, 1387-96.

IRGSP. (2005). The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **436**, 793-800.

Irish, V. F. and Benfey, P. N. (2004). Beyond Arabidopsis. Translational biology meets evolutionary developmental biology. *Plant Physiol* **135**, 611-4.

Itoh H. Shimada A., et al. 2005. Overexpression of GRAS protein lacking the DELLA domain confers altered gibberellin responses in rice. *Plant J.* **44**, 669-79.

Johnson, A. A., Hibberd, J. M., Gay, C., Essah, P. A., Haseloff, J., Tester, M. and Guiderdoni, E. (2005). Spatial control of transgene expression in rice (Oryza sativa L.) using the Gal4 enhancer trapping system. *Plant J* **41**, 779-89.

Kamiya, N., Itoh, J., Morikami, A., Nagato, Y. and Matsuoka, M. (2003a). The SCARECROW gene's role in asymmetric cell divisions in rice plants. *Plant J* **36**, 45-54.

Kamiya, N., Nagasaki, H., Morikami, A., Sato, Y. and Matsuoka, M. (2003b). Isolation and characterization of a rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *Plant J* **35**, 429-41.

Kamoshita, A., Wade, J., Ali, L., Pathan, S., Zhang, J., Sarkarung, S. and Nguyen, T. (2002). Mapping QTLs for root morphology of a rice population adapted to rainfed lowland conditions. *Theor Appl Genet* **104**, 880-893.

Konishi, M. and Sugiyama, M. (2003). Genetic analysis of adventitious root formation with a novel series of temperature-sensitive mutants of Arabidopsis thaliana. *Development* **130**, 5637-47.

Li, Z., Mu, P., Li, C., Zhang, H., Gao, Y. and Wang, X. (2005). QTL mapping of root traits in a doubled haploid population from a cross between upland and lowland japonica rice in three environments. *Theor Appl Genet* **110**, 1244-52.

Liu, H., Wang, S., Yu, X., Yu, J., He, X., Zhang, S., Shou, H. and Wu, P. (2005). ARL1, a LOB-domain protein required for adventitious root formation in rice. *Plant J* **43**, 47-56.

Malamy, J. E. and Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development* **124**, 33-44.

Mergemann, H. and Sauter, M. (2000). Ethylene induces epidermal cell death at the site of adventitious root emergence in rice. *Plant Physiol* **124**, 609-14.

Miyao, A., Tanaka, K., Murata, K., Sawaki, H., Takeda, S., Abe, K., Shinozuka, Y., Onosato, K. and Hirochika, H. (2003). Target site specificity of the Tos17 retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *Plant Cell* **15**, 1771-80.

Paquette, A. J. and P. N. Benfey 2005. Maturation of the ground tissue of the root is regulated by gibberellin and SCARECROW and requires SHORT-ROOT. *Plant Physiol* **138**(2): 636-40.

Paterson, A. H., Bowers, J. E., Chapman, B. A., Peterson, D. G., Rong, J. and Wicker, T. M. (2004). Comparative genome analysis of monocots and dicots, toward characterization of angiosperm diversity. *Curr Opin Biotechnol* **15**, 120-5.

Paterson, A. H., Bowers, J. E., Peterson, D. G., Estill, J. C. and Chapman, B. A. (2003). Structure and evolution of cereal genomes. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 644-50.

Sallaud, C., Gay, C., Larmande, P., Bes, M., Piffanelli, P., Piegu, B., Droc, G., Regad, F., Bourgeois, E., Meynard, D. et al. (2004). High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards in silico reverse genetics. *Plant J* **39**, 450-64.

Shimizu, A., Yanagihara, S., Kawasaki, S. and Ikehashi, H. (2004). Phosphorus deficiency-induced root elongation and its QTL in rice (Oryza sativa L.). *Theor Appl Genet* **109**, 1361-8.

Sorin, C., Bussell, J. D., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G., McKhann, H., Garcion, C., Vaucheret, H., Sandberg, G. et al. (2005). Auxin and light control of adventitious rooting in Arabidopsis require ARGONAUTE1. *Plant Cell* **17**, 1343-59.

Steffens, B. and Sauter, M. (2005). Epidermal Cell Death in Rice Is Regulated by Ethylene, Gibberellin, and Abscisic Acid. *Plant Physiol.*

Takahashi, F., Sato-Nara, K., Kobayashi, K., Suzuki, M. and Suzuki, H. (2003). Sugar-induced adventitious roots in Arabidopsis seedlings. *J Plant Res* **116**, 83-91.

Wolfe, K. H., Gouy, M., Yang, Y. W., Sharp, P. M. and Li, W. H. (1989). Date of the monocot-dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6201-5.

Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G. K., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X. et al. (2002). A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. indica). *Science* **296**, 79-92.

Zheng, B. S., Yang, L., Zhang, W. P., Mao, C. Z., Wu, Y. R., Yi, K. K., Liu, F. Y. and Wu, P. (2003). Mapping QTLs and candidate genes for rice root traits under different water-supply conditions and comparative analysis across three populations. *Theor Appl Genet* **107**, 1505-15.

Zheng, H. G., Babu, R. C., Pathan, M. S., Ali, L., Huang, N., Courtois, B. and Nguyen, H. T. (2000). Quantitative trait loci for root-penetration ability and root thickness in rice: comparison of genetic backgrounds. *Genome* **43**, 53-61.

CHAPITRE III

CRIBLAGE D'UNE COLLECTION DE LIGNEES D'INSERTION ENHANCER TRAP GAL4-UAS-GFP POUR DES EXPRESSIONS GFP TISSU-SPECIFIQUES

Le développement du système racinaire est contrôlé par l'interaction de plusieurs gènes conduisant à une héritabilité polygénique de nombreux caractères. Les sélectionneurs ont modifié certains caractères du système racinaire donnant ainsi des variétés cultivées, améliorées et adaptées à des contextes particuliers ; Ainsi on trouve une large gamme de variétés possédant une grande variabilité des caractères tels que la longueur, l'épaisseur, la longueur spécifique, la présence et le nombre de racines séminales, adventives, et latérales. La sélection à par exemple permis de modifier progressivement l'architecture racinaire de riz pluviaux, qui possèdent un système racinaire plus profond et plus dense et donc plus adapté à des conditions de culture déficitaires en eau par rapport à des riz irrigués. Ces dernières années ont vu l'amélioration des techniques de sélection, permettant de suivre la ou les zones de chromosomes possédant les allèles à introgresser par sélection assistée par marqueurs (MAS). La MAS a d'abord concerné des gènes majeurs mais le cœur de la stratégie de la MAS est la recherche de QTLs dans des variétés traditionnelles, leur marquage puis leur transfert dans des variétés élites. La MAS de QTLs a cependant de nombreuses limites, en particulier la grandeur de l'intervalle de confiance qui contient les QTLs, toujours élevé et qui limite son efficacité. Par ailleurs, l'analyse QTL est souvent descriptive et ne renseigne pas sur les gènes sous-jacents. Cette information pourrait souvent avoir une portée plus générique. Par exemple, le clonage d'un QTL pour la tolérance à la salinité chez le riz, (Ren et al. 2005) à permis de montrer qu'il s'agissait d'un homologue à un transporteur HKT par ailleurs étudié chez *Arabidopsis thaliana* pour son rôle dans le même mécanisme. Il est donc rationnel d'avancer que certains allèles pour ce gène auront un effet positif sur la tolérance à la salinité chez le riz, d'autres céréales voir d'autres plantes. De nombreux exemples encore plus pédagogiques existent par exemple pour des QTLs de précocité chez le riz dont certains correspondent à des gènes majeurs pour la précocité de floraison chez *Arabidopsis thaliana* (Doi et al 2004 ; Hayama et al 2003 ; Izawa et al 2003 ; Kojima et al 2002 ; Yano et al 2001). Cependant, le clonage de QTLs reste délicat, long et aléatoire ; Caractériser au niveau moléculaire les gènes (QTLs ou gènes majeurs) impliqués dans une fonction biologique comme le développement fournit un moyen par la suite d'accélérer les programmes de sélection et également nos connaissances fines de ce processus biologique.

Une collection de près de 30 000 lignées d'insertion ADN-T enhancer trap de riz *Oryza sativa* cv. Nipponbare a été généré dans le cadre du programme Génoplante (Sallaud et al. 2003 ; 2004) (figure III.8). Les régions flanquantes de la bordure de l'ADN-T des premiers

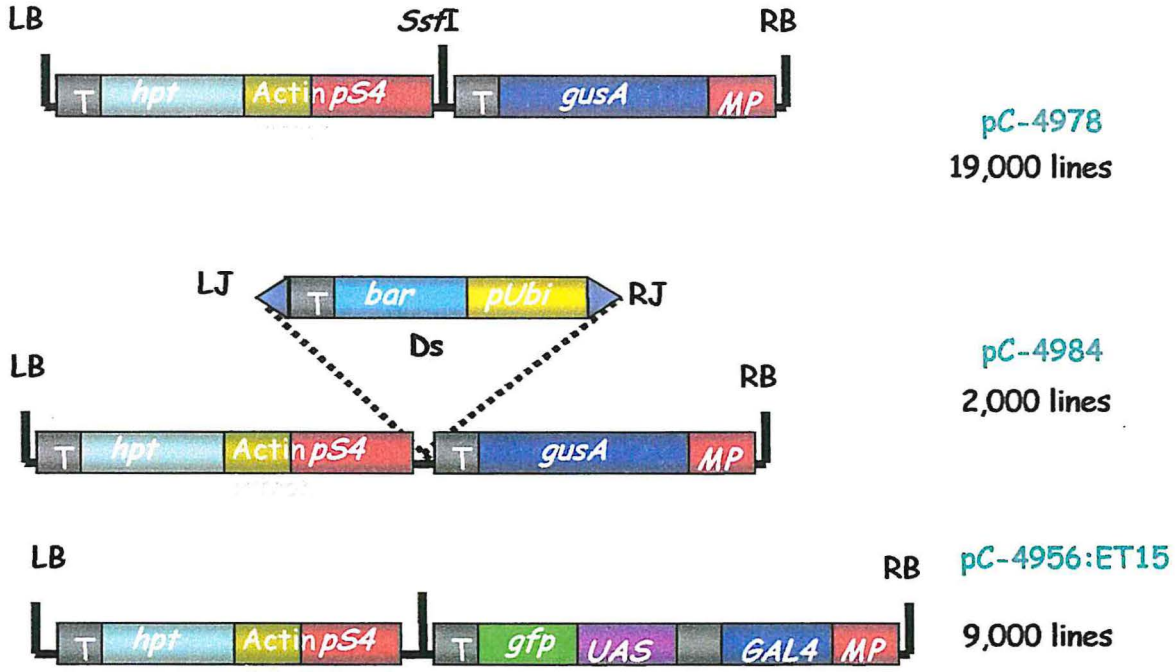


Figure III.8.a : Vecteurs utilisés pour générer la collection de lignées d'insertion de Génoplante. 19000 lignées ont été transformées par pC-4978 et portent le gène rapporteur de la B-glucuronidase (GUS). 2000 lignées ont été transformées par pC-4984, et portent l'élément transposable Ds ainsi que le gène rapporteur GUS. Enfin, 9000 lignées ont été transformées par pC-4956:ET15 et portent le gène rapporteur de la GFP. Lorsque l'ADN-T enhancer trap Gal4-UAS-GFP est inséré proche d'un promoteur, Gal4 est exprimé et va se fixer à la séquence activatrice UAS (Upstream Activator Sequence) de transcription de la GFP. A. Betzner and W. Tucker, ANU , Canberra, Australia.

hpt : gène de résistance à l'hygromycine ;pS4 : promoteur du gène de la capside du Subterranean Clover Stunt Virus;gusA : ;MP : promoteur minimal ;LB-RB : Left Border-Right Border; gfp : green fluorescent protein; UAS : Upstream Activator Sequence; GAL4 : facteur de transcription de levure.

transformants ont été isolées et séquencées. Les insertions des ADN-T apparaissent distribuées relativement uniformément entre les 12 chromosomes et leur densité suit, le long de chaque chromosome, celle de l'abondance des gènes (plus faible autour du centromère et plus forte au niveau des régions proches des extrémités du chromosome). De façon intéressante les insertions sont rarement trouvées dans les séquences répétées pauvres en gènes. La moitié des insertions se retrouve à l'intérieur des limites reconnues des gènes conduisant à de très probables pertes de fonction des gènes interrompus. 62% des insertions se retrouvent ainsi dans ou à proximité des séquences codant pour des protéines connues et 30% des insertions interrompent les produits de transcription des gènes (ADNc pleine longueur) et sont donc présentes dans les exons. Un tiers des ADNc correspondant aux insertions avait été classifié dans une catégorie fonctionnelle précise, ce qui a permis de déterminer que les gènes interrompus par les inserts ADN-T étaient représentatifs de l'ensemble des gènes, c'est à dire sans biais significatif résultant d'une préférence pour une catégorie particulière (Sallaud et al 2004).

Cette banque de mutants est un outil majeur pour la génomique et la biologie du développement car elle représente un point de départ pour rechercher et isoler des mutants pour différents caractères. Cette collection inclut 9 000 lignées transformées via une cassette Gal4-UAS-GFP, assurant le rôle de piège à enhancer (figure III.8). La technique « enhancer trap » est une stratégie puissante pour identifier de nouveaux gènes et leurs éléments de régulation. Ce système de piège permettrait d'activer ou d'inactiver n'importe quel gène s'exprimant de façon spécifique dans une cellule, un type cellulaire ou un tissu. Un criblage *in vivo* non destructif permet alors de trier les lignées exprimant le gène rapporteur de la GFP et ainsi multiplier et étudier plus aisément les lignées d'intérêt.

Dans le cadre de ce travail de thèse, 2683 lignées enhancer trap Gal4-UAS-GFP ont été criblées. Les données phénotypiques et les données d'expression GFP des lignées d'intérêt criblées sont compilées dans la base **Oryza Tag Line** [(OTL : http://www.genoplante-info.infobiogen.fr/oryzatagline/ (Larmande et al. *en préparation*)]. Les FST correspondantes aux insertions responsables des expressions et phénotypes observés sont quant à elles compilées dans la base de données **OryGenesDB** (http://orygenesdb.cirad.fr) dont l'objectif initial est de regrouper l'ensemble des données génomiques essentielles sur le riz. OrygenesDB permet au généticien moléculaire via une stratégie de génétique inverse de

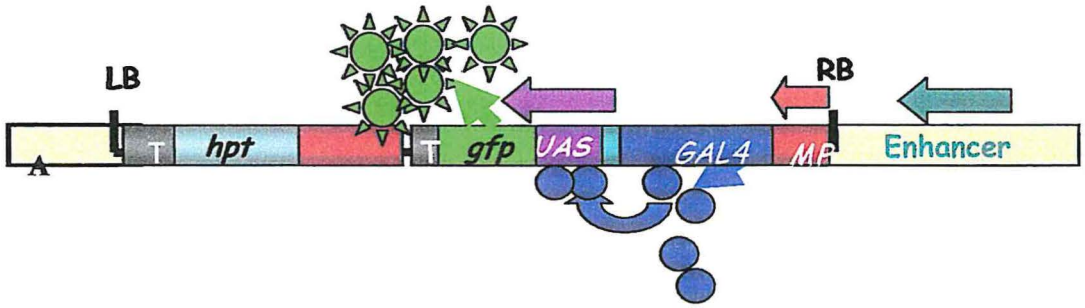


Figure III.8.b: Les 2683 lignées criblées au cours de cette thèse ont inséré l'ADN-T pC4956 : ET15; Il porte un gène de résistance à l'hygromycine *hpt* et un piège à activateur particulier qui permet la production du facteur transcriptionnel hybride GAL4-VP16. Ce facteur va se lier spécifiquement aux éléments UAS contrôlant la transcription du gène de la GFP présent dans le même ADN-T et permettre son expression. L'intérêt du système, outre d'utiliser le gène rapporteur de la GFP, qui permet une analyse non destructive à l'échelle cellulaire, est de pouvoir ensuite étudier dans des tissus ou cellules spécifiques où s'exprime GAL4-VP16 (et donc le gène de la GFP) des processus physiologiques et développementaux par introduction puis transactivation de nouveaux gènes contrôlés par les éléments UAS. Ce système qui a montré tout son intérêt chez la drosophile (Brand et Perrimon 1993) et *Arabidopsis* (Kiegle *et al,* 2000 a et b), est testé pour la première fois chez le riz. A. Betzner and W. Tucker, ANU , Canberra, Australia.
Le vecteur a été construit en insérant dans le site unique KpnI de pC4956 un fragment PCR à partir du vecteur pET15 (pBIN mGAL4-VP16UASGAL4mGFPER (Haseloff *et al.* 1999), comprenant depuis la bordure droite de l'ADN-T ; i .une région minimale (-48bp) du promoteur CaMV35S, la séquence codante composite optimisée GAL4-VP16 et le terminateur nos 3' , ii. une cassette servant uniquement ici d'espaceur comprenant le promoteur nos, la séquence codante nptII et le terminateur nos, iii. 5 éléments UAS répétés en tandem suivis de la région -90 bp du promoteur CaMV35S , de la séquence codante de la GFP et du terminateur nos.

trouver rapidement des mutants d'insertion dans ses gènes favoris, et de récupérer les annotations liées à ces gènes (Droc et al. 2006).

Alors que le chapitre précédent décrivait le fonctionnement du méristème apical racinaire, et l'organisation cellulaire du système racinaire du riz *Oryza sativa* L. cv Nipponbare, ce deuxième chapitre illustre les principaux résultats du criblage spécifique de lignées enhancer trap. En effet, l'objectif principal de ce criblage était la mise en évidence de marqueurs du développement racinaire, afin d'illustrer le fonctionnement et l'organisation cellulaire du méristème décrit précédemment. Nous voulions isoler des lignées présentant une activité GFP tissu-spécifique afin d'utiliser des lignées Gal4-UAS-GFP pour l'étude du développement racinaire. Nous avons ainsi pu isoler des lignées exprimant la GFP spécifiquement dans un type cellulaire ou tissu ou organe. Nous avons également isolé des mutants phénotypiques exprimant ou non la GFP, dans le but de découvrir des gènes intervenant dans le développement du système racinaire.

L'article suivant présente une collection de lignées enhancer trap spécifique au système racinaire du riz et la mise au point d'un protocole d'imagerie pour visualiser la GFP in vivo à l'échelle cellulaire. Différents marqueurs cellulaires y sont présentés, lesquels pourront être utilisés pour des études développementales et physiologiques. Par ailleurs, les séquences flanquantes de ces lignées ont été isolés et devront permettre de remonter aux gènes qui ont été étiquetés par l'ADN-T. Même si aucun phénotype n'est visible, sur la base de la séquence isolée (annotation) et du profil d'expression GFP cette approche peut également permettre d'isoler des gènes impliqués dans le développement racinaire. Une combinaison : facteur de transcription plus un profil GFP spécifique d'un tissu peut-alors être considéré comme un indice que ce facteur de transcription joue un rôle dans la différenciation de cette couche.

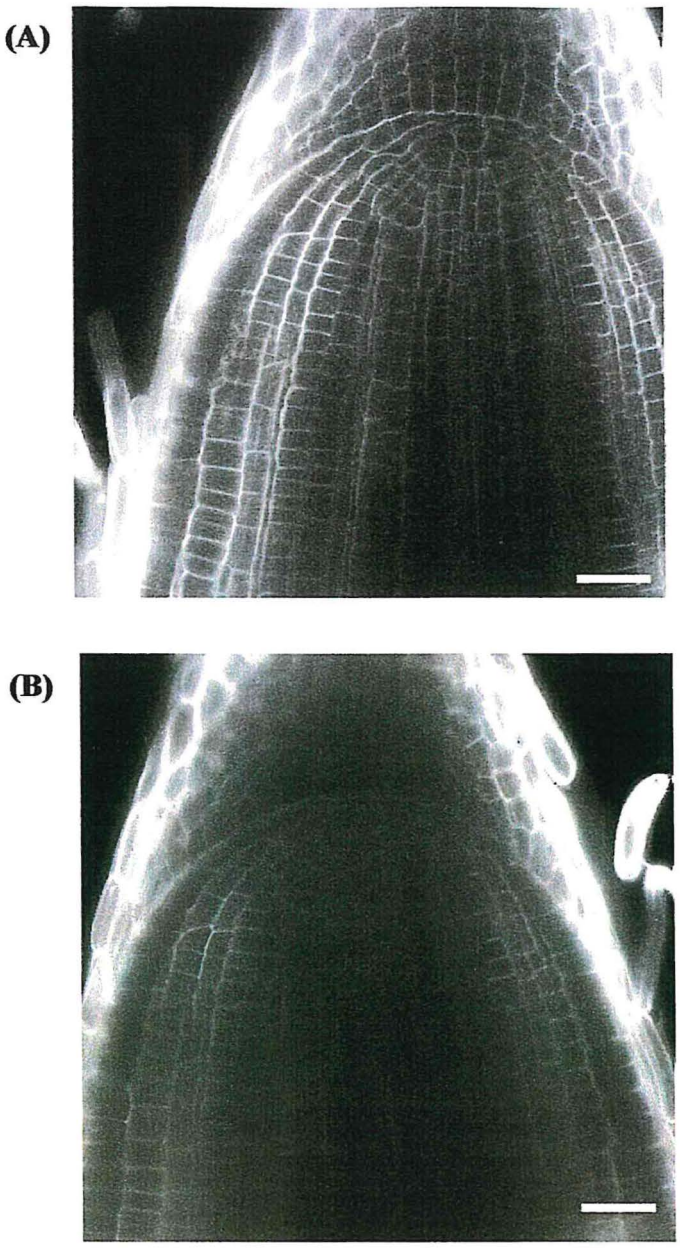


Figure III.1: Median section of an embryonic root using TLSM (A) or CLSM (B). Scale bar : 50µm

SCREENING AND DEEP CHARACTERIZATION OF RICE (*ORYZA SATIVA* L. CV NIPPONBARE) ENHANCER-TRAP LINES FOR ROOT SPECIFIC GENES

J.Rebouillat[1], A. Dievart[1], G. Giese[2], E. Guiderdoni[1] and C. Périn[1]

1 CIRAD, UMR PIA 1096, TA 40/03 Avenue Agropolis 34198 Montpellier Cedex 5, France
2 Max-Planck-Institut fur Medizinische Forschung, Heidelberg, Germany

ABSTRACT

Enhancer trapping is a powerful strategy to identify novel genes and regulatory elements. The Gal4-UAS-GFP system is an enhancer trap system previously designed to trans-activate or inactivate any gene in a cell or tissue specific manner. Several enhancer trap libraries have been established in rice but limited applications for root expression at the cellular level were available, due to several reasons. The anatomy of rice roots is complex. The significant thickness of rice roots makes classical confocal microscopy ineffective in inner tissus. The development of an efficient high resolution microscope is then needed to locate GFP expression in a cell specific manner. We first developed a fast and efficient protocol to visualize GFP and cell walls in median longitudinal view of intact root tip using a two photon imaging system. We screened a library of enhancer trap lines produced in our laboratory to identify root specific and root cell specific GFP lines. More than 2680 lines were screened for GFP expression in roots of T_1 seedlings. Among the lines with GFP expression, 25.7% exhibited GFP expression in the root system while 5.4% expressed GFP specifically in a root organ or specifically in a tissue(s). Seventy five lines displaying either cell specific or root specific GFP expressions were deeper characterized in the T_2 generation. Sixty five lines were confirmed in the T_2 generation for GFP expression and 6 were characterized at the cellular level using a two photon microscope to get clear insights of the tissue(s) expressing the GFP. Flanked Sequence Tag (FST) of T-DNA borders of some positive T_2 lines were then isolated, sequenced and located on the rice genome. This library of the rice root specific enhancer trap library will be an efficient tool to identify roots associated genes or developmental molecular markers. The application of the selected population of enhancer trap lines expressing Gal4-GFP in specific root tissues to decipher root morphogenesis or to clone tissue-specific enhancers will be discussed.

