

2017-2018

Master 1 Biologie Végétale

Effets des prétraitements thermiques ou chimiques sur la tolérance au stress de plantules *d'Arabidopsis thaliana*

Jean Romane |

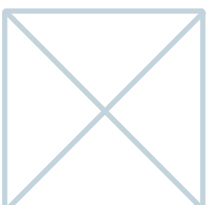
Sous la direction de M. |
Tolleter Dimitri

Membres du jury

Simier Philippe | Enseignant chercheur

Peltier Didier | Enseignant chercheur

Fontaine Kévin | ATER



Soutenu publiquement le :
3 juillet 2018



UNIVERSITÉ DE NANTES



université
angers

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



REMERCIEMENTS

Je souhaite adresser ma gratitude à tous ceux qui m'ont aidé de prêt ou de loin à l'élaboration de ce rapport.

Je tiens à remercier particulièrement Dimitri Tolleter, en tant que maître de stage, pour m'avoir encadré. Le temps qu'il m'a accordé, ses conseils et son savoir sur le sujet m'ont grandement aidé pour la réalisation de cette étude. Merci pour votre aide, votre soutien et le temps passé pour les nombreuses relectures.

Je remercie chaleureusement Elise Réthoré pour ses conseils et le temps qu'elle m'a accordé tout au long des travaux réalisés. Merci à Marie-Hélène Avelange-Macherel et Pascal Satour pour leurs remarques constructives, leurs encouragements et leur bonne humeur.

Mes remerciements s'adressent également à toute l'équipe SMS pour m'avoir chaleureusement accueilli durant ce stage.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) **Romane JEAN**
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **27 juillet 2018**

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



Glossaire

Acclimatation : Survie d'une plante à une température initialement létale grâce à un prétraitement à une température élevée.

Choc thermique : placement des plantes à des températures supérieures à 40°C, température à laquelle le stress commence à devenir létal.

HSR : Heat Stress Réponse. Voie de réponse au stress thermique.

HSPs : Heat-Shock Proteins = Protéines de choc thermique. Famille de protéines constitutives ou synthétisées par un organisme sous l'effet d'un stress.

Stress thermique : fait de faire subir aux plantes des températures supérieures aux températures de croissance.

Liste des abréviations

HSR : Heat Stress Response = Voie de réponse au stress thermique

HSP : Heat-Shock Proteins = Protéines de choc thermique

sHSP : Small Heat-Shock Proteins = Petites protéines de choc thermique

HSF : Heat Stress Transcription Factor = facteur de transcription de la voie de réponse au stress thermique

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

LEA : Late Embryogenesis abundant proteins

PS II : Photosystème II

Pu : Putrescine

Sp : Spermine

Spd : Spermidine

Table des matières

TABLE DES FIGURES	8
TABLE DES TABLEAUX.....	9
LISTE DES ANNEXES	9
INTRODUCTION	1
1. L'institut	1
2. Intérêt et enjeu	1
3. Perception de la chaleur et signalisation	2
4. Prétraitement thermique	3
5. Les polyamines	3
6. Les protéines de choc thermique (HSPs).....	4
7. Impact de la chaleur sur la photosynthèse et la respiration	4
8. Objectif du stage	5
MATERIELS ET METHODES	6
1. Matériels végétaux.....	6
2. Priming thermique et choc thermique	6
3. Priming chimique par les polyamines (Spermidine (Spd), Spermine (Sp) et Putrescine (Pu))	6
4. Extraction et dosage des protéines	7
5. Electrophorèse et Western Blot	7
6. Dosage de la chlorophylle.....	9
7. Oxygraphie	9
8. Calculs et Statistiques	9
RESULTATS.....	10
1. Acclimatation au stress thermique	10
2. Effet des polyamines sur les plantules sans stress thermique	10
3. Est-il possible de mimer un priming thermique par un priming chimique avec des polyamines ?.....	11
4. Est-il possible de mimer un priming thermique par un priming chimique si le temps entre le priming et le stress est plus court ?	11
5. Effet des polyamines sur la photosynthèse	12
6. Influence du temps de culture sur la photosynthèse et la respiration	12
7. Effet mémoire d'un double priming	13
8. Le double priming influence-t-il la mémoire du priming ?.....	13
9. Influence de la température du stress sur la respiration et la photosynthèse	14
10. Force de protection d'un double priming suivi d'un choc thermique à 45 °C	14
DISCUSSION	15
1. Prétraitement et choc thermique.....	15
2. Les polyamines	16
CONCLUSION ET PERCEPTIVES	17
BIBLIOGRAPHIE.....	18
ANNEXES I : PLANNING EXPERIMENTAL	21
ANNEXES II : EFFET DE 100 µM DE SPERMINE SUR LA PHOTOSYNTHESE	22

Table des figures

Figure 1 : Voie de biosynthèse des polyamines (Putrescine, Spermidine et Spermine) et connexions avec d'autres voies métaboliques.

Figure 2 : Récapitulatif du déroulement des manipulations réalisées.

Figure 3 : Plan des plaques multipuits.

Figure 4 : Schéma illustrant le positionnement des différents composés pour le transfert des protéines sur membrane.

Figure 5 : Réaction chémiluminescente.

Figure 6 : Schéma d'une électrode à oxygène vu en coupe.

Figure 7 : Copie d'écran d'une trace réalisée en oxygraphie.

Figure 8 : Acclimatation au stress thermique à la suite d'un priming au sixième jour (D6) et un choc thermique à 43 °C au septième jour (D7).

Figure 9 : Photographie des plantules des conditions C, P 100, P 500 et P 5000 12 jours après le priming chimique aux polyamines.

Figure 10 : Priming chimique au sixième jour avec la spermidine et un choc thermique à 43 °C au septième jour.

Figure 11 : Priming chimique avec la putrescine et un choc thermique à 43 °C.

Figure 12 : Priming chimique avec la spermine et un choc thermique à 43 °C.

Figure 13 : Photographie des membranes après révélation de la quantité en HSP 101 et 17.6 à la suite du choc thermique à 43 °C 24 heures après un priming chimique à la spermine.

Figure 14 : Consommation et production de dioxygène lors de la respiration et la photosynthèse après le choc thermique à 43 °C.

Figure 15 : Influence du temps de culture sur la respiration et la photosynthèse.

Figure 16 : Double priming réalisé au sixième et quatorzième jour suivi d'un choc thermique au quinzième jour.

Figure 17 : Simple priming réalisé au quatorzième jour (D14) suivi d'un choc thermique au quinzième jour (D15).

Figure 18 : Simple priming réalisé au sixième jour (D6) suivi d'un choc thermique au quinzième jour (D15).

Figure 19 : Double priming réalisé au sixième et quatorzième jour suivi d'un choc thermique au vingt-troisième jour.

Figure 20 : Photographie d'un simple priming (D6 D15) pour les conditions C, H et PH 11 jours après le choc thermique.

Figure 21 : Double priming réalisé au sixième et quatorzième jour suivi d'un choc thermique au vingt-sixième jour.

Figure 22 : Traces réalisées en oxygraphie pour la mesure du dioxygène en nmol/mL.

Figure 23 : Double priming réalisé au sixième et quatorzième jour suivi d'un choc thermique à 45 °C au quinzième jour.

Figure 24 : Quantité relative de protéines HSPs 101 et 17.6 à la suite du choc thermique pour le simple priming et le double priming.

Table des tableaux

Tableau I : Nom des cultures subissant un priming thermique.

Tableau II : Nom des cultures subissant un priming chimique.

Tableau III : Nom des cultures subissant un double priming thermique.

Tableau IV : Volume à prélever des différents constituants de la gamme étalon réalisée pour le dosage des protéines.

Tableau V : Récapitulatif de la quantité relative de protéine des HSPs 101 à la suite du choc thermique.

Tableau VI : Récapitulatif de la quantité relative de protéine des HSPs 17.6 à la suite du choc thermique.

Tableau VII : Récapitulatif de la quantité relative de protéine des HSPs 101 à la suite du choc thermique pour les traitements aux polyamines.

Liste des annexes

Annexe I : Planning expérimental

Annexe II : Effet de 100 μ M de spermine sur la photosynthèse

Introduction

1. L'institut

L'Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS) est un laboratoire sous la co-tutelle de l'INRA, Agrocampus Ouest et l'Université d'Angers situé à Beaucouzé (49) aux portes d'Angers. L'IRHS a un budget d'environ 2,3 M€ et comptabilise 220 personnes réparties dans treize équipes de recherches. Ces équipes sont réparties selon 3 pôles : Rosiers et Ornementales, Fruits et Légumes et enfin Semences et rassemblent des personnes aillant les expertises de généticiens, génomiciens, phytopathologistes, physiologistes, écophysiologistes, biochimistes, modélisateurs, bioinformaticiens et biophysiciens au service de la qualité et santé des espèces horticoles et de la production de semences.

L'équipe SMS « Seedling, Metabolism and Stress », qui m'a accueillie pour réaliser mon stage, résulte de la fusion de deux équipes qui a vu le jour en Janvier 2018. Elle comporte une vingtaine d'agents (maîtres de conférences, doctorants, techniciens, ingénieurs d'études...) et a à son actif 70 publications publiées dans différents journaux depuis 2010. Les trois thématiques de recherches au sein de cette équipe se portent sur la vigueur des semis, la perception des nitrates et sa signalisation ainsi que sur la biologie mitochondriale. Dans cette dernière thématique, il est porté un intérêt plus particulier sur les adaptations et le rôle des mitochondries dans la tolérance extrême au stress ainsi que sur le rôle des protéines de stress telles que les HSPs (Heat Shock Proteins) et les LEA (Late Embryogenesis abundant proteins) exprimées au niveau des mitochondries des graines.

Les membre de l'équipe SMS ont pour ambition, depuis plusieurs années, d'étudier les mécanismes qui contribuent à l'émergence et à l'implantation efficaces des semis sous des contraintes environnementales telles que les hautes températures par exemple. Les recherches menées au sein de SMS permettent une meilleure connaissance de la physiologie et des déterminants génétiques qui influent sur la vigueur des semis et aident à améliorer la performance des cultures dans le contexte du changement climatique mondial et de l'agriculture durable.

De plus, les Pays de la Loire est la première région horticole de France, cela permet à l'IRHS d'apporter une dynamique importante dans le développement des secteurs de l'horticulture et des semences grâce aux recherches qui y sont faites. Grâce au pôle de compétitivité Végépolys qui allie recherche, formation et entreprise, l'IRHS fait également partie d'un grand réseau qui dynamise et développe ce territoire.

2. Intérêt et enjeu

Les plantes sont des organismes sessiles, et leur capacité à s'adapter au stress est cruciale pour la survie dans les milieux naturels (Queitsch *et al.*, 2000). En effet, pour tous les organismes vivants, des températures modérément supérieures à la température de croissance optimale représentent un problème pour la survie (Richter *et al.*, 2010). Les plantes peuvent subsister à des températures supérieures à celles optimales pour la croissance (thermotolérance basale) ou acquérir une tolérance à un stress thermique léthal (thermotolérance acquise) si elles sont exposées à des températures modérément élevées (Kaplan *et al.*, 2004 ; Ruelland et Zachowski, 2010).

Avec le dérèglement climatique avéré aujourd'hui, il est important d'observer les impacts que peuvent avoir des changements de température sur les plantes car leur survie dépend de leur capacité à s'adapter à ces variations thermiques. Il a été reporté des baisses de rendements dues à des épisodes de variations du climat telles que l'amplitude des épisodes de chaleur qui tend à augmenter (Ahuja *et al.*, 2010). En effet, le stress thermique devient un problème de plus en plus important pour la sécurité alimentaire à mesure que le réchauffement de la planète progresse (Ohama *et al.* 2017). Il est donc important d'appréhender la voie de réponse au stress thermique HSR (Heat Stress Response) car cela pourrait permettre de comprendre comment les plantes arrivent à s'adapter et à survivre aux fortes températures, ainsi que de sélectionner des plantes plus tolérantes au stress thermique (Mittler et Blumwald, 2010).

3. Perception de la chaleur et signalisation

On sait que l'acclimatation à la température résulte d'un processus multigénique extrêmement complexe (Guy *et al.*, 2007) impliquant un certain nombre de changements physiologiques et biochimiques (Ruelland et Zachowski, 2010), y compris des changements dans la structure et la fonction des membranes, la teneur en eau dans les tissus, l'expression globale des gènes, des protéines, des lipides et de la composition des métabolites secondaires (Kaplan *et al.*, 2004).

Les plantes semblent ressentir des changements de température au niveau des membranes, où le signal de chaleur active transitoirement des canaux perméables au calcium qui semblerait être indispensable pour induire la HSR (Ohama *et al.*, 2017 ; Saidi *et al.*, 2009), ainsi qu'au niveau de l'accumulation de protéines dénaturées présentes (Richter *et al.*, 2010). De plus, il a été remarqué que le stress thermique a également provoqué une augmentation générale des taux d'acides aminés libres, et il a été conclu que des taux accrus d'acides aminés pouvaient être associés à la dégradation des protéines (Guy *et al.*, 2007).

La réponse au choc thermique nécessiterait des facteurs de transcriptions spécifiques prénommés facteurs de choc thermique (Richter *et al.*, 2010). Selon Ikeda *et al.* (2011), ils régulent l'expression des gènes des protéines de choc thermique (HSPs), qui confèrent la thermotolérance. Leur liaison à l'élément de choc thermique sur l'ADN initierait l'assemblage de la machinerie de transcription (Richter *et al.*, 2010). Selon Guy *et al.* (2007) les gènes affectés par le choc thermique seraient contrôlés par deux gènes HSF (Heat Shock Transcription Factor) majeurs, HsfA1a et HsfA1b.

Les facteurs de transcriptions sont les principaux régulateurs de la transcription au cours de la HSR selon Ohama *et al.* (2017). Cependant, l'adaptation au stress thermique serait un système de régulation multicouche comprenant non seulement des facteurs de transcriptions, mais aussi des régulateurs épigénétiques comme l'hyper méthylation de H3K4 (histone 4 lysine 4) qui fonctionnerait comme une forme de mémoire au stress thermique (Ohama *et al.*, 2017).

Dans la suite de ce mémoire, nous utiliserons le terme stress thermique pour qualifier le fait de faire subir aux plantes des températures supérieures aux températures de croissance. Nous utiliserons le terme de choc thermique pour le placement des plantes à des températures supérieures à 40°C, température à laquelle le stress commence à devenir létal.

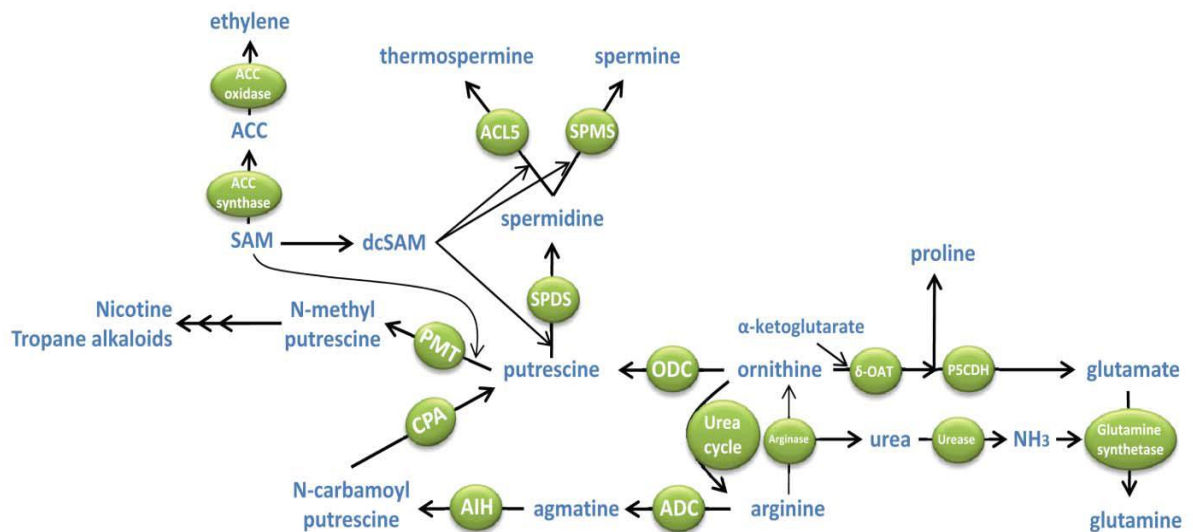


Figure 1 : Voie de biosynthèse des polyamines (Putrescine, Spermidine et Spermine) et connexions avec d'autres voies métaboliques. ACC, acide aminocyclopropane carboxylique ; ACL5, ACAULIS5 - thermospermine synthase ; ADC, arginine décarboxylase ; AIH, agmatine iminohydrolase ; CPA, N-carbamoylputrescine amidohydrolase ; dcSAM, SAM décarboxylée ; δ -OAT, δ -ornithine aminotransférase ; ODC, ornithine décarboxylase ; P5CDH, pyrroline 5-carboxylate déshydrogénase ; PMT, Putrescine N-méthyltransférase ; SAM, S-adenosylméthionine ; SAMDC, S-adenosylméthionine décarboxylase ; SPDS, spermidine synthase ; SPMS, spermine synthase (d'après Bitrián et al., 2012).

4. Prétraitement thermique

On parle de thermotolérance quand une plante survit à des températures supérieures à sa température optimale de croissance. La capacité à acquérir une tolérance accrue au stress thermique est connue comme une thermotolérance acquise ou une acclimatation (survie à une hausse de température létale grâce à un priming (ou prétraitement) à une température élevée mais non létale) (Bokszczanin et Fragkostefanakis, 2013 ; Kaplan et al., 2004).

