

Analyse post-génomique de la tolérance à la dessiccation

Julia Buitink¹ et Olivier Leprince²

¹ INRA, UMR 1191, Physiologie moléculaire des semences, IFR 149 QUASAV, 49045 Angers, France

² Agrocampus Ouest, UMR 1191, Physiologie moléculaire des semences, IFR 149 QUASAV, 49045 Angers, France

Auteur correspondant : Julia Buitink, julia.buitink@angers.inra.fr

Reçu le 10 janvier 2008

Résumé – La tolérance à la dessiccation (TD) est la propriété de survivre à un retrait total de l'eau cellulaire sans dégâts irréversibles. Apparue très tôt au cours de l'évolution, elle confère aux organismes secs la capacité de survivre à des conditions extrêmes de l'environnement pendant une durée allant de quelques années à plusieurs siècles. L'objectif de cet article est de présenter les apports récents des approches en « postgénomique » sur les différents modèles et d'apporter des éléments de réponse à la question de savoir si les attributs moléculaires nécessaires à la survie à l'état sec sont communs à tous les anhydrobiotes. Le répertoire minimal de mécanismes impliqués dans la tolérance à la dessiccation est l'accumulation de sucres non-réducteurs et polyols, l'accumulation de protéines LEA et la répression coordonnée du métabolisme. Les mécanismes de protection offerts par ces processus sont décrits. Il est fort probable que d'autres facteurs inconnus jusqu'à présent sont également nécessaires au vu de la forte proportion de gènes impliqués dans la TD dont la fonction est inconnue. Les similitudes entre réponses au déficit hydrique et à la dessiccation sont brièvement envisagées.

Mots clés : Longévité / métabolisme / semences / plantes reviviscentes / protéines LEA / sucres non-réducteurs

Abstract – Postgenomic analysis of desiccation tolerance.

Desiccation tolerance is the capacity to survive complete drying. It is an ancient trait that can be found in prokaryotes, fungi, primitive animals (often at the larval stages), whole plants, pollens and seeds. In the dry state, metabolism is suspended and the duration that anhydrobiotes can survive ranges from years to centuries. Whereas genes induced by drought stress have been successfully enumerated in tissues that are sensitive to cellular desiccation, we have little knowledge as to the adaptive role of these genes in establishing desiccation tolerance at the cellular level. This paper reviews postgenomic approaches in a variety of desiccation tolerant organisms in which the genetic responses have been investigated when they acquire the capacity of tolerating extremes of dehydration or when they are dry. Accumulation of non-reducing sugars, LEA proteins and a coordinated repression of metabolism appear to be the essential and universal attributes that can confer desiccation tolerance. The protective mechanisms of these attributes are described. Furthermore, it is most likely that other mechanisms have evolved since the function of about 30% of the genes involved in desiccation tolerance remains to be elucidated. The question of the overlap between desiccation tolerance and drought tolerance is briefly addressed.

Key words: Longevity / metabolism / seeds / resurrection plants / LEA proteins / non-reducing sugars

Introduction

Il existe un principe établi en biologie selon lequel l'eau est le composant fondamental de la vie. Elle est nécessaire pour l'intégrité biologique et constitue un composant indispensable ainsi qu'un milieu réactionnel pour la cellule, assurant ainsi la continuité du métabolisme. Et pourtant, dès 1702, Anthony van Leeuwenhoek décrivait dans une lettre adressée à Hendrik van Bleywijk des « animalcules » capables de reprendre vie lorsqu'il réhydratait de la poussière sèche et apparemment inerte, récoltée de la gouttière (Leopold, 1986; Tunnacliffe & Lapinski, 2003). Van Leeuwenhoek fut ainsi le premier à décrire le phénomène de tolérance à la dessiccation (TD), c'est-à-dire la propriété de survivre à un retrait total de l'eau cellulaire sans dégâts irréversibles.

Les « animalcules » décrits par van Leeuwenhoek correspondaient à des rotifères, des invertébrés asexués constituant un phylum particulier. Au même titre, il existe des exemples d'animaux tolérants à la dessiccation parmi deux autres phylums : nématodes et tardigrades. S'il n'est recensé aucun animal tolérant à la dessiccation à l'état adulte en dehors de ces trois phylums, en revanche, à l'état larvaire, il existe quelques exemples chez les arthropodes (embryons d'*Artemia ssp.* au stade gastrula; Leopold, 1986; Clegg, 2001). Par contre, la TD est largement présente dans le règne végétal, tant chez les végétaux inférieurs que les plantes vasculaires. À ce jour, on compte plus de 300 espèces d'Angiospermes capables de supporter sans dommage une dessiccation poussée à plus de -100 MPa (plantes reviviscentes). Pour ces espèces, l'ensemble de l'appareil végétatif est tolérant à une dessiccation lente. Certaines espèces comme *Cratogeomys plantagineum* et *Xerophyta villosa* sont devenues des modèles d'études au niveau moléculaire (Illing *et al.*, 2005). Mais, c'est au niveau des organes de dissémination (pollen, graines) que la TD est largement répandue chez les Angiospermes (plus de 95 % des espèces recensées). Chez les graines, la TD est acquise dans la seconde moitié du développement pendant la phase de remplissage. Elle est perdue progressivement au cours de l'imbibition, de manière asynchrone : dans les racines, au moment de la percée hors des téguments de la graine, ensuite dans les hypo/épicotyles et finalement dans les cotylédons (Buitink *et al.*, 2003). Enfin, la TD est également rencontrée chez les algues et les prokaryotes, notamment les cyanobactéries (Potts *et al.*, 2005).