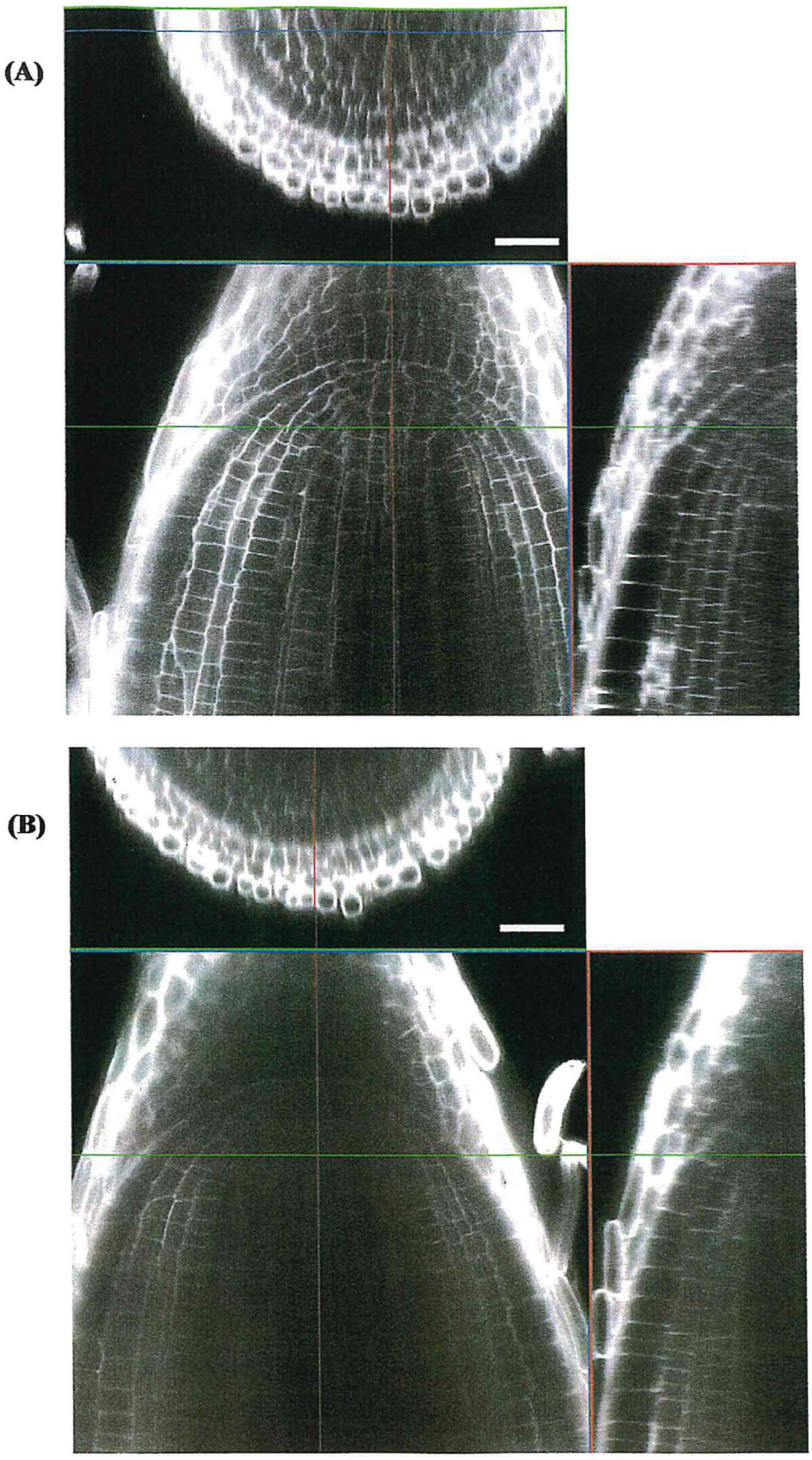


Figure III. 2: Orthogonal view of an embryonic root using TLSM (A) or CLSM (B).

INTRODUCTION

Enhancer trap technology was successfully used in the past to isolate genes with tissue, stage specific, or even cell specific gene expression, mainly in *Arabidopsis thaliana* (Campisi et al., 1999; Engineer et al., 2005; Laplaze et al., 2005; Liu et al., 2005). Recently, with the emergence of rice as a model species for monocotyledons several enhancer trap libraries have been produced, including GUS or GFP as reporter genes (Wu et al., 2004; Johnson et al., 2005). The Gal4 enhancer trapping system was first developed for *Drosophila melanogaster* (Brand and Perrimon, 1993). This enhancer trap system can be used to screen for expression pattern under cellular enhancer. Moreover, targeted expression of another gene can be done by crossing or overtransformation using a UAS construction. The Gal4 transcription factor can then drive any gene of interest in a tissue or cell specific manner. For instance, a gene of interest can be misexpressed in a specific tissue, or downregulated using a UAS-RNAi construct. Targeted cell ablation is at hand by transactivation of a UAS diptheria toxin gene construct. The Gal4 enhancer trapping system is a toolbox broadly used by many developmental biologists but the first prerequisite is the production of a large library of randomly inserted Gal4 enhancer trap T-DNA constructs followed by a thorough characterization of their resulting individual expression pattern.

In the frame of a Genoplante project we produced 9 000 independent T_0 transformants with the Gal4-UAS-GFP construct in collaboration with Cambridge University (Johnson et al., 2005). A first broad screen of GFP in T_0 and T_1 was achieved and epifluorescence data were stored in the Oryza Tag Line database (Larmande et al *in preparation*, http://genoplante-info.infobiogen.fr/OryzaTagLine/). Demonstration of transactivation in root epidermal cell was also done using the GUS reporter gene (Johnson et al., 2005). A first set of 7 500 FST were generated for a subset of our T-DNA collection mainly of the GUS enhancer trap subset part of the collection (Sallaud et al., 2004). These FSTs were generated from 15 000 independent enhancer trap lines using GUS as a reporter gene and are accessible through OryGenesDB, a database dedicated to rice reverse genetics (Droc et al 2006 *in press,* http://orygenesdb.cirad.fr). This opens the possibility to identify enhancer trap lines with root specific GFP expression to study molecular genetics of root rice development.

A pitfall of this strategy is a need of imaging solution to locate and follow GFP *in vivo*. First, ones need it for a precise localisation of GFP expression during the screening but also to use these lines as molecular markers, or to target cell specific gene expression. The classical imaging system dedicated to monitor GFP expression in plant is the Confocal Laser Scanning

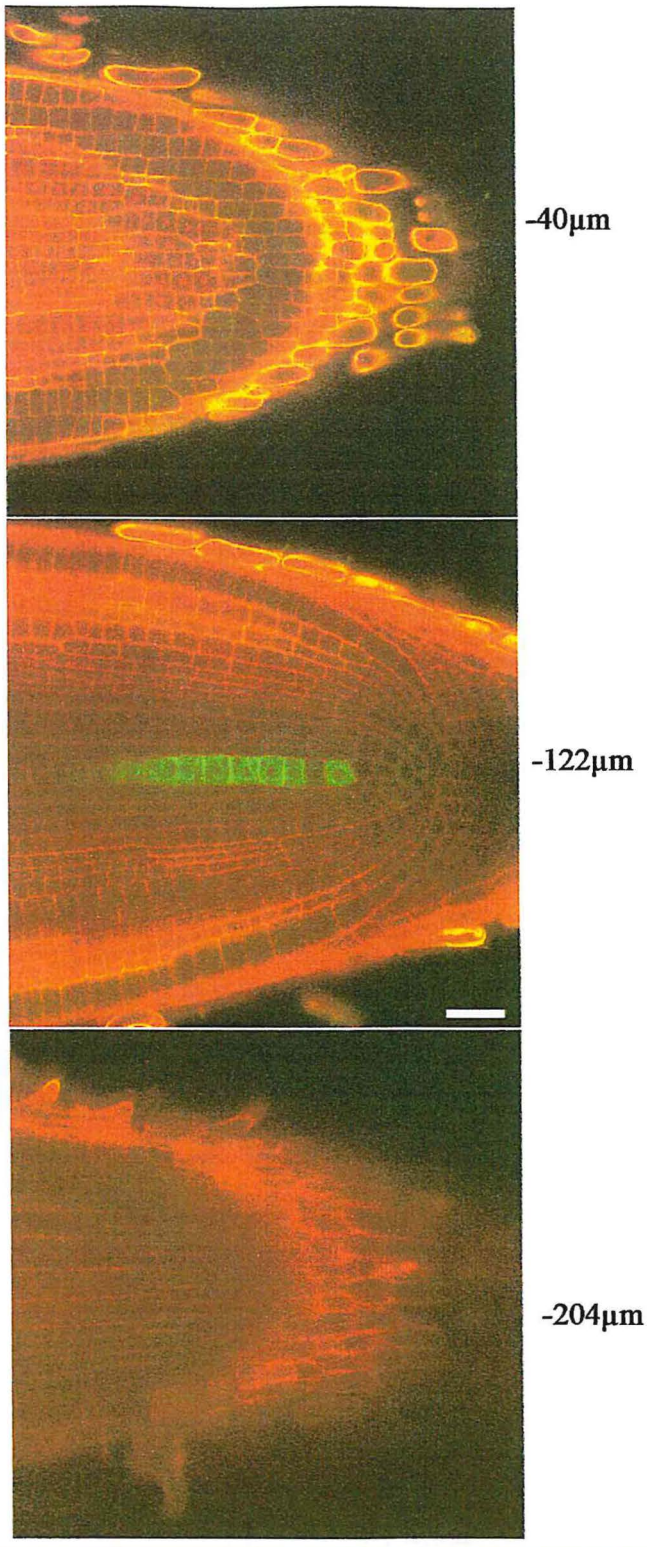


Figure III.3 : Longitudinal view of the GPL10 line embryonic root using TLSM at 40µm (A), 122µm (B) and 204µm (C) from the root surface. Pseudocolor for Propidium Iodide (cell wall staining) and GFP are respectively in red and green. Scale bar : 50µm

Microscope (CLSM). Double labelling using Propidium Iodide that specifically stains cell walls is by far the most popular system used by plant molecular biologists to follow GFP, especially but not exclusively, for people working with the plant model *A. thaliana*.

A. thaliana roots are very thin and then are accessible to CLSM. Unfortunately, this is an exception and if CLSM is able to penetrate 30-50μm inside the *A. thaliana*, enough for an optical median view of the whole root, most of other species roots are several times thicker. Let's say that a primary root of rice close to the apex, has a diameter of 300μm, so for a median view, ones need to penetrate as deep as 150μm inside the root apex. CLSM is then useless for our purpose at least if we want to keep the simplicity of viewing whole root structure at the cellular level without fixing and sectioning. In the last few years, Two-photon Laser Scanning Microscope (TLSM) had progressively become a standard technology for cell biology laboratory, among them TLSM was very popular for neurobiologist (Helmchen and Waters, 2002; Hubener and Bonhoeffer, 2005; Niell and Smith, 2004; Oertner, 2002) and TLSM at >500μm deep in nervous tissues is possible (Levene et al., 2004; Oheim et al., 2001). TLSM has recently demonstrated its advantage like improvement of signal-to-noise ratio but more important for thick-tissue penetration. Applications for plants are scare, but Feijo and Moreno (2004) reviewed most of the TLSM application to plant and give insight of the high potential of the TLSM for plant cellular biology. Thus, TLSM application seems promising for deep penetration in thick roots.

We demonstrate the feasibility of deep characterization of cell specific pattern in primary roots of rice using an optimized protocol for deep root penetration in living primary rice root using TLSM. We point out the critical points for high quality imaging of cell wall and GFP expression for imaging as deep as 200μm. We report the isolation of positive enhancer trap lines showing root tissue specific expression. Flanking Sequence Tags (FST) for all the positive T_2 identified were isolated and mapped to rice genome and several independent T_2 progeny for each T_1 positive line were checked for GFP segregation. The applications of this library of enhancer trap lines expressing Gal4-UAS-GFP in specific root tissues to decipher root morphogenesis or to clone tissue-specific enhancers will also be discussed.

MATERIALS AND METHODS

Enhancer trap transgenic lines

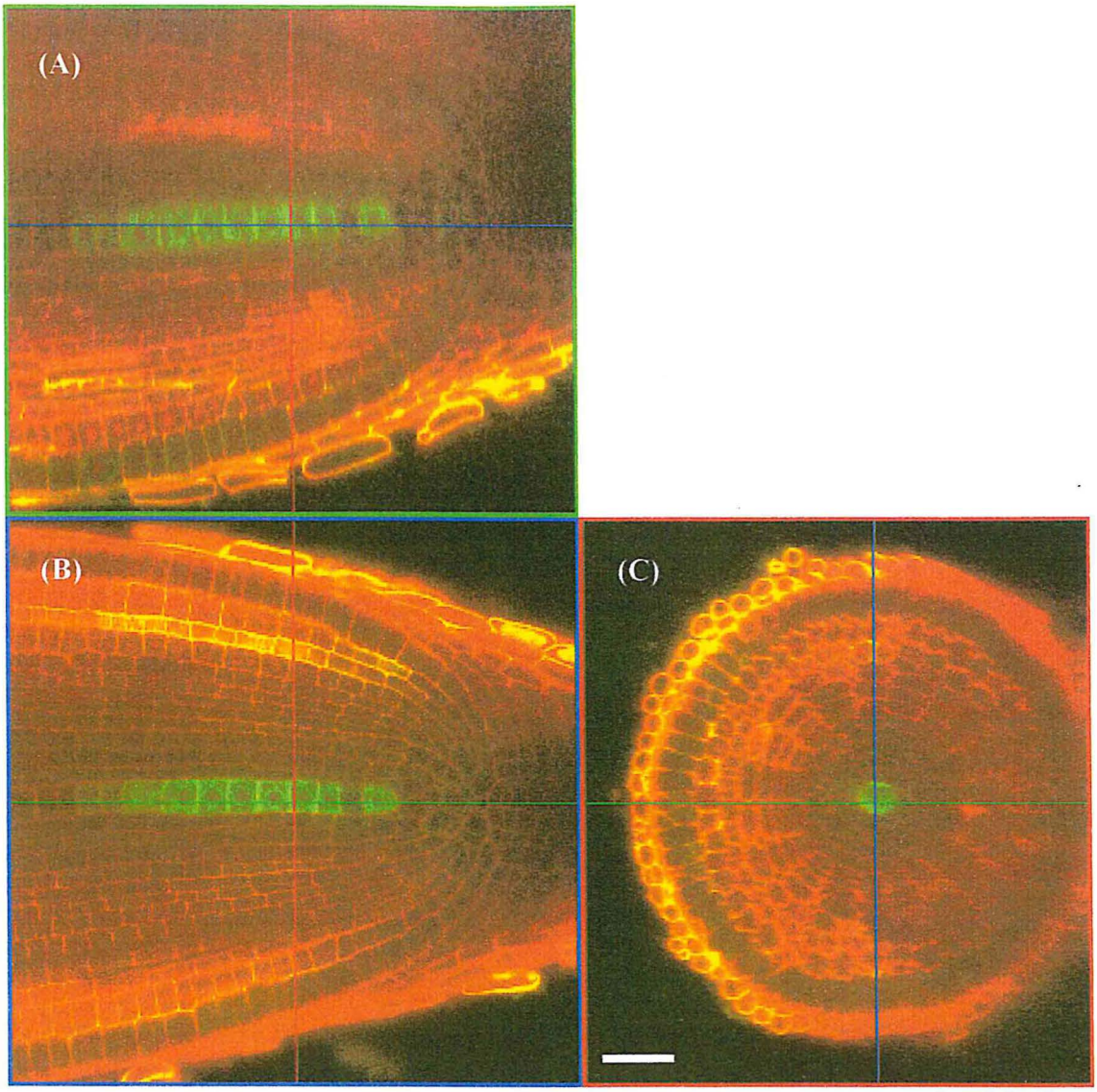


Figure III.4: Orthogonal view of the whole GPL10 line embryonic root using TLSM (A) sagital view, (B) Longitudinal view (C) transversal view. Scale bar : 50µm

The Gal4-UAS-GFP transgenic lines were produced through *Agrobacterium tumefaciens* transformation (Sallaud et al., 2003). The *gfp* reporter gene (Haseloff et al., 1997) targeted to the endoplasmic reticulum was placed downstream of a -90CaMV 35S minimal promoter TATA and five tandem UAS sequences to which the GAL4 protein binds and activates transcription. See Johnson et al. (2005) and Sallaud et al. (2004) for more details on constructs.

Plant growth conditions

Rooted T_0 seedlings of *Oryza sativa* L. cv Nipponbare were transferred to the greenhouse in Jiffy peat pots, and moved to soil after 15 days. Seeds were harvested from fertile lines, dried for 3 days at 37°C, and placed into cold storage (4°C, 30% humidity). For T_1, T_2 and T_3 screening, control wild type and mutant lines seeds were sterilized in ethanol 70%, and then in 40% sodium hypochlorite and let for imbibition in sterile water in Petri dishes. Subsequently, imbibed seeds were transferred in sterile conditions to Petri plates (20cmx20cm) containing sterile half strength Murashige and Skoog (MS) mixture with half strength vitamins, pH 5.8 with 0.8% agar. Plates were placed vertically with an angle of 15% from the vertical in a growth chamber at 25°C, 60% humidity, and under a 12 hours photoperiod. T_1 Seedlings showing significant GFP expression in root were transferred in greenhouse. T_2 and T_3 were also screened in the same manner, allow growing until adult stage, and seeds of each plant were harvested individually.

GFP Screening

Expression of GFP was assessed at different stages: (1) T_1 seeds 16 h after imbibition in Petri dishes on moist filter paper; (2) 1-week-old T_1 seedlings at the second-leaf stage; (3) 1-week-old T_2 seedling; and (4) 1-week-old T_3 seedling. GFP fluorescence in living tissues was detected using a Leica MZ FLIII fluorescence stereomicroscope (Leica Microscopie Systems SA, Heerbrugg, Switzerland) and GFP Plus fluorescence filter set [GFP2, 460-500 nm excitation filter and longpass of 520 nm barriers filter]. Images were acquired using a Leica DC 300F digital camera. All images were processed for publication using Adobe Photoshop CS (Adobe Systems, San Jose, USA).

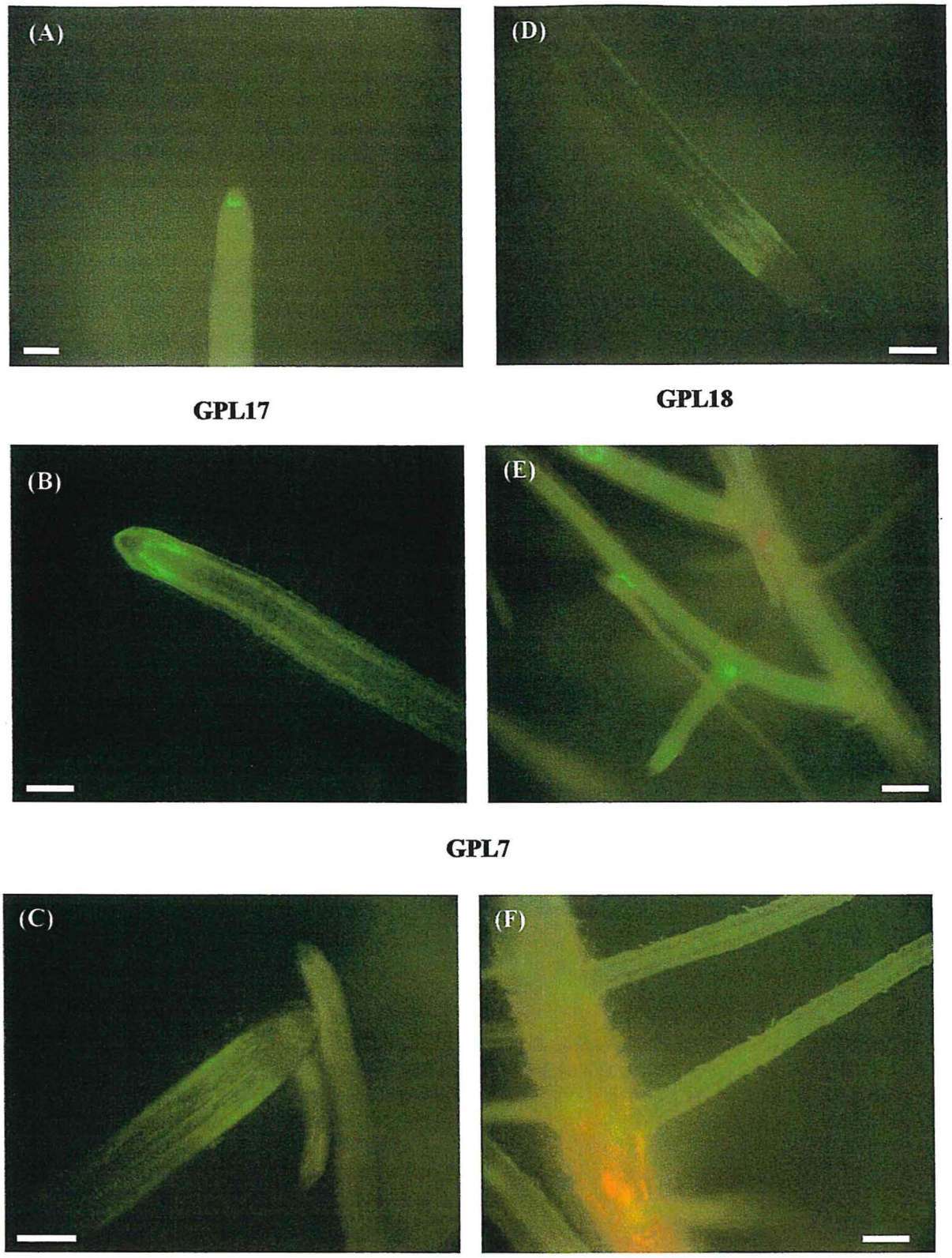


Figure III.5: Root specific GFP pattern view using stereomicroscope. Scale bar A, B, C, D, E : 200µm; F : 100µm

Two photon Laser Scanning Microscopy (TLSM)

Root tip were dipped into Propidium iodide at 10μg/ml during 10 mn then briefly washed with distilled water three times. Root tips were included in low melting agarose at a 0.5% then mounted between a slide and a cover slip of 170μm±1μm. Root tip were scanned using a TLSM equipped with a chameleon laser at an excitation wavelength of 780 nm. The GFP and PI emissions were collected in separate channels with respectively a bypass of 500–550 nm and a bypass of 570- 640 nm using 4 external Non Descanned Detector (NND), two were placed above and two beneath the samples. All channels were then overlaid to create composite images and locate GFP expression in a cell specific manner. For cell wall autofluorescence, the excitation wavelength was also at 800 nm but only the internal descanned detector was used with a longpass of 510 nm. All images were processed using Zeiss LSM5 software. For images stack, the autobrightness correction was applied.

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Root tip were stained and prepared following the same protocol as for the TLSM. A Leica LSM 510 confocal microscope with an argon laser was used for imaging at a wavelength of 488 nm. GFP and PI emissions were collected in separate channels with respectively a bypass of 500-550 and a longpass of 610 nm and then overlaid to create composite images. Images stack were produced following the same procedure as described for the TLSM.

DNA extractions

Fresh leaves (30 mg) of young regenerated plants were collected in a 96-collection tube format, deep frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Tissues were disrupted by adding a stainless-steel bead to each tube of the 96-well rack and shaking the rack for 1.50 min in a clamp attached to a stationary reciprocating saw. Genomic DNA was extracted with the Qiagen DNA extraction kit according to the manufacturer's procedures.