Un prétraitement de conditionnement à des températures modérées avant un traitement à température létale a montré une amélioration partielle de la survie chez plusieurs espèces végétales (Silva-Correia et al. 2014). Lorsqu'il est appliqué un priming à 37 °C pendant 90 minutes, il est observé une thermotolérance face au stress thermique de 45 °C pendant 30 minutes qui était initialement léthal chez *Arabidopsis thaliana* (Larkindale et Vierling, 2007).

De plus, Silva-Correia et al. (2014), ont montré qu'un stress thermique important (15 °C au-dessus de la température de croissance optimale d'*Arabidopsis*) est nécessaire pour déclencher la totalité des événements de signalisation conduisant à des réponses d'acclimatation.

5. Les polyamines

Les polyamines peuvent avoir un effet protecteur contre les stress abiotiques tels que la hausse de température (Sagor et al., 2012). Leur fonction biologique était initialement associée à la capacité de lier différentes macromolécules anioniques (ADN, ARN, chromatine et protéines), les considérant ainsi comme des substances ayant un rôle structural (Alcázar et al., 2010). Cependant, il a été décrit ultérieurement qu'en plus de stabiliser les structures macromoléculaires, les polyamines agissent comme des molécules régulatrices dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux. Ceux-ci comprennent la division cellulaire, la différenciation et la prolifération, la mort cellulaire, la synthèse de l'ADN et des protéines et l'expression génique (Alcázar et al., 2010). De plus, l'accumulation de polyamines apporterait une tolérance accrue aux multiples stress abiotiques, y compris la tolérance à la chaleur (pour revue Asthir et Deep, 2011). En effet, les polyamines joueraient également un rôle important dans la protection des plantes contre le stress abiotique en raison de leur rôle dans l'ajustement osmotique, le maintien de la stabilité de la membrane et le piégeage des radicaux libres (Cvikrová et al., 2012).

Pour cela, les polyamines pourraient interagir avec les membranes et les acides nucléiques, mais également avec les protéines kinases et les facteurs de transcription et seraient donc impliqués dans les voies de transduction du signal (Cvikrová et al., 2012). Selon Yiu et al. (2009), les polyamines ont également des propriétés antiradicalaires et une activité antioxydante qui confère une protection contre les stress abiotiques.

La biosynthèse des trois polyamines les plus courantes (putrescine (Put), spermidine (Spd) et spermine (Sp)) est initiée soit par décarboxylation directe de l'ornithine par l'ornithine décarboxylase (ODC), soit par décarboxylation de l'arginine par l'arginine décarboxylase (ADC) (figure 1). Une autre enzyme essentielle pour la synthèse de polyamines est la S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC), qui est nécessaire pour la production du groupe aminopropyle utilisé dans la biosynthèse de Spd et Sp (Cvikrová et al., 2012). Par conséquent, les polyamines et l'éthylène pourraient agir de manière antagoniste en rivalisant avec le substrat commun SAM. Alors que l'éthylène contribuerait à la sénescence et à la maturation des fruits, les polyamines favoriseraient la croissance et inhiberaient la sénescence (Bitrián et al., 2012).

Selon Königshofer et Lechner (2002), sous contrainte thermique, la spermidine et la spermine plutôt que la putrescine, semblent contribuer à la tolérance au stress. Ainsi, il est intéressant de se pencher sur ces molécules pour essayer de produire des plantes tolérantes au stress.

6. Les protéines de choc thermique (HSPs)

Pour se protéger contre les hausses de températures, les plantes synthétisent des HSPs (Heat Shock Proteins). Les HSPs sont divisés en cinq grandes classes, à savoir, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, et de petites protéines de choc thermique (sHSPs) (Lin *et al.*, 2018 ; Richter *et al.*, 2010). Les HSPs sont impliquées dans le maintien et la restauration de l'homéostasie des protéines lors du stress thermique. En effet, elles améliorent les problèmes causés par le mauvais repliement et l'agrégation des protéines en empêchant la formation d'agrégats protéiques non spécifiques et en aidant les protéines à acquérir leurs structures natives (Queitsch *et al.*, 2000 ; Richter *et al.*, 2010). HSP 101, HSP 70, HSP 17.6 et HSP 17.7 peuvent également protéger les cellules végétales contre la mort cellulaire programmée induite par la chaleur selon Lin *et al.* (2018).

Les protéines de la famille des HSPs 100 sont une localisées dans le cytosol (comme l'HSP 101) et comprennent à la fois des éléments inductibles à la chaleur et constitutifs. Elles favorisent la réactivation des protéines dénaturées par la chaleur (Queitsch *et al.*, 2000). Elles sont dépendantes de l'ATP et peuvent tirer les protéines mal repliées à travers leur pore central, permettant aux protéines de se replier (Richter *et al.*, 2010). De plus les protéines HSPs 100 coopèrent généralement avec les HSPs 70 pendant le traitement des protéines agrégées (Liberek *et al.*, 2008).

Les petites HSPs (sHSPs) (12 à 40 KDa) se distinguent par une localisation intracellulaire diverse (cytosolique – par exemple 17.6 -, mitochondriale, chloroplastique, peroxysomique et nucléaire) et sont indépendantes de l'ATP. Elles sont proposées comme première ligne de défense, interagissant avec les protéines dénaturées pour empêcher leur agrégation lors du stress et les présentant aux chaperons HSP 100 et HSP 70 dépendants de l'ATP qui peuvent désagréger et replier les protéines non-natives (McLoughlin *et al.*, 2016).

7. Impact de la chaleur sur la photosynthèse et la respiration

La Rubisco, enzyme majeure de la photosynthèse, est très sensible à la température (Hüve *et al.*, 2011 ; Ruelland et Zachowski, 2010). De même la protéine D1, constituant du core complexe du photosystème II (PS II) est dégradée lors d'une augmentation de la température (pour revue Allakhverdiev *et al.*, 2008). De plus, une augmentation de la température entraîne un changement de fluidité membranaire effectant le transport des électrons au niveau des thylacoïdes (Hüve *et al.*, 2011 ; Ruelland et Zachowski, 2010).

Selon Grass et Burris (1995), les taux de respiration des mitochondries isolées d'embryons de graines de *Triticum durum* présentaient des taux de consommation d'oxygène plus faibles à partir de 4 h à haute température (36 °C jour/29 °C nuit) que les mitochondries isolées d'embryons de graines cultivées à basse et moyenne température (20/15 et 28/21 °C). L'acclimatation à des températures plus chaudes se traduit par une respiration qui diminue (pour revue Atkin et Tjoelker, 2003).

8. Objectif du stage

Le travail effectué au cours de ce stage porte sur l'étude de l'influence de différents prétraitements sur la survie de plantules d'*Arabidopsis thaliana* (Col-0) à la suite d'un stress thermique de 43 ou 45 °C. Pour cela, il sera réalisé des primings chimiques avec des polyamines (Putrescine, Spermidine et Spermine) à différentes concentrations pour déterminer s'il est possible de mimer un priming thermique par un priming chimique, ainsi que des doubles primings thermiques à 37 °C pour tester l'effet mémoire. Étant donné la durée du stage il a été choisi de produire des résultats préliminaires qui seront à confirmer par la suite. Les résultats obtenus permettront d'optimiser les prétraitements testés dans le but de protéger les plantes des hausses de températures initialement létales, et à plus long terme de créer des plantes surexprimant des HSPs ou des polyamines et/ou de remplacer des prétraitements thermiques par des chimiques en vue de protéger les végétaux d'importance économique du réchauffement climatique.

D -1



*Préparation des boîtes de cultures
selon la figure 3*

Chambre froide (4°C, de 12 à 24h)

Stratification des graines

D 0

Chambre de culture (100 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, 16h de
luminosité à 21 °C / 8h de nuit à 19 °C, sur plaque agitante)

Germination et croissance

D X (6 à 26
jours après
D0)

Priming thermique
(2h à 38 °C)

Priming chimique (2h avec Pu,
Sp ou Spd à 100 et 500 μM)

Récupération

*Récupération de 2h
ou 24 h*

D Y (1 à 12
jours après
DX)

Choc thermique
(2h à 43 °C) *

Récupération pendant 5h

Congélation

Oxygraphie

Dosage de la
chlorophylle

Calcul de la respiration
et de la photosynthèse
brute

Extraction et dosage des
protéines

Western Blot (Détection HSP
101 et 17.6)

Visualisation de la
membrane

Photo

D Y + 11 jours

* : ou à 45 °C pour les cultures 7 et 4.

Figure 2 : Récapitulatif du déroulement des manipulations réalisées. D X : jour n° X ; Pu : Putrescine ; Sp : Spermine et Spd : Spermidine.

Tableau I : Nom des cultures subissant un priming thermique

<i>Numéro de culture</i>	<i>Priming</i>	<i>Stress thermique</i>
2	hP (D6)	HS (D14)
8	hP (D6)	HS (D13)
11	hP (D6)	HS (D14)
1	hP (D6)	HS (D8)
13	hP (D14)	HS (D15)
3	hP (D14)	HS (D26)
1'	hP (D26)	HS (D27)
7	hP (D14)	HS+ (D15)
12'	hP (D6)	HS (D15)

Tableau II : Nom des cultures subissant un priming chimique

<i>Numéro de culture</i>	<i>Priming</i>	<i>Stress thermique</i>
5	Sp cP (D6)	HS (D7)
12	Spd cP (D6)	HS (D7)
16	Pu cP (D6)	HS (D7)
5'	X cP (D6)	HS (D7)
6'	Sp cP (D7)	HS (D7)
14	Spd cP (D7)	HS (D7)
17	Pu cP (D7)	HS (D7)

Légendes :

- C : Control (sans aucun stress)
- P : Priming
- H : Stress thermique (sans priming)
- PH : Priming + Stress thermique
- Photo : Plantules présent en photo à la fin de l'expérience
- Prot : Plantules pour l'extraction de protéines
- Oxy : Plantules présent pour mesurer la concentration de dioxygène lors de la respiration et la photosynthèse

Tableau III : Nom des cultures subissant un double priming thermique

<i>Numéro de culture</i>	<i>Priming</i>	<i>Priming</i>	<i>Stress thermique</i>
10	hP (D6)	hP (D14)	HS (D15)
9	hP (D6)	hP (D14)	HS (D23)
6	hP (D6)	hP (D14)	HS (D26)
4	hP (D6)	hP (D14)	HS+ (D15)

A

a

C photo	P photo	C prot
H photo	PH photo	H prot

B

C	P 100	P 500
H	PH 100	PH 500

b

C oxy	P oxy	P prot
H oxy	PH oxy	PH prot

C

Pu	Sp	Spd
P5000	P5000	P5000
PH5000	PH5000	PH5000

Figure 3 : Plan des plaques multipuits. A : pour les cultures subissant un priming thermique. B : multipuits pour les cultures subissant un priming chimique. Plan de plaque en trois exemplaires (a, b et c). C : pour la culture 5'. C : Control (sans aucun stress) ; P : Priming ; H : Stress chimique (sans priming) ; PH : Priming + Stress chimique et 100 et 500 : Concentration en μM de polyamine.

Matériels et méthodes

1. Matériels végétaux

Comme décrit dans Benamar *et al.* (2013) 17 mg de graines d'*Arabidopsis thaliana* écotype Colombia (Col-0) sont mises en culture dans 6 mL d'eau minéral d'Evian dans chaque puits de plaques multipuits (6 puits – CytoOne référence CC7672-7506) selon le plan présenté en figure 3 (système Araphen). Les graines sont mises en chambre froide à 4 °C et à l'obscurité pendant 12 à 24 heures environ pour lever la dormance. Les plaques multipuits contenant les graines sont ensuite mises en chambre de culture sur une table d'agitation elliptique (135 rpm) à 21 °C avec une période de 16 heures de lumière (100 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) et 8 heures d'obscurité à 19 °C.

Le suivi de 21 cultures d'*Arabidopsis thaliana* Col-0 est réalisé selon le déroulement présenté dans la figure 2. Les lancements des cultures ainsi que les manipulations effectuées sont réalisés à des jours différents (tableau I, II et III) (ANNEXE I).

Remarque : Le choix a été fait de ne pas réaliser de réplicat biologique dans un premier temps afin d'obtenir des résultats préliminaires. Néanmoins les expériences se font sur une population de plantules (plus d'une centaine) permettant d'éliminer de dérive génétique individuelle.

2. Priming thermique et choc thermique

Les plantules avec leur milieu de culture (eau d'Evian) sont transvasées dans des bouteilles Shotts en verre de 25 mL avec des bouchons vissées hermétiquement et placées au bain-marie à 38° C pour les priming et 43 ou 45 °C pour les stress thermiques pendant 2h. Les bain-maries utilisés sont équipés de LED pour apporter une lumière constante lors du traitement thermique (100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Les plantules ainsi que le milieu de culture sont remis dans les puits correspondants de la plaque après les traitements. Des plantules des différentes conditions (C, P ou P 100 et P 500, H, PH ou PH 100 et PH 500) sont récupérées après le stress thermique et mises dans des tubes de 1,5 mL contenant 2 billes en verres. Les tubes sont placés au congélateur à -24 °C en attendant de réaliser l'extraction des protéines. Les plaques multipuits sont remises en chambre de culture sur agitateur après chaque traitement.

Remarque : les stress sont faits le matin à 8h pour toujours être dans les mêmes conditions métaboliques, sauf lorsque priming et choc thermique ont lieu le même jour. Des schémas synoptiques du déroulement des expériences seront présentés dans la partie résultats pour en faciliter la lecture. Il est à noter qu'ils ne sont pas à l'échelle pour l'axe du temps.

3. Priming chimique par les polyamines (Spermidine (Spd), Spermine (Sp) et Putrescine (Pu))

Pu, Sp, Spd proviennent de chez Sigma-Aldrich (adresse). Les poudres sont dissoutes dans du DMSO 10%. Le pH a été ajusté entre 5 et 6 avec de l'acide chloridrique pour la Spermidine et la Spermine qui basifient énormément le milieu.

Tableau IV : Volume à prélever des différents constituants de la gamme étalon réalisée pour le dosage des protéines.

Quantité de BSA (μg)	0	1	2	3	4	5
<i>BSA 0,1 mg/mL (μL)</i>	0	10	20	30	40	50
<i>H₂O (μL)</i>	50	40	30	20	10	0
<i>Réactif de Bradford (μL)</i>	200	200	200	200	200	200
<i>Total (μL)</i>	250	250	250	250	250	250

Les plantules sont transvasées dans des plaques multipuits contenant 6 mL d'eau d'Evian avec des concentrations en polyamines déterminées sur le plan de plaque (figure 3BC). Les plaques sont mises sur plateau agitant et dans la chambre de culture pendant 2h. A la suite du traitement chimique, les plantules sont épongées pour enlever l'excès de solutions et rincées deux fois avec de l'eau d'Evian avant d'être épongées une dernière fois et remises dans leurs milieux de culture originel. Les plaques multipuits sont ensuite remises sur agitateur dans la chambre de culture.

4. Extraction et dosage des protéines

Les échantillons avec 2 billes de verre dans des tubes de 1,5 mL sont tout d'abord trempés dans de l'azote liquide puis mis dans des portoirs sortis de congélateur à -80 °C. Le broyage est effectué 1 min à 30 Hertz par TissueLyser de Qiagen. Les tubes sont sortis des portoirs et de nouveau mis dans l'azote liquide.

Il est rajouté 500 µL de tampon SEE [50 mM Na₂HPO₄ ; 50 mM NaH₂PO₄ (pH8) ; 10 mM d'EDTA (chélatant les ions métalliques et inhibant les protéases utilisant ces ions) ; 0,1 % de Triton-X 100 et 0,1 % de Sarcosyl (N-laurysarcosine) (détergents solubilisant les membranes et permettant d'en extraire les protéines) contenant du DTT 10 mM (réduit les ponts disulfures des protéines) et un cocktail antiprotéase (anti protéase (AP) 25 X (inhibant l'action des protéases) et PMSF 100 X (inhibiteur de protéases à sérine)] dans chaque tube. Les tubes sont ensuite réchauffés puis vortexés. Pour améliorer la lyse des cellules un « freeze-thaw » est réalisé : tubes mis dans l'azote (congélation) pendant 1 min environ puis décongélation en les réchauffant. Les tubes sont vortexés une dernière fois avant d'être mis sur glace.

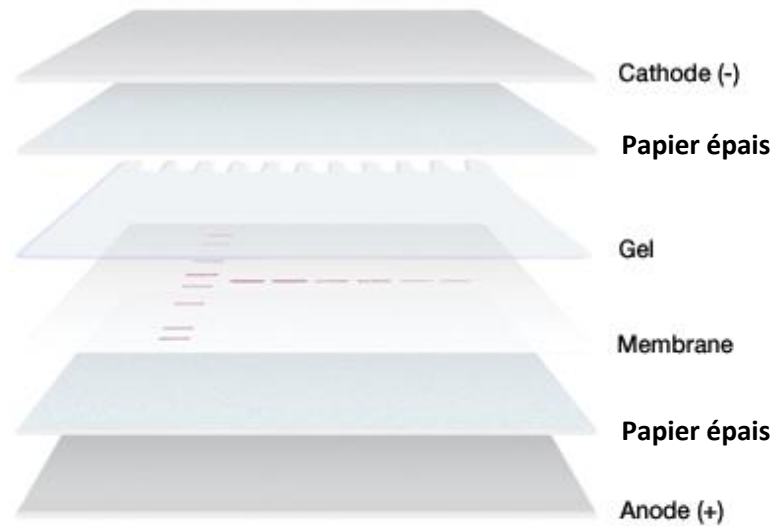
Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) à l'aide d'une courbe étalon d'albumine sérique de bœuf (BSA) allant de 0 à 5 µg de BSA à 0,1 mg/mL (tableau IV).