Il aura fallu plus de 150 ans pour établir que la TD existe, après de nombreux débats scientifiques autour de la question de la génération spontanée. En effet, à l'état sec, ces organismes sont dans un état de quiescence. Le métabolisme est complètement arrêté. Tant chez les graines que les cystes d'*Artemia fran-*

ciscana, des études biochimiques et biophysiques ont démontré la présence de très faible teneur en ATP (charge énergétique inférieure à 0,2) et aucune activité des chaînes transporteuses d'électrons (revue dans Leopold, 1986; Leprince *et al.*, 2000; Clegg, 2001). Cette quiescence s'accompagne d'une capacité à survivre aux conditions extrêmes de l'environnement (par exemple une gamme de températures allant de -190 à >100 °C) (Tunnacliffe & Lapinski, 2003) et une longévité allant de plusieurs années à plusieurs siècles (Tableau 1). Ces propriétés biologiques sont expliquées en grande partie par la formation d'un état vitreux intracellulaire dans lequel les macromolécules sont immobilisées dans un état solide métastable. En effet, la mobilité moléculaire y est telle que le système ressemble à un solide bien que la phase reste liquide (revue dans Buitink & Leprince, 2004).

À ce jour, il est difficile d'unifier les mécanismes de protection et de régulation qui déterminent la TD. Ce constat repose sur trois raisons.

- 1) La définition de la survie à l'état sec reste imprécise dans la littérature et fait l'objet de débats sémantiques, notamment sur la question de savoir s'il s'agit d'un phénomène qualitatif ou quantitatif qui s'exprime en fonction de la durée de vie ou de la teneur en eau atteinte après dessiccation (voir les revues de Clegg, 2001; Proctor & Pence, 2002; Tunnacliffe & Lapinski, 2003). De plus, la distinction entre survie à l'état sec, c'est-à-dire teneur en eau à l'équilibre avec <50-60 % d'humidité relative (soit -100 à -300 MPa), et survie à des stress osmotiques dit « extrêmes » (> -10 MPa) ou chroniques n'est pas toujours clairement établie dans la littérature, notamment pour le modèle *Caenorhabditis elegans*.
- 2) La réponse de l'anhydrobionte est complexe lors du retrait de l'eau. Cette réponse inclut très certainement une réponse liée à un déficit hydrique peu poussé lors des premières minutes de dessiccation (Illing *et al.*, 2005; Potts *et al.*, 2005; Buitink *et al.*, 2006). Cependant, elle doit être considérée à la fois comme un processus et un but à atteindre par l'organisme.
- 3) La TD est un phénomène multifactoriel faisant intervenir plusieurs mécanismes de protection dont il faut encore vérifier l'interdépendance.

L'objectif de cet article est de présenter brièvement les apports récents des approches en « post-génomique » sur les différents modèles et d'apporter des éléments de réponse à la question de savoir si les attributs moléculaires nécessaires à la survie à l'état sec sont communs à tous les anhydrobiotes.

Tableau 1. Quelques exemples d'anhydrobiontes et preuves expérimentales de leur longévité à l'état sec.

Groupe	Organe et espèces	Longévité	Référence
Rotifère	<i>Mniobia</i> ssp	9 ans (spécimens trouvés dans des mousses conservées en herbarium)	Guidetti & Jönsson, 2002
Champignon	<i>Schizophyllum commune</i>	34 ans sous vide (0.01 mm Hg)	Proctor & Pence, 2002
Bryophyte	<i>Riccia macrocarpa</i>	23 ans en conditions ambiantes	Proctor & Pence, 2002
	<i>Tortula syntrichia</i>	14 ans en conditions ambiantes	Proctor & Pence, 2002
Spermaphyte	Graines de <i>Nelumbo nucifera</i>	1 350 ans (sous terre, site archéologique)	Shen-Miller <i>et al.</i> , 1995
	Feuilles de <i>Myrothamnus flabellifolius</i>	9 mois (50 % humidité relative, 25 °C)	Farrant & Kruger, 2001
	Graines de <i>Pisum sativum</i>	95 % de germination après 65 ans de stockage à 5 °C puis à -18 °C	Walters <i>et al.</i> , 2005
	Caryopses de <i>Zea mays</i>	96 % de germination après 61 ans de stockage à 5 °C puis à -18 °C	Walters <i>et al.</i> , 2005

Génomique et modèles physiologiques

Le tableau 2 présente les modèles et les approches qui ont été utilisées pour avoir accès sans *a priori* aux gènes impliqués dans la TD. Les efforts ont porté essentiellement sur le transcriptome d'espèces végétales. Comparativement à la tolérance aux stress abiotiques, les criblages postgénomiques et les approches de génomique fonctionnelle permettant d'élucider la TD sont peu nombreux. Chez les plantes reviviscentes et la vaste majorité des anhydrobiontes animaux, l'absence de génome séquencé constitue un obstacle au développement d'analyses transcriptomiques (Collet *et al.*, 2004) et protéomiques exhaustives (Jiang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Pour ces espèces, la construction de banques d'ADNc au cours du séchage et le séquençage d'EST s'est révélée comme la méthode de choix (Tableau 2). Une stratégie alternative est de comparer par hybridation soustractive ou par bioinformatique le transcriptome d'espèces tolérantes avec des espèces sensibles à la dessiccation. Pour ce qui concerne les tissus végétatifs, les approches de génétique inverse ne sont possibles que pour *Craterostigma plantagineum* chez laquelle une méthode de transformation stable et des mutants d'insertion existent (Smith-Espinoza *et al.*, 2005). Cependant, la faible croissance de cette plante couplée à la difficulté de produire des graines constitue un frein à la validation fonctionnelle de gènes candidats.

Chez les graines, outre le problème de la connaissance du génome, il faut également prendre en compte la nécessité de dissocier la TD des phénomènes liés au remplissage au cours du développement des graines, à la germination ou à la croissance des racines pendant l'imbibition. Afin de pouvoir