Molecular analysis of the T-DNA flanking borders sequences

Amplification of T-DNA left and right borders flanking sequences was done by PCR walking (Devic et al. 1997; Siebert et al. 1995). It consists of three steps: ligation, polymerase chain

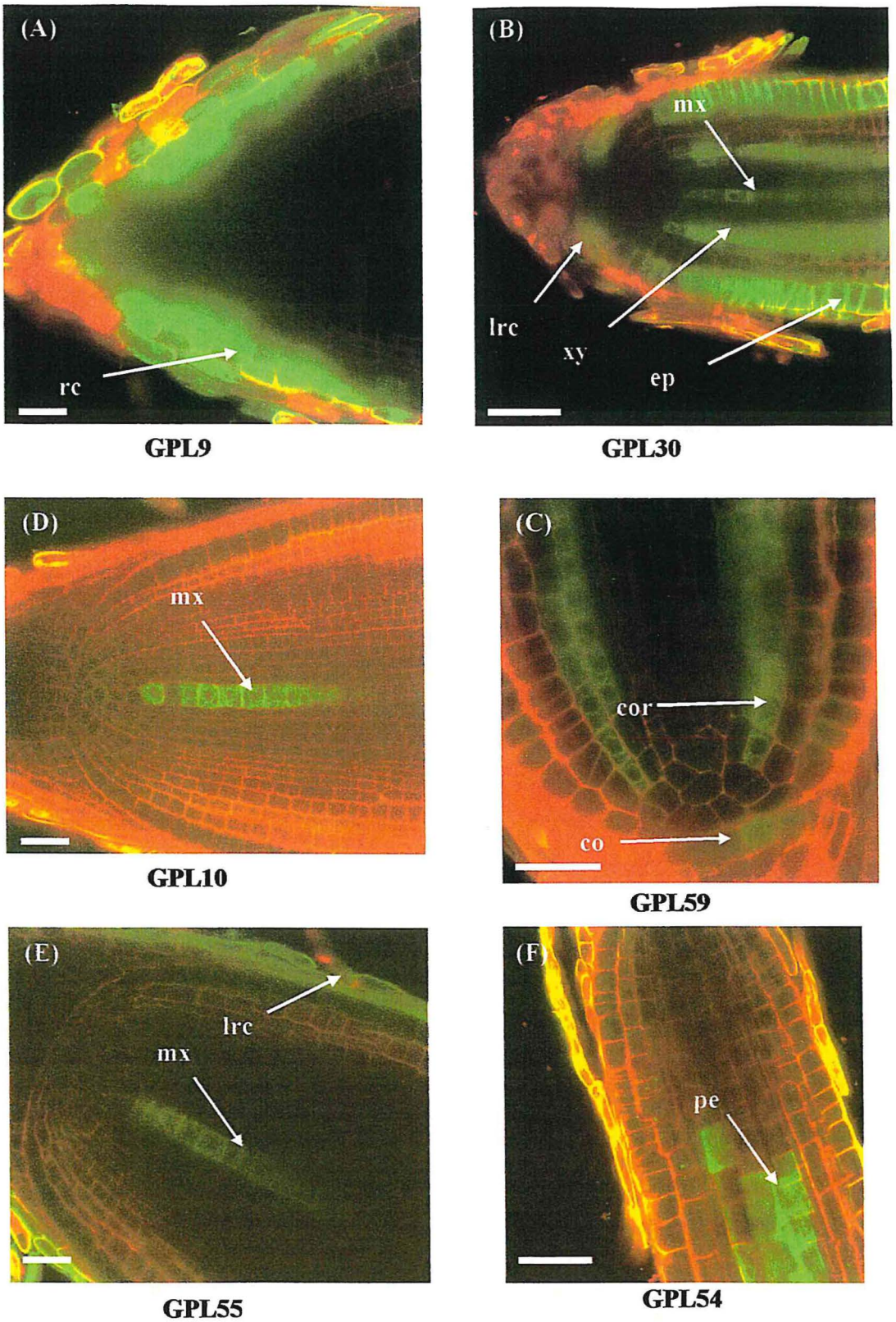


Figure III.6: Root specific GFP pattern TLSM. rc: root cap, lrc: lateral root cap, co: columella, ep: epidermis, xy: xylem, mx: central metaxylem, pe: pericycle, cor: cortex. Scale bar A, C, D, E : 50µm; B et F : 100µm

reaction PCR1 and PCR2. For the left border: Each DNA sample (25 ng) was digested separately with the *Dra*I, *Nae*I or *Ssp*I restriction enzymes (10 u/μg) and ligated with the ADPR1/ADPR2 adaptor using T4 DNA ligase at 25 °C in 10-mgrl volume. The adaptor was prepared by annealing the complementary oligonucleotides, ADPR1 (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGCCGCCCGGGGAGGT-3') ADPR2 (5'-P-ACCTCCCC-NH2-3') by incubation at 94 °C for 5 min in restriction enzyme buffer no. 4 (Gibco-BRL, Gathersburg, Md.) followed by gradual cooling to 28 °C. PCR1 was performed with a specific adaptor primer, AP1 (5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'), and a specific T-DNA left border primer, HYG1 (5'-ATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATTT-3'). PCR reactions contained 2ml of the ligation/digestion, 1× PCR buffer (Eurobio), 0.25 u *Taq* DNA polymerase (Eurobio), 50 *M* dNTP, 1.5 m*M* $MgCl_2$, 200 n*M* AP1 and HYG1 primers in a 20-mgrl volume reaction. Cycle conditions were performed in a MJR thermo-cycler (MJR Research, Mass.) as follows: 5 min at 94 °C followed by 29 cycles of 94 °C 30 s, 67 °C for 45 s, and 72 °C for 2 min and 30 s. A last cycle–the elongation step – was carried out at 72 °C for 5 min. PCR2 was performed with a nested specific adaptor primer, AP2 (5'-CTATAGGGCTCGAGCGGC-3'), and a nested specific T-DNA left border primer, CAMB3 (5'-AGATGCCGACCGGATCTGTC-3'). PCR2 was performed with a 1/50 dilution of the PCR1 product using the same conditions as for PCR1, except for the final volume of the reaction which was adjusted to 100 mgrl. A 4-mgrl aliquot of the PCR2 reaction was loaded on a 1.2% agarose gel for electrophoresis. After gel staining with ethidium bromide, PCR products showing a unique band were then directly sequenced with a third nested specific T-DNA primer, CAMB6 (5'-CGCTCATGTGTTGAGCATAT-3'), by Genome Express (Grenoble, France). For the right border, same conditions were used except the primers were:
GRB3 (5'CGATGGAGGACAGGAGCTTCATTG-3') GRB7 (5'-AGAGGAAGGGTCTTGCGAAGATCC-3') with restriction enzymes SspI, EcoRV and DraI.

Sequence analysis

Identification of the T-DNA footprint and binary vector sequences as well as assignation of T-DNA insertion on rice BAC/PAC sequences were carried out by similarity searches (BLASTN) in a pipeline using a perl program (Brunaud et al., 2002). BAC/PAC sequences were downloaded from the NCBI site (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) according to the BAC clone list on the RGP web page (http://www.rgp.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/statusdb/irgsp-

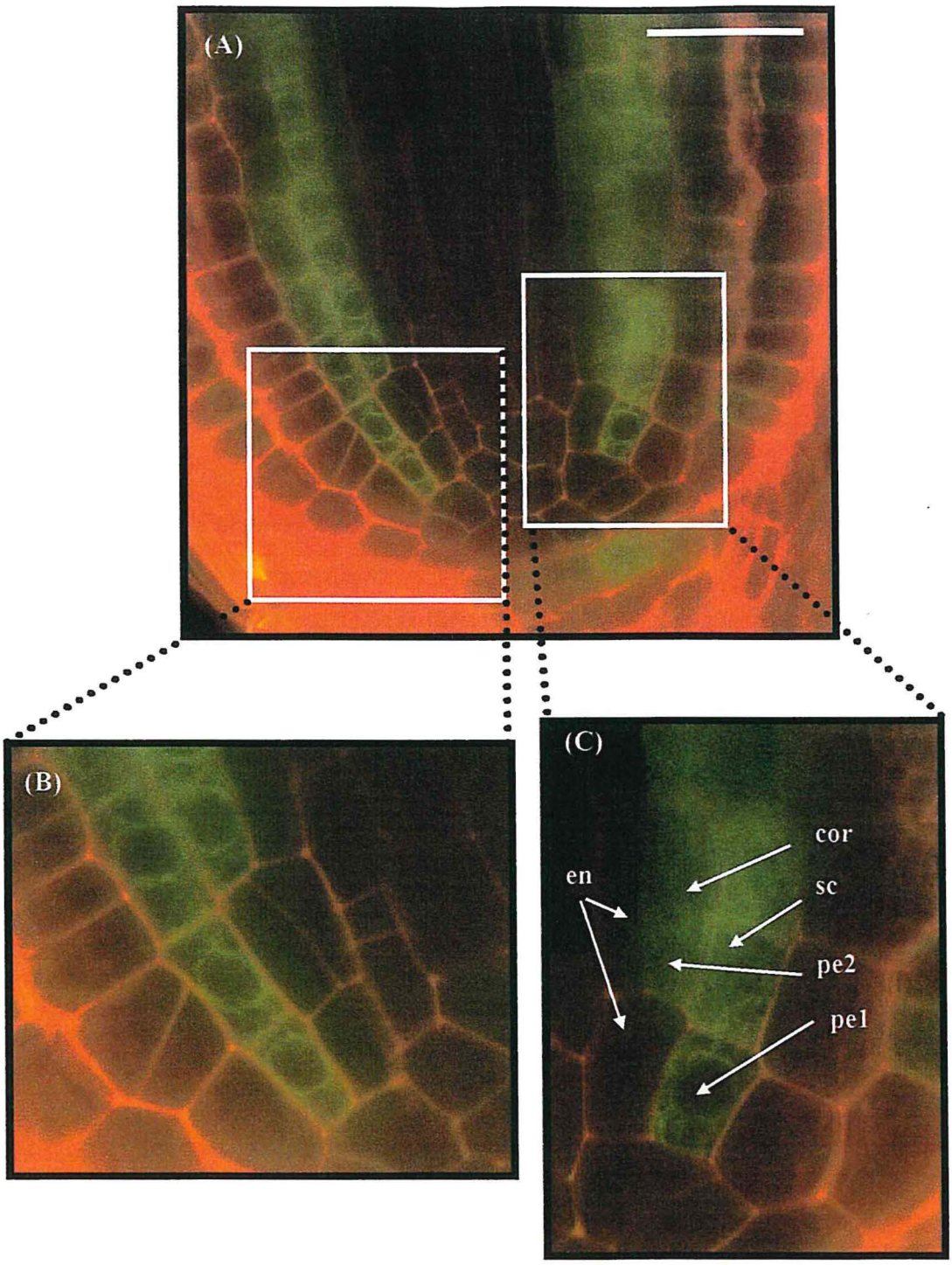


Figure III.7: GFP expression cortex, epidermis and columella specific. Detail view of the cortex initials in GPL59 line. En=endodermis, co=cortex, sc=sclerenchyma, pe1=periclinal division of endodermis giving rise to the sclerenchyma layer, pe2=periclinal division of endodermis given rise to a cortex cell layer. Scale bar : 50µm

status.cgi) and pseudomolecules from the TIGR site at http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/pseudomolecules/info.shtml. See (Droc et al 2006 *in press*) for more details (http://orygenesdb.cirad.fr). T-DNA footprint was identified using a home made perl script and vector containing sequences was removed from FST. FST positions were then assigned to rice pseudomolecules using BLASTN software with an e-value of 1e-10 and percentage of similarity up to 95%. All the predicted genes and cDNA located nearby or inside a FST were extracted from the OryGenesDB database.

RESULTS

TLSM as a tool for whole root imaging at the cellular level

TLSM improves greatly penetration and allow visualization of internal cellular structure with the associated GFP in a median optical view of a thick primary rice root. We first checked several issues for TLSM. First, we optimized the choice of a high resolution lens for TLSM. Three high resolution lenses were used, a 40x water immersion aperture 1.2 (C-Apochromat), one 63x water immersion (C-Apochromat 1.2W) and one 63x oil immersion (C-Apochromat 1.3W). We recorded the area of the measured intensity after averaging several time at 50μm inside the fluoresceine (10μg/ml) at a wavelength of 800 nm. Amazingly, there is an order of magnitude of 10 between the best objective and the worst. The 40x gave the best result while the 63x water immersion is three times less performing followed by the worst one the 63x oil immersion with a 10 times lower signal emission. As pointed out by Feijo and Moreno (2004), and Levene et al. (2004), this demonstrates that the choice of an optimal lens objective is a critical issue for TLSM. We then try to improve embedding process of root. Direct imaging of agar embedded using the 40x water immersing lens gave totally useless results (data not shown) probably because the laser focus in this surface is not sharp enough. The best result was achieved using 0.5% low melting agarose as embedding media, two spacers and a cover slip with a 170μm±1μm. The need of such constraints on cover slip thickness is a critical issue for high resolution scanning as any variation in thickness will degrade laser focus at high resolution scanning. In order to improve as much as possible the penetration we decided to shift to external non descanned detector (ENDD). During penetration, a better photon collection could be done either by up or down ENDD, depending of course of the actual position of the scanning. We found, as a rule of the thumb, that the

better solution was to use the four available ENDD in two channels, one for PI and the other one for GFP.

In order to compare CLSM and TLSM performance, we did two stacks of an adventitious rice root and try to get clear images as deep as possible. For the CLSM, the penetration was 60-80μm with a laser Argon power at 80% and an optical resolution at 1.6 μm. With TLSM we were able to record images at 120 μm (Figure III.1). Chameleon laser was at 85% of its maximal power, since we chose a wavelength of 800 nm theoretically generating the maximum of laser power. The same slice interval of 1.5μm was used for CLSM and TLSM and the orthogonal view clearly demonstrate the better performance of TLSM (Figure III.2). Cell boundaries cannot precisely define. After 3 cell layers for CLSM while for TLSM cell wall are clearly visible even up to 150μm deep (Figure III.2). As a proof of concept, we made another stack on enhancer trap root specific line GPL10. CLSM was used to analyse root GFP expression of an embryonic root. GFP and PI were recorded in two separate channels. We used the four ENDD for the two channels and overlaid them to create composite image. A half optical median show without any doubt that GFP expression is specific to the central metaxylem vessel and the first metaxylem cell expressing GFP coming back to anticlinal division of the metaxylem initial (Figure III.3). A 220μm stack of the whole GPL10 root tip was made using the autobrightness correction with an optical section of 1.5μm for each slice. Orthogonal view demonstrates that cell boundaries could be still well defined as deep as 200μm (Figure III.4).

GFP expression in various tissues of the rice root system

Bright GFP fluorescence, localized to the endoplasmic reticulum (Haseloff et al., 1997), was detected by epifluorescence microscopy in a wide range of cell types of all major organs of the rice plant at an overall expression frequency of 32% for lines analysed at the T_0 adult, T_1 seed and seedling stages. For the T_1 seedling stage, the GFP expression frequencies for root consistently averaged 25.7%. Around 5.4% are specific to (an) organ(s) (adventitious root, embryonic root, lateral root) or tissue(s) (vascular, pericycle, endodermis, epidermis). We screened 2683 T_1 T-DNA enhancer trap Gal4-UAS-GFP insertion lines. Seventy five lines with either cell specific or root specific GFP expression were subject to a deeper characterization in the T_2 generation. Three T_2 progeny of 20 seedlings coming from three independent GFP positive T_1 seedling lines were observed. A total of 165 T_2 progeny of 20 seedlings coming from 75 T_1 lines were analysed for GFP expression plant by plant. Sixty

five lines were confirmed in the T_3 generation for GFP expression while 10 did not express GFP. A silencing rate of 13% is observed between T_2 and T_3 generations. Twenty lines (31%) were fixed for GFP expression while 45 lines (69%) had progenies segregating for GFP (annexe : Table III.1). We examined GFP expression pattern under stereomicroscope and found expressions in almost all rice root tissue types, like epidermis, sclerenchyma, cortex, endodermis, and vascular bundles (annexe : Table III.1).

Very specific patterns were found, probably because of enhancer trap insertion close to genes tightly regulated during development, for instance inside root meristem (Figure III.5A & 5B) or transiently in epidermal cells (Figure III.5D). But most of the patterns were more complex with GFP expressed differently in several root types. GPL7 lines exhibited a specific GFP expression inside root meristem and in epidermal cells for the primary roots while the GFP expression in lateral roots was vascular (Figure III.5B & 5E). GPL59 is an another example of a complex GFP pattern with GFP expression in early epidermal cells (Figure III.5C) in embryonic roots but a vascular expression in lateral roots (Figure III.5F). Nevertheless, some very specific GFP patterns were recovered with cell specific expression. All of these lines have also meristem expression of GFP suggesting that their T-DNA insertion are close to an enhancer tightly regulated spatially and developmentally. One line has a root cap specific pattern, 2 lines an epidermis specific pattern and 9 a stele specific pattern. Stele specific lines need more investigation because they can correspond to several distinct expression pattern in ground (cortex, endodermis) or vascular (pericycle, xylem, phloem) tissues. TLSM investigation will help to precise the cell pattern of these lines and help to characterize GFP expression in initials cells for these tissues. Twelve lines had an organ specific pattern. Nine seems specific to the lateral roots while 3 appeared specific to the primary roots.

TLSM laser scanning microscopy (TLSM) enabled a more detailed examination of some GFP expression patterns in the roots of enhancer trap lines selected by epifluorescence microscopy. Some lines are clearly cell specific, for instance GPL9 is root cap specific, GPL10 is metaxylem specific and GPL54 is pericycle specific (Figure III.6) but with no expression in the meristem. Again, some GFP profiles are more complex with GFP expression is several tissues. GPL30 GFP expression in a large lateral root tip was found in lateral root cap initials, epidermis but also in endodermis and central large metaxylem vessel. GPL55 was classified as stele and epidermis specific but TLSM optical view shows an expression in central metaxylem vessel, in epidermis and in lateral root cap (Figure III.6). TLSM achieve a deep characterization of cell expression pattern as demonstrated also for GPL59 classified as vascular for lateral root. Actually, GFP expression is not vascular but cortical and columella

specific suggesting the need of TLSM all the positive root specific GFP lines to clarify their GFP patterns at the cellular level. GPL59 GFP expression in ground tissue first appears after the third periclinal cell division of the epidermis-endodermis in a cell layer that will become the sclerenchyma layer (Figure III.7A, 7B & 7C). Then GFP appears in any subsequent cell layer coming from successive divisions of endodermis but never in endodermis itself (Figure III.7A, 7B & 7C).

Flanking sequence Tag

We first established a protocol for sequencing the right border of the T-DNA and first tried this protocol to isolate right borders FST for 42 lines. Unfortunately, most of them, 87 % were found to correspond to tandem insertions or sequence of bad quality. The right border T-DNA footprint is always found but followed most of the time by the T-DNA left border sequence with small or large deletions indicating that most of the T-DNA insertions were inserted in tandem repeat. We then decided to use the left border protocol to isolate FST for all the T_2 lines. A total of 112 FST corresponding to 69 independent insertions were isolated for 55 lines and 10 lines did not get any FST (Table III.2). Twenty two insertions were located in intergenic region, more than 2kb away from any annotated gene and fifteen FST do not match on the rice genome based on our quality controls. Thirty three independent insertions were found inside annotated genes or in promoter regions defined as 800 pb upstream the starting codon. Insertions were found for instance, in transcription factors, as a MADS-box like gene or a putative Myb-like protein, in a P-ATPase Ca2+ dependent pump but also in or nearby genes of unknown function (Table III.2). Sixteen FST were inserted in forward orientation according to the gene position and could be considered as putative candidates for the GFP patterns seen in these lines while seventeen were in reverse positions. Segregating T_2 lines for GFP will enables checking if the correct enhancer was identified by cosegregation with the candidate T-DNA insertion.

DISCUSSION

As described for brain imaging (Levene et al., 2004; Oheim et al., 2001) but also for cellular plant biology (Feijo and Moreno, 2004), TLSM overcomes some of the CLSM limitations, better signal to noise ratio but more important, allow a deeper penetration in thick samples. In our case, TLSM penetrate 3 times deeper than CLSM on a same sample in optimal conditions

so up to 200μm around the focal limit of the objective we were using. As primary rice root tip are around 300-350μm diameter this is enough for a median optical view of a root. The optimal wavelength of 800 nm was a compromise to see GFP and PI during the same scanning process. A wavelength of 720 nm got even better results for PI (data not shown) but increases the probability of cell damage as it is close to UV illumination (720 nm via 2-photon excitation). For GFP, a wavelength of 850 nm is the optimal but at this wavelength we lose around 20% of laser power, so less penetration and the PI staining is hardly visible. For smaller roots, like *A. thaliana*, or for rice lateral roots, TLSM allows complete scanning of the whole organ and 3D reconstructions has been performed. A more promising issue will be going through 4D reconstruction of root growth. This is at hand as several protocols to grow isolated root apices were developed in *A. thaliana*, rice and in several other species. This will open the way to follow in vivo the whole root organ growth with a sub cellular precision.

We have screened our rice enhancer trap library with detailed attention to root specific patterns. The major GFP pattern detected in root was in the zone of lateral root emergence (lrz). Lateral root emergence is a complex process tightly regulated by hormonal interactions but also induces wounding and cell death given a first explanation of the frequent occurence of lrz GFP pattern. Most of the root-specific GFP patterns found were complex, suggesting that root specific genes are mostly involved in cell differentiation in several tissues and during several developmental stages. Nevertheless, some lines were isolated with cell specific expression and/or organ specific GFP patterns. One line has a root cap specific pattern, 2 lines an epidermis specific pattern and 9 lines a stele-specific pattern. TLSM investigation will help to precise the cell pattern of these lines in the future. These lines will be used to manipulate root architecture by targeted cell ablation (Laplaze et al., 2005) or transactivation has we already demonstrated this possibility (Johnson et al., 2005). The organ specific lines remains to be confirmed in adult plants as all root types, including embryonic, adventitious and lateral roots are not always visible at the seedling stage.

Several T-DNA insertions found from the enhancer trap lines are candidates for driving GFP expression. Sixteen insertions were found inside or nearby predicted genes in the correct orientation, and one of them (GPL8) was found in the vicinity of a transcription factor, namely a MADS-box like. The closest homolog found in *A. thaliana* was AGL16 recently classified inside the ANR1 subclade (Parenicova et al., 2003), a MADS box involved in nitrate induced root architecture modifications (Gan et al., 2005; Zhang and Forde, 1998). Further characterization of this line will provide information concerning molecular event

during root development. The MADS-box like gene can be involved in root development in rice. GFP expression for the MADS-box like is found in stele/epidermis and deeper characterization of this line will be undertaken. It is then feasible to use these lines for identifying root cell specific genes.

In order to obtain tools to study the molecular and cellular bases of root development in rice, a population of 2683 GAL4 enhancer trap lines was screened and 12 root cell specific were recovered among 65 root specific lines. Flanking sequences for these root specific lines were isolated. These lines will be used in the future to get deep insight into rice root development by visualizing cell position and fate during development, cloning of root specific promoter and targeted activation or inactivation of root development genes.

Le criblage racinaire spécifique de près de 3000 lignées sur 9000 contenant une insertion enhancer trap Gal4-UAS-GFP générées dans le cadre du projet Génoplante, a été réalisé et a permis d'identifier des lignées GFP spécifiques des tissus racinaires. Ces lignées spécifiques seront utilisables comme marqueurs du développement, pour la capture d'enhancers, ou encore pour l'analyse fonctionnelle de gènes (suractivation de facteurs de transcription, inactivation de gènes de manière cellule ou tissu spécifique).

Nous avons par ailleurs optimisé la méthode de criblage racinaire spécifique de cette collection, qui consistait jusqu'à maintenant en une observation *in vivo* d'une éventuelle expression de la GFP sous loupe binoculaire. L'observation fine de ces lignées au niveau cellulaire, nous a été permise via l'utilisation d'un microscope biphoton ou TLSM. Alors que la visualisation des tissus racinaires d'*Arabidopsis* se fait aisément via un microscope confocal (CLSM), l'accès à la structure interne de la racine de riz est rendu plus difficile. Ceci est du principalement à la différence d'épaisseur entre les deux racines. Nous avons ainsi pu comparer la pénétration des tissus racinaires de riz avec les deux types de méthodes, et nous avons montré que le TLSM permettait un accès total à la structure racinaire de riz. Ce système permettra alors de confirmer les expressions GFP d'intérêt que nous trouverons via une première approche sous loupe binoculaire. En effet, ce criblage racinaire sera poursuivi pour les autres lignées enhancer trap, afin de compléter la collection racine spécifique avec des expressions plus fines.