Pour chaque échantillon d'une culture (C, P, H et PH pour les traitements thermiques et C, P 100, P 500, H, PH 100, PH 500 pour les traitements chimiques), il est prélevé trois volumes différents (1, 2 et 4 µL) de surnageant mis dans 200 µL de réactif de Bradford 4X et complétés avec de l'eau distillée pour atteindre 250 µL de volume total, transférés dans une plaque 96 puits. Deux gammes étalons sont réalisées par plaque. La lecture de l'absorbance est effectuée à 595 nm sur le spectrophotomètre SPECTRO star^{nano} de BMG LABTECH et les données sont traitées par le logiciel Mars. En effet, le changement de la couleur du bleu de Coomassie se réalise par liaison avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. Par conséquent, la concentration en protéine peut être mesurée à cette longueur d'onde.

5. Electrophorèse et Western Blot

L'électrophorèse des protéines se fait en conditions dénaturantes (technique de SDS-PAGE, Laemmli, 1970) sur un gel polyacrilamide 12%. Pour la réalisation du gel d'électrophorèse, le gel de séparation (Protegel, H₂O ultrapure, Glycérol 80 %, Tampon de séparation 4X (1,5 M de Tris-HCL, 0,4 % de SDS, pH 8,8), APS 40 % et TEMED) est coulé en premier, suivi du gel de concentration (Protegel, H₂O ultrapure, Tampon de concentration 4X (0,5 M de Tris-HCL pH 6,8, 0,4 % de SDS), APS 40 % et TEMED). Le gel de concentration permet de concentrer les protéines et le gel de séparation, de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. La migration se fait dans du tampon de migration (0,1 M de Tris, 0,768 M de Glycine et 0,1 % de SDS) qui permet de conduire

A



B

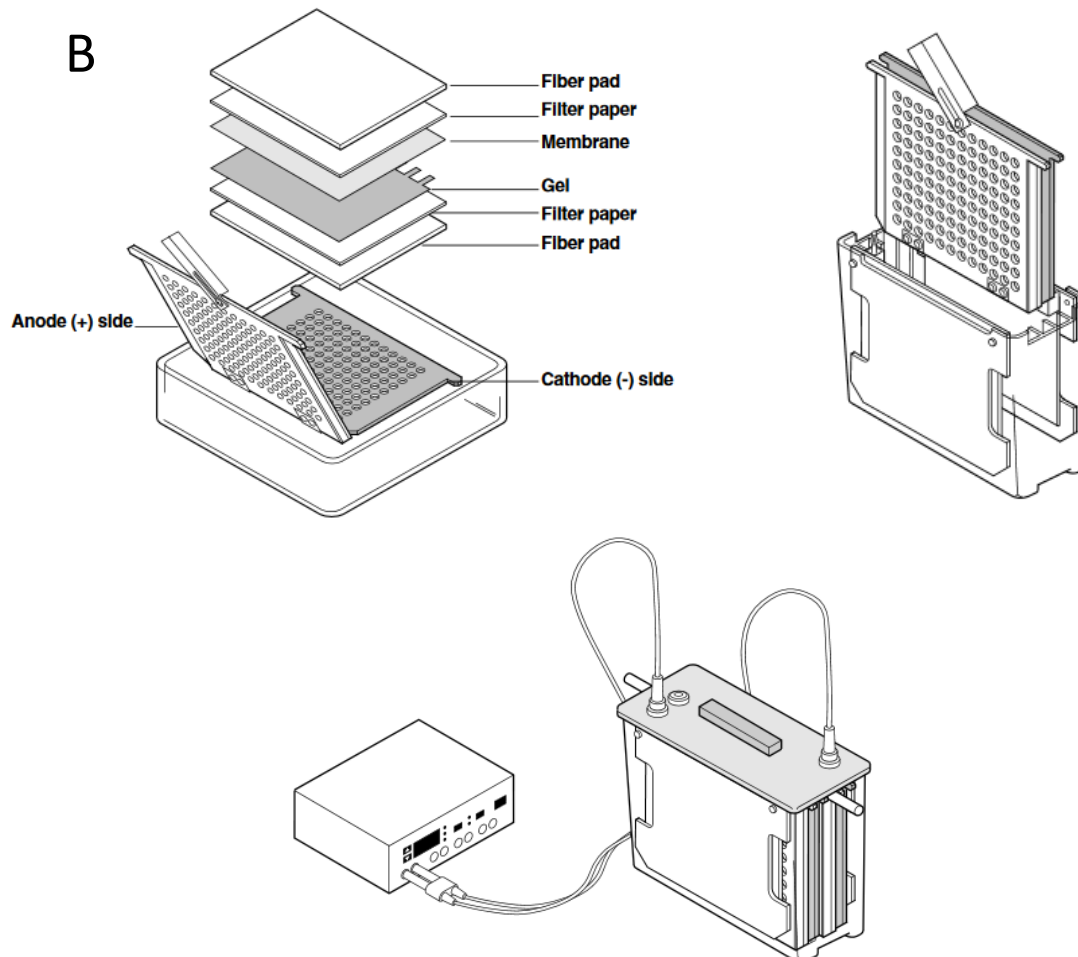


Figure 4 : Schéma illustrant le positionnement des différents composants pour le transfert des protéines sur membrane. A : transfert en semi-sec, B : transfert en liquide. Fiber paper : papier éponge, Filter paper : 3 papier Watman. Source : <http://www.bio-rad.com/fr-fr/applications-technologies/protein-blotting-methods?ID=LUSPPSESH>. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1703910D.pdf> (modifié)

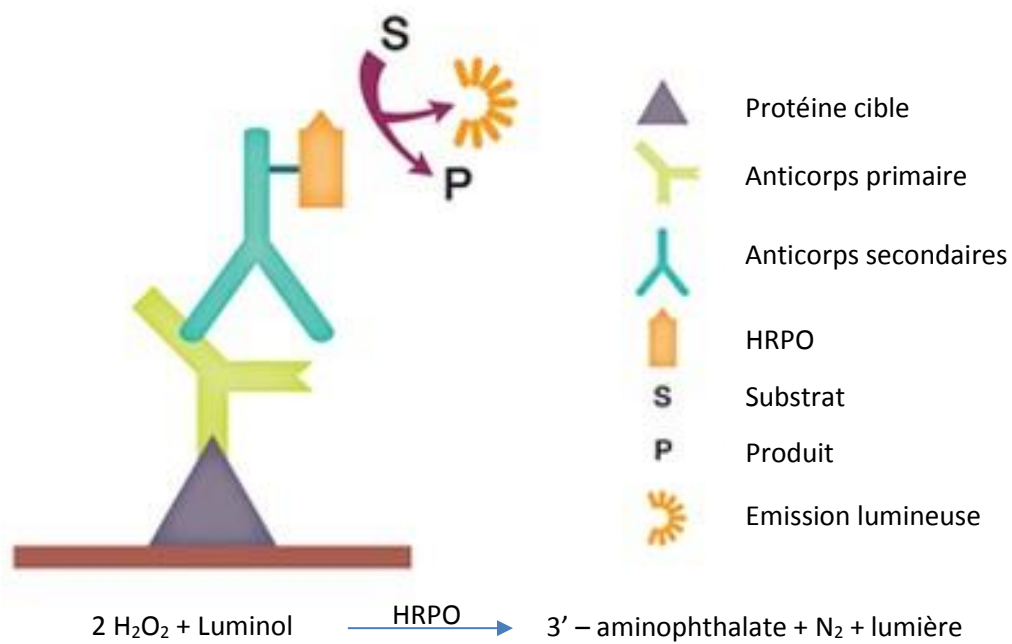


Figure 5 : Réaction chémiluminescente. La chimiluminescence est l'émission lumineuse détectable d'une réaction chimique, utilisant l'HRPO (Horse Radish Peroxidase) comme enzyme conjuguée à l'anticorps secondaire et le Luminol comme substrat. Le Luminol est oxydé par HRPO, provoquant une émission de lumière détectée par le ChemiDoc. Source : <http://www.bio-rad.com/fr-fr/product/clarity-clarity-max-western-ecl-blotting-substrates?ID=e08909eb-3369-42ec-a585-df189004268f> (modifié).

le courant électrique. Les protéines sont chargées négativement, par conséquent, elles migreront vers le bas de la cuve (cathode). Il est chargé la quantité de 20 µg de protéines pour chaque échantillon et 10 µL de marqueurs Dual Color (BioRad). La migration se fait à tension constante (200V), grâce au Power PAC 1000 de BIO-RAD, pendant environ 1h jusqu'à sorti du front de migration du gel.

À la suite de l'électrophorèse, le gel est rincé 3 fois à l'eau distillée puis mis dans du tampon de transfert (Tampon CAPS 10X (48 mM Tris, 39 mM Glycine, 1,3 mM SDS), 10 % de méthanol ou d'éthanol, pH 9,2). Le gel est mis en agitation. Un deuxième bain de 5 min dans du tampon de transfert est de nouveau réalisé après rinçage du gel.

Deux méthodes ont été utilisées pour transférer les protéines du gel de polyacrylamide sur membrane PVDF (PolyVinylidene Fluoride, 0,2 µm) : La méthode de transfert en semi-sec, grâce à TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFERT CELL de BIO-RAD ou de transfert en liquide, grâce à Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell de BIO-RAD (schémas généraux présentés en figure 4). La membrane de PVDF est préalablement activée au méthanol pur avant d'être équilibrée, tout comme tous les autres constituants du transfert, dans le tampon de transfert. Le transfert se fait à tension constante, 15V pendant 20 min pour le transfert semi-sec ou 100V pendant 1h pour le transfert liquide.

Après le transfert la membrane est au TBST (TBS (Tris-Buffered Saline : 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl), 0,05 % Tween 20) pendant 5 min sur agitateur. La membrane est ensuite colorée au rouge Ponceau puis rincée au TBST pour décolorer. La membrane est ensuite mise à saturer dans du TBST contenant 3 % de lait en poudre demi-écrémé (pour bloquer les sites aspécifiques) sur agitateur en chambre froide pour la nuit ou à température ambiante pendant 1h.

Après rinçage au TBST la membrane peut être découpée en plusieurs morceaux (deux horizontalement pour pouvoir tester les protéines a haut poids moléculaires d'une part, et à faible poids moléculaires de l'autre et verticalement lorsque plusieurs expériences sont placées sur le même gel. L'anticorps primaire dilué au 1/5000eme pour HSP 17.6 (petite HSP, cytosolique) et HSP 101 (famille des HSPs 100, cytosolique) dans du TBST lait 3 % est mis en contact avec la membrane pour 2h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C.

Les membranes sont rincées plusieurs fois dans du TBST (5 fois 5 min) avant incubation avec l'anticorps secondaire couplés à une Horse Radish Peroxidase dilué au 1/20000eme dans du TBST (anti-IgG de lapin). Les membranes sont incubées pendant 45 min à température ambiante avant d'être rincées 5 fois 5 min sur agitateur.

La révélation des protéines se fait grâce au produit de révélation ECL (Enhance ChemiLuminescence) de BIO-RAD sous le ChemiDoc™ XRS+ de BIO-RAD. Ce produit comprend deux solutions : une solution chemiluminescente (luminol) et une solution de peroxyde. Pour une demi-membrane, on la recouvre d'1 mL de produit de révélation (½ de luminol et ½ de peroxyde) (figure 5). La demi-membrane est ensuite prise en photo grâce au logiciel ImageLab (temps de révélation plus long pour HSP 17.6 car en moins grande quantité que les HSP 101).

Pour comparer les quantités relatives des HSP 101 et 17.6, les bandes sur les membranes révélant les HSPs sont quantifiées à l'aide du logiciel ImageLab.

Les membranes sont pour finir conservées sèches dans du papier Watman.

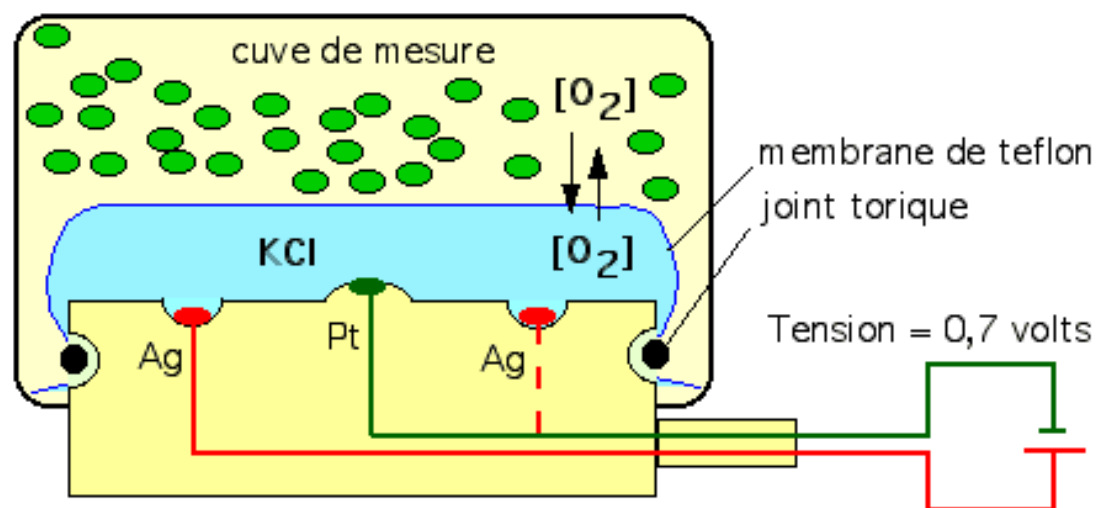


Figure 6 : Schéma d'une électrode à oxygène vu en coupe. Ag : anode circulaire en argent et Pt : cathode en platine. Source : https://rnbio.upmc.fr/physio_veg_photosynthese_page_electrode.

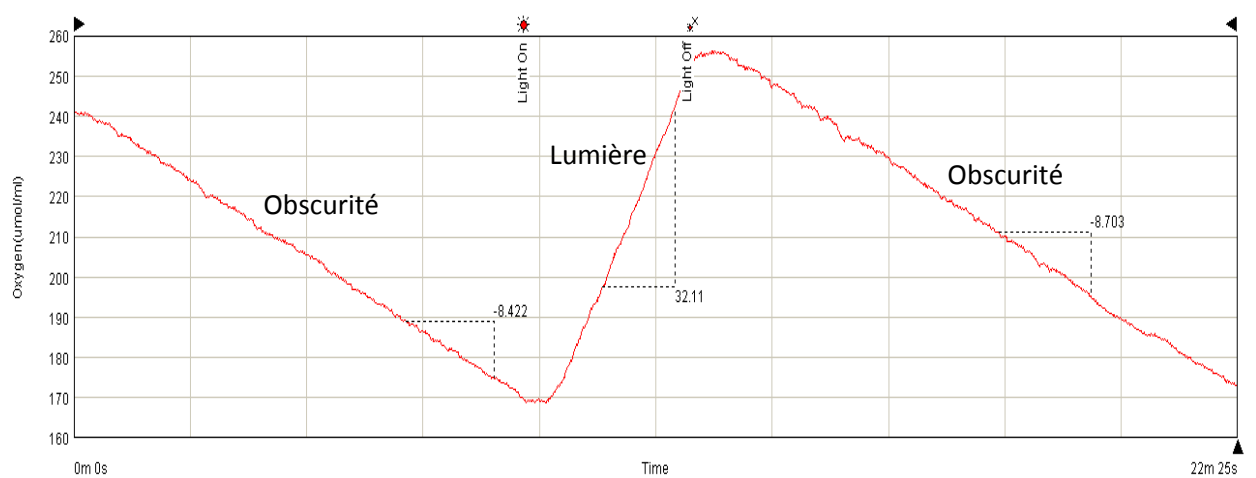


Figure 7 : Copie d'écran d'une trace réalisée en oxygraphie.

6. Dosage de la chlorophylle

Les plantules sont séchées brièvement à la suite de l'oxygraphie et mises dans 1 mL DMF (diméthylformamide) pour extraire les pigments. Les tubes sont laissés à 4 °C pendant 12 heures minimum pour parfaire l'extraction et éviter la dégradation des pigments.

Les échantillons sont centrifugés 5 min à 14000 g et le surnageant dosé selon la méthode de Moran (1982). L'absorbance est mesurée à 647 et 664nm sur 100µL d'échantillon mis dans un puit d'une plaque 96 puits en quartz, par le spectrophotomètre FLUOstar Omega de BMG LABTECH. Le logiciel Omega est utilisé pour la lecture des données.

7. Oxygraphie

Pour les différentes conditions testées (C_{oxy} , P_{oxy} , H_{oxy} et PH_{oxy} ou C, P 100, P 500, H, PH 100 et PH 500 (figure 2)) de chaque culture, la concentration de dioxygène a été mesurée à l'aide d'une électrode à oxygène (figure 6) Oxy-Lab de Hansatech.

L'électrode à oxygène contient une membrane de téflon qui est perméable aux gaz et imperméable à l'eau. Par conséquent, on conserve le même volume (1 mL d'eau naturel d'Evian) mis dans la chambre. L'électrode est polarisée et le courant électrique est proportionnel à la concentration en dioxygène. Cela permet donc de déterminer, à la suite de la calibration et de la mesure du courant électrique, la concentration en dioxygène à l'aide du logiciel O₂ View.

Pour chaque condition testée, il est prélevé une petite motte de plantules (environ 1/3 des plantules présentes dans un puits) puis elle est mise dans la chambre de l'électrode à oxygène. La concentration en dioxygène est d'environ 250 nmol au départ et la température est contrôlée à 25 °C grâce à un bain-marie. La concentration en dioxygène est d'abord mesurée à l'obscurité. Dans cette condition il y a consommation de dioxygène. Les plantules sont ensuite éclairées, dans cette condition d'éclairement les plantules produisent de l'oxygène grâce à la photosynthèse. Les plantules sont ensuite de nouveau remises en condition d'obscurité et la mesure continue jusqu'à atteindre une consommation de dioxygène stable comme présenté dans la figure 7.