Dans la construction utilisée, le gène codant pour l'activateur transcriptionel Gal4 sert d'élément de piégeage tandis que le gène de la GFP contrôlé par des séquences activatrices amont (UAS) est l'élément rapporteur. L'intégration de la cassette dans le génome de la plante peut conduire à la détection d'un gène endogène par une activation spécifique de cellules ou tissus de GAL4 et donc de la GFP. En dehors de son intérêt pour la détection de gènes, ce système basé sur la stratégie Gal4 permet la transactivation de manière spécifique des transgènes, contrôlés par les éléments UAS introduits par croisement ou une nouvelle transformation dans une lignée d'activation Gal4, comme démontré chez *Arabidopsis*. Le catalogue de profils GFP racinaires spécifiques constitue donc une ressource originale pour permettre i) l'expression ciblée de gènes d'intérêt dans des tissus particuliers et ii) de manipuler finement des processus physiologiques pour leur compréhension chez le riz dans un premier temps, puis de façon plus générale chez les céréales. Au sein du laboratoire, nous avons déjà montré que cette approche était fonctionnelle en retransformant, à l'aide d'un vecteur de transactivation UAS:GUSA, des cals de 3 lignées pC4956:ET15 montrant des

profils d'expression GFP stables et avec des niveaux d'expression variables. Aucune activité GUS n'a été détectée dans les cals sauvages régénérants transformés avec ce construit indiquant qu'en l'absence d'activation par Gal4, ce construit est incapable de conduire à une expression GUS (Johnson et al., 2005). Une activation stable des gènes GFP et GUS a par contre été démontrée dans les mêmes types tissulaires de racines, feuilles, et fleurs des plantes T_0 régénérées et de leurs descendances T_1. L'activité GUS n'a été observée que chez les plantes positives pour la GFP et leurs descendants ségrégeaient selon un ratio mendélien. Les profils GFP et GUS étaient cohérents non seulement en terme de profil d'expression mais aussi en terme d'intensité des signaux.

Une approche complémentaire qui sera prochainement testée, tire également avantage de l'ADN-T portant le système Gal4-UAS-GFP. Le vecteur de transactivation peut également être utilisé pour inactiver spécifiquement un gène cible par RNAi. Cet outil permettra d'étudier de manière fine le rôle de gènes du développement en fonction de leur site d'extinction ou de sur-activation. Enfin, une autre possibilité est de tester des hypothèses sur le rôle de certaines couches pour la différenciation d'autres couches. Par exemple, est ce que la couche d'exoderme est nécessaire pour qu'il y ait différenciation de la couche sclérenchymateuse ? En d'autres termes, existe-t-il un signal de différenciation émis par l'exoderme ? Une expérience utilisant une construction UAS::DT (toxine diphtérique) couplée à une lignée possédant une expression GFP spécifique de l'exoderme permettra de tester cette hypothèse en détruisant l'exoderme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Atkinson D, Hooker J., 1993. Using roots in sustainable agriculture. *Chem Ind* **4:** 14–17

Brand, A. and Perrimon, N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.

Brunaud, V., Balzergue, S., Dubreucq, B. et al. 2002. T-DNA integration into the *Arabidopsis* genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO Rep.* **3**, 1152–1157.

Campisi, L., Yang, Y., et al., 1999. Generation of enhancer trap lines in Arabidopsis and characterization of expression patterns in the inflorescence. *Plant J* **17**, 699-707.

Chandler, V. L. and V. Brendel 2002. The Maize Genome Sequencing Project. *Plant Physiol* **130**(4): 1594-7.

Chin, H.G., Choe, M.S., et al., 1999. Molecular analysis of rice plants harboring an Ac/Ds transposable element-mediated gene trapping system. *Plant J.* 19, 615–623.

Doi, K., T. Izawa, et al., 2004. Ehd1, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of Hd1. *Genes Dev* **18**(8): 926-36.

Droc G., Perin C., et al (2006). OryGenesDB an interactive tool for rice reverse genetics. *Nucl. Ac. Research.* 1: 34(Database issue): D736–D740.

Engineer, C. B., Fitzsimmons, et al., 2005. Development and evaluation of a Gal4-mediated LUC/GFP/GUS enhancer trap system in Arabidopsis. *BMC Plant Biol* **5**, 9.

Feijo, J. A. and Moreno, N., 2004. Imaging plant cells by two-photon excitation. *Protoplasma* **223**, 1-32.

Gan, Y., Filleur, S., Rahman, et al., 2005. Nutritional regulation of ANR1 and other root-expressed MADS-box genes in Arabidopsis thaliana. *Planta*, 1-13.

Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T. et al., 2002. A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. japonica). *Science*, 296, 92–100.

Haseloff, J., K. R. Siemering, et al., 1997. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(6): 2122-7.

Hayama, R., S. Yokoi, et al., 2003. Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature* **422**(6933): 719-22.

Helmchen, F. and Waters, J., 2002. Ca2+ imaging in the mammalian brain in vivo. *Eur J Pharmacol* **447**, 119-29.

Hirochika, H., Guiderdoni, E., An, G. et al., 2004. Rice mutant resources for gene discovery. Plant Mol. Biol. 54, 325–334.

Hochholdinger, F., Woll, K., Sauer, M. and Dembinsky, D., 2004b. Genetic dissection of root formation in maize (Zea mays) reveals root-type specific developmental programmes. *Ann Bot (Lond)* **93**, 359-68.

Hubener, M. and Bonhoeffer, T., 2005. Visual cortex: two-photon excitement. *Curr Biol* **15**, R205-8.

Ingram H. E., R. M., Kater, M. M., Davies, B. et al. ,2003. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world. *Plant Cell* **15**, 1538-51.

Ito, Y., Eiguchi, M. and Kurata, N., 2004. Establishment of an enhancer trap system with Ds and GUS for functional genomics in rice. *Mol Genet Genomics* **271**, 639-50.

Izawa, T., Y. Takahashi, et al., 2003. Comparative biology comes into bloom: genomic and genetic comparison of flowering pathways in rice and Arabidopsis. *Curr Opin Plant Biol* **6**(2): 113-20.

Jeon, J.S., Lee, S., Jung, K.H. et al., 2000. T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. Plant J. 22, 561– 570.

Jeong, D.H., An, S., Kang, et al., 2002. T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. Plant Physiol. 130, 1636–1644.

Johnson, A. A., Hibberd, J. M., Gay, et al., 2005. Spatial control of transgene expression in rice (Oryza sativa L.) using the GAL4 enhancer trapping system. *Plant J* **41**, 779-89.

Kojima, S., Y. Takahashi, et al., 2002. Hd3a, a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene, promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions. *Plant Cell Physiol* **43**(10): 1096-105.

Kush, A. and K. Sabapathy 2001. Oxy5, a novel protein from Arabidopsis thaliana, protects mammalian cells from oxidative stress. Int J Biochem Cell Biol **33**(6): 591-602.

Laplaze, L., Parizot, B., et al., 2005. Gal4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* **56**, 2433-42.

Levene, M. J., Dombeck, D. A., et al., 2004. In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue. *J Neurophysiol* **91**, 1908-12.

Leyser O, Fitter A 1998. Roots are branching out in patches. Trends Plant Sci **3:** 203–204

Liu, P. P., Koizuka, N., et al., 2005. Large-scale screening of Arabidopsis enhancer-trap lines for seed germination-associated genes. *Plant J* **41**, 936-44.

Miyao, A., Tanaka, K., Murata, et al., 2003. Target site specificity of the Tos17 retrotransposon shows a preference for insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *Plant Cell*, 15, 1771–1780.

Niell, C. M. and Smith, S. J., 2004. Live optical imaging of nervous system development. *Annu Rev Physiol* **66**, 771-98.

Oertner, T. G. 2002. Functional imaging of single synapses in brain slices. *Exp Physiol* **87**, 733-6.

Oheim, M., Beaurepaire, E., et al., 2001. Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth. *J Neurosci Methods* **111**, 29-37.

Parenicova, L., de Folter, S., et al. 2003. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world. *Plant Cell* **15**, 1538-51.

The Rice Chromosome 10 Sequencing Consortium 2003. In-depth view of structure, activity, and evolution of rice chromosome 10. *Science*, 300, 1566–1569.

Sallaud, C., Meynard, D., Van Boxtel, J. et al., 2003. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (Oryza sativa L.) functional genomics. *Theor. Appl. Gen.* 106, 1396–1408.

Sallaud, C., Gay, C., Larmande, P., et al. 2004. High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards in silico reverse genetics. *Plant J* **39**, 450-64.

Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, et al., 2002. Agricultural sustainability and intensive agricultural production. *Nature*, 418, 671–677.

Wu, C., Li, X., Yuan, W. et al., 2003. Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. *Plant* J. 35, 418– 427.

Yano, M., S. Kojima, et al., 2001. Genetic control of flowering time in rice, a short-day plant. *Plant Physiol* **127**(4): 1425-9.

Yu, J. et al., 2002. A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. indica). *Science*, 296, 79–92.

Zhang, H. and Forde, B. G. 1998. An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* **279**, 407-9.

CHAPITRE IV

CARACTERISATION MOLECULAIRE, CELLULAIRE ET PHENOTYPIQUE DU MUTANT HAZAZEL

Le crible d'une partie de la collection de lignées de riz enhancer trap Gal4-UAS-GFP décrite au chapitre précédent nous a permis d'isoler de nombreuses lignées d'intérêt. Au cours de ce criblage nous avons identifié un mutant racinaire avec un phénotype fort que nous nommerons ***hazazel*** (*hzl*) dans la suite de l'analyse. La mort de la racine séminale, qui survient quelques jours après germination, est le trait le plus caractéristique du mutant *hzl*. Ce mutant se développe avec retard par rapport au type sauvage, reste petit et peu vigoureux, talle peu et produit peu de panicules et aucune graine. De plus, le développement post embryonnaire des racines est fortement perturbé. Le méristème apical de la racine séminale meurt rapidement, entraînant la mort progressive de la racine elle-même et de nombreuses racines latérales émergent alors en arrière de la zone de nécrose du méristème de la racine séminale. L'apparition de ces racines latérales ne se fait pas normalement, dans la mesure où plusieurs racines latérales peuvent émerger simultanément au même niveau de la racine primaire.
Par ailleurs, nous avons également constaté, sur un effectif réduit de plantes de la génération T_1, que tous les mutants présentaient une expression GFP. Bien qu'obtenue sur un faible nombre de plantes T_1, cette liaison suggérait la possibilité que ce mutant soit étiqueté par un ADN-T. Nous avons donc choisi d'analyser plus en détail ce mutant. Ce chapitre IV présente les premiers résultats de la caractérisation cellulaire et moléculaire de *hzl*. Néanmoins, ces résultats sont encore très préliminaires, la découverte récente de ce mutant au début de la troisième année de la thèse n'ayant pas permis de mener ce travail à son terme.

MATERIELS ET METHODES

Conditions de croissance et criblage phenotypique des plantes

Pour chacune des 2683 lignées T_1, 5 graines ont été stérilisées (éthanol 70% et hypochlorite de sodium 40%) et placées dans des boites de Pétri en chambre de culture régulée (28°C, 60% d'humidité, 12 heures jour/12 heures nuit). Les plantules ont été observées de 7 à 10 jours après germination sous une loupe binoculaire (Leica Microscopie Systèmes SA, Heerbrugg, Switzerland) à l'aide du filtre GFP2 de Leica (filtre d'excitation 480-520 nm et filtre d'émission >510 nm) sous lumière UV. La loupe binoculaire permet une localisation tissulaire de l'expression GFP. Les plantes possédant une expression GFP significative ont été transférées en pots, en serre confinée. A floraison, des fleurs ont été prélevées plante à plante et observées sous loupe binoculaire et lumière UV pour détecter une éventuelle expression GFP. Les plantes ont été menées à graines qui sont récoltées plante à plante. Enfin, les plantes

adultes en serre ont été phénotypées une dernière fois après récolte des graines. Les graines T_2 ont ensuite été resemées pour permettre l'observation plus précise des plantes présentant les phénotypes intéressants. Ces graines ont été semées en boites de Pétri verticales (20cmx20cm) contenant du milieu Murashige and Skoog (MS/2, vitamines/2, pH 5,8), auquel est ajouté de l'agarose à la concentration de 0,8%. Les plantes ont été phénotypées puis transférées en serre. Elles ont aussi été menées à graines en serre confinée et les graines ont été récoltées plante à plante. Lorsque le phénotype mutant affectait grandement la croissance des plantes, les plantules ont été transférées en tube contenant du milieu MS/2, phytagel à 20g/L et du saccharose à 2% pour réduire leur mortalité afin d'obtenir suffisamment de matériel pour les analyses moléculaires.

Histologie classique et microscopie

Les racines de mutants et de plantes témoins, âgées de 7 à 10 jours après germination des plantules ont été prélevées. Les apex racinaires ont été fixés par de l'acroléine, puis déshydratés progressivement dans des bains successifs d'alcool de 70 à 100%, avant d'être inclus dans des blocs de résine. Ces blocs ont été coupés avec un microtome Leica RM2155 en coupes longitudinales et transversales de 3μm d'épaisseur. Les coupes ont été colorées à l'acide periodique-Schiff / Naphtol blue black (CI 20 470) (Fisher D.B., 1968). Les observations ont été réalisées sous microscope Leica DM6000 avec lumière blanche, et les photos ont été acquises avec la Camera couleur QImaging Micropublisher 3.3 et le logiciel Open Lab.

Extraction d'ADN

Les prélèvements de feuilles ont été réalisés sur des plantes en serre âgées de 3 semaines et sur des plantules *in vitro* pour les mutants. Les échantillons ont été directement congelés dans l'azote liquide, puis broyés dans un mortier. L'extraction d'ADN a été faite avec du MATAB préalablement chauffé à 74°C : pour 500 mL de MATAB, 50 mL de Tris-HCL 100mM pH 8.0, 140 mL de NaCl 1.4 M, 20 mL d'EDTA 20mM, 10g de MATAB, 5g de PEG 6000, 2.5g de sulfite de sodium. Cinq mL de tampon ont été ajouté à chaque échantillon puis tous les échantillons ont été incubés à 74°C pendant 40 mn sous agitation. Les échantillons ont été refroidi à température ambiante pendant 10 mn puis 6 mL de CIAA (Chloroforme IsoAmylAlcool 24 : 1) ont été ajoutés. Le mélange a été agité plusieurs fois puis centrifugé à

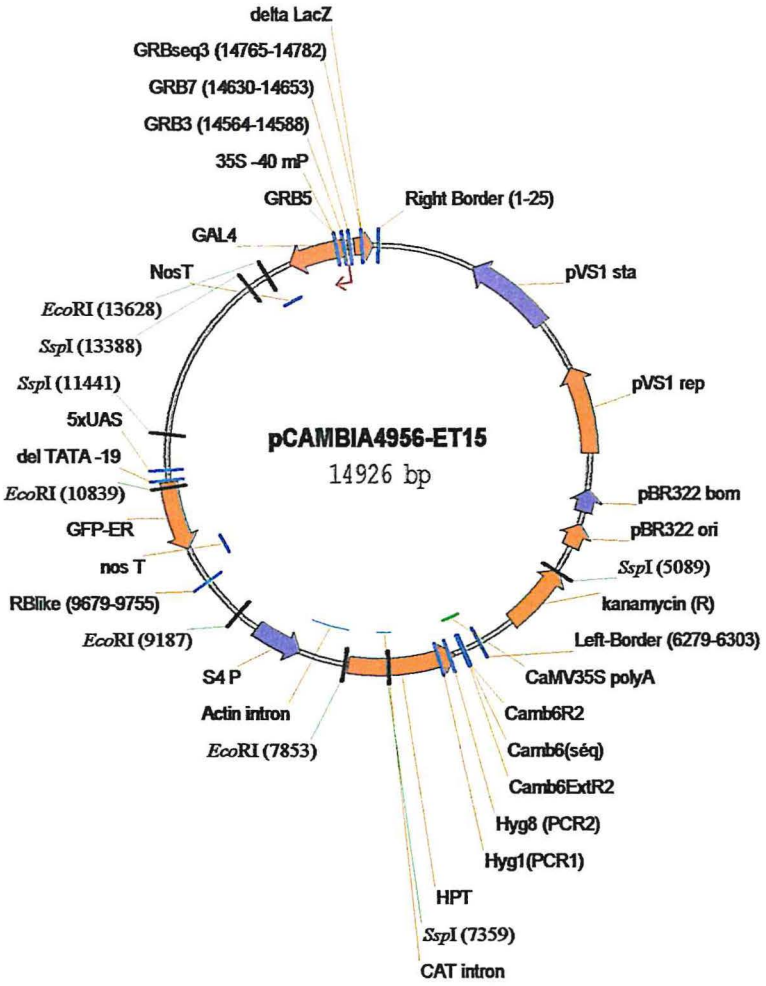


Figure IV.1 : Carte du vecteur pCAMBIA4956-ET15 utilisé pour créer la collection de lignées enhancer trap GAL4-UAS-GFP. HPT: gène de résistance à l'hygromycine; Actin intron: intron du gène actine1 de riz; GFP-ER: protéine fluorescente verte adressée au réticulum endoplasmique; 5xUAS: motifs de reconnaissance du facteur de transcription GAL4; GAL4: facteur de transcription de levure se fixant spécifiquement sur les séquences UAS; 35S-40mp: promoteur 35S minimal. pS4: promoteur Subterranean Clover Stunt Virus; nos : terminateur de la nopaline synthase.

6500 rpm pendant 10 mn et la phase supérieure, contenant l'ADN, a été pipettée délicatement. 20μL de RNAse ont été ajoutés pour éliminer les ARN. Une nouvelle extraction au CIAA a été réalisée et la phase aqueuse récupérée a été précipitée à l'aide de 5mL d'isopropanol. L'ADN a été récupéré, resuspendu dans 150μL de tampon TE puis stocké à 4°C.

Southern blot

5μg d'ADN génomique ont été digérés par l'enzyme EcoRI: 15 unités d'enzyme de restriction ont été ajoutées à 20μL de tampon QSP 200μL d'eau distillée, l'incubation a eu lieu à 37°C pendant 1h00. Une électrophorèse a ensuite été réalisée sur gel d'agarose à 0.8% dans du TAE 1X pendant 16h00 à 20V. Les gels ont été colorés au Bromure d'Ethidium, rincés et photographiés. Le gel a été immergé dans de l'acide chlorhydrique 0,25N, rincé avec de l'eau distillée puis neutralisé dans du NaOH 0.4N pendant 30 min. Le gel a été déposé sur une membrane de Nylon Hybond N+ puis le transfert a été effectué par capillarité toute la nuit. La membrane a ensuite été rincée dans du 2XSSC.
Pour l'hybridation, la membrane a été incubée dans une solution de préhybridation (Tris-Cl 50mM pH8, EDTA 10mM pH8, SSC 5X, SDS 0.2%, Denhart 1X) pendant 5 heures. La sonde hpt de 1000pb a été préparée par double digestion EcoRI/BglII du vecteur PILTAB-22, purifiée à partir d'un gel d'agarose low melting à 0.5%. La sonde a été marquée avec du 32P-dCTP (4μCi) par amorçage aléatoire grâce au kit Mega Prime labelling System (Amersham) à l'aide de 50ng de sonde purifiée sur gel. La sonde a alors été dénaturée pendant 5 min à 95°C et ajoutée à la solution d'hybridation. L'hybridation a été réalisée toute la nuit. La membrane a été rincée successivement à l'aide de 2XSSC, SDS 1% 10 mn à 65°C, puis deux fois 15 min à 65°C dans du 2XSSC, SDS 0.1%. La membrane a alors été rincée une ou plusieurs fois à 65°C à l'aide du tampon 0.1xSSC, SDS 10% jusqu'à atteindre un niveau de radioactivité compris entre 50 et 250 cps. La membrane a été mise à exposer dans une cassette contenant un écran (Phosphoimager, Storm 840 Molecular Dynamics) permettant la visualisation du signal radioactif.

Isolement des séquences flanquantes de l'ADN-T

L'ADN des mutants a été isolé à partir de feuilles fraîches de plantes âgées de 3 semaines. L'amplification des bordures flanquantes gauche et droite des ADN-T a été réalisée par la stratégie de marche par PCR (Devic et al., 1997). L'ADN des mutants a été digéré par

plusieurs enzymes de restriction générant des extrémités franches (DraI, EcoRV, Ecl 136, NaeI, NruI, et SmaI ont ete testées pour l'analyse des bordures gauches, et les couples d'enzymes DraI+Sst2 et SspI+Sst2 ont ete utilisés pour l'analyse des bordures droites). Ces fragments à bouts francs ont ensuite été liés à un adaptateur. Deux PCR successives (PCR1 et PCR2) ont ensuite ete réalisées de façon à amplifier les fragments génomiques compris entre l'ADN-T et l'adaptateur. Les produits PCR (30μL) ont été séquencés par la société Génome Express. Les oligonucleotides utilisés pour ces réactions de PCR et pour le séquençage sont les suivants : Pour l'amplification des bordures gauches, les oligonucleotides spécifiques de l'adaptateur et de l'ADN-T sont respectivement AP1 (5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3') et Hyg1 (5'-ATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATTT-3') pour la PCR1, et AP2 (5'P ACCTCCCC 3'NH_2) et Hyg8 (5'- GTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAG-3') pour la PCR2. L'oligonucleotide Camb6 (5'- ATATGCTCAACACATGAGCG -3') a été utilisé pour le séquençage. Pour l'amplification des bordures droites, les oligonucleotides spécifiques de l'adaptateur et de l'ADN-T sont respectivement AP1 et GRB3 (5'-CGATGGAGGACAGGAGCTTCATTG-3') pour la PCR1, et AP2 et GRB7 (5'-AGAGGAAGGGTCTTGCGAAGATCC -3') pour la PCR2. Pour le sequencage, l'oligonucleotide GRBSeq3 (5'-TCGCCTTGCAGCACATCC -3') a été utilisé.

Bioanalyse des séquences flanquantes

Les séquences obtenues ont été alignées sur la séquence du génome du riz via OrygenesDB (Droc et al. 2006) pour localiser l'insertion de l'ADN-T et le gène marqué par la GFP et/ou responsable du phénotype mutant observé. Le nettoyage des séquences FST est basé sur la recherche de l'empreinte de l'ADN-T (présence des bordures droites et/ou gauches) et de la présence éventuelle du vecteur binaire. Les FST sont localisées sur les séquences BAC/PAC de riz (BLASTN) dans un pipeline utilisant un programme Perl (Brunaud et al. 2002 ; Sallaud et al. 2004). Le contrôle de la qualité des séquences obtenues après séquençage est réalisé : si le pourcentage de N est trop élevé ou si la séquence est inférieure à 50 pb alors la séquence est considérée comme mauvaise ; s'il est retrouvé la trace de l'intégration d'une partie du vecteur binaire pCAMBIA4956-ET15, la séquence correspondante est alors enlevée. La séquence finale n'est gardée que si elle est supérieure à 30 pb et que l'empreinte de l'ADN-T est retrouvée.

Vérification des insertions par PCR

Deux PCRs successives ont été réalisées à l'aide d'amorces chevauchantes afin i) de détecter la présence de l'ADN-T au site d'insertion et ii) de distinguer entre plantes homozygotes et hétérozygotes pour cette insertion. Les conditions des PCR1 et 2 étaient identiques: 3 min de dénaturation suivie de 35 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 s, une étape d'hybridation à 55°C pendant 30 s et une étape d'élongation à 72°C pendant 1 min. Enfin, la PCR se termine par une dernière étape d'élongation finale à 72°C pendant 5 min. Après amplification, les produits de la PCR1 ont été dilués au 1/100 puis 2μL des produits de dilution ont été utilisés pour la PCR2 réalisée dans les mêmes conditions que la PCR1. Les produits d'amplification de la PCR2 ont été révélés à l'aide d'un gel d'agarose a 1.2%.