A la fin de la mesure l'échantillon est placé dans des tubes de 1,5 mL et mis au congélateur à - 25 °C en attendant de réaliser toutes les mesures de respirations et photosynthèses des différents échantillons. Les échantillons sont ensuite sortis du congélateur et il est rajouté dans chaque tube 1 mL de DMF (diméthylformamide). Les échantillons sont ensuite placés à - 4 °C en attendant de pouvoir réaliser le dosage de la chlorophylle.

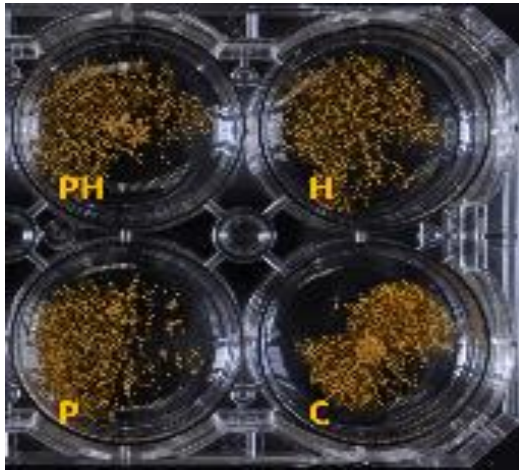
Grâce au logiciel Excel et des données recueillies après mesure de la chlorophylle et de la respiration et de la photosynthèse, il est calculé pour chaque échantillon la photosynthèse nette et brute ainsi que la respiration en $\text{nmol.s}^{-1}.\text{mg chl}^{-1}$. La photosynthèse brute est la somme de la respiration plus celle de la photosynthèse nette. Une moyenne avec écart-type pour les réplicats est effectuée.

8. Calculs et Statistiques

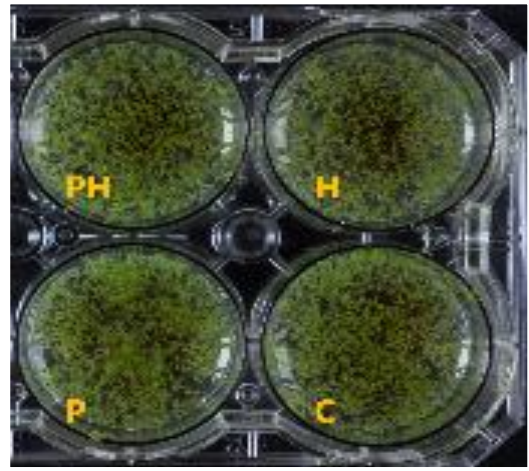
Des tests de Student et d'ANOVA avec un α de 0,05 sont utilisés pour déterminer si les différences observées pour chaque condition et culture sont significativement différentes (si valeurs inférieures à 0,05) lorsque plus de 3 réplicats ont pu être réalisés.

A

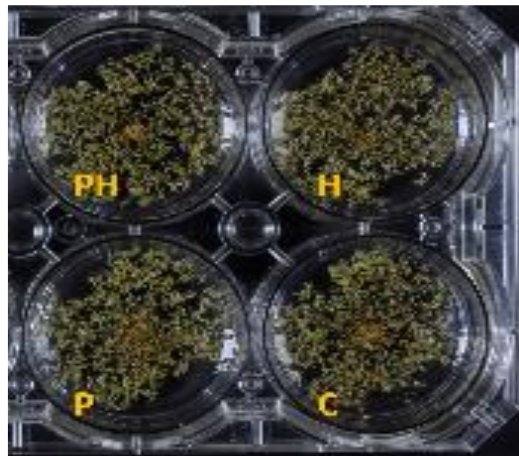
D1



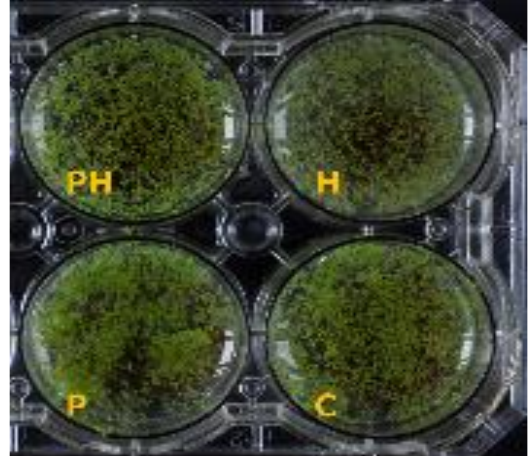
D11



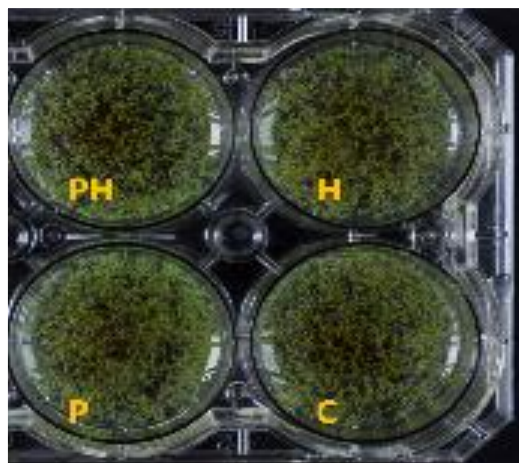
D3



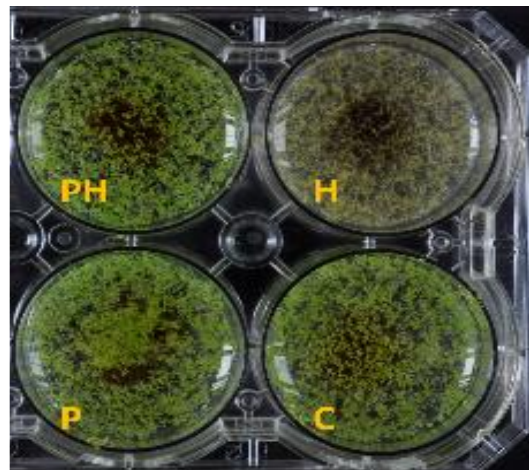
D14

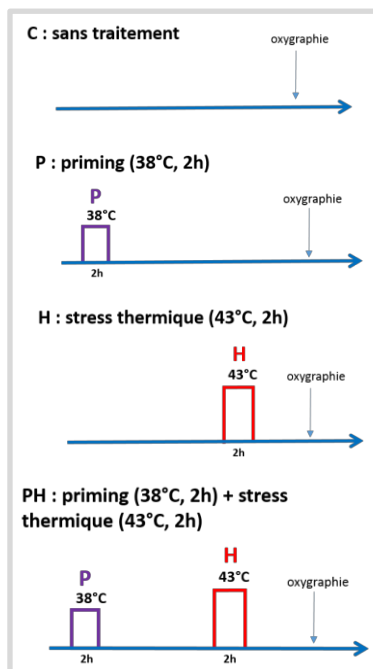


D7

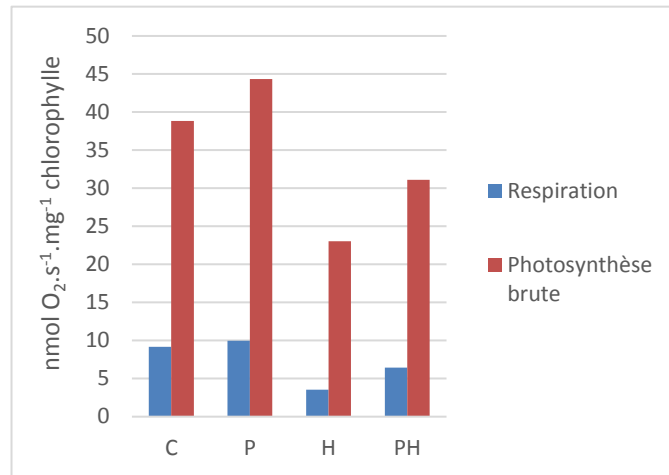


D18





B



C

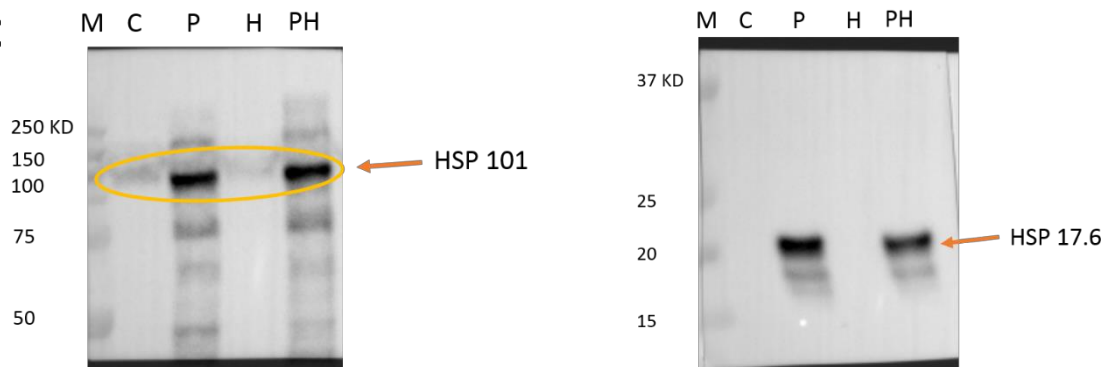


Figure 8 : Acclimatation au stress thermique à la suite d'un priming au sixième jour (D6) et un choc thermique à 43 °C au septième jour (D7). A : Cinétique du développement des plantules au cours des jours. B : Consommation et production de dioxygène lors de la respiration et la photosynthèse 5h après le stress thermique à 43 °C. C : Photographie des membranes après révélation de la quantité en HSP 101 et 17.6 à la suite du stress thermique à 43 °C.

Tableau V : Récapitulatif de la quantité relative de protéine des HSPs 101 à la suite du choc thermique. Valeurs relatives par rapport à la condition C. Abs : absence d'HSPs.

	HSP 101			
	C	P	H	PH
D6 D7	1	4,031	abs	4,342

Tableau VI : Récapitulatif de la quantité relative de protéine des HSPs 17.6 à la suite du choc thermique. Valeurs relatives par rapport à la condition P. Abs : absence d'HSPs.

	HSP 17.6			
	C	P	H	PH
D6 D7	abs	1	abs	0,833

Résultats

1. Acclimatation au stress thermique

Après imbibition dans de l'eau d'Evian et passage à 4 °C pendant une nuit, les graines sont mises en culture au jour D1 (figure 8A). La germination et le développement des cotylédons sont visibles au troisième jour (D3). Un stress thermique de 2 heures à 38 °C est réalisé au jour 6 puis un choc thermique, de 2 heures à 43 °C, 24 heures après (D7). Aucune différence n'est visible entre les plantules des différentes conditions à la suite de ces traitements (figure 8A). Les plantules de condition H qui ont seulement subi un stress thermique à 43 °C commence à jaunir au quatorzième jour (D14), et 11 jours après le stress thermique (D18) elles sont mortes (figure 8A). Par contre les plantules ayant subi le prétraitement thermique à 38°C et un stress thermique à 43 °C 24 heures après (condition PH) sont toujours vivantes 11 jours après le stress (D18) (figure 8A). On peut observer que les plantules de la condition C (n'ayant aucun traitement) ont le même aspect visuel de D6 à D18. 5 heures après le stress thermique à 43 °C réalisé à D7, les plantules des différentes conditions sont prélevées pour réaliser une mesure de la respiration et de la photosynthèse. Pour cela nous regardons la consommation et la production de dioxygène à l'obscurité et à la lumière respectivement. Les plantules qui ne subissent aucun traitement (condition C) ont une consommation de dioxygène de 9 nmol O₂.s⁻¹.mg⁻¹ chlorophylle pour la respiration et une production de dioxygène de 39 nmol O₂.s⁻¹.mg⁻¹ chlorophylle pour la photosynthèse (figure 8B). Cette production diminue d'environ 50 % et la consommation diminue des 2/3 pour les plantules de condition H (43 °C, 2h). Comparées aux plantules ayant subi un stress thermique, les plantules de condition PH (priming 38 °C, 2h + choc 43 °C, 2h) ont une photosynthèse et une respiration plus performantes de 45 % et 26 % respectivement (figure 8B).

Au niveau moléculaire nous savons que les HSPs sont des marqueurs de la réponse au stress thermique. Par la technique du western blot la présence et l'abondance de ces dernières, dans les extraits protéiques des plantules, sont testées.

La quantité d'HSP 101 a augmenté quatre fois à la suite du priming thermique à 38 °C (tableau V). Le priming thermique à 38 °C permet également la synthèse de HSP 17.6 (qui est absente dans les conditions C et H) que celui-ci soit suivi d'un choc thermique ou non (tableau VI). Le choc thermique suivant le priming a fait diminuer de 20 % la quantité d'HSP 17.6.

Le priming thermique à 38 °C au sixième jour protège les plantules d'un stress thermique à 43 °C 24 heures plus tard, en induisant une protection faisant intervenir des HSPs.

2. Effet des polyamines sur les plantules sans stress thermique

Différentes concentrations de polyamines (100, 500 et 5000 µM) ont été testées sur des plantules de 6 jours en l'absence de tout autre stress.

12 jours après un contact de 2 heures, les plantules traitées à la spermine et la spermidine 5000 µM sont mortes. Celles traitées à la putrescine à la même concentration semblent survivre mais en étant moins

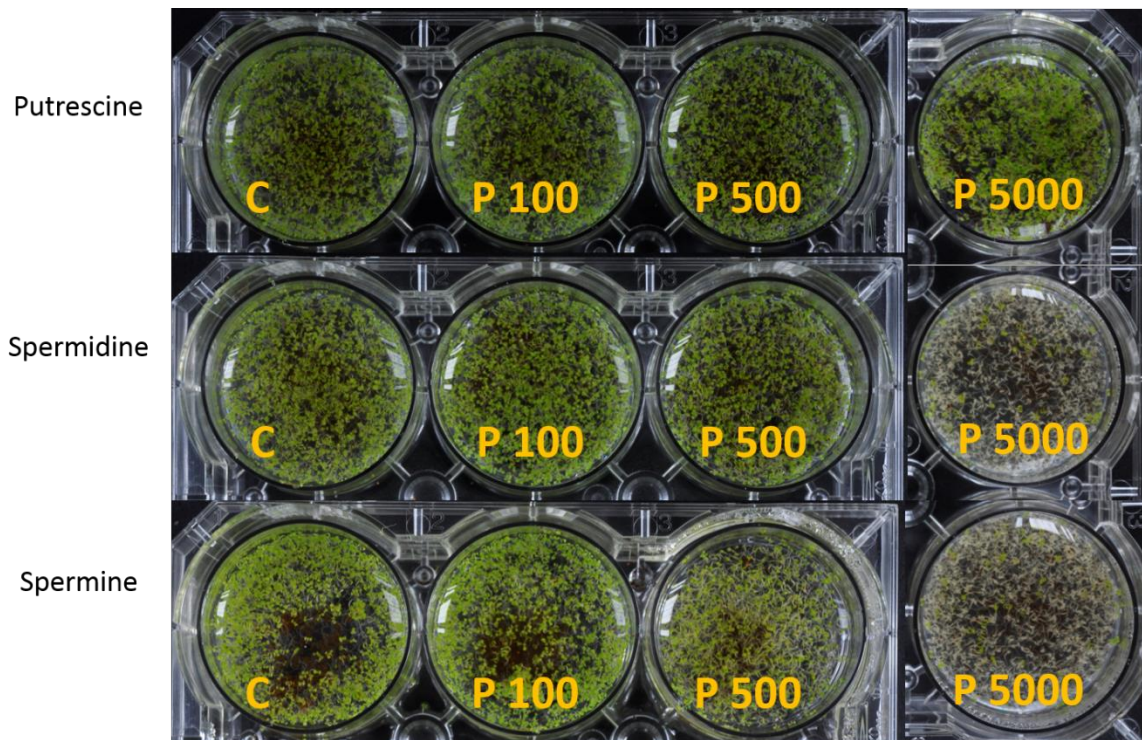
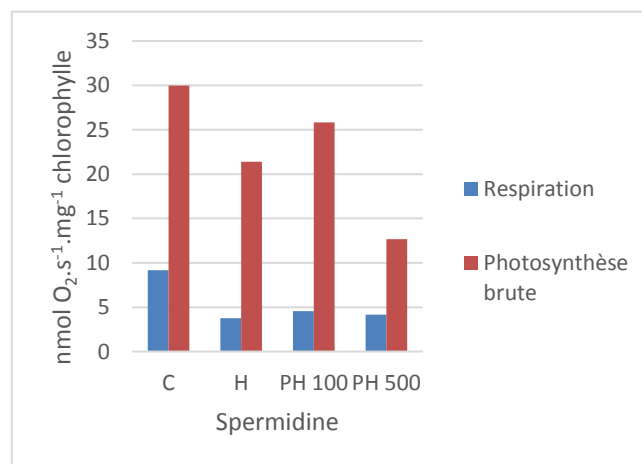


Figure 9 : Photographie des plantules des conditions C, P 100, P 500 et P 5000 12 jours après le priming chimique aux polyamines. 100, 500 et 5000 : concentration en μM de polyamine.

A



B

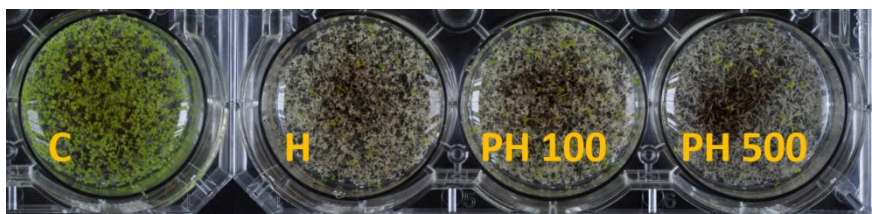
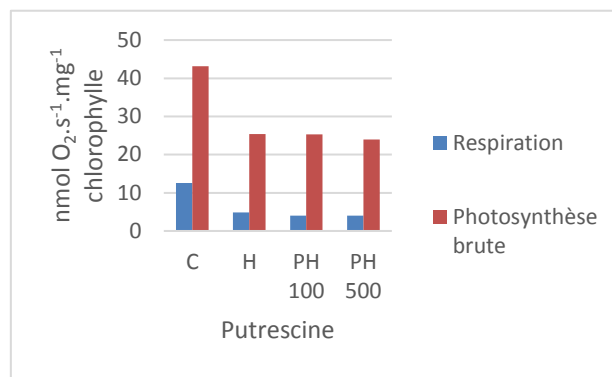


Figure 10 : Priming chimique au sixième jour avec la spermidine et un choc thermique à 43 °C au septième jour. A : Consommation et production de dioxygène lors de la respiration et la photosynthèse 5h après le choc thermique de 43 °C. B : Photographie des conditions C, H, PH 100 et PH 500 11 jours après le choc thermique.

A



B



C

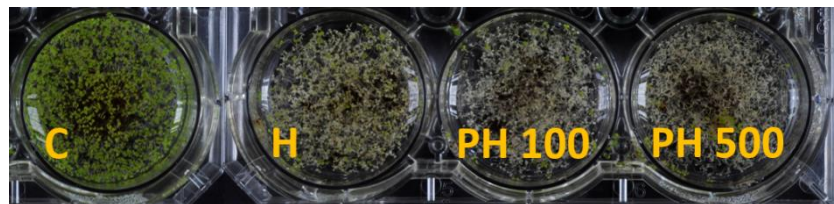
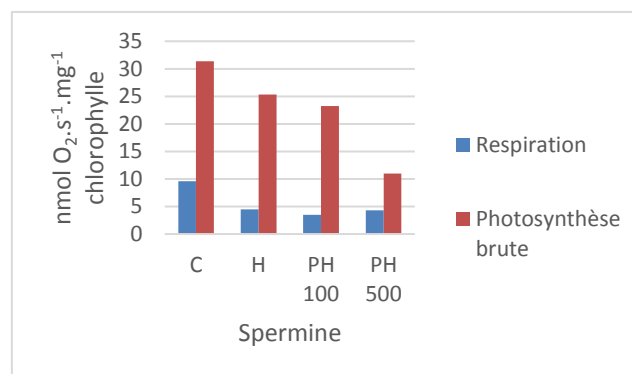
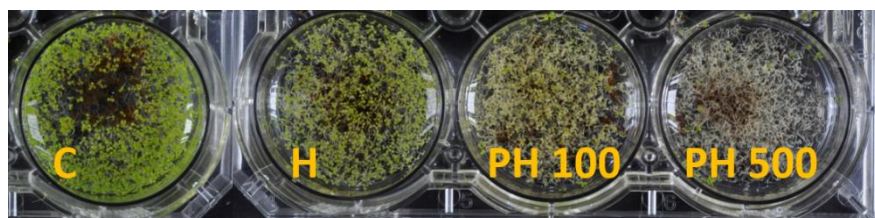


Figure 11 : Priming chimique avec la putrescine et un choc thermique à 43 °C. A : Consommation et production de dioxygène lors de la respiration et la photosynthèse 5h après le choc thermique de 43 °C. B : Photographie des conditions C, H, PH 100 et PH 500 11 jours après le stress thermique à la suite d'un priming chimique au sixième jour et un choc thermique au septième jour. C : Photographie des conditions C, H, PH 100 et PH 500 11 jours après le choc thermique à la suite d'un priming chimique et un choc thermique au septième jour.

A



B



C



Figure 12 : Priming chimique avec la spermine et un choc thermique à 43 °C. A : Consommation et production de dioxygène lors de la respiration et la photosynthèse 5h après le choc thermique à 43 °C. B : Photographie des conditions C, H, PH 100 et PH 500 11 jours après le choc thermique à la suite d'un priming chimique au sixième jour et un choc thermique au septième jour. C : Photographie des conditions C, H, PH 100 et PH 500 11 jours après le choc thermique à la suite d'un priming chimique et un choc thermique au septième jour.

vigoureuses (figure 9). Le même constat est fait pour la spermine à 500 μM . Par contre, à 100 μM les polyamines ne semblent pas impacter négativement les plantules tout comme à 500 μM pour la putrescine et la spermidine (figure 9).

Les primings chimiques sont donc réalisés aux concentrations de 100 et 500 μM pour ne pas impacter la survie des plantules lors des expériences utilisant les polyamines.

3. Est-il possible de mimer un priming thermique par un priming chimique avec des polyamines ?

Dans des conditions similaires à celles décrite dans le paragraphe 1 sur le priming thermique, un traitement de 2 heures aux polyamines (priming chimique) est réalisé en substitution du stress thermique à 38 °C, 24 heures avant le choc thermique à 43 °C.

5 heures après le choc thermique la respiration diminue de moitié par rapport au contrôle quel que soit le prétraitement (figure 10A). La photosynthèse qui s'établit à 30 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ chlorophylle pour le contrôle est diminué de 27, 14 et 58 % pour les conditions H, PH 100 et PH 500 respectivement lors de la photosynthèse (figure 10A). (Pour rappel : H = choc thermique seul, PH 100 = priming chimique 2h à 100 μM + choc thermique). A 11 jours après le choc thermique, aucune plantule ayant subi le choc n'a survécu (figure 10B).

La spermine n'a donc pas réussi à protéger les plantules du stress thermique réalisé 24 heures après le priming chimique.

4. Est-il possible de mimer un priming thermique par un priming chimique si le temps entre le priming et le stress est plus court ?

Après l'échec de la spermine à mimer un priming thermique, nous avons voulu tester d'autres polyamines ainsi qu'un temps plus court entre le priming et le choc thermique.

Le traitement à la putrescine ne change pas l'impact du choc thermique sur la respiration et la photosynthèse (figure 11A). La consommation diminue d'environ 65 % pour les conditions H, PH 100 et PH 500 lors de la respiration et la production diminue de plus de 40 % pour les conditions H, PH 100 et PH 500 lors de la photosynthèse (figure 11A).

Des résultats similaires sont trouvés pour la spermine. En effet, la consommation diminue de plus de 50 % pour les conditions qui ont subi un stress. La production diminue de 20, 25 et 65 % pour les conditions H, PH 100 et PH 500 respectivement (figure 12A).

Que ce soit pour la putrescine ou la spermine, 11 jours après le choc thermique, il n'y a aucune survie (figure 11B et 12B).

La diminution de 24 heures à 2 heures entre le priming chimique et le choc thermique à 43 °C n'y change rien (figures 11C et 12C).

Dans nos conditions, les polyamines ne semblent pas pouvoir mimer un priming thermique.

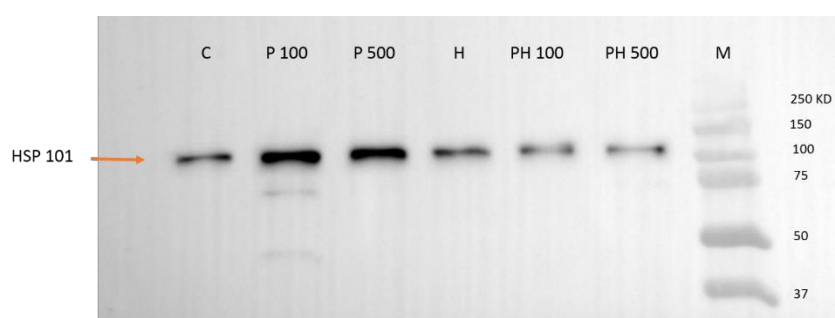
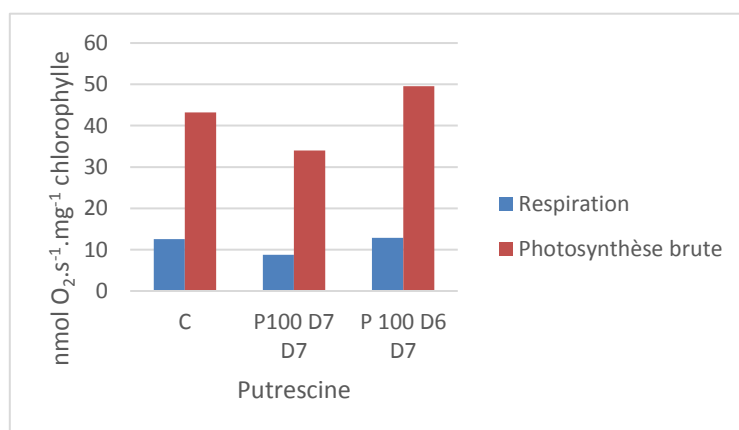


Figure 13 : Photographie des membranes après révélation de la quantité en HSP 101 et 17.6 à la suite du choc thermique à 43 °C 24 heures après un priming chimique à la spermine.

Tableau VII : Récapitulatif de la quantité relative de protéine des HSPs 101 à la suite du choc thermique pour les traitements aux polyamines. Valeur relative par rapport à la condition C. Abs : absence d'HSPs.

	HSP 101				
	P 100	P 500	H	PH 100	PH 500
Putrescine (D6 D7)	1,606	1,150	0,537	abs	0,955
Spermidine (D6 D7)	1,004	0,570	0,761	0,663	0,292
Spermine (D6 D7)	1,856	1,618	0,896	0,593	0,456

A



B

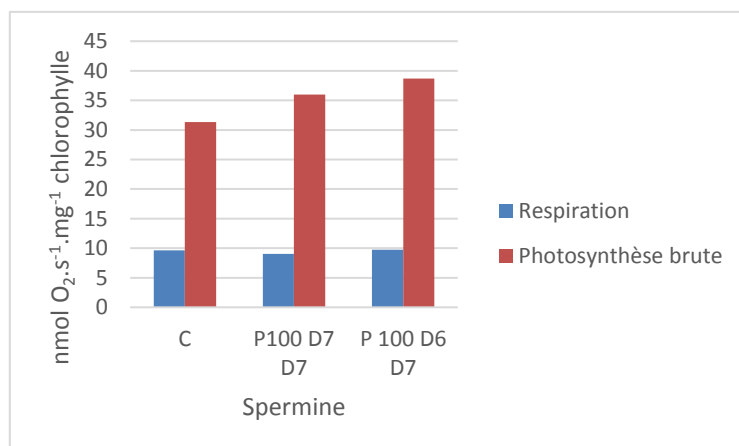


Figure 14 : Consommation et production de dioxygène lors de la respiration et la photosynthèse après le choc thermique à 43 °C. A : traitement à la spermine. B : traitement à la putrescine. D7 D7 : priming chimique et choc thermique au septième jour. D6 D7 : priming chimique au sixième jour et choc thermique au septième jour.

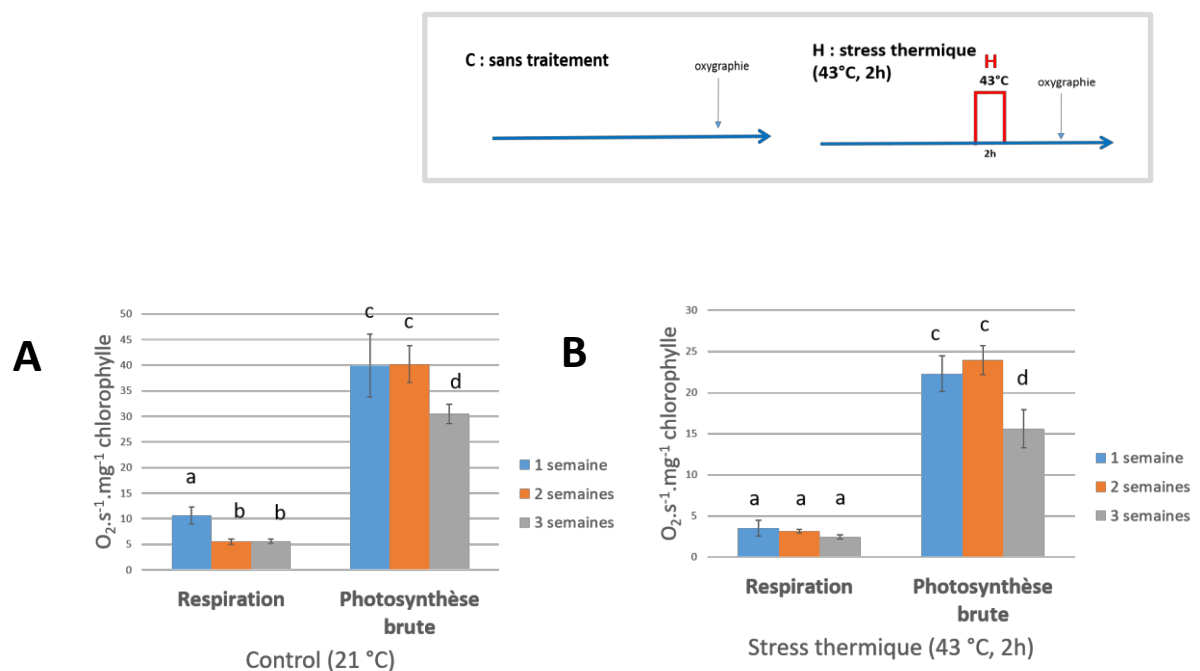


Figure 15 : Influence du temps de culture sur la respiration et la photosynthèse. A : Influence du temps de culture pour la condition contrôle (C), B : influence du temps de culture pour la condition stress thermique (H). Ecart-type réalisé sur 10 réplicats pour 1 semaine, 12 réplicats pour 2 semaines et 8 réplicats pour 3 semaines. Test d'Anova et de Student avec un α de 0,05. Résultats significativement différents lorsque les lettres ne sont pas identiques.

D'un point de vue moléculaire, on constate l'absence d'HSP 17.6, quelles que soient les conditions après le choc thermique (données non montrées). Cependant, l'HSP 101 est détectable (tableau VII, figure 13). À la suite du priming chimique à 100 μ M, une augmentation de la quantité en HSP 101 de 38 et 46 % pour la putrescine et la spermine respectivement est observée par rapport au contrôle. La quantité des HSPs est également plus importante avec des concentrations de 500 μ M lors du priming chimique. Cependant, elle est moins importante de 28 et 13 % pour la putrescine et la spermine respectivement comparée à la concentration de 100 μ M (tableau VII). Pour la spermidine, les primings chimiques aux deux concentrations testées n'apportent pas de changement pour ces deux HSPs (tableau VII).

Mais un stress thermique à 43 °C (conditions PH) réduit les quantités de ces deux HSPs à un niveau inférieur au contrôle (tableau VII).

Des niveaux similaires sont retrouvés pour la condition H (tableau VII).

Même avec une augmentation de la quantité de protéine à la suite du prétraitement chimique, cette quantité n'atteint pas une quantité 75 % plus importante comme chez un priming thermique de 38 °C (tableau V).

Le priming chimique ne permet pas d'induire complètement la voie de biosynthèse permettant de protéger les plantules d'un stress thermique.

5. Effet des polyamines sur la photosynthèse

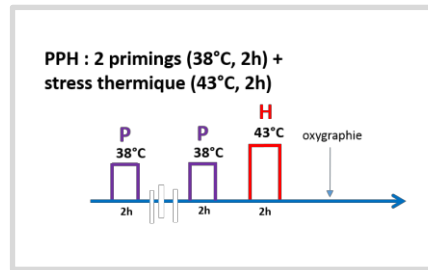
Au cours des expériences d'oxygraphie, on a pu constater que les plantules ayant été en présence de 100 μ M de polyamines ont une photosynthèse augmentée (figure 14). En effet, pour la putrescine, on observe une augmentation de production de dioxygène de 14 % 24 heures après le traitement chimique comparé au contrôle (C) (figure 14A). Quant à la spermine, une augmentation de 20 % par rapport au contrôle est observée (figure 14B). Une amélioration de la photosynthèse pour les mêmes conditions est également visible pour la spermidine (annexe II). Par contre, 5 heures après le traitement (condition P 100 D7 D7) la photosynthèse est soit affectée de 14 % soit faiblement augmentée de 15 % par rapport au contrôle pour la putrescine et la spermine respectivement.

La photosynthèse est améliorée à une concentration de 100 μ M de polyamine mais il faut attendre au moins 24 heures pour voir une différence importante.

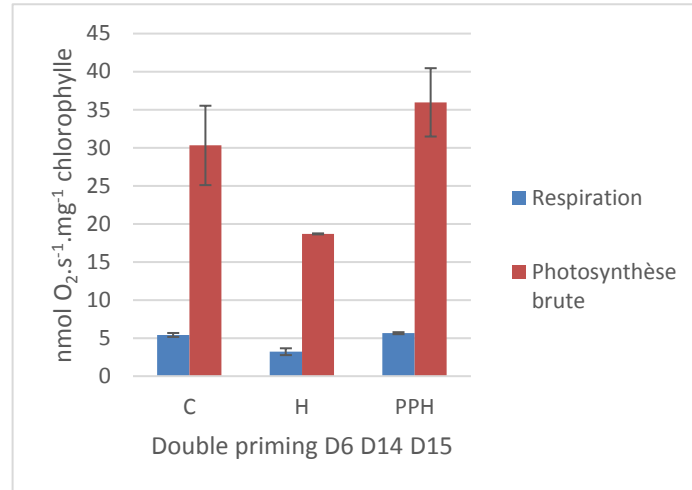
6. Influence du temps de culture sur la photosynthèse et la respiration

Afin de pouvoir réaliser des stress et choc thermique à des temps différents de D6 D7, nous avons regardé l'influence de l'âge des plantules sur la respiration et la photosynthèse après un choc thermique.