Amorces utilisées :

i) La présence de l'insertion dans Os11g35660.1 est révélée à l'aide des couples ASAB06_JR8ExtF/CAMB6_ExtR pour la PCR1, et ASAB06_JR8F/CAMB6_R pour la PCR2. Une bande de 697 pb témoigne de la présence de l'insertion.
ASAB06_JR8_ExtF (5'-GGACTAGTTAGCGCGTAGTTGC -3')
Position : chromosome 11 :20356787-20356809
CAMB6_ExtR (5'- GGTTCCTATAGGGTTTCGCTCATG-3'), position 216 pb en amont de la bordure gauche du vecteur pCAMBIA4956-ET15 (Figure IV.1).
ASAB06_JR8_F (5'-GTAGTTGCGGTGGGGGCTAA-3')
Position : chromosome 11 :20356801-20356821
CAMB6_R (5'- CGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAA-3'), 199 pb en amont de la bordure gauche du vecteur pCAMBIA4956-ET15 (Figure IV.1).

ii) Les plantes hétérozygotes pour l'insertion dans Os11g35660.1 sont révélées à l'aide des couples ASAB06_JR8_ExtF/ASAB06_JR8_ExtR2 pour la PCR1 et ASAB06_JR8_F/ ASAB06_JR8_R2 pour la PCR2. Une bande de 652 pb est amplifiée si l'insertion est à l'état hétérozygote ou si il n'y a pas d'insertion.
ASAB06_JR8_ExtR2 (5'-CAAGAAAGCTAGGTCAAAGTCACTG-3')
Position : chromosome 11 : 20357442-20357467
ASAB06_JR8_R2 (5'-CAAAGTCACTGTACCTCTCCAAC-3')
Position : chromosome 11 : 20357430-20357453

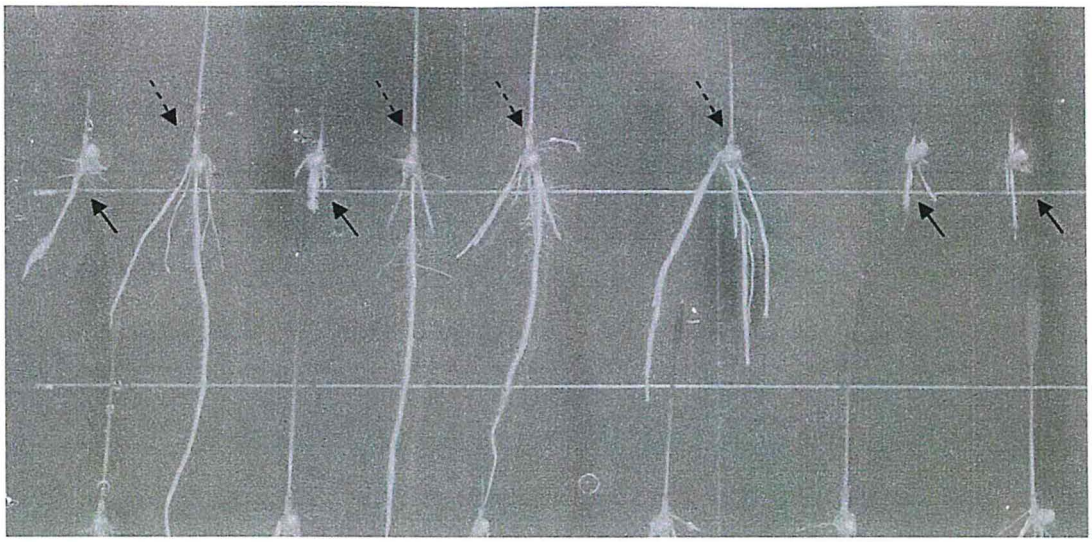


Figure IV.2.a : Développement du mutant *hazazel* 8 jours après semis en boite de pétri verticale. Le phénotype *hzl* ségrége à la génération T_1. Phénotype sauvage (flèches pointillées), phénotype *hzl* (flèches pleines).

Figure IV.2.b : Développement du mutant *hazazel* à 50 jours après semis. (A) Détails du phénotype *hzl*. (B) de gauche à droite : phénotype *hzl*, phénotype *aza*, et phénotype sauvage *Oryza sativa* L. Nipponbare.

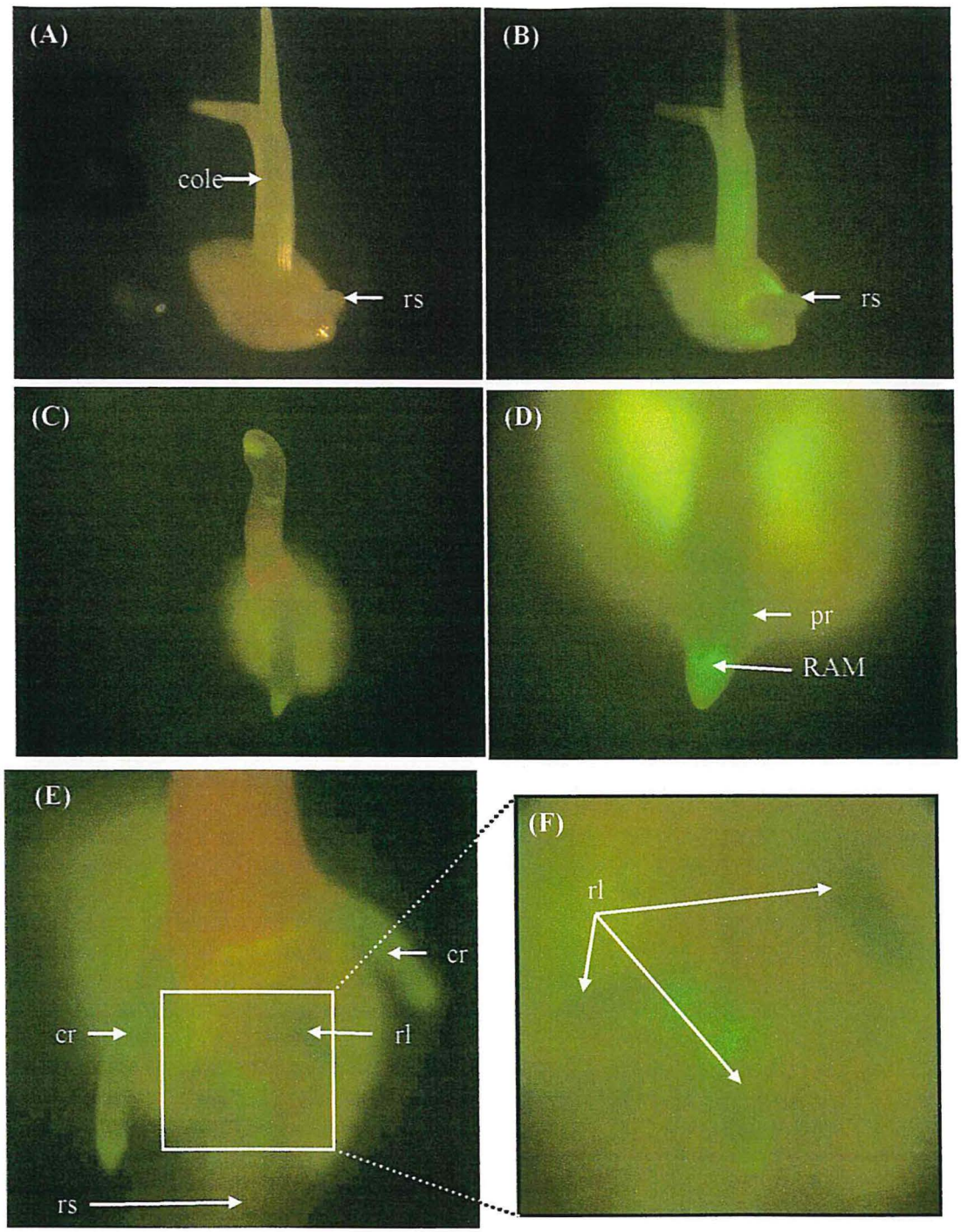


Figure IV.3a : Développement du mutant *hzl* 2 jours après semis stade plantule. (A) lumière blanche (grossissement 3x). (B, C) Observation de l'expression GFP dans le coléoptile et l'apex racinaire sous lumière UV et filtre GFP2 (grossissement 3x). L'expression GFP diminue dans le coléoptile, et s'accentue dans la racine au niveau de la coiffe et de la zone méristématique (E, 3x). Une densité accrue de poils racinaires est visible en (D, F) juste au dessus de la zone méristématique (10x). cole : coléoptile; rs : racine séminale; cr : racine coronaire; rl : racine latérale; pr : poils racinaires.

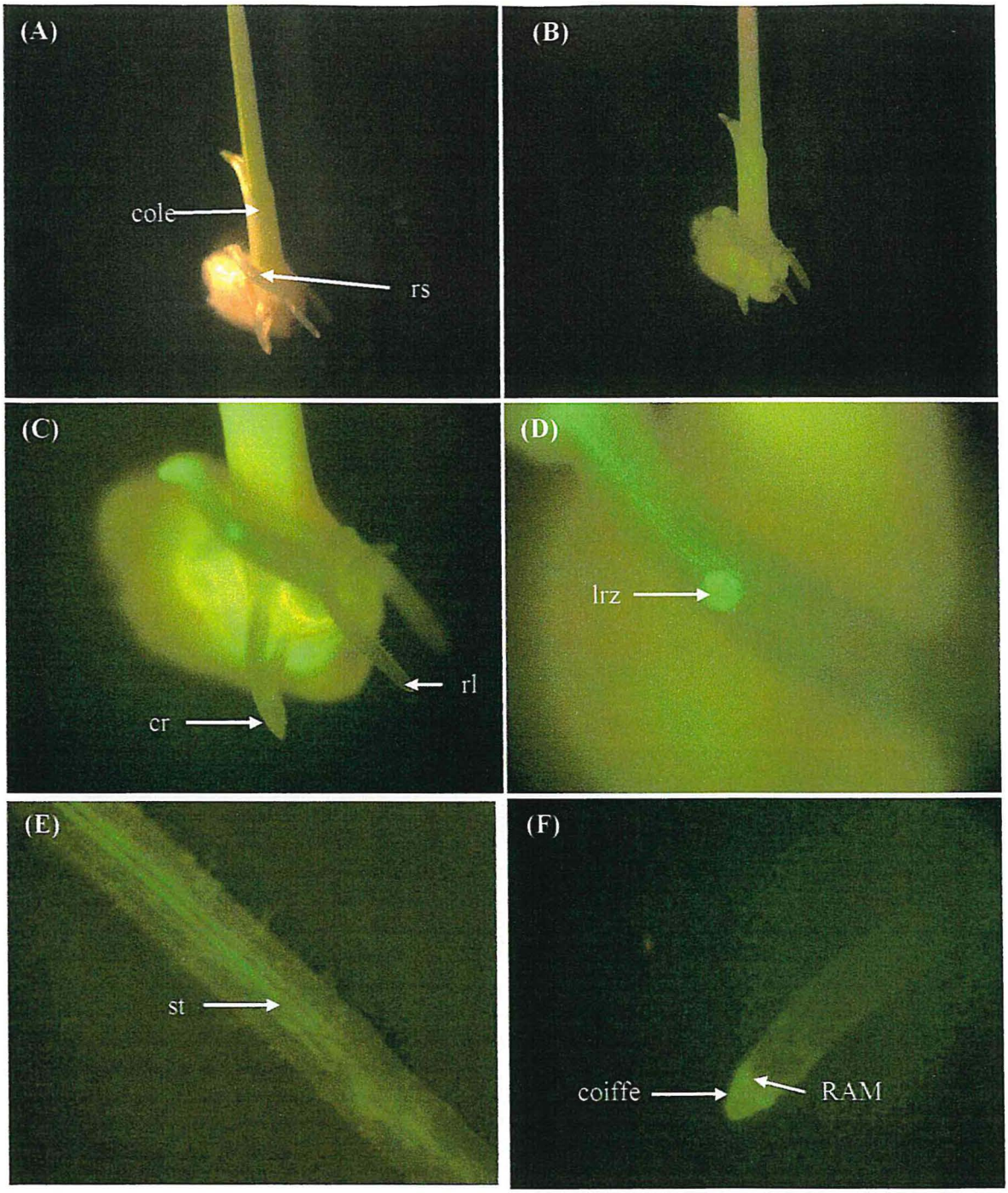


Figure IV.3b : Développement du mutant *hzl* 4 jours après semis stade plantule. (A) lumière blanche (grossissement 3x). (B) Observation de l'expression GFP sous lumière UV et filtre GFP2 (grossissement 3x). (C) La fluorescence de la GFP est visible dans le coléoptile, et les racines (6x). (D, E) Expression GFP dans les tissues vasculaires et dans les zones d'émergence des racines latérales ou primordia latéraux (10x), (F) Expression dans la coiffe et la zone méristématique (10x). cole : coléoptile; rs : racine séminale; cr : racine coronaire; rl : racine latérale; coiffe; RAM : méristème; st : stèle; lrz : zone d'émergence de racine latérale

RESULTATS

Une mutation, nommée hzl, entraîne la mort précoce du méristème de la racine séminale.

Au cours du criblage des 2683 lignées T_1 (issues des plantes T_0 provenant de la régénération d'un call) de la collection enhancer trap Gal4-UAS-GFP, un mutant à phénotype fort, nommé *hazazel* (*hzl*) a été isolé. La racine séminale des plantes mutantes *hzl* dégénère quelques jours après germination (Fig. IV.2.a). *hzl* présente également un très fort retard de développement et produit des panicules minuscules ne contenant aucune graine (Fig. IV.2.b). Par ailleurs, une expression GFP racinaire est observée chez les mutants *hzl* suggérant que *HZL* pourrait être étiquetée par un ADN-T. L'observation des plantes en boîte de pétri verticale révèle qu'au stade 2 jours après semis (JAS), la croissance de la racine séminale est réduite pour les mutants *hzl* (Figure IV.2.a). Un nombre anormalement élevé de poils racinaires se développent en arrière du méristème de la racine séminale (Fig. IV.3.a A-F). A 4 JAS les premières racines latérales émergent de la racine séminale (Fig. IV3.b A-D). Au stade 8 JAS, le méristème apical de la racine séminale commence à se nécroser et à mourir entraînant la formation et la croissance rapide de multiples racines latérales (Fig. IV.3c A-D). L'apparition des racines latérales est désordonnée. Plusieurs racines latérales émergent sur une couronne située au même niveau de la racine séminale (Fig.IV.3c A et B).

Tous les mutants *hzl* expriment la GFP suggérant qu'il existe une liaison génétique forte entre le locus hzl et un ADN-T enhancer exprimant la GFP. Il n'est bien sûr pas possible d'inférer une relation causale à ce stade entre cette expression GFP et la mutation *hzl*. En effet, aucun résultat ne nous permet de supposer qu'il y ait par exemple fusion transcriptionnelle entre un ADN-T et le gène *HZL*. Néanmoins, dans l'attente de résultats complémentaires nous présentons les profils GFP observés chez les mutants *hzl* de manière purement descriptive.

Les mutants *hzl* expriment la GFP dans la coiffe et au niveau du méristème de la racine séminale au stade 2 JAS (Fig. IV.3.a C-F). Au stade 4 JAS, la plantule poursuit sa croissance, et la racine séminale exprime la GFP au niveau de la coiffe, du méristème, et de la stèle (Fig. IV.3b C, E-F). Les primordia latéraux expriment la GFP, en particulier au moment de l'émergence des racines latérales (Fig.IV.3b D). Au stade 8 JAS, la GFP est exprimée dans la coiffe latérale, mais également au niveau du système vasculaire dans les racines latérales (Fig. IV.3c C-D). L'expression GFP est donc retrouvée systématiquement associée à la zone méristématique, la stèle et la coiffe des racines primaires et secondaires. Au stade floraison, les anthères présentent une forte fluorescence GFP (données non montrées) confirmant que l'expression GFP n'est pas spécifique du système racinaire.

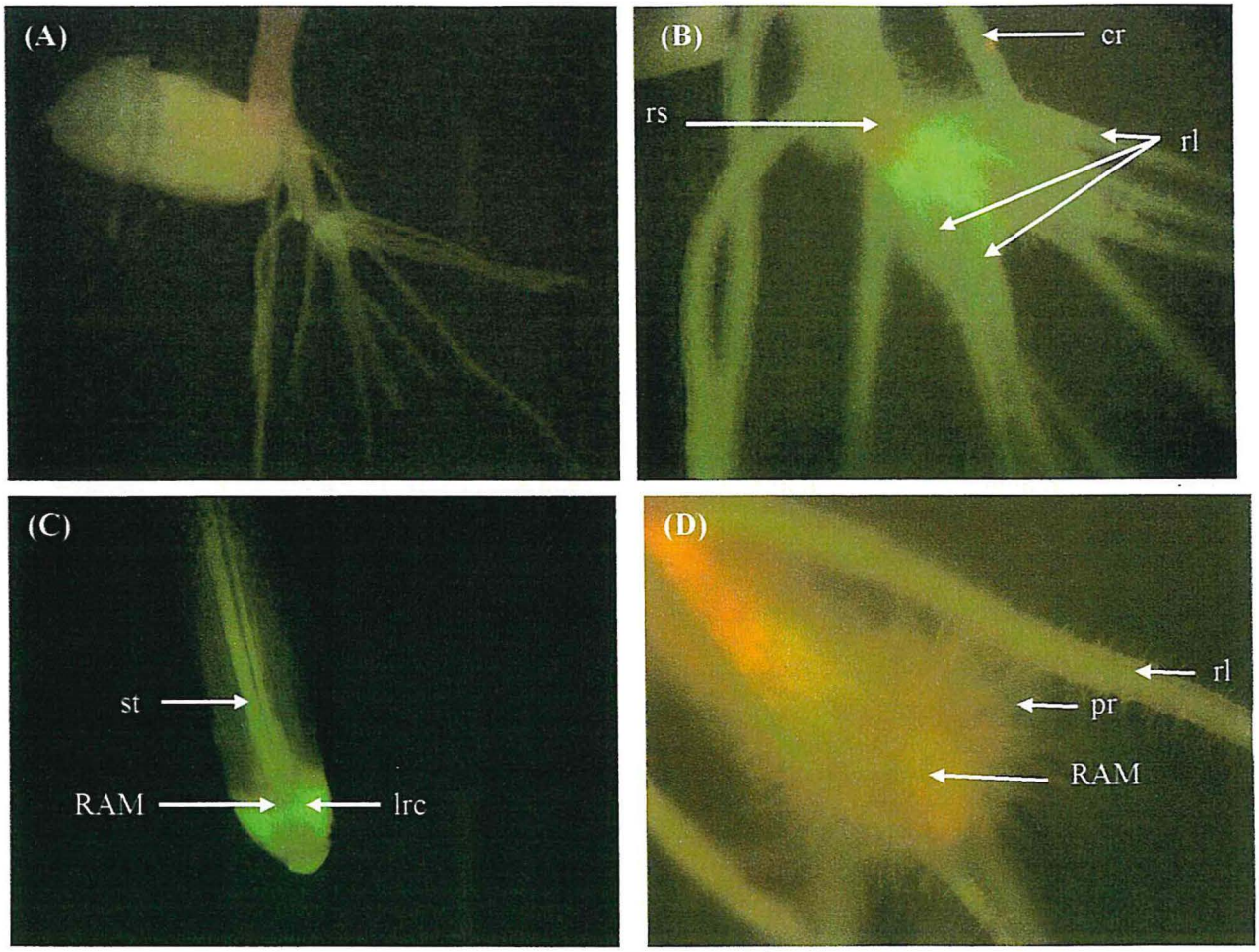


Figure IV.3c : Développement du mutant *hzl* 8 jours après semis. (A) Observation de l'expression GFP sous lumière UV et filtre GFP2, le méristème apical racinaire (RAM) de la racine séminale est mort et les racines latérales ont pris le relais de croissance du système racinaire (grossissement 3x). (D) Le RAM mort n'exprime plus la GFP, la densité accrue de poils racinaire est toujours visible juste au dessus du méristème (grossissement 10x). (B, C) Expression GFP dans les tissus vasculaires de la racine séminale, les zones d'émergence des racines latérales ou primordia latéraux, et dans les tissus vasculaires et les cellules latérales de la coiffe des racines latérales (10x). rs : racine séminale; cr : racine coronaire; rl : racine latérale; co : coiffe; RAM : méristème; st : stèle; lrc : cellules latérales de la coiffe.

Il est à noter par ailleurs, qu'un deuxième phénotype (*aza*) (ce phénotype n'a été observé qu'une seule fois, dans des conditions « particulières », voir discussion pour détails) a été observé chez certaines plantes mutantes. En serre, ces plantes adultes présentent un tallage important et sont plus petites que les plantes sauvages (Figure IV.2.b), alors qu'aucun phénotype n'avait été observé en boîte de pétri verticale.

La couche sclérenchymateuse est absente des racines séminales des mutants hzl

L'organisation radiale des mutants *hzl* est anormale comparée au type sauvage (voir chapitre II pour une description de l'anatomie radiale et longitudinale). Dans la racine séminale du génotype sauvage se succèdent de l'extérieur vers l'intérieur, l'épiderme, l'exoderme, la couche sclérenchymateuse, le cortex (ou l'aérenchyme suivant le stade de développement de la racine), l'endoderme, le péricycle, et la stèle constituée des tissus conducteurs (Fig. IV.4 C-D). Or, on note chez le mutant *hzl* l'absence de la couche sclérenchymateuse (Fig. IV.4 A-B) visible chez le témoin comme une couche cellulaire fine et plus intensément colorée (coloration au Schiff), située entre l'exoderme et le cortex (Fig. IV.4 C-D).

Les coupes longitudinales des racines séminales du mutant *hzl* révèlent l'existence de deux couches cellulaires présentant une activité mitotique intense. En effet, la coloration Naphtol Blue Black permet de mettre en évidence la présence de protéines et colore fortement les cellules méristèmatiques et les cellules en division active. Toutes les cellules de deux couches cellulaires adjacentes sont fortement colorées par le Naphtol chez le mutant *hzl* (Fig IV.4 A-B). La couche la plus interne correspond à l'endoderme mais les apex des mutants *hzl* étaient trop dégradés pour conclure sur le type cellulaire de la couche adjacente à l'endoderme. Il n'a donc pas été possible de « suivre » cette couche jusqu'aux cellules initiales du méristème de la racine séminale. Il s'agit soit d'une couche de cortex, soit d'une seconde couche endodermique (Fig. IV.4 A-B). Chez le témoin, une coloration intense est généralement observée lors des premières divisions des cellules endodermiques et du péricycle « compétentes » au cours de la formation des primordia des racines latérales (cf Chapitre II). Il est possible que, chez les mutants *hzl*, ces profils mitotiques suivent la mort de l'apex racinaire qui est suivie par l'apparition simultanée de nombreuses racines latérales en amont du méristème de la racine séminale.

hzl est une mutation récessive et est génétiquement liée à un ADN-T enhancer GFP

L'analyse de ségrégation de la mutation sur 459 plantes T_2 et T_3 permet de conclure que *hzl* est sous le contrôle d'un gène récessif. Un total de 102 plantes présente le phénotype *hzl*

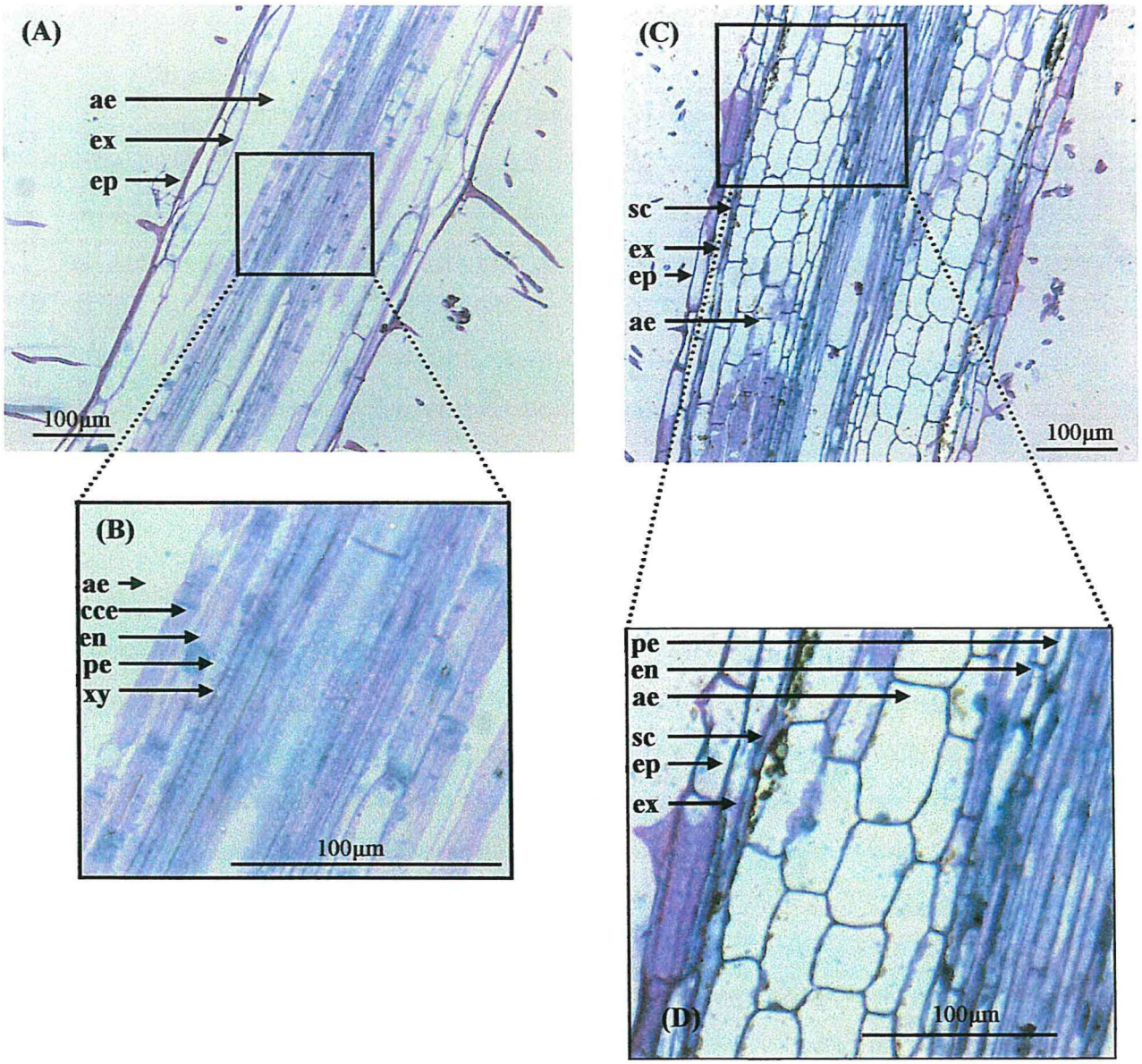


Figure IV.4 : Anatomie racinaire du mutant *hzl*. Coupes longitudinales de racine séminale *hzl* (A, B), de type sauvage (C, D), colorations Schiff-Naphtol Blue Black. ep : épiderme; sc : sclérenchyme; ex : exoderme; ae : aérenchyme; en : endoderme; pe : pericycle; xy : xylème; ph : phloème. cce : couche cellulaire de cortex non différencié, ou seconde couche endodermique.