Pour la condition contrôle (C), la respiration diminue de moitié au bout de 2 semaines puis se stabilise (figure 15A). En effet, il est obtenu une différence significative (p-value de $1,7 \times 10^{-5}$) entre la première semaine et la deuxième. En ce qui concerne la photosynthèse, elle est stable durant les deux premières semaines de culture puis diminue d'1/4 à la troisième semaine (p-value de 0,0012) (figure 15A).



A



B

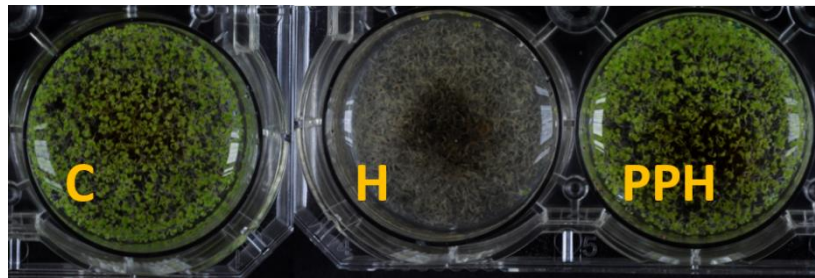
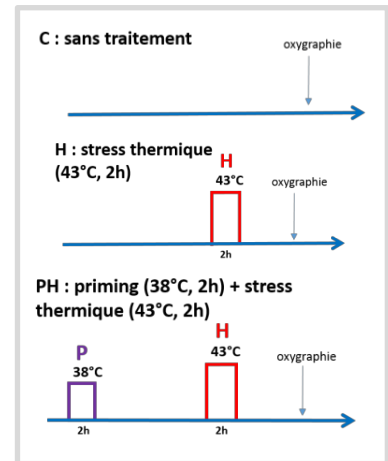
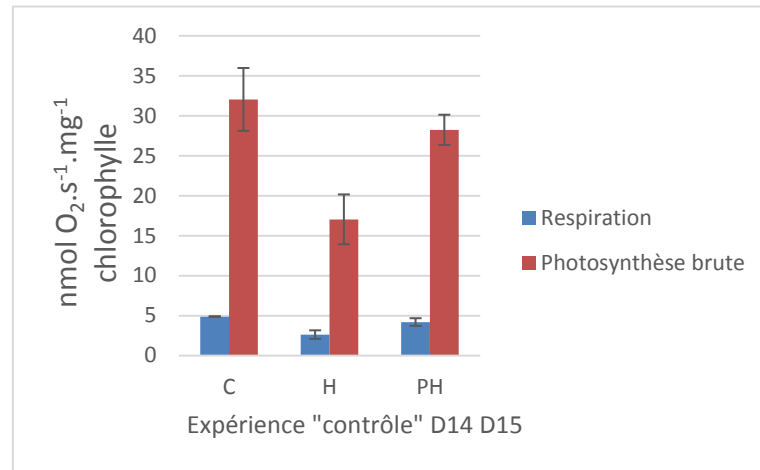


Figure 16 : Double priming réalisé au sixième et quatorzième jour suivi d'un choc thermique au quinzième jour. A : Consommation et production de dioxygène lors de la respiration et la photosynthèse 5h après le choc thermique de 43 °C. Ecart-type réalisé avec deux réplicats. B : Photographie des conditions C, H et PPH 11 jours après le choc thermique.

A



B

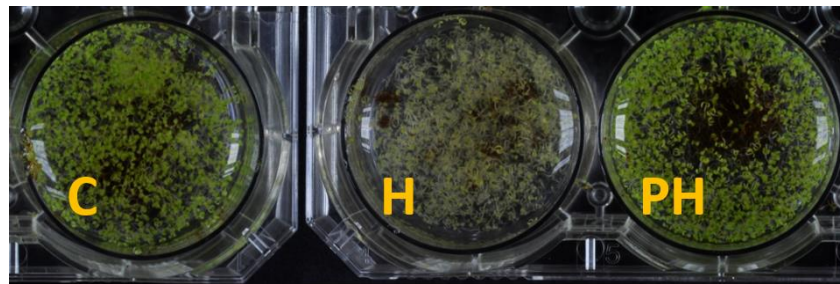
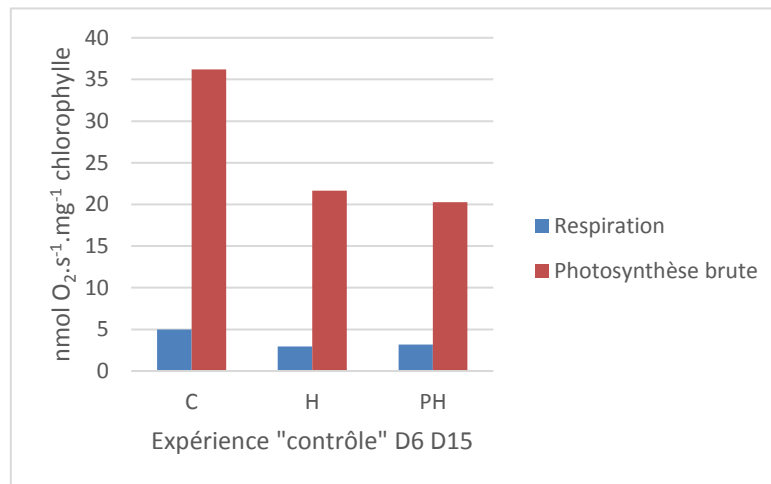


Figure 17 : Simple priming réalisé au quatorzième jour (D14) suivi d'un choc thermique au quinzième jour (D15). A : Consommation et production de dioxygène lors de la respiration et la photosynthèse 5h après le choc thermique à 43 °C. Ecart-type réalisé avec deux réplicats. B : Photographie des conditions C, H et PH 11 jours après le choc thermique.

A



B

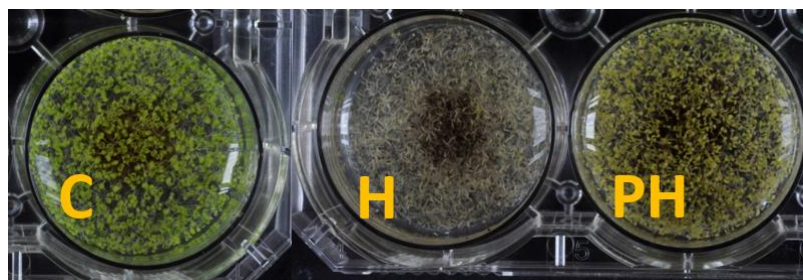
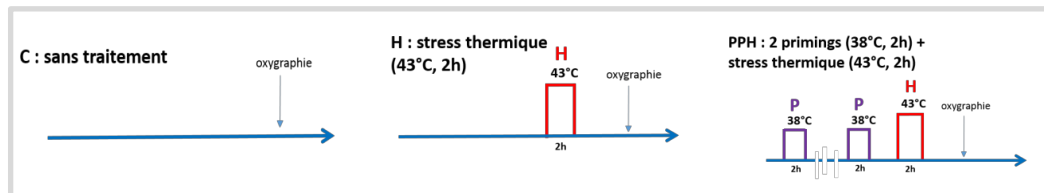
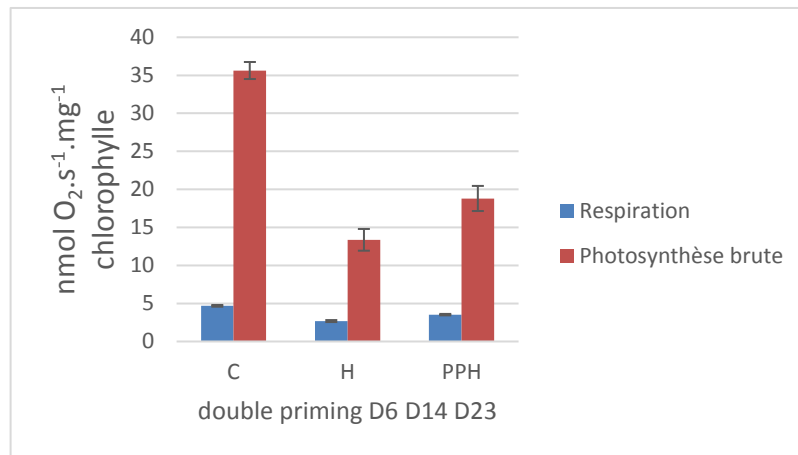


Figure 18 : Simple priming réalisé au sixième jour (D6) suivi d'un choc thermique au quinzième jour (D15). A : Consommation et production de dioxygène lors de la respiration et la photosynthèse 5h après le choc thermique de 43 °C. Ecart-type réalisé avec deux réplicats. B : Photographie des conditions C, H et PH 11 jours après le choc thermique.



A



B

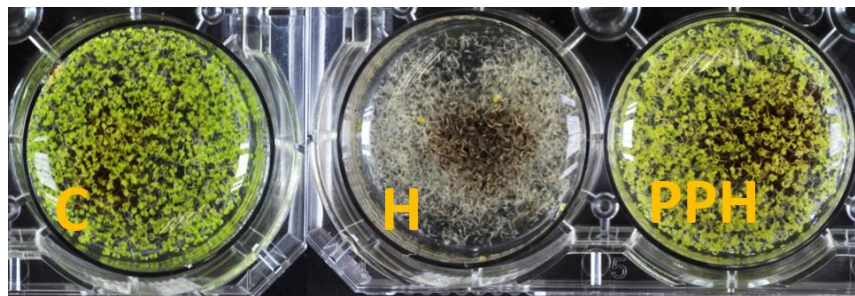


Figure 19 : Double priming réalisé au sixième et quatorzième jour suivi d'un choc thermique au vingt-troisième jour. A : Consommation et production de dioxygène lors de la respiration et la photosynthèse 5h après le choc thermique de 43 °C. Ecart-type réalisé avec deux réplicats. B : Photographie des conditions C, H et PPH 11 jours après le choc thermique. Remarque : les plantules de la condition PPH sont à l'œil nu clairement vivantes (coloration verte similaire au contrôle).

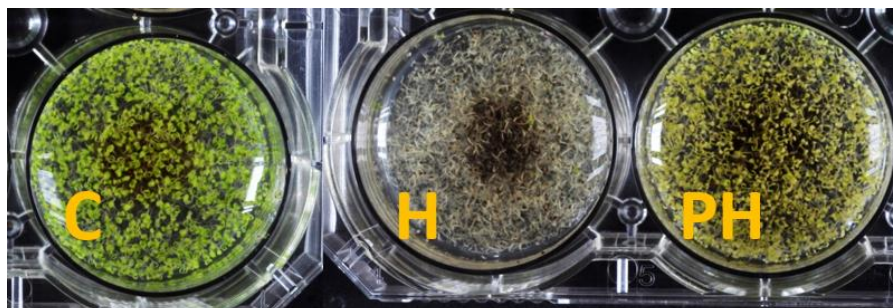


Figure 20 : Photographie d'un simple priming (D6 D15) pour les conditions C, H et PH 11 jours après le choc thermique. Remarque : les plantules de la condition PH sont clairement mortes (coloration jaune caractéristique des plantules mourantes).

Les plantules ayant subi un stress thermique sont affectées similairement au niveau de leur respiration, quel que soit leur âge (p-value de 0,052) (figure 15B). La photosynthèse quant à elle, se voit diminuer lors de la troisième semaine jusqu'à 1/3 comparée aux deux premières semaines (p-value de 0,001) (figure 15B).

7. Effet mémoire d'un double priming

Afin de tester l'effet mémoire d'un double priming thermique nous avons réalisé un premier priming à D6 (38 °C pendant 2 heures) puis un deuxième à D14. Le choc thermique à 43 °C (pendant 2 heures) est réalisé à différents temps suivant ce deuxième priming.

Les mesures oxygraphiques sont réalisées 5 heures après la fin du choc thermique. Dans le cas d'un choc thermique une journée après le deuxième priming (à D15) la respiration n'est pas impactée (condition PPH) (figure 16A). Il en est de même pour la photosynthèse, ce qui représente un gain de 76 % et de 92 % pour la respiration et la photosynthèse respectivement, par rapport aux plantules non conditionnées (condition H).

En comparaison avec la situation d'un priming simple, si celui-ci est réalisé 24 heures avant le choc thermique la condition PH ne présente plus qu'un avantage de 59 % et 66 % pour la photosynthèse et la respiration sur la condition stressée (H) (figure 17A). Par contre, qu'il s'agisse d'un priming simple (figure 17B) ou double (figure 16B) les plantules sont protégées et survivent, ne présentant pas de différence avec le contrôle.

Au niveau moléculaire, on observe une légère augmentation de la quantité d'HSP 17.6 présente dans les conditions PPH dans le cas du double priming (0,86 contre 0,78 pour le simple priming en unité relative par rapport à la condition P respective).

Même si un priming simple est suffisant pour protéger les plantules d'un choc thermique à 43 °C, il semblerait qu'un double priming permette une meilleure protection de la respiration et de la photosynthèse.

8. Le double priming influence-t-il la mémoire du priming ?

Si on allonge le temps entre le priming et le choc thermique, par exemple à 9 jours (expérience D6 D15), l'activité photosynthétique et respiratoire de H et PH deviennent indistinguables (figure 18A). Cela a pour conséquence une non survie des plantules après choc thermique, même si elles ont eu un priming (figure 18B). Nous avons néanmoins pu noter que les plantules PH semblaient être affectées moins rapidement que les plantules H.

Dans le cas d'un double priming en gardant cet écart de 9 jours entre le dernier priming et le choc thermique (expérience D6 D14 D23), nous avons obtenu une augmentation de la respiration et de la photosynthèse de 31 et 41 % respectivement comparée à la condition H (figure 19A). Cette protection entraîne une survie des plantules PPH à 11 jours après choc thermique (figure 19B).

Donc un double priming permet de garder une mémoire, au moins de 9 jours, du priming. Cette limite n'est que de 8 jours pour le simple priming. En effet, avec un écart de 8 jours (expérience D6 D14) on a une survie du PH (figure 20) mais une mort avec un écart de 9 jours (expérience D6 D15) (figure 18B).

Pour voir la limite de protection du double priming, il est réalisé un choc thermique 12 jours après le second priming (expérience D6 D14 D26). 5 heures après le choc thermique, une augmentation de 23 et 16 % est

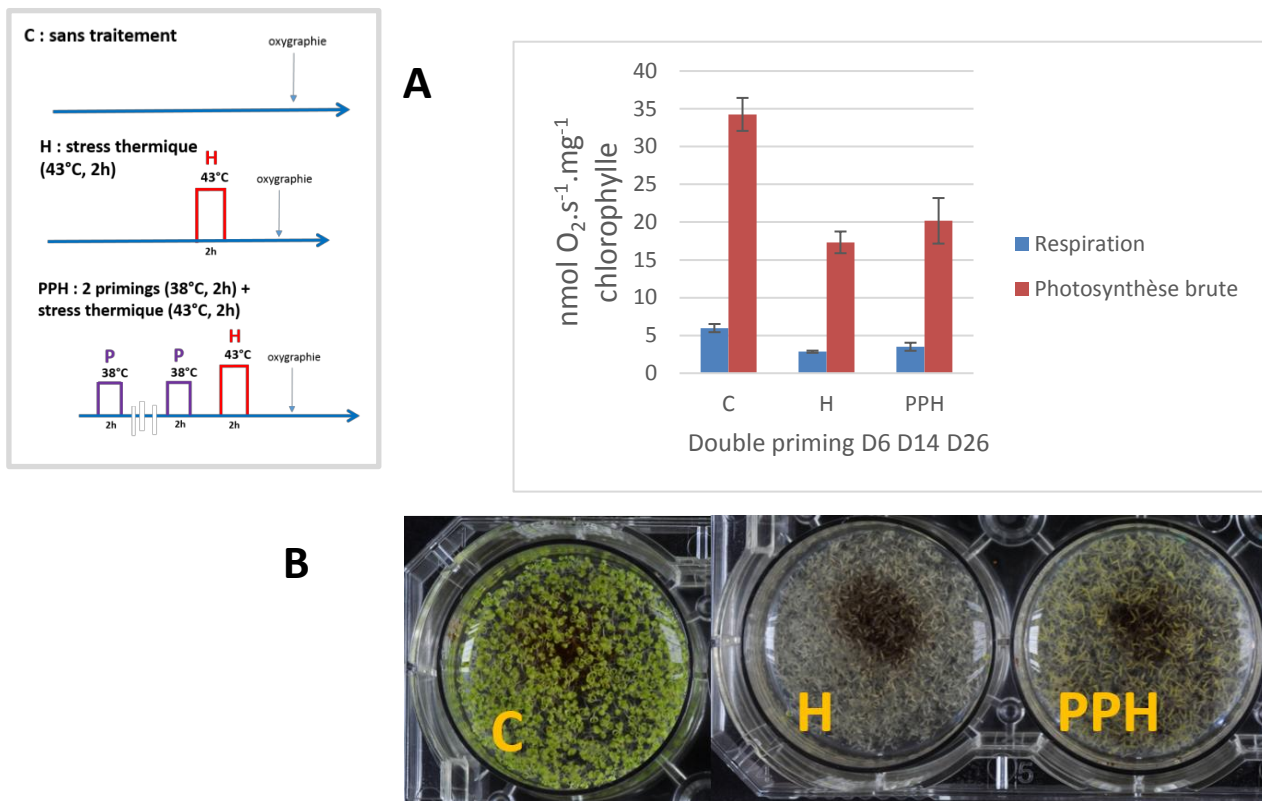


Figure 21 : Double priming réalisé au sixième et quatorzième jour suivi d'un choc thermique au vingt-sixième jour. A : Consommation et production de dioxygène lors de la respiration et la photosynthèse 5h après le choc thermique de 43 °C. Ecart-type réalisé avec deux réplicats. B : Photographie des conditions C, H et PPH 11 jours après le choc thermique

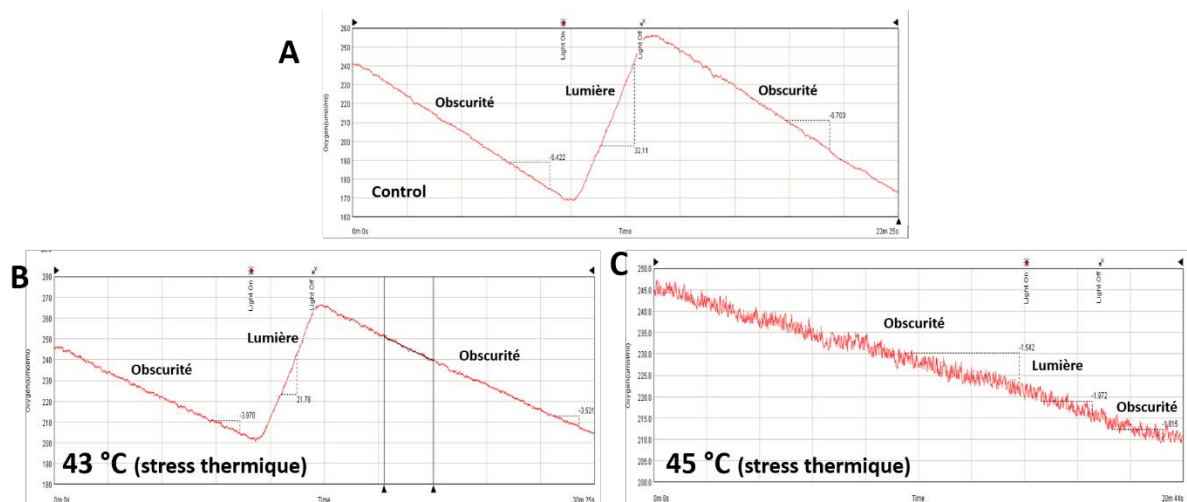
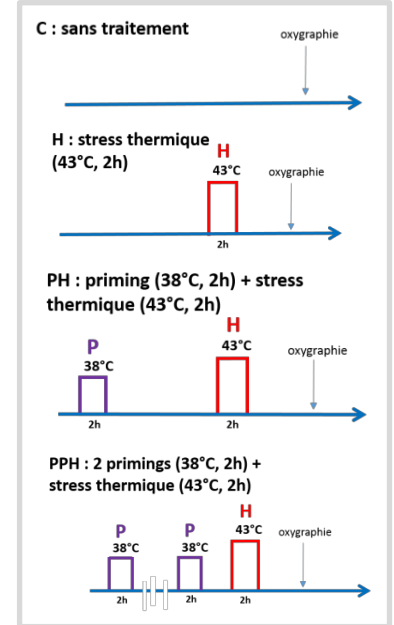
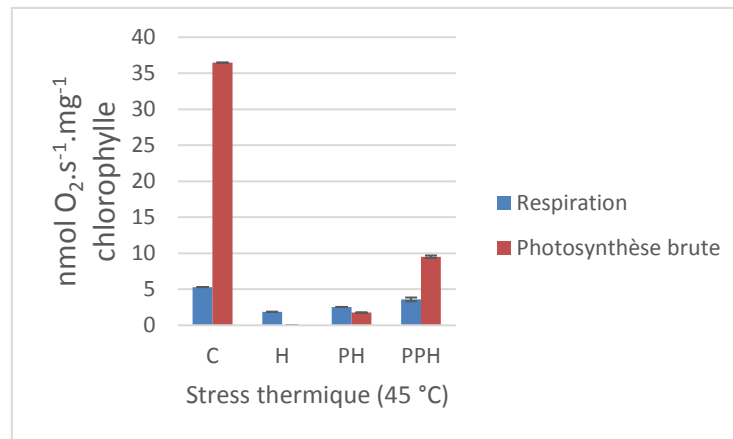
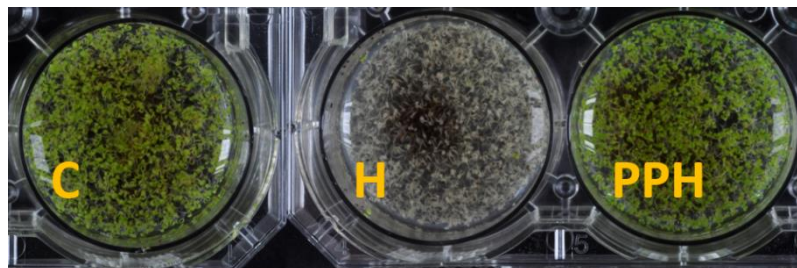


Figure 22 : Traces réalisées en oxygraphie pour la mesure du dioxygène en nmol/mL. A : Trace pour la condition contrôle. B : Trace pour la condition choc thermique à 43 °C, C : Trace pour la condition choc thermique à 45 °C.

A



B



C

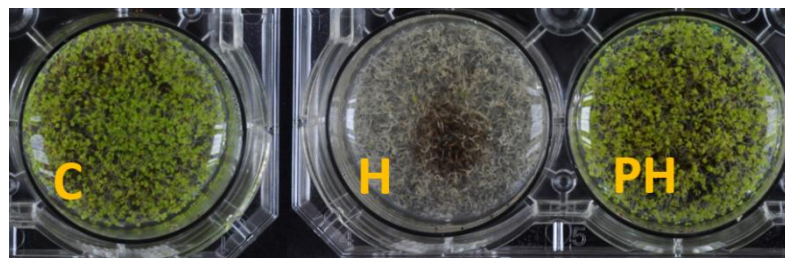


Figure 23 : Double priming réalisé au sixième et quatorzième jour suivi d'un choc thermique à 45 °C au quinzième jour. A : Consommation et production de dioxygène lors de la respiration et la photosynthèse 5h après le choc thermique à 45 °C. Ecart-type réalisé avec deux réplicats. B : Photographie des conditions C, H et PPH du double priming 11 jours après le choc thermique à 45 °C, C : Photographie des conditions C, H et PH du simple priming 11 jours après le choc thermique à 45 °C.

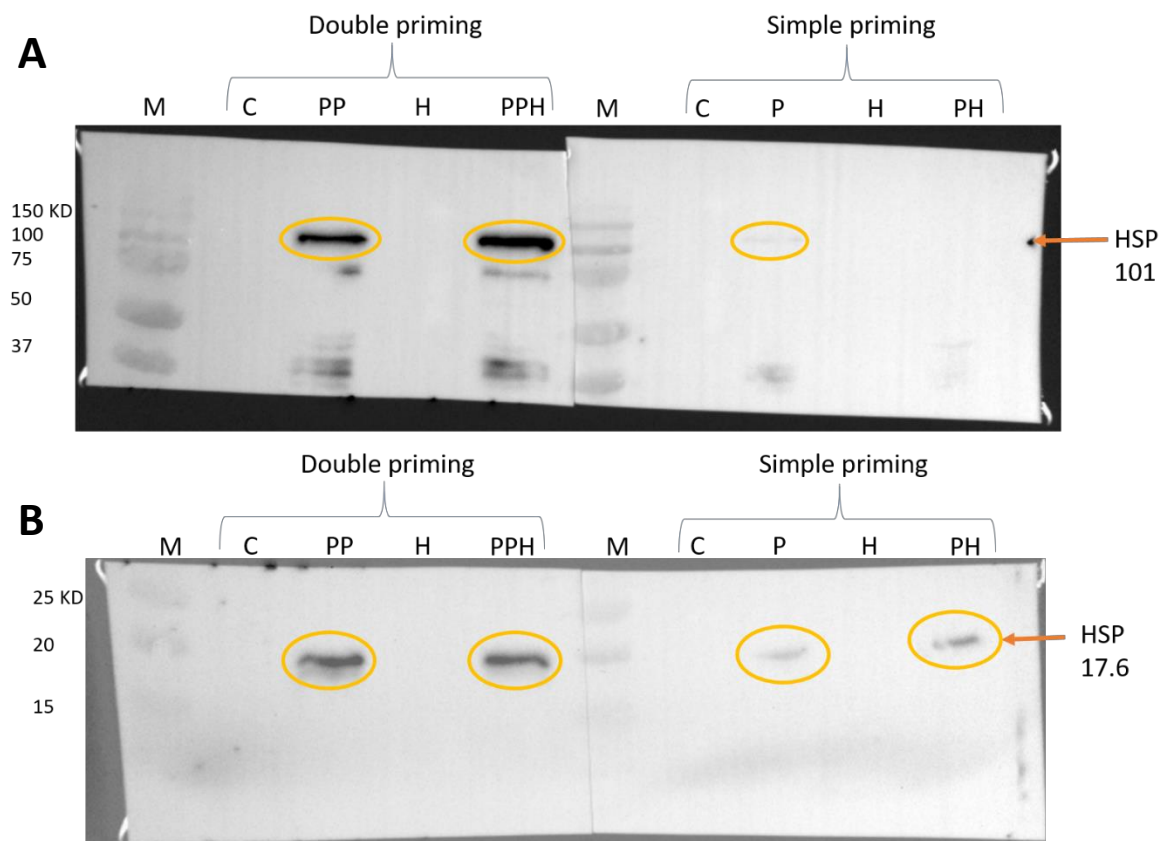
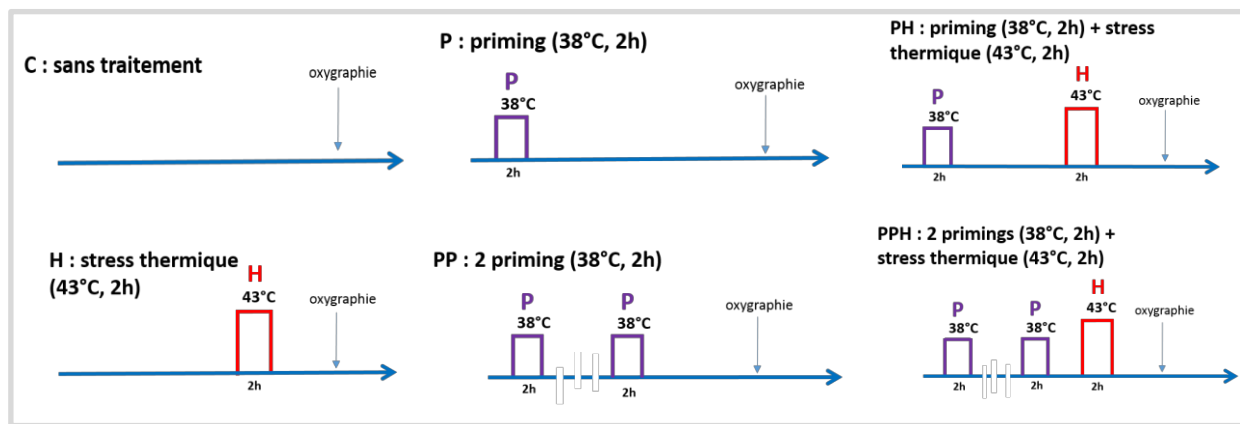


Figure 24 : Quantité relative de protéines HSP 101 et 17.6 à la suite du choc thermique pour le simple priming et le double priming. A : Quantité relative de protéine HSP 101, B : Quantité relative de protéine HSP 17.6.

observée pour la respiration et la photosynthèse respectivement pour la condition PH comparée à la condition H (figure 21A). Cependant, 11 jours après le choc thermique, les plantules ne survivent pas (figure 21B).

L'effet mémoire d'un double priming se situe donc entre 9 et 12 jours.

9. Influence de la température du stress sur la respiration et la photosynthèse

Pour tester les limites d'une protection induite par un priming thermique, un choc thermique à 45 °C (au lieu de 43 °C) est réalisé 24 heures après le priming.

Lors d'un choc thermique à 43 °C, les plantules de condition H ont le même profil oxygraphique que celles de condition C, à savoir une consommation de dioxygène à l'obscurité et une production de dioxygène à la lumière (figure 22A). Seules les valeurs de pente sont différentes (figure 22B). Lorsqu'il est appliqué un choc thermique à 45 °C, aucune production de dioxygène n'est visible lorsque les plantules sont mises à la lumière (figure 22C). L'appareil photosynthétique n'est plus du tout fonctionnel 5 heures après un choc thermique à 45 °C alors qu'il est encore moyennement fonctionnel à la suite d'un choc thermique à 43 °C.

10. Force de protection d'un double priming suivi d'un choc thermique à 45 °C

Afin de tester la force de protection induite par le double priming, un choc thermique à 45 °C 24 heures après le deuxième priming est effectué.

5 heures après le choc thermique à 45 °C, la respiration se voit diminuer de 52, 65 et 32 % pour les conditions H, PH et PPH respectivement par rapport à la condition contrôle (figure 23A).

Les plantules en condition H ne sont plus capables de réaliser la photosynthèse (figure 14A). Pour les plantules de condition PH (simple priming), la photosynthèse est inhibée de 95 % (figure 23A). Mais lorsqu'un double priming est réalisé 24 heures avant le choc thermique à 45 °C, la photosynthèse est 5 fois plus importante comparé à la photosynthèse du simple priming (figure 23A).

Cependant, l'impact du choc thermique à 45 °C sur la photosynthèse et la respiration du simple priming n'a pas suffisamment endommagé les plantules pour les voir mortes 11 jours après le stress (figure 23C). Néanmoins, au laboratoire des tests antérieurs ont été réalisés montrant une létalité à 45 °C montrant la nécessité de reproduire cette expérience.

La protection plus importante de la respiration et de la photosynthèse que procure le double priming permet de maintenir en vie les plantules de condition PPH 11 jours après le choc thermique à 45 °C (figure 23B).

Au niveau moléculaire, la présence des HSP 101 est visible pour les conditions P et PPH du double priming mais que pour P chez le simple priming. De plus, elle n'est pas détectée dans la condition C. Cela semble être dû à un problème lors du transfert qui nécessiterait de refaire l'expérience.

L'HSP 17.6 est observée pour les conditions P et PPH du double priming et P et PH du simple priming (figure 24A et B).

Que ce soit pour l'HSP 101 ou 17.6, une quantité plus importante de protéine est visible chez le double priming (figure 24A et B).

Discussion

Les expériences réalisées dans cette étude ont permis de consolider le fait qu'un choc thermique impacte de manière significative la respiration et la photosynthèse. De plus, il a pu être mis en évidence qu'un prétraitement thermique non létal à 38 °C permet une protection de l'appareil photosynthétique et des mitochondries à la suite d'un choc thermique à 43 et 45 °C et donc la survie des plantules.

1. Prétraitement et choc thermique

Les plantules subissant un choc thermique de 43 °C ne survivent pas. Le choc thermique impacte de manière importante la photosynthèse et la respiration. Il est décrit dans la littérature que l'appareil photosynthétique et les mitochondries sont sensibles à la chaleur (Hüve *et al.*, 2011 ; Ruelland et Zachowski, 2010). En effet, d'après nos résultats, si la respiration est impactée négativement de 2/3 et la photosynthèse de moitié, le métabolisme énergétique n'est plus suffisant pour garder les plantules en vie. Une protection du métabolisme énergétique semble donc indispensable à la survie des plantules.

Selon Silva-Correia *et al.* (2014), l'efficacité de l'acclimatation (prétraitement thermique) est positivement corrélée avec des températures d'acclimatation allant jusqu'à 37 °C. Ils démontrent que 30 minutes d'acclimatation ont permis la viabilité de la plupart des semis d'*Arabidopsis thaliana*, mais qu'une période plus longue a garanti la survie complète des plantules à un choc thermique ultérieur à 45 °C pendant 20 min. Nos résultats montrent bien qu'une acclimatation à 38 °C pendant 2 heures protège également les plantules d'un stress thermique à 43°C pendant 2 heures. Il a été proposé par Havaux en 1993, une protection du PSII par un prétraitement thermique. Ceci pourrait être dû à une meilleure protection de la protéine D1 constituant majeure du core complexe et également maillon faible du PSII. Cette protection peut être directe en limitant les attaques nucléophiles ou indirecte en protégeant la machinerie permettant son remplacement. En effet le turnover de D1 pouvant être réduit à 30 minutes, protéger la machinerie protéique de remplacement peut donner un gros avantage. Nous avons en effet montré que lors d'un choc thermique à 43 °C pendant 2 heures, précédé d'un priming thermique, la photosynthèse se voit certes diminuer d'1/3 mais ne dépasse pas le seuil critique de 1/2. La respiration diminue, quant à elle, de moitié mais ne dépasse également pas le seuil critique. Ceci peut être corrélé à l'accumulation de protéines HSPs qui vont pouvoir protéger la machinerie de remplacement de D1, au niveau de la photosynthèse.

Nos plantules ayant subi un choc thermique de 45 °C ont réussi à survivre malgré les dommages importants sur la respiration et la photosynthèse. Les facteurs génétiques peuvent jouer un rôle sur la résistance aux fortes chaleurs. Il a été rapporté par Silva-Correia *et al.* (2014) que les écotypes WS et C24 d'*Arabidopsis thaliana* sont plus résistants aux chocs thermiques, immédiatement suivie par Col-0. Les écotypes Cvi et particulièrement Ler étaient significativement plus sensibles au stress thermique. Puisque nous avons utilisés Col-0 pour nos expériences, cela pourrait expliquer la résistance des plantules suite au choc thermique à 45 °C des plantules de conditions PH. Cependant, les tests réalisés préalablement au laboratoire ne montrent pas de survie suite à un choc thermique à 45 °C. Il faudra donc refaire des tests pour les expériences réalisées à 45 °C.