(théorique : 115) et 357 un phénotype sauvage (théorique : 344) conforme à la ségrégation d'un gène récessif (test de $\chi 2$, p=17% hypothèse nulle d'un gène récessif acceptée).

Génotype	wt/wt	wt/hzl	hzl/hzl	TOTAL	p
Phénotype	[wt]	[wt]	[hzl]	459 plantes	17%
Ségrégation théorique	1/4	1/2	1/4		
Effectif théorique	344		115		
Effectif observé	357		102		

Nous avons testé sur cette population l'hypothèse d'une liaison génétique entre l'expression GFP et le phénotype *hzl*. Sous cette hypothèse, les ségrégations théoriques sont (25% : 50% : 25%), avec 25% des plantes GFP et de phénotype *hzl* (homozygote ADN-T), 50% des plantes GFP et de phénotype sauvage (hétérozygote ADN-T) et 25% non GFP et de phénotype sauvage (homozygote sauvage).

Les 459 plantes se répartissent effectivement en 3 classes phénotypiques : 102 plantes ont un phénotype *hzl* et une expression GFP (théorique : 115), 109 ont un phénotype sauvage et ne présentent pas d'expression GFP (théorique : 115) et 248 ont une expression GFP et un phénotype sauvage (théorique : 229). Les ségrégations observées sont en accord avec l'hypothèse d'une liaison génétique forte d'un ADN-T enhancer GFP et de la mutation *hzl* (test de $\chi 2$, p=20% hypothèse nulle acceptée).

Génotype	wt/wt gfp-/gfp-	wt/hzl gfp-/gfp+	hzl/hzl gfp+/gfp+	TOTAL 459 plantes	p 20%
Phénotype	[wt] [GFP-]	[wt] [GFP+]	[hzl] [GFP+]		
Ségrégation théorique	1/4	1/2	1/4		
Effectif théorique	115	229	115		
Effectif observé	109	248	102		

Il semble donc que *hzl* soit génétiquement lié à un ADN-T exprimant la GFP. L'hypothèse que *HZL* serait étiqueté n'est donc pas rejetée.

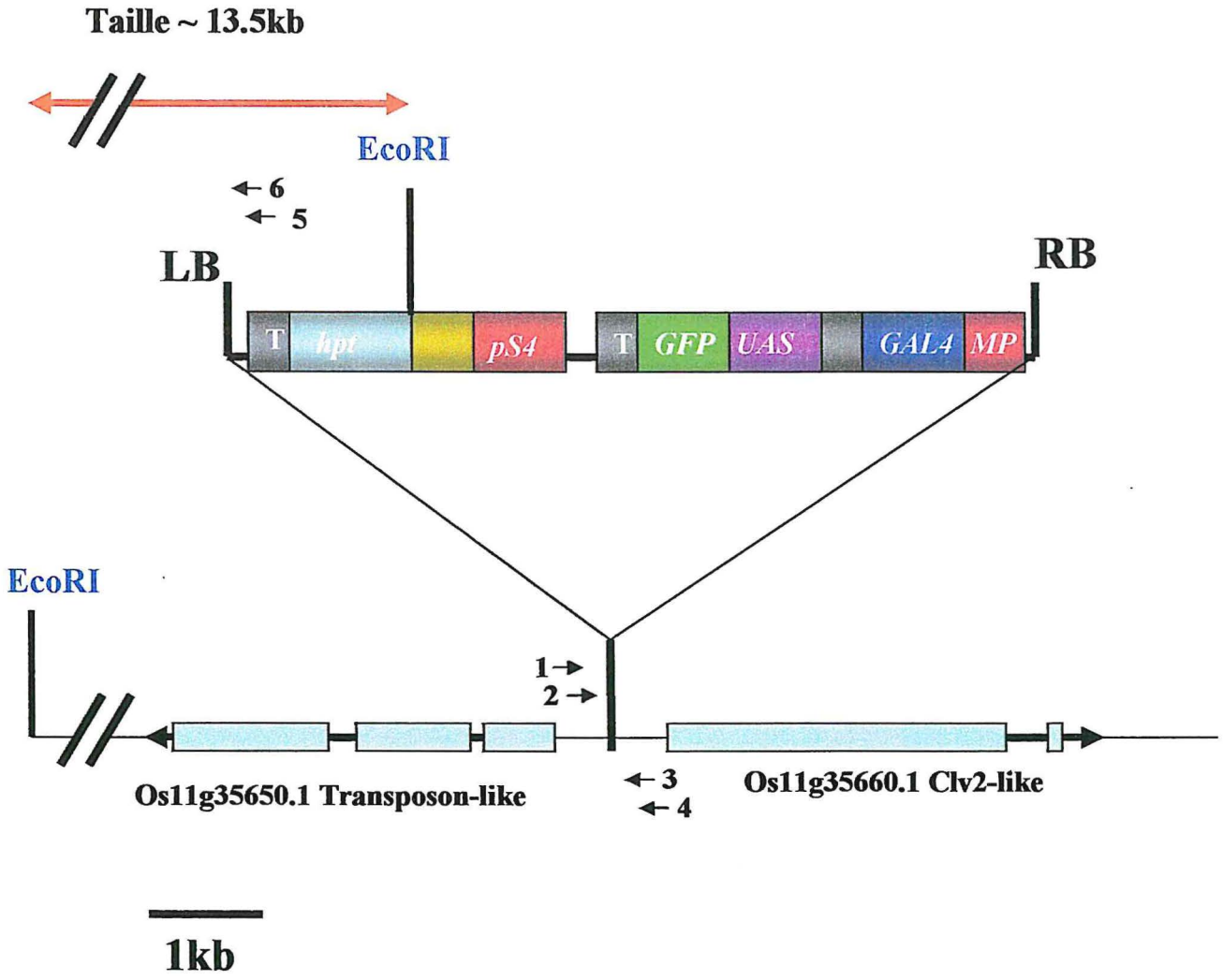


Figure IV.5 : Site d'insertion de l'ADN-T dans la région 5'du gène Os11g35660.1. Les amorces utilisées pour la détection de l'insertion par PCR sont schématisées à l'aide de flèches numérotées. 1=ASAB06_JR8ExtF; 2=ASAB06_JR8F; 3=ASAB06_JR8R2; 4=ASAB06_JR8ExtR2; 5=CAMB6_ExtR; 6=CAMB6_R. En rouge, le fragment théorique révélé par southern blot en utilisant la sonde hpt et EcoRI (cf Figure IV.6.A). LB=bordure gauche; RB=bordure droite; hpt=gène de résistance à l'hygromycine; MP=promoteur minimal; GAL4=facteur de transcription de la levure; UAS=Upstream Activation Sequence; pS4=promoteur du gène de la capside du Subterranean Clover Stunt Virus

Une insertion dans le promoteur de Os11g35660.1 ou Os11g35650.1, un Clv2-like, a été isolée par marche chromosomique par PCR et n'est pas liée génétiquement à l'expression GFP

Nous avons cherché à isoler les séquences flanquantes aux ADN-T présents chez *hzl.* Un premier ensemble de 4 séquences a permis d'isoler une séquence génomique de riz. L'analyse de cette séquence a permis de montrer que l'ADN-T à ce locus est inséré dans le promoteur de Os11g35660.1, une séquence appartenant à la famille des CVL2-like, des récepteurs sans domaine kinase possédant des répétions riches en leucine (LRR) (Fig. IV.5). Afin de tester l'hypothèse d'une liaison génétique totale entre l'expression de la GFP et l'insertion de l'ADN-T en 5' du gène Os11g35660.1, une population de 30 individus en ségrégation a été phénotypée pour l'expression de la GFP et génotypée par PCR pour l'insertion en 5' du gène Os11g35660.1. La présence de 12 individus possédant au moins une copie de l'ADN-T inséré en 5' du gène Os11g35660.1 et n'exprimant pas la GFP, et de 3 individus exprimant la GFP mais sans l'insertion, permet d'exclure l'hypothèse d'une liaison génétique totale entre l'expression de la GFP et l'insertion de l'ADN-T en 5' du gène Os11g35660.1 (Figure IV.8).

Au moins deux locus ADN-T ségrégent indépendamment dans les lignées hzl

Une analyse southern sur 9 plantes ségrégeant pour le phénotype *hzl* réalisée avec hybridation d'une sonde hpt, a permis de montrer qu'au moins deux locus ADN-T ségrégeaient indépendamment l'un de l'autre (Fig. IV.6.A). Nous avons déjà identifié un site d'insertion situé dans le promoteur de Os11g35560.1. La présence d'une insertion dans ce locus doit se matérialiser par une bande d'environ 13.5kb (Fig IV.5) sur le southern. Cette bande est retrouvée chez les génotypes T_1 96, T_1 97, T_2 26 et T_1 103. Afin de vérifier que cette bande correspond bien à l'insertion dans le promoteur de Os11g35560.1, nous avons recherché par PCR la présence de cette insertion chez les 9 plantes utilisées pour réaliser le southern (Fig. IV.6) à l'aide des amorces 5 et 1 pour la PCR1 puis 6 et 2 pour la PCR2 (Fig. IV.5).

Les résultats de PCR confirment les résultats du southern et permettent de conclure que la bande de haut poids moléculaire correspond à la présence de l'insertion dans le promoteur de Os11g35560.1. Par ailleurs, ces résultats confirment que l'insertion dans Os11g35560.1 n'est pas responsable de l'expression GFP (Fig. IV.6.A, flèches vertes) puisque par exemple les plantes T_1 87 ou T_1 93 n'ont pas d'insertion dans le promoteur de Os11g35660.1 mais expriment la GFP. Par ailleurs, la bande de plus faible poids moléculaire (~3.5 kb) correspondrait donc à l'insertion liée à la GFP et nommée « ni » (non identifié).

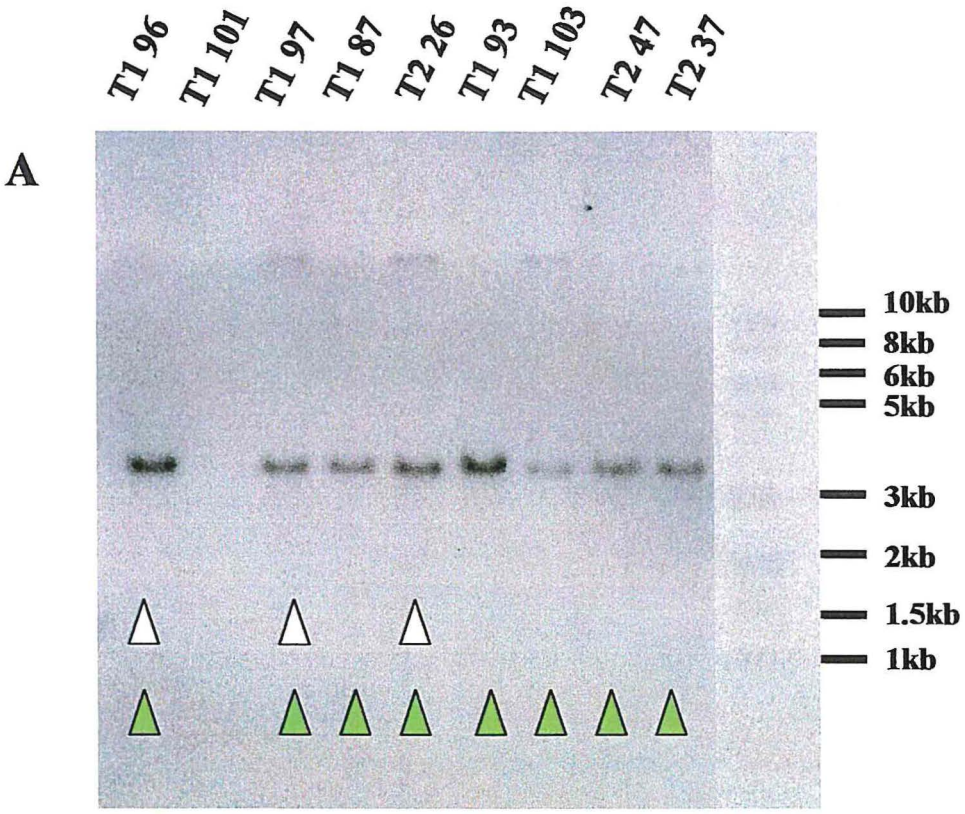


Figure IV.6.A : Détermination du nombre d'insertions d'ADN-T dans les mutants *hzl* par southern blot. Fragment révélé après digestion par EcoRI et hybridation par la sonde hpt. Les flèches blanches indiquent les plantes avec un phénotype *hzl*, et les flèches vertes correspondent aux plantes exprimant la GFP.

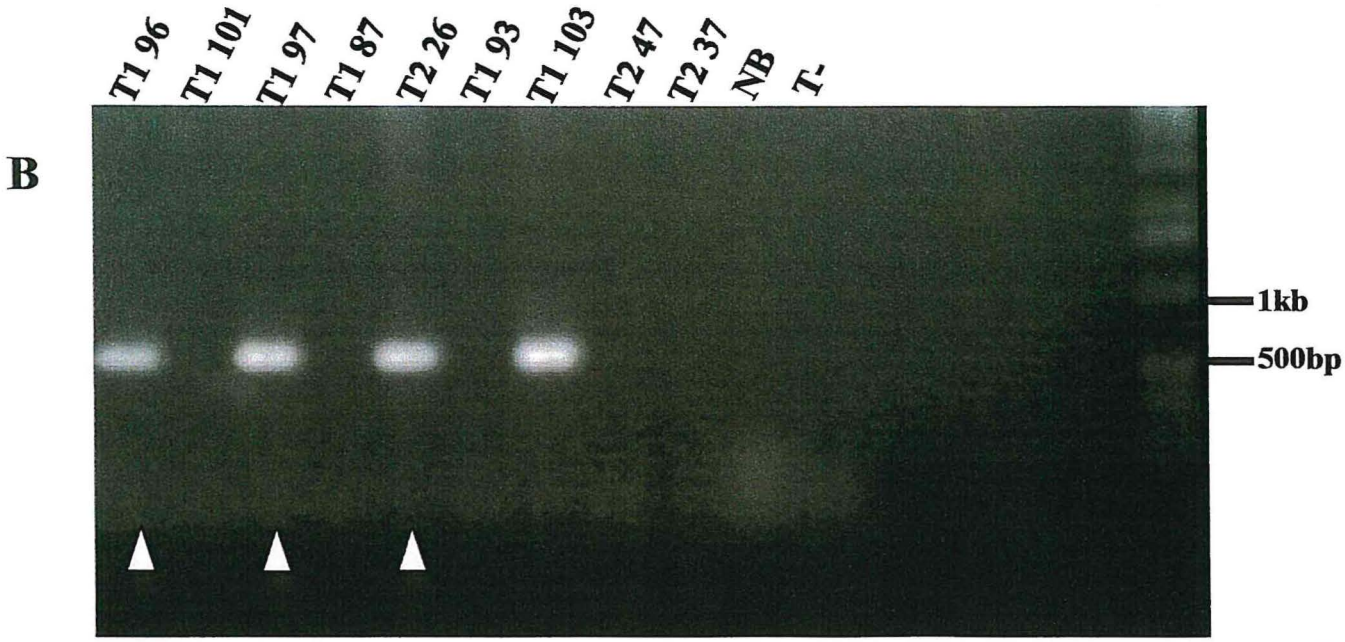


Figure IV.6.B : Détection par PCR de l'insertion dans le promoteur de Os11g35660.1. NB : témoin non transgénique, T- : contrôle négatif (Mix PCR sans ADN). Le produit d'amplification obtenu est à la taille attendue (697 pb). Les flèches indiquent les plantes avec un phénotype *hzl*.

Génotypage des descendances T_2 et T_3 et identification de plantes où une seule des insertions ADN-T est présente

La stratégie choisie pour préciser le rôle de chacune des insertions dans l'expression du phénotype *hzl*, est d'étudier des plantes ne possédant que l'une ou l'autre des deux insertions. Pour obtenir des plantes ne possédant que l'insertion de l'ADN-T en 5' du gène Os11g35660.1, les plantes T_2 et T_3 n'exprimant pas la GFP, mais possedant l'insertion ont été autofécondées, et leur descendance sera analysée. Les plantes de phénotype sauvage qui expriment la GFP et ne possèdent pas l'insertion dans Os11g35560.1 (pas d'amplification par PCR), donc hétérozygotes pour la deuxième insertion « ni » et ne ségrégeant plus que pour cette insertion ont été analysées (T1 87, T2 47 et T2 37). Les descendances de ces 3 plantes ségrégent toutes pour la GFP, confirmant que l'insertion « ni » serait bien à l'origine de l'expression GFP observée. De plus, trois de ces plantes possèdent le phénotype *hzl* montrant que l'expression du phénotype mutant *hzl* est due à cette insertion et à elle seule.

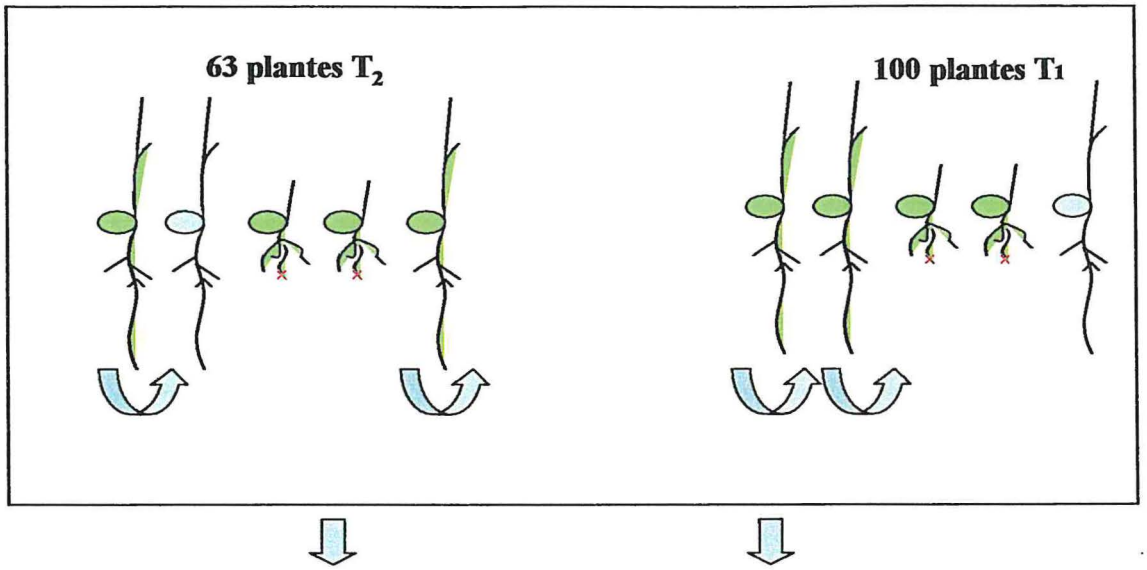
De nouvelles séquences flanquantes ont été isolées par marche chromosomique par PCR pour le locus « ni »

Nous avons ensuite cherché à identifier la séquence flanquante du site d'insertion « ni ». A partir de l'ADN des plantes T_1 87, T_2 47, T_2 37 et T_1 93 nous avons généré de nouvelles séquences flanquantes par marche chromosomique par PCR à partir des bordures gauches et droites.

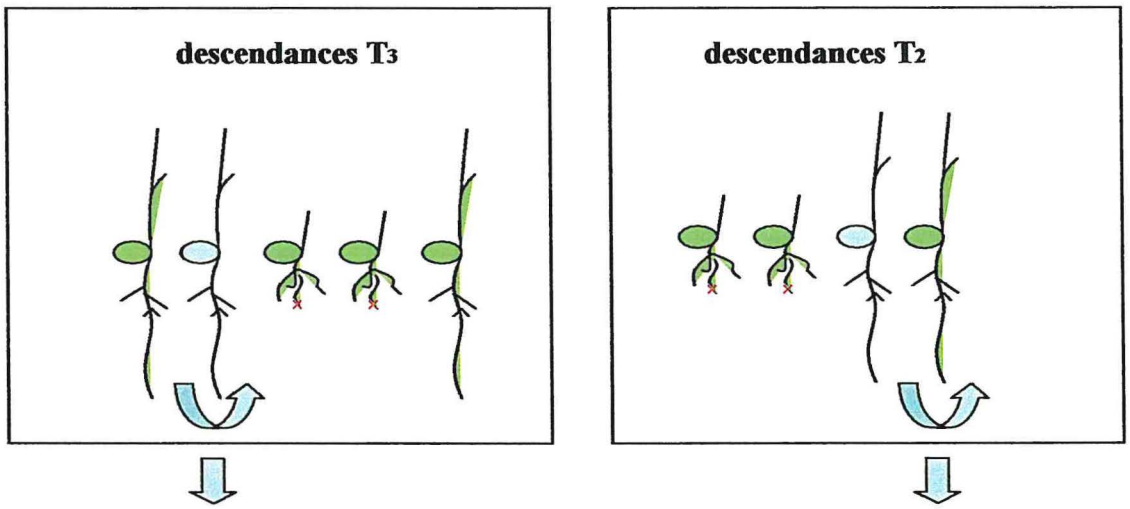
Un ensemble de 23 séquences a été isolé par marche chromosomique à partir de la bordure gauche mais elles ne contenaient que du vecteur pCAMBIA4956-ET15 (Fig IV.1 et 9). L'analyse de ces FST montre qu'il s'agit d'une insertion en tandem où la bordure gauche est retrouvée suivie de la séquence de l'intron de l'actine de pCAMB4956-ET15 proche d'une deuxième bordure gauche. Il semble donc qu'à ce locus il y ait insertion de deux ADN-T en tandem dans le sens RB-LB/LB-RB, qu'un réarrangement ait produit une délétion d'environ 2200 pb dans la bordure droite du deuxième ADN-T (Fig. IV.9.A,) et ait conduit à la perte de la séquence de hpt.

Enfin, un dernier ensemble de 6 séquences a été obtenu par marche chromosomique à partir de la bordure droite de pCAMBIA4956-ET15. Nous avons de nouveau retrouvé uniquement du vecteur mais dans une configuration différente de celle obtenue à partir de la bordure gauche (Fig. IV.9.B). L'empreinte de la bordure droite est retrouvée, suivie d'un autre ADN-T en orientation inverse LB-RB/RB-LB avec une délétion d'environ 3000 pb de la bordure

Criblage GFP et phénotypique des plantes T_1 et T_2 et autofécondation des plantes exprimant la GFP. Southern blot sur 9 plantes pour déterminer le nombre de copies ADN-T



Deuxième criblage, séparation des deux insertions ADN-T par PCR



Descendance T_4 possédant uniquement l'insertion dans Os11g35660.1

Descendance T_3 possédant l'insertion au locus non identifié "ni"

Figure IV.7: Recherche des lignées ne possédant que l'une des deux insertions ADN-T. Un premier criblage a été conduit sur 100 plantes T1 et 63 plantes T2. Les plantes exprimant la GFP (en vert) ont été transférées en serre et autofécondées. Vingt trois descendances T2 et T3 ont été semées (20 plantes/descendance) et les mutants transférés en tube dans un milieu MS/2 saccharose 2%. Un sous ensemble des lignées de ces descendances a été analysé par southern et/ou PCR afin de rechercher les lignées ne comportant que l'insertion dans le promoteur de Os11g35660.1 ou l'insertion dans le locus "ni" pour non identifié (exprimant la GFP).

droite pour le deuxième ADN-T (Fig. IV.9.B). La bordure droite et la séquence GAL4 sont donc manquantes pour le deuxième ADN-T.