On observe une diminution de la quantité d'HSP101 et HSP17.6 après un choc thermique, ce qui avait été préalablement décrit par Echevarría-Zomeño *et al.* (2016) pour la HSP 101. Les fortes chaleurs sont connues pour avoir un impact sur la dégradation des protéines (Guy *et al.*, 2007 ; Richter *et al.*, 2010). Cela pourrait expliquer

la quantité moins importante de protéines chez les plantules dans nos conditions H. Par conséquent, les plantules subissant, un choc thermique à 43 °C pourrait ne pas arriver à survivre à cause d'une protection trop faible de la machinerie cellulaire permettant au métabolisme de se maintenir.

Par contre lorsqu'il y a eu un priming thermique des protéines comme la HSP 17.6 sont surexprimées Sun *et al.* (2001). Cette surexpression limite les dommages dus à la dénaturation et à l'agrégation des protéines, et éventuellement contribue à l'homéostasie de la fluidité membranaire (Richter *et al.*, 2010). De plus selon Echevarría-Zomeño (2016), 5 heures après un traitement à 45 °C pendant 3 heures, les plantes acclimatées (qui ont subi préalablement un prétraitement à 38 °C pendant 1 heure), recommencent leur synthèse protéique contrairement aux plantes non acclimatées. La synthèse protéique suite à un stress thermique est l'un des premiers symptômes de la récupération du stress. Ceci est rendu possible grâce à l'activation des voies de réponse au stress thermique HSR (Mittler et Blumwald, 2010 ; Ohama *et al.*, 2017 ; Saidi *et al.*, 2009). Dans notre cas l'augmentation de la quantité d'HSPs 101 et 17.6 peut expliquer la survie des plantules acclimatées grâce à leur rôle de protection dans un stress thermique.

La mémoire plus longue apportée par un double priming semble être dû à une protection de la respiration et de la photosynthèse dû à une accumulation plus importante en protéines protectrices telles que les HSPs. Il est décrit que les HSPs induites sont présentes 7 jours après un stress thermique non létal (Roulé, 2016). Par conséquent, lorsque deux primings thermiques sont réalisés à 7 jours d'intervalle, on induit la voie de réponse au stress thermique HSR, à nouveau, juste avant qu'elle ne s'éteigne. Ceci semble avoir comme effet une réactivation plus forte, marquée par une plus forte accumulation d'HSPs, et une meilleure protection du métabolisme énergétique.

2. Les polyamines

Les polyamines sont connues pour avoir un effet protecteur contre les fortes températures. Par exemple un traitement à la spermine à des concentrations de 50 et 100 µM permet une protection partielle lors d'un stress thermique à 42 °C pendant 2 heures (Sagor *et al.* 2013). Nous n'avons pas réussi à reproduire cet effet protecteur dans nos conditions de culture.

L'induction de la mort des plantules à une concentration élevée de 5000 µM montre que les polyamines peuvent entrer dans les plantules, et cet effet néfaste est conforme à ce qui est décrit dans la littérature (Sagor *et al.* 2013).

Étant donné que nous travaillons sur un système biologique particulier, stoppé à un stade de développement précoce, il est possible que les polyamines ne puissent pas agir au stade plantule et ne peut avoir un effet que sur des plantes matures.

Même si dans nos conditions les polyamines sont incapables de protéger les plantules des effets d'un choc thermique, elles sont néanmoins capables d'augmenter l'accumulation d'HSP 101, mais pas celle d'HSP 17.6. Comme il a été décrit que les polyamines augmentent l'induction des gènes HSR déclenchés par un stress thermique (Sagor *et al.*, 2013), on peut relier l'accumulation d'HSP 101 à cette activation. Mais celle-ci semble insuffisante pour induire l'HSP 17.6. Il est donc possible qu'à notre stade de développement la voie dans laquelle se trouve HSP 17.6 est la plus importante pour la protection des plantules contre un choc thermique.

Nous montrons une stimulation de la photosynthèse suite à un traitement à faible concentration de polyamines. Celle-ci pourrait être due à la levée partielle du frein existant au transfert des électrons au niveau du complexe b6f. En effet les polyamines ont pour effet de diminuer le potentiel osmotique et d'augmenter le potentiel électrique, au niveau de la composition de la force proton motrice (Ioannidis *et al.*, 2012). Cette diminution du potentiel osmotique provoque les mêmes effets qu'une diminution du transfert cyclique des électrons autour du PSI, permettant ainsi un plus fort débit d'électrons sur le PSII, et donc une photosynthèse plus active (Tollete *et al.* 2011).

Conclusion et perspectives

Cette étude a permis d'obtenir des résultats préliminaires sur l'optimisation des prétraitements testés dans le but de protéger les plantes des hausses de températures initialement létales.

Sur notre modèle de plantules stoppées dans leur développement les polyamines n'ont pas réussi à mimer les effets protecteurs d'un priming thermique, ni l'induction de marqueurs moléculaires comme la petite HSP 17.6. Néanmoins, un traitement à faible concentration a montré une stimulation de la photosynthèse. Il serait pertinent de voir par des techniques de spectroscopie résolue dans le temps et de fluorimétrie les mécanismes mis-en-œuvre pour stimuler la photosynthèse.

Nos résultats montrent que la puissance et la mémoire du priming thermique peuvent être augmentées en le répétant dans le temps. La réalisation d'une cinétique de mémoire serait nécessaire afin de mieux la caractériser, ainsi que d'une analyse de survie à différentes températures. Une fois caractérisées il serait possible de tester cette puissance et cette mémoire lors de primings répétés et à température croissante pour simuler les augmentations de températures dans la nature.

Bibliographie

Ahuja, I., Vos, C.H., Bones, M. and Hall D. (2010). Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science* 15 (12). Elsevier Ltd : 664-74.

Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P. and Tiburcio, A.F. (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* **231**:1237–49.

Allakhverdiev, S.I., Kreslavski, V.D., Klimov, V.V., Los, D.A. and Carpentier R. (2008). Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research* **98** : 541–550.

Asthir, B. and Deep, A. (2011). Thermotolerance and Antioxidant Response Induced by Putrescine and Heat Acclimation in Wheat Seedlings. *Seed Science and Biotechnology* **5** (1), 42-46.

Atkin, O.K. and Tjoelker, M.G. (2003) Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends Plant Sci.*, **8**, 343–351.

Benamar A., Pierart A., Baecker V., Avelange-Macherel M., Rolland A., Gaudichon S., di Gioia L., Macherel D. (2013), Simple system using natural mineral water for high-throughput phenotyping of *Arabidopsis thaliana* seedlings in liquid culture. *Int. J. High Throughput Screen*, 1-15.

Bitrián, M., Zarza, X., Altabella, T., Tiburcio A.F and Alcázar, R. (2012). Polyamines under abiotic stress: metabolic crossroads and hormonal crosstalks in plants. *Metabolites*, **2**, 516-528.

Bokszczanin, L. and Frangkostefanakis, S. (2013). Perceptives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance. *Frontiers in Plant Science* **4** : 315.

Cvikrová, M., Gemperlová, L., Dobrá, J., Martincová, O., Prásl, I.T., Gubisc, J. and Vanková, R. (2012). Effect of heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants. *Plant Science* **182** 49– 58.

Echevarría-Zomeño, S., Fernández-Calvino, L., Castro-Sanz, A. B., López J. A., Vázquez, J. and Castellano, M. (2016). Dissecting the proteome dynamics of the early heat stress response leading to plant survival or death in *Arabidopsis*. *Plant Cell & Environment* **39** : 1264-1278.

Grass, L. and Burris, J.S. (1995). Effect of heat stress during seed development and maturation on wheat (*Triticum durum*) seed quality. II. Mitochondrial respiration and nucleotide pools during early germination. *CANADIAN JOURNAL OF PLANT SCIENCE*. 831-41.

- Guy, C., Kaplan, F., Kopka, J., Selbig, J. and Hinch, D.K.** (2008). Metabolomics of temperature stress. *Physiologia Plantarum* **132**: 220–235.
- Havaux, M.** (1993). Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures. *Plant, Cell Environ.*, **16**, 461–467.
- Hüve, K., Bichele, I., Rasulov, B. and Niinemets, Ü.** (2011) When it is too hot for photosynthesis: Heat-induced instability of photosynthesis in relation to respiratory burst, cell permeability changes and H₂O₂ formation. *Plant, Cell Environ.*, **34**, 113–126.
- Ikedo, M., Mitsuda, N. and Ohme-Takagi, M.** (2011), Arabidopsis HsfB1 and HsfB2b Act as Repressors of the Expression of Heat-Inducible Hsfs But Positively Regulate the Acquired Thermotolerance. *Plant Physiol* **157**(3), 1243–1254.
- Ioannidis N.E., Cruz, J.A., Kotzabasis K. and Kramer D.M.** (2012). Evidence That Putrescine Modulates the Higher Plant Photosynthetic Proton Circuit. *PLoS ONE* **7**(1): e29864.
- Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D.W., Zhao, W., Schiller, K.C., Gatzke, N., Sung, D.Y. and Guy C.L.** (2004), Exploring the Temperature Stress Metabolome of Arabidopsis. *Plant Physiology*, Vol. **136**, pp. 4159–4168.
- Königshofer, H. and Lechner, S.** (2002). Are polyamines involved in the synthesis of heat-shock proteins in cell suspension cultures of tobacco and alfalfa in response to hightemperature stress?. *Plant Physiology and Biochemistry* **40** (2002) 51–59.
- Larkindale, J. and Vierling, E.** (2007). Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant Physiology* **146** (2) : 748–61.
- Liberek, K., Lewandowska, A. and Zietkiewicz, S.** (2008). Chaperones in control of protein disaggregation. *The EMBO Journal* **27** (2) : 328–35.
- Lin, J.-S., Kuo, C.-C., Yang, I.-C., Tsai, W.-A., Shen, Y.-H., Lin, C.-C., Liang, Y.-C., Li, Kuo, Y.-W., King, W.-C., Lai, H.-M. and Jeng, S.-T.** (2018). MicroRNA160 modulates plant development and heat shock protein gene expression to mediate heat tolerance in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **9** 1–16.
- Mittler, R. and Blumwald, E.** (2010). Genetic engineering for modern agriculture : challenges and perspectives. *Annual Review of Plant Biology* **61** : 443–62.
- McLoughlin, F., Basha, E., Fowler, M.E., Kim, M., Bordowitz, J., Katiyar-Agarwal, S. and Vierling, E.** (2016). Class I and II small heat shock proteins together with HSP101 protect protein translation factors during heat stress. *Plant Physiology* **172**, 1221–1236.
- Ohama N., Sato, H., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2017). Transcriptional Regulatory Network of Plant Heat Stress Response. *Trends in Plant Science* **22** (1) : 53–65.
- Queitsch, C., Hong, S.-W., Vierling, E. and Lindquist, S.** (2000), Heat Shock Protein 101 Plays a Crucial Role in Thermotolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell* (2), Vol. **12**, 479–492.

Richter, K., Haslbeck, M. and Buchner, J. (2010), The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Molecular Cell* **40**, Elsevier Inc. : 253-66.

Roulé, T. (2016). Profils d'expression des HSPs lors de l'acclimatation au stress thermique chez des plantules d'*Arabidopsis thaliana*. Mémoire Master 1 Biologie et Technologie du végétal, Faculté des Sciences, Angers, 20 p.

Ruellanda, E., Zachowski A. (2010), How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany* **69** (3). Elsevier B. V. : 225-32.

Sagor, G.H.M., Berberich, T., Takahashi, Y., Niitsu, M. and Kusano, T. (2012). The polyamine spermine protects *Arabidopsis* from heat stress-induced damage by increasing expression of heat shock-related genes. *Transgenic Res* **22**:595-605.

Saidi, Y., Finka, A., Muriset, M., Bromberg, Z., Weiss, Y.G., Maathuis, F.J., and Goloubinoff, P. (2009), The heat shock response in moss plants is regulated by specific calcium-permeable channels in the plasma membrane. *Plant Cell*. **9**, 2829–2843.

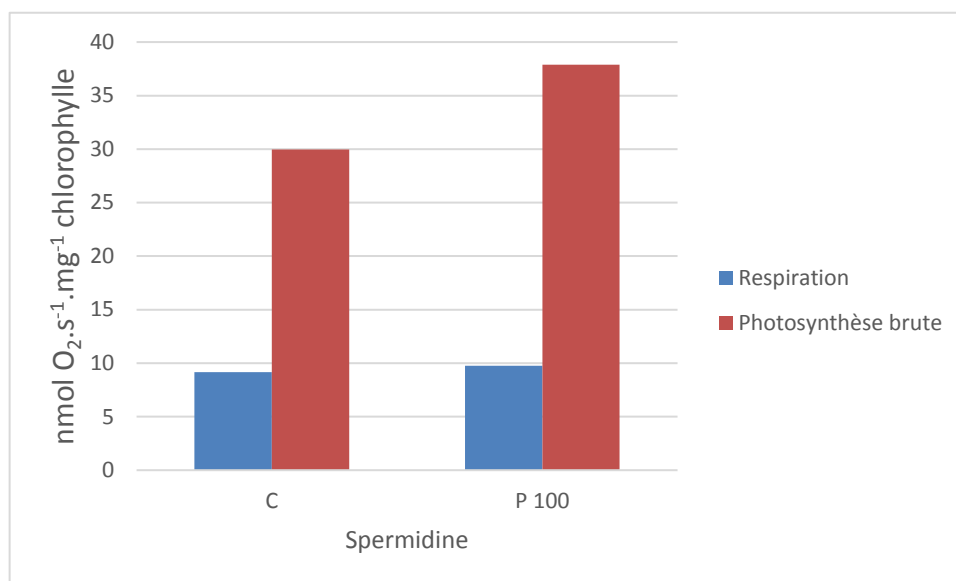
Silva-Correia, J., Freitas, S., Tavares, R.M., Lino-Neto, T. and Azevedo, H. (2014). Phenotypic analysis of the *Arabidopsis* heat stress response during germination and early seedling, development. *Plant Methods*, **10**:7.

Sun, W., Bernard, C., Cotte, B., Montagu, M. et Verbruggen, N. (2001). At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. *Plant Journal* **27** (5) : 407-15.

Tolleter, D., Ghysels, B., Alric, J., Petroutsos, D., Tolstygina, I. and Krawietz, D. (2011). Control of hydrogen photoproduction by the proton gradient generated by cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell* **23** (7), 2619-2630.

Yiu, J.C., Juang, L.D., Fang, D.Y.T., Liu, C.W. and Wu, S.J. (2009) Exogenous putrescine reduces flooding-induced oxidative damage by increasing the antioxidant properties of Welsh onion. *Scientia Horticulturae* **120**, 306-314.

Annexes II : Effet de 100 μM de spermine sur la photosynthèse



Priming chimique au sixième jour avec la spermidine et un choc thermique à 43 °C au septième jour.

A : Consommation et production de dioxygène lors de la respiration et la photosynthèse 5h après le stress thermique de 43 °C.

RÉSUMÉ

Dans le contexte de réchauffement climatique actuel, il est important d'étudier l'impact des stress thermiques sur les plantes qui par essence ne peuvent bouger. Nous avons utilisé comme modèle des plantules d'*Arabidopsis thaliana*, cultivées sous agitation dans de l'eau minérale, présentant la particularité d'être stoppées dans leur développement. Nous avons exploré deux pistes d'acclimatation : le priming thermique en imposant aux plantules un ou deux stress non létaux, ou le priming chimique en traitant les plantules avec des polyamines. Nous avons analysé l'impact de ces traitements de priming sur la survie après un choc thermique léthal, ainsi que sur la respiration et la photosynthèse, et sur l'accumulation de protéines de stress, l'HSP101 et l'HSP17.6.

Si les polyamines ont été incapables, dans notre système, de protéger les plantules de la mort à la suite d'un choc thermique, elles ont permis de stimuler la photosynthèse à faible concentration.

Par contre, les plantules ont montré une bonne acclimatation à la suite des traitements avec un stress thermique (2 heures à 38 °C) simple ou double. Elles ont présenté une respiration et une photosynthèse plus performante que des plantules soumises à un choc thermique à 43 °C, ainsi qu'une expression des HSP étudiées plus importante. Nous montrons également que la puissance et la mémoire du priming thermique peuvent être augmentées en répétant dans le temps.

mots-clés : stress thermique, photosynthèse, respiration, HSPs, polyamines

ABSTRACT

In the context of current global warming, it is important to study the impact of heat stress on plants which are sessile. We used as a plant model seedlings of *Arabidopsis thaliana* grown under shaking in mineral water, which are arrested in their development. We explored two ways of acclimation: priming by imposing one or two non-lethal stress on seedlings, or chemical priming by treating seedlings with polyamines. In addition to survival after lethal heat shock, we looked at the impact on basic energy metabolism, namely respiration and photosynthesis, as well as on the accumulation of stress proteins, HSP101 and HSP17.6.

While polyamines were found unable to protect seedlings from death due to heat shock in our system, they stimulated photosynthesis at low concentrations.

In contrast, the seedlings showed an efficient acclimation following treatments with a single or double heat stress (2 hours at 38 °C). They exhibited better respiration and photosynthesis than seedlings treated only with heat shock at 43 °C, as well as higher expression of HSPs studied. We also show that the power and memory of priming can be increased by repeating it over time.

keywords : heat stress, photosynthesis, respiration, HSPs, polyamines