DISCUSSION

Un nouveau mutant racinaire, *hazazel* a été isolé durant le criblage de la collection de lignées d'insertion enhancer trap GFP. Cette mutation récessive entraîne rapidement la mort du méristème apical de la racine séminale. Elle s'accompagne de l'émergence simultanée de nombreuses racines latérales en amont de la zone de nécrose, un phénomène constaté fréquemment chez le riz lors de la mort des méristèmes racinaires des racines primaires par exemple, en conditions anoxiques (Kuwata et al., 1978). Les racines de ce type présentent classiquement un phénotype nommé « racines en queue de lion » (lion's tail roots) (Kuwata et al., 1978). *hazazel* semble donc incapable d'assurer tout le développement post-embryonnaire de la racine séminale. De plus, une couche cellulaire, la couche sclérenchymateuse, est absente chez les mutants. *hazazel*, par ces deux aspects, pas de maintien du fonctionnement du méristème et absence de différenciation d'une couche cellulaire, fait penser à des mutations comme *scr*. En effet, chez les mutants *scr-1*, la division asymétrique d'une des deux cellules filles de l'initiale du cortex/endoderme ne se produit pas, formant une couche cellulaire indifférenciée et les racines cessent leur croissance précocement (Scheres et al. 1995; Di Laurenzio et al. 1996). Malheureusement, nous n'avons pu analyser la structure des méristèmes racinaires du mutant *hazazel* afin de rechercher (i) l'origine de l'arrêt du fonctionnement du méristème (absence de centre quiescent, différenciation précoce...) (ii) rechercher l'origine de la perte de la couche sclerenchymateuse chez *hzl*. Ces analyses histologiques du RAM seront menées prochainement sur un nombre élargi de mutants *hzl* ; soit par fixation du RAM avant sa dégénérescence pour une analyse en histologie classique ; soit par une analyse non destructive via TLSM.

Un autre phénotype, nommé *aza* dans les résultats et ne présentant pas de phénotype racinaire a été identifié au moment de la floraison des plantes T_1 et T_2. Un phénotype aérien semi-dwarf avec un tallage (ramification aérienne) plus important que le témoin sauvage était visible chez les plantes à floraison. Sur les générations suivantes, 357 plantes ont été transférées en serre, et nous n'avons jamais retrouvé ce phénotype. Ce résultat reste inexpliqué à ce jour, sauf à supposer qu'il existe une autre mutation en ségrégation sensible à la photopériode. En effet, la floraison des 100 plantes T_1 et 63 plantes T_2 a eu lieu en septembre 2005, en conditions de

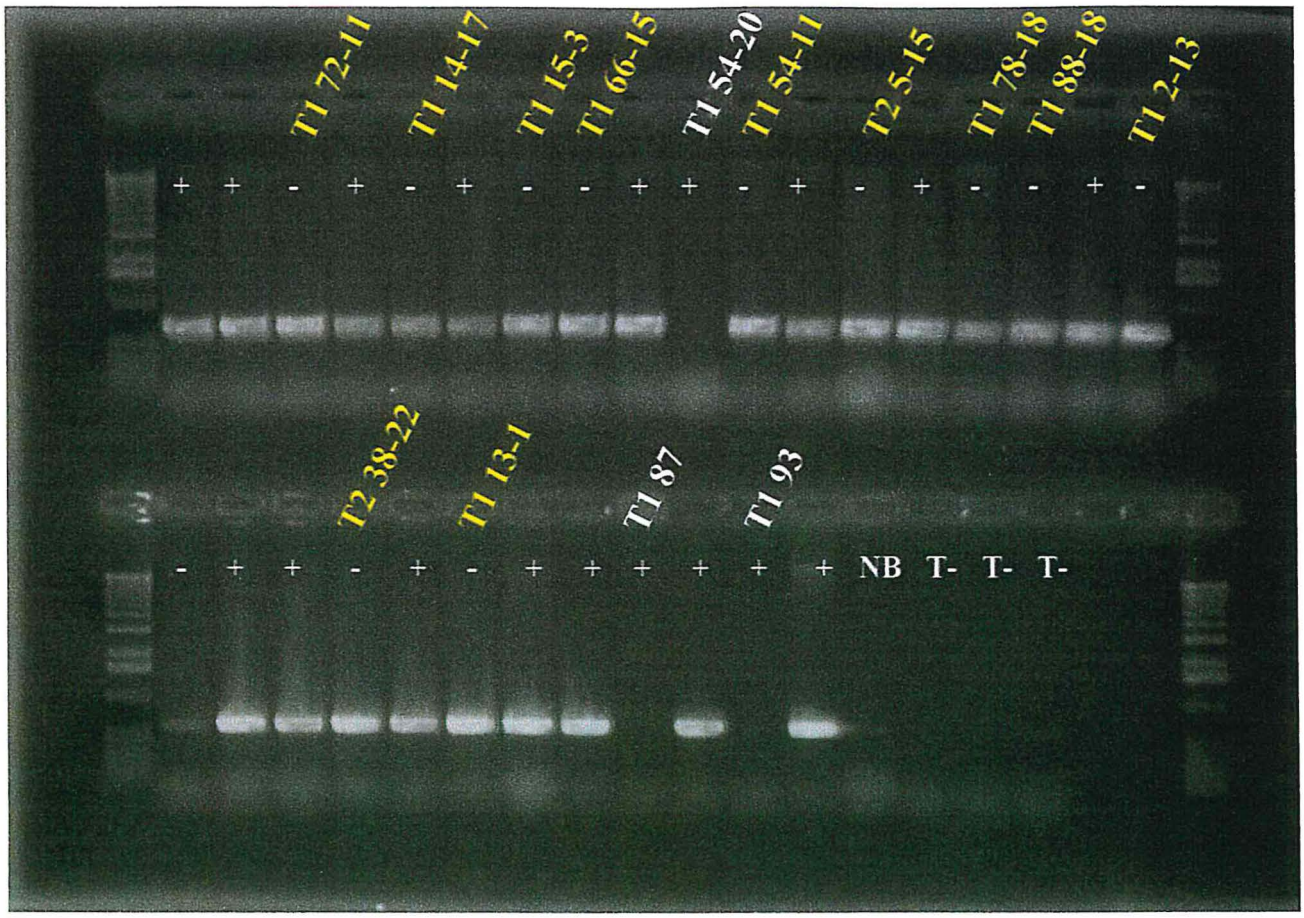


Figure IV.8 : Recherche par PCR des individus: exprimant la GFP (qui possèdent donc l'insertion non identifiée "ni") et ne possédant pas l'insertion dans le promoteur de Os11g35560.1 En jaune, les plantes qui possèdent uniquement l'insertion dans Os11g35660.1; en blanc, les plantes qui possèdent uniquement l'insertion au locus "ni". NB : témoin Nipponbare non transgénique, T-: témoins négatifs (mix PCR sans ADN); + : plante exprimant la GFP, - : plante n'exprimant pas la GFP. Le produit d'amplification obtenu est à la taille attendue (652pb).

jours longs, alors que la floraison du dernier criblage a eu lieu en février 2006 en conditions de jours courts.

Nous avons montré que *hazazel* est une mutation récessive qui est liée génétiquement à un ADN-T enhancer GFP. En effet, sur un effectif de 459 plantes, l'ensemble des mutants *hzl* expriment la GFP et les ségrégations conjointes GFP/phénotype mutant *hzl* sont en accord avec l'hypothèse d'un ADN-T fortement lié génétiquement à *hzl*. Deux locus ADN-T ségrègent dans les mutants *hzl* et les résultats du southern permettent d'émettre l'hypothèse selon la quelle seule l'insertion au locus « ni » est liée à l'expression GFP et à l'expression du phénotype *hzl*. L'insertion positionnée dans le promoteur de Os11g35560.1 n'est donc pas liée à *hzl*, au vue des résultats obtenus pour le moment. Afin d'isoler les séquences flanquantes à l'insertion « ni », nous sommes repartis de l'ADN de plantes ne contenant que cette insertion, sur la base des résultats du southern, et nous avons généré de nouvelles FST bordure gauche et bordure droite. Malheureusement, toutes les séquences obtenues ne contenaient que du vecteur pCAMBIA4956-ET15. L'analyse de ces FST suggère que plusieurs ADN-T partiellement délétés et en tandem sont présents au locus « ni », ce qui va compliquer l'identification de la position de l'insertion. Ces insertions en tandem sont une caractéristique commune de toutes les collections ADN-T (Kononov et al., 1997) et l'analyse qui a été conduite chez le riz montre que leur pourcentage est de l'ordre de 22% (Sallaud et al., 2004). Nous essayons actuellement d'isoler cette séquence flanquante en repartant de l'ADN de plantes *hzl* ne possédant pas l'insertion OsClv2-like par TAIL-PCR (Singer and Burke, 2003). Il sera nécessaire de refaire les southern en multipliant les sondes utilisées (ie GAL4, GFP...) afin de s'assurer tout d'abord qu'il n'y ait pas un troisième ADN-T qui aurait perdu le segment hpt et qui ségrégerait dans les descendances *hzl*. Il sera alors possible d'analyser plus précisément la structure du locus « ni » afin de préciser le nombre d'ADN-T inséré et les déletions éventuelles.

La liaison génétique totale observée dans la population analysée entre *hzl* et la GFP suggère que *hzl* est étiqueté par un ADN-T et que cet ADN-T est en fusion transcriptionnelle. Malheureusement, aucun élément ne nous permet de conclure sur l'étiquetage par l'ADN-T de *hzl* à ce stade des analyses. En effet, la liaison génétique entre l'expression GFP et le phénotype *hzl* peut résulter de l'insertion d'un ADN-T à quelques centaines de kb en amont du locus hzl et donner l'illusion que *hzl* est étiqueté. Enfin, même dans l'hypothèse où *hzl* serait étiqueté, il est également possible que l'ADN-T ne soit pas en fusion transcriptionnelle. Il suffit par exemple qu'il soit inséré au locus *hzl* en orientation inverse du sens de

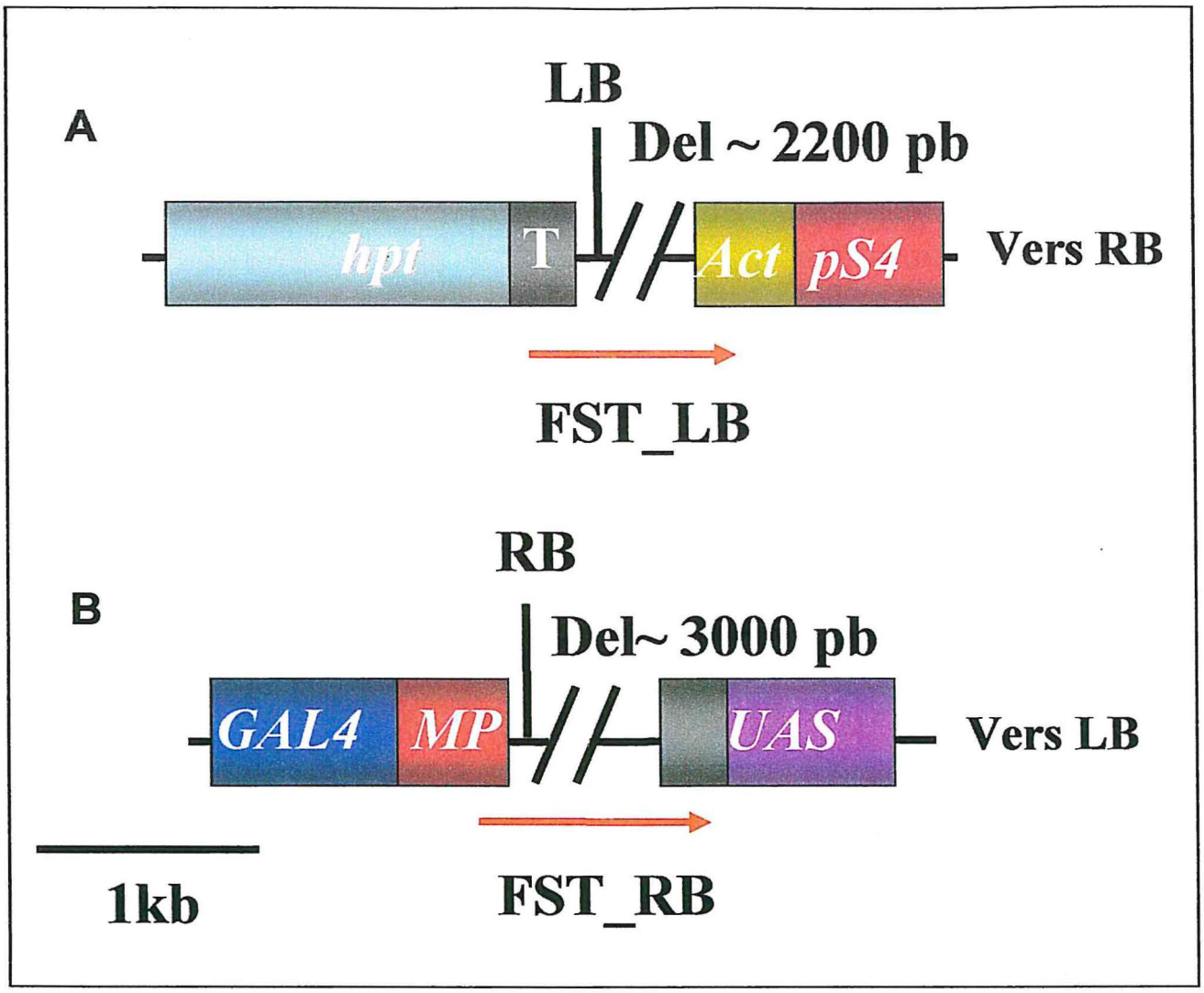


Figure IV.9 : Représentation schématique de l'organisation des ADN-T déduite des séquences flanquantes obtenues par marche PCR à a partir des plantes T1 87, T2 47, T2 37 et T1 93 (A) : A partir de la bordure gauche (FST_LB); (B): A partir de la bordure droite (FST_RB) Act=intron du gène actine1; LB=bordure gauche; RB=bordure droite; hpt=gène de résistance à l'hygromycine; MP=promoteur minimal; GAL4=facteur de transcription de levure; UAS=Upstream Activation Sequence; pS4=promoteur du gène de la capside du Subterranean Clover Stunt Virus, Del=délétion

transcription de *hzl* et que l'expression GFP soit sous le contrôle d'un enhancer en aval de *hzl*. Même si nos résultats n'excluent pas que *HZL* soit étiqueté, et même dans l'hypothèse où *HZL* serait étiqueté, il restera de toutes façons à prouver que le gène identifié correspond bien à *HZL* par une expérience de complémentation et/ou bien en phénocopiant la mutation par RNAi, ou encore en recherchant dans les autres collections de lignées d'insertions de riz de nouvelles insertions à ce locus. L'analyse des générations suivantes, T_2 et T_3 va nous permettre de séparer les deux insertions. Le génotype de ces lignées aux deux locus sera vérifié par southern et PCR et nous disposerons bientôt de descendances en ségrégation pour chacune des deux insertions.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Brunaud, V., Balzergue, S., Dubreucq, B. et al. 2002. T-DNA integration into the *Arabidopsis* genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO Rep.* **3**, 1152-1157.

Bundock, P. and P. Hooykaas, 2005. An Arabidopsis hAT-like transposase is essential for plant development. *Nature* **436**(7048): 282-4.

Devic M, Albert S, Delseny M, Roscoe TJ, 1997. Efficient PCR walking on plant genomic DNA. *Plant Physiol.* Biochem. 35 : 331-339.

Di laurenzio L., Wysocka-Diller et al., 1996. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* **86** : 423-433.

Droc G., Perin C., et al 2006. OryGenesDB an interactive tool for rice reverse genetics. *Nucl. Ac. Research.* 1 : 34(Database issue): D736–D740.

Kawata S., El Aishi M. and Yamazaki Y. 1978. Morphology and anatomy of "stunted" roots in rice plants. Proc. Crop Sci. Soc. Japan 47: 286-292.

Kononov, M.E., Bassuner, B. and Gelvin, S.B. 1997. Integration of T-DNA binary vector 'backbone' sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant J.* 11, 945–957.

Sallaud, C., Gay, C., Larmande, P., et al. 2004. High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards in silico reverse genetics. *Plant J* **39**, 450-64.

Scheres. B., Di Laurenzio L., et al. 1995. Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* **125** : 2283-2289.

Singer T. and Burke E. 2003. High-throughput TAIL-PCR as a tool to identify DNA flanking insertions. *Methods Mol Biol.* 2003;236:241-72.

CONCLUSION GÉNÉRALE

PERSPECTIVES

Le riz est une des principales cultures vivrières de la planète. L'accroissement de la production de riz est indispensable pour assurer la sécurité alimentaire et la stabilité économiques de nombreux pays. Aujourd'hui, la production doit faire face à de nombreuses contraintes, environnementales notamment, de plus en plus importantes. En effet, le manque d'eau est l'un des principaux facteurs externes auquels doit s'adapter la riziculture de demain. C'est pourquoi l'amélioration variétale est essentielle à l'accroissement de la production de riz. Le riz possède une grande diversité génétique et phénotypique, et montre ainsi une grande adaptabilité à son environnement. Le système racinaire est la structure de la plante donnant accès aux ressources hydrominérales, il se doit alors d'être doué d'une grande plasticité pour se développer au travers de son substrat afin de puiser ces ressources essentielles au développement de la plante. Sélectionner pour un système racinaire optimal pour une condition agronomique donnée est devenue une priorité dans une perspective de réduction des intrants, en particulier dans l'optique d'une réduction de la consommation en eau. Une meilleure connaissance des processus moléculaires sous-jacents au développement racinaire chez le riz permettra d'accélérer et d'optimiser à long terme la sélection d'idéotypes mieux adaptés à ces nouveaux objectifs de sélection.

L'objectif de ce travail de thèse était d'initier la compréhension des mécanismes moléculaires du développement racinaire du riz *Oryza sativa* L. Nipponbare, via la découverte de gènes clés impliqués dans le développement racinaire et spécifiquement dans l'organisation cellulaire et le fonctionnement des méristèmes racinaires. L'approche retenue consistait à cribler une collection de lignées d'insertion enhancer trap Gal4-UAS-GFP et à rechercher des mutants affectés dans le développement racinaire.
La première étape consistait donc à dresser un référentiel du développement racinaire du riz, aux niveaux morphologique, anatomique et cellulaire. Nous avons ainsi pu mettre en évidence des différences de fonctionnement dans la mise en place des organes souterrains, entre les deux plantes modèles *Arabidopsis thaliana* et *Oryza sativa*, ainsi que des différences de structures. Ces structures diversifiées au cours de l'évolution supposent des différences de stratégies d'adaptation à l'environnement, et par conséquent, différentes fonctions.

Le deuxième chapitre nous a permis de mettre en évidence les caractéristiques morphologiques, anatomiques et cellulaires racinaires chez le riz. Ce chapitre servira de référence pour toutes les études moléculaires et cellulaires qui feront suite à cette thèse mais surtout, il a permis de dégager un ensemble de questions résultant de la comparaison avec

Arabidopsis thaliana.

Une première série de questions concerne l'organogenèse latérale : Les différents types de racines latérales ont une morphologie et un comportement très différent et leur détermination à lieu très tôt, dès la mise en place des primordia. Quelle est l'origine de cette différence ? La formation de ces primordia résulte par ailleurs de la dédifférenciation de cellules du péricycle et de l'endoderme et souligne ainsi une autre différence importante avec *Arabidopsis thaliana* ou seule les cellules issues de la dédifférenciation des cellules du péricycle sont à l'origine des racines latérales. Il serait par exemple intéressant de regarder les fonctions du ou des orthologue(s) de ALF4 chez le riz. En effet, ALF4 serait impliqué dans le maintien des compétences mitotiques des cellules du péricycle chez Arabidopsis (DiDonato et al., 2004) (donc également des cellules de l'endoderme chez le riz).

L'analogie histologique détaillée des méristèmes a mis en évidence une structure générale et un fonctionnement commun à tous les types racinaires. Mais l'analyse comparée avec la structure des méristèmes racinaires d'*Arabidopsis thaliana* a permis de mettre en lumière des différences au niveau des initiales à l'origine des différents types cellulaires : Quelle est la fonction des « larges cells » qui jouxtent les initiales des tissus vasculaires ? Est-ce que ces cellules ont un rôle analogue aux cellules du centre quiescent ? Quelle est l'origine de la variation du nombre de divisions périclines dans les tissus corticaux entre les différents types racinaires ? Est-ce due à des différences au niveau de gènes responsables des divisions asymétriques endoderme/cortex tels que SCR et SHR ? Le riz possédant 2 orthologues pour SCR et 2 orthologues pour SHR il est tentant d'émettre une hypothèse incluant l'expansion de ces familles de facteurs de transcription et leur « néofonctionnalisation ». Des travaux menés sur Arabidopsis ont montré qu'un changement dans le profil d'expression de SHR (mis sous le contrôle du promoteur SCR) conduisait à une augmentation très significative du nombre de couches corticales (Nakajima et al., 2001) et renforcent la vraisemblance de cette hypothèse. Par ailleurs, une deuxième couche de cortex apparaît tardivement chez Arabidopsis et serait sous le contrôle conjoint de SHR et de l'acide gibberellique (GA) indépendamment de SCR. (Paquette and Benfey 2005). Une analyse fonctionnelle détaillée des rôles respectifs de SCR, SHR et GA chez le riz dans la formation des couches corticales est parfaitement envisageable et sera conduite dans un futur proche. Ainsi, il existe de nombreux mutants dans la biosynthèse et la voie de transduction des gibbérellines chez le riz (OsGAI, Slender, Sd-1 etc...) (Thomas and Sun 2004 et Sakamoto and Matsuoka 2004). La compréhension de l'origine des variations du nombre de couches corticales des types racinaires chez le riz est

donc à notre portée et nous possédons les outils (imagerie *in vivo* via TLSM) pour mener à bien ce travail.

Une troisième série de questions concerne le fonctionnement des initiales entre le riz et Arabidopsis. Plusieurs différences importantes ont été mises à jour, par exemple les cellules latérales de la coiffe chez le riz sont issues du fonctionnement d'une série unique d'initiales alors que chez Arabidopsis il n'existe qu'une initiale commune pour les cellules latérales de la coiffe et l'épiderme. Dans le même ordre d'idée, il existe une initiale commune chez le riz pour tous les tissus (hors stèle) depuis l'épiderme jusqu'à l'endoderme alors que chez Arabidopsis, une initiale indépendante génère le cortex et l'endoderme mais pas l'épiderme. Quelle est l'origine de ces différences ?

Afin de systématiser l'approche comparative entre riz et Arabidopsis, une approche de phylogénomique (Eisen and Fraser 2003) a été initiée au laboratoire afin de comparer l'ensemble des gènes d'*Arabidopsis thaliana* et du riz et de prédire les orthologues chez ces deux espèces. Cet outil va permettre de tester la conservation, par une approche *in silico,* des gènes intervenant dans le développement racinaire (Irish and Benfey 2004): pour quels gènes clefs y a-t-il correspondance 1 :1 ? Quelles sont les sous-familles espèces spécifiques ? Existe-t-il une expansion espèce spécifique de certaines sous familles ? Conjuguée à l'étude anatomique et cellulaire entreprise au cours de cette thèse, ce travail permettra de formuler des hypothèses précises, testables et permettra d'initier une approche évolution développement (evo-devo) du système racinaire entre moncotodylédones et dicotylédones.

Le troisième chapitre nous a permis d'isoler une collection de lignées aux marqueurs développementaux spécifiques des divers tissus racinaires du riz. Ces lignées pourront alors être utilisées pour répondre à la question précédente.

Le jeu de lignées GFP racines et tissus spécifiques isolé est une boîte à outils formidable pour tester la fonction de gènes impliqués dans le développement racinaire. Il permettra de répondre à des questions issues du chapitre précédent comme par exemple : si un gène d'Arabidopsis est nécessaire et suffisant pour induire la différenciation pour un tissu donné, est-ce que l'orthologue chez le riz assure la même fonction ? Cette vérification pourra être faite par exemple en trans-inactivant ce gène par croisement avec une lignée GFP du tissu cible et en induisant la différenciation par trans-activation à l'aide d'une autre lignée avec une expression GFP dans une autre couche cellulaire. Enfin, nous pourrons tester la fonction de certains types cellulaires par ablation cellulaire. Par exemple, une lignée marquant

spécifiquement la coiffe pourra être croisée avec une lignée de transactivation portant le gène de la toxine diphtérique sous contrôle de l'élément d'activation UAS ; Toutes les cellules marquées seront tuées spécifiquement par la toxine diphtérique dans la descendance. Ce type d'expérimentation a par exemple permis de démontrer le rôle de la coiffe dans la perception de la gravité (Tsugeki and Fedoroff 1999).

Les FSTs isolées sur les lignées exprimant la GFP dans les racines fournissent une liste de gènes candidats pour le fonctionnement ou la différenciation cellulaire dans le méristème racinaire. En particulier, deux facteurs de transcription candidats ont été isolés : une MADS-box (lignée GPL8), un Myb (lignée GPL49) dont les profils GFP putatifs sont respectivement : spécifique de la coiffe racinaire et stèle/épiderme. La suite du criblage permettra d'isoler un petit nombre de séquences sur la base de leur profil d'expression et de leur séquence. L'avantage de cette approche est que même si aucun phénotype n'est observé (par exemple en raison de la redondance fonctionnelle) il est possible d'inférer que certains candidats sont intéressants et qu'un examen plus approfondi de leur fonction pourra être entrepris. Par exemple, le gène à MADS-box (lignée GPL8) a-t-il un rôle dans le fonctionnement et/ou la différenciation de la coiffe ?

Le criblage va se poursuivre avec l'objectif d'isoler un jeu d'une vingtaine de lignées racine et tissus spécifiques. Neuf lignées ont été isolées jusqu'à présent, il faudra donc cribler encore 3000 familles T_1 pour atteindre cet objectif. Les FSTs seront isolées sur l'ensemble de ces lignées et fourniront des gènes candidats pour la différenciation cellulaire, le maintien et le fonctionnement des méristèmes racinaires.

Le quatrième et dernier chapitre, bien que synthétisant des résultats préliminaires, a permis d'isoler un mutant racinaire et de démontrer que ce mutant était étiqueté par un ADN-T. La lignée correspondante possède deux insertions que nous avons pu séparer. Une FST a pu mettre en évidence l'insertion d'un ADN-T, mais il n'est pas lié à la mutation et de nouvelles FSTs vont être produites pour caractériser l'insertion à l'origine d'*hzl*. Ce mutant présente des caractéristiques intéressantes : il semble en particulier altéré dans les mécanismes de maintien du méristème apical racinaire. De plus, lors de la mort de l'apex de la racine principale on observe une production simultanée et co-localisée de racines latérales en arrière du méristème apical. L'expression GFP liée à *HZL* est principalement localisée au niveau de la coiffe ainsi qu'au niveau de la stèle. Ce mutant est étiqueté et la localisation de l'insertion est en cours. Le criblage de la collection fournit de nouveaux mutants, en particulier, nous avons isolé dans les derniers mois de la thèse un nouveau mutant, *asu*, où tous les apex racinaires meurent peu de

temps après leur émergence, qu'il s'agisse de racines coronaires, de la racine séminale ou des racines latérales. *asu* est donc un candidat très intéressant pour étudier les mécanismes de maintien des méristèmes racinaires en complément de *hzl*.

Une nouvelle thématique a démarré en 2002 au Laboratoire d'analyse fonctionnelle du riz et le sujet de cette thèse représente l'aboutissement des 3 premières années de travail sur ce sujet. Des données descriptives anatomiques, morphologiques, cellulaires ont été obtenues et serviront maintenant de tremplin pour toutes les études fonctionnelles qui suivront. C'est un premier pas essentiel, qui a permis de préciser l'étendue des différences qui existent avec l'autre plante modèle *Arabidopsis thaliana* et qui va permettre de hiérarchiser les différentes questions et hypothèses qui émergent de cette analyse descriptive. Deux outils puissants, eux aussi pré-requis pour toute analyse développementale future du développement racinaire à l'échelle cellulaire ont été mis en place : la mise au point d'un protocole d'imagerie cellulaire utilisant la microscopie bi-photonique qui permet une visualisation des tissus racinaires *in vivo* à grande profondeur et haute résolution et la production d'une collection de lignées racine et tissus spécifiques qui permettront de manipuler à l'échelle cellulaire et moléculaire le développement racinaire. Enfin, un mutant racinaire étiqueté a été isolé au cours de cette thèse mais le temps a manqué pour le caractériser finement, aussi bien à l'échelle cellulaire qu'à l'échelle moléculaire. Ce travail va se poursuivre et permettra, en complément de l'analyse d'autres mutants isolés au cours de la thèse, d'analyser dans le détail le développement racinaire chez le riz, la plante modèle pour les monocotylédones. Enfin, la comparaison avec *Arabidopsis thaliana*, initiée également dans le cadre de cette thèse, formera un point de départ pour une étude de la conservation des mécanismes moléculaires sous-jacents au développement racinaire entre monocotodylédones et dicotylédones.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DiDonato R.J., Arbuckle E. et al. 2004. Arabidopsis ALF4 encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation. *Plant J.* 37(3):340-53.

Nakajima K., Sena G. et al. 2001. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature.* 413(6853):307-11.

Paquette A.J., and Benfey PN. 2005. Maturation of the ground tissue of the root is regulated by gibberellin and SCARECROW and requires SHORT-ROOT. *Plant Physiol.* 138(2):636-40.

Thomas S. G., and Sun T.P. 2004. Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. *Plant physiol.* 135(2):668-76.

Sakamoto T., and Matsuoka M. 2004. Generating high-yielding varieties by genetic manipulation of plant architecture. *Curr Opin Biotechnol.* 15(2):144-7.

Eisen J.A. and Fraser C.M. 2003. Phylogenomics: intersection of evolution and genomics. *Science.*13;300(5626):1706-7.

Irish V.F. and Benfey PN. 2004. Beyond Arabidopsis. Translational biology meets evolutionary developmental biology. *Plant Physiol.*135(2):611-4.

Tsugeki R. and Fedoroff N.V. 1999. Genetic ablation of root cap cells in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(22):12941-6.

ANNEXES

Table III.1: GFP expression patterns identified in the enhancer trap lines. o: GFP+; F: fixed ; S: segregation

Lines	endosperm	zerl	stele	meristem	root cap	lateral root cap	epiderm	L	P	151	152	153	154	155	156
GPL1	O	O	O		O	O	O	O	O	F					
GPL2	O	O	O					O	O			F		S	
GPL3			O				O	O	O	S					
GPL4		O						O	O	S					
GPL5		O	O	O				O	O	S					
GPL6			O	O	O			O	O	F					
GPL7		O	O	O	O	O		O	O		S	S			
GPL8		O	O				O	O	O	S					
GPL9				O	O			O	O	S					
GPL10			O	O					O	S					
GPL11	O		O					O		S					
GPL12		O	O	O	O		O	O	O	S	S			S	
GPL13			O				O	O	O		S	S			
GPL14	O		O	O	O		O	O	O	S			F	F	
GPL15			O					O		S					
GPL16			O					O	O	S					
GPL17				O					O	S					
GPL18		O			O		O		O	S	F		S		
GPL19		O	O		O		O	O	O				S		
GPL20		O	O	O				O	O	S	F	S			
GPL21		O	O	O		O	O	O	O	S		S	S		
GPL22	O	O						O							
GPL23		O	O	O				O	O	S		S	S		
GPL24	O	O	O				O	O	O		F		F		
GPL25		O	O	?				O	O	F	F	F			
GPL26		O	O	O				O	O	F					
GPL27	O	O	O		O	O	O	O	O	S	S	F			
GPL28			O	O				O		S					
GPL29		O		O					O	S					
GPL30	O	O	O	O		O	?	O	O	S	S	F			
GPL31			O	O			O	O	O			S			
GPL32	O	O	O	O			O	O	O		S		S		
GPL33		O	O				O	O	O	S	S				S
GPL34	O	O	O	O		O	O	O	O		F	F			
GPL35		O	O				O	O	O	S	S			S	
GPL36				O			O	O	O		S	S			
GPL37		O	O					O	O	S		S	S		

Lines	endosperm	zerl	stele	meristem	root cap	lateral root cap	epiderm	L	P	151	152	153	154	155	156
GPL38		O	O				O	O	O	S		S			
GPL39		O	O			O	O	O	O	F					
GPL40		O	O	O	O			O	O		F		S		
GPL41			O	O		O		O	O		F	S		S	
GPL42	O	O	O		O	O		O	O	S			S	S	
GPL43	O	O	O		O	O	?	O	O	S	S				F
GPL44	O	O	O		O		O	O	O	S	S	S			
GPL45	O	O	O				O	O			S				
GPL46		O	O				O	O				S	S		
GPL47	O	O	O			O	O	O	O		S				
GPL48		O	O					O	O	S					
GPL49			O				O	O		S		S			
GPL50		O						O	O	S					
GPL51	O	O	O					O	O	S	F				
GPL52		O						O	O		S				
GPL53		O	O				O	O			F	S		S	
GPL54	O		O	O			O	O	O		S	S		S	
GPL55	O	O	O	O	O		O	O	O	S	S	S			
GPL56		O	O					O	O	F	F				
GPL57	O	O	O				O	O	O	F	F				
GPL58		O	O				O	O	O	F	F				
GPL59		O	O	O	O	O	O	O	O		S			S	
GPL60	O	O	O	O				O		S	F				
GPL61		O	O				O	O			S				
GPL62			?	O			O	O	O					S	
GPL63		O	O					O		S					
GPL64		O	O					O	O	S	S	F			
GPL65	O	O	O				O	O	O	S	S		S		

Table III.2: The T-DNA Flanking Sequences Tag (FST) identified in the enhancer trap lines

Plant name	Border	Enzym	Chr.	Start	Stop	Strand	Region	Orientation	Gene	Annotation
GPL2	LB	SspI	8	17894478	17894601	-	Promoteur	Reverse	J013059F18	
GPL4	LB	DraI	No hit							
GPL5	LB	SspI	2	4481083	4481790	-	Promoter	Reverse	Os02g08400.1	
GPL5	LB	DraI	2	4481131	4481790	-	Promoter	Reverse	Os02g08400.1	acetyltransferase, GNAT family, putative
GPL5	LB	SspI	2	4480953	4481497	-	Promoteur	Reverse	Os02g08400.1	acetyltransferase, GNAT family, putative
GPL5	LB	DraI	2	4481131	4481497	-	Promoteur	Reverse	Os02g08400.1	acetyltransferase, GNAT family, putative
GPL6	LB	DraI	4	25981017	25981198	-	Intergenic			
GPL6	LB	DraI	4	22847525	22847647	+	Intergenic			
GPL6	LB	SspI	4	22847684	22848014	+	Intergenic			
GPL6	LB	SspI	No hit							
GPL7	LB	DraI	4	22847525	22847647	+	Intergenic			
GPL7	LB	SspI	4	22847525	22848031	+	Intergenic			
GPL7	LB	DraI	4	22847525	22847647	+	Intergenic			
GPL7	LB	SspI	4	22847684	22848014	+	Intergenic			
GPL8	LB	DraI	2	30409278	30409402	-	Promoter	Forward	002-151-A10	Oryza sativa (japonica cultivar-group) isolate 29949 MADS box protein-like protein mRNA
GPL8	LB	SspI	5	18552457	18552928	-	Gene	Reverse	Os05g32140.1	UDP-sulfoquinovose synthase / sulfite:UDP-glucose sulfotransferase / sulfolipid biosynthesis protein (SQD1) identical to gi:2736155
GPL9	LB	SspI	2	34174387	34174685	-	Intergenic			
GPL11	LB	SspI	10	13671905	13672046	-	Intergenic			
GPL12	LB	EcoRV	6	31063050	31063539	-	Gene	Reverse	Os06g51360.1	LysM domain, putative
GPL13	LB	DraI	6	20714600	20715119	+	Promoter	Forward	Os06g35530.1	probable shaggy-like protein kinase etha (EC 2.7.1.-) - rice
GPL13	LB	DraI	4	22847525	22847647	+	Intergenic			
GPL13	LB	SspI	4	22847525	22848014	+	Intergenic			
GPL13	LB	EcoRV	6	20714585	20714660	+	Intergenic			
GPL14	LB	DraI	7	22187766	22188108	-	Promoter	Forward	Os07g37040.1	octicosapeptide/Phox/Bem1p (PB1) domain-containing protein various predicted proteins contains Pfam profile PF00564: PB1 domain
GPL14	LB	DraI	7	22187766	22188108	-	Promoteur	Forward	Os07g37040.1	PB1 domain, putative
GPL14	LB	EcoRV	7	22187932	22188108	-	Promoteur	Forward	Os07g37040.2	PB1 domain, putative
GPL15	LB	DraI	4	22847525	22847647	+	Intergenic			
GPL15	LB	EcoRV	4	22847525	22847636	+	Intergenic			
GPL19	LB	SspI	No hit							
GPL21	LB	DraI	4	23107640	23107890	-	Intergenic			
GPL21	LB	SspI	4	23108179	23108387	+	Intergenic			

Plant name	Border	Enzym	Chr.	Start	Stop	Strand	Region	Orientation	gene	Annotation
GPL21	LB	EcoRV	4	23107324	23108129	-	Intergenic			
GPL25	LB	DraI	No hit							
GPL25	LB	SspI	No hit							
GPL26	LB	SspI	2	26640167	26640479	-	Intergenic			
GPL28	RB	SspI	7	26414747	26415211	-	Promoteur	Reverse	J013169J18	SNF2 domain-containing protein / helicase domain-containing protein contains similarity to DNA-dependent ATPase A GI:6651385 from [Bos taurus]), contains PFam profiles PF00271: Helicase conserved C-terminal domain, PF00176: SNF2
GPL28	LB	DraI	12	24414854	24414927	-	Intergenic			
GPL28	LB	DraI	No hit							
GPL31	LB	SspI	No hit							
GPL33	LB	DraI	2	26639830	26640467	-	Intergenic			
GPL33	LB	SspI	2	26640167	26640479	-	Intergenic			
GPL35	LB	DraI	1	37319472	37319917	+	Intergenic			
GPL35	LB	SspI	1	37319708	37319978	+	Intergenic			
GPL38	LB	DraI	6	10888917	10889325	-	3'UTR	Reverse	Os06g19130.1	Similar to embryogenesis transmembrane protein - maize
GPL38	LB	SspI	5	12392817	12392954	-	Intergenic			
GPL39	LB	DraI	3	11557551	11557690	-	Promoteur	Forward	Os03g20440.2	VQ motif, putative
GPL39	LB	SspI	No hit							
GPL41	LB	SspI	No hit							
GPL42	LB	EcoRV	3	7541689	7542148	+	5'UTR	Reverse	Os03g13930.1	Similar to subtilisin proteinase
GPL43	LB	DraI	No hit							
GPL45	LB	EcoRV	2	9857578	9857737	-	Intergenic			
GPL46	LB	DraI	10	2930154	2930291	-	Promoter	Forward	Os10g05840.1	Putative proline-rich protein
GPL46	LB	SspI	10	2930293	2930909	+	Promoter	Reverse	Os10g05840.1	Putative proline-rich protein
GPL47	LB	SspI	11	8228215	8228661	-	Intergenic			
GPL49	LB	DraI	7	14366724	14367000	+	3'UTR	Reverse	001-115-G07	Oryza sativa (japonica cultivar-group) putative myb protein (MYB) mRNA
GPL49	LB	SspI	7	14366724	14366775	+	3'UTR	Reverse	001-115-G07	Oryza sativa (japonica cultivar-group) putative myb protein (MYB) mRNA
GPL51	LB	SspI	8	18352315	18352572	-	Gene	Forward	Os08g30070.1	expressed protein
GPL51	LB	DraI	8	18352530	18352572	-	Gene	Forward	Os08g30070.1	expressed protein
GPL51	LB	SspI	8	18352315	18352572	-	Gene	Forward	Os08g30070.1	expressed protein
GPL51	LB	DraI	8	18352530	18352572	-	Gene	Forward	Os08g30070.2	expressed protein
GPL51	LB	EcoRV	8	18352632	18352953	+	Gene	Forward	Os08g30070.3	expressed protein

Plant name	Border	Enzym	Chr.	Start	Stop	Strand	Region	Orientation	Gene	Annotation
GPL52	LB	SspI	9	20253344	20253548	+	Gene	Forward	J023133F16	kinesin motor family protein contains Pfam profile: kinesin motor domain PF00225
GPL52	LB	DraI	9	20253346	20253516	+	Gene	Forward	J023133F16	kinesin motor family protein contains Pfam profile: kinesin motor domain PF00225
GPL53	RB	SspI	5	17667322	17667435	-	5'UTR	Forward	Os05g30790.1	hypothetical protein
GPL53	LB	DraI	5	17667465	17668238	+	5'UTR	Reverse	Os05g30790.1	hypothetical protein
GPL53	LB	EcoRV	5	17667465	17668217	+	5'UTR	Reverse	Os05g30790.1	hypothetical protein
GPL53	LB	SspI	5	17667465	17668171	+	5'UTR	Reverse	Os05g30790.1	hypothetical protein
GPL53	LB	DraI	5	17667465	17668082	+	Gene	Reverse	Os05g30790.1	hypothetical protein
GPL53	LB	SspI	5	17667465	17668083	+	Gene	Reverse	Os05g30790.1	hypothetical protein
GPL53	RB	EcoRV	12	12937287	12937337	+	Intergenic			
GPL54	LB	DraI	4	24239659	24239733	-	Promoter	Reverse	J013105J09	Arabidopsis thaliana mRNA for GCN2 homologue (gcn2 gene).|PLN
GPL54	LB	SspI	4	24239436	24239778	-	Promoteur	Reverse	J013105J09	Arabidopsis thaliana mRNA for GCN2 homologue (gcn2 gene).|PLN
GPL56	LB	SspI	11	8754808	8755005	+	3'UTR	Forward	Os11g15470.1	hypothetical protein
GPL56	LB	SspI	11	8754806	8755005	+	5'UTR	Forward	Os11g15470.1	hypothetical protein
GPL56	LB	SspI	11	8754806	8755005	+	5'UTR	Forward	Os11g15470.2	hypothetical protein
GPL57	LB	SspI	12	25630553	25630657	+	Promoter	Forward	Os12g41440.1	retrotransposon protein, putative, LINE sub-class
GPL57	LB	SspI	12	25630553	25630657	+	Promoteur	Forward	Os12g41440.1	retrotransposon protein, putative, LINE sub-class
GPL58	RB	SspI	9	19380490	19380895	+	Gene	Reverse	Os09g33470.1	retrotransposon protein. putative, unclassified
GPL58	LB	DraI	2	4197816	4198073	+	Gene	Reverse	Os02g08010.1	calcium-translocating P-type ATPase PMCA-type
GPL60	RB	EcoRV	12	12937287	12937337	+	Intergenic			
GPL61	LB	DraI	12	5128064	5128802	+	Gene	Forward	Os12g09710.1	NB-ARC domain
GPL61	LB	DraI	12	5128064	5128780	+	Gene	Forward	Os12g09710.1	NB-ARC domain, putative
GPL61	LB	EcoRV	12	5128064	5128364	+	Gene	Forward	Os12g09710.2	NB-ARC domain, putative
GPL61	RB	EcoRV	12	5127848	5128020	-	Gene	Reverse	Os12g09710.1	NB-ARC domain, putative
GPL61	LB	SspI	No hit							
GPL62	LB	DraI	5	23335193	23335298	+	Gene	Forward	OSJNBa0018K15.9	similar to rice EST CB664544
GPL63	LB	DraI	4	22847525	22847647	+	Intergenic			
GPL63	LB	SspI	4	22847525	22848014	+	Intergenic			
GPL64	LB	DraI	No hit							
GPL64	LB	SspI	No hit							
GPL64	RB	EcoRV	No hit							

ÉTUDE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE DU DEVELOPPEMENT RACINAIRE CHEZ LE RIZ (ORYZA SATIVA L. CV NIPPONBARE) : CRIBLAGE ET CARACTERISATION D'UNE COLLECTION DE LIGNEES D'INSERTION ENHANCER TRAP GAL4-UAS-GFP

RESUME

Le riz est une des principales cultures vivrières mondiales. L'accroissement de la production de riz est indispensable pour assurer la sécurité alimentaire et la stabilité économique de nombreux pays. C'est pourquoi l'amélioration variétale est essentielle à l'accroissement de la production de riz. Le système racinaire est la structure de la plante donnant accès aux ressources hydrominérales, aussi, une connaissance fine de son développement est indispensable. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés aux niveaux cellulaire et moléculaire du développement racinaire.

Nous avons tout d'abord revisité les étapes de la mise en place du système racinaire, en nous focalisant sur le fonctionnement cellulaire du méristème apical racinaire chez le riz, et en le comparant à celui bien décrit d'*Arabidopsis thaliana*, plante modèle des dicotylédones. Ce référentiel met évidence des différences de structures et de fonctionnement importantes entre les plantes modèles des monocotylédones et des dicotylédones, soulignant ainsi l'intérêt d'étudier plus finement les mécanismes de mise en place des structures souterraines chez le riz.

Nous avons ensuite établi une collection de lignées enhancer trap Gal4-UAS-GFP exprimant la GFP de manière spécifique, dans des cellules, tissus ou organes racinaires particuliers. Ces lignées aux divers marqueurs cellulaires pourront être utilisés pour des études développementales et physiologiques. Par ailleurs, nous avons affiné la méthode de criblage de ces lignées. L'observation *in vivo* de racine, via un microscope biphotonique, permet la visualisation au niveau cellulaire de sa structure interne, jusqu'à 200µm, et facilite la localisation précise du marqueur cellulaire.

Enfin, nous avons initié l'étude d'un mutant qui i) exprime la GFP dans les zones méristématiques, et ii) possède un phénotype racinaire et aérien suggérant une anomalie dans le fonctionnement des méristèmes.

Mots clés : *Oryza sativa* L., développement racinaire, méristème, lignées enhancer trap Gal4-UAS-GFP

A CELLULAR AND MOLECULAR STUDY OF ROOT DEVELOPMENT IN RICE (*ORYZA SATIVA* L. CV NIPPONBARE): SCREENING AND CHARACTERISATION OF A LIBRARY OF GAL4-UAS-GFP ENHANCER TRAP LINES

ABSTRACT

Rice is one of the world's most important food crops. Increased production is essential to ensure the food security and economic stability of many countries. Crop improvement is therefore essential to achieve an increase in rice production. The root system allows the plant to access mineral and water resources and an accurate knowledge of its development is crucial. In this study, we investigated the mechanisms of root development at the cellular and molecular level.

First of all, we revisited the steps in the establishment of the root system, focusing on cell fate at the root apical meristem in rice, comparing it with the well-described process in *Arabidopsis thaliana*, the model plant for dicotyledons. This comparison highlights major differences in structure and function between the two model plants, underlining the importance of studying in greater detail the process of establishing the underground structures of rice.

Next, we established a collection of Gal4-UAS-GFP enhancer trap lines that express GFP in specific root cells, tissues and organs. These lines expressing various cellular markers can be used for developmental and physiological studies. In addition, we refined the method of screening these lines. Observation of roots *in vivo*, using a two-photon microscope, allows their internal cell structure to be visualised down to 200µm and facilitates the precise location of cellular markers.

Finally, we initiated the study of one mutant which i) express GFP in its meristematic zones and ii) show a root and shoot phenotype that suggests an anomaly in the functioning of their meristems.

Keywords: *Oryza sativa* L., root development, meristem, Gal4-UAS-GFP enhancer trap lines

---

Discipline: Biologie cellulaire CNU 65

CIRAD-Département AMIS TA 40/03 Avenue Agropolis – 34398 Montpellier Cedex 5 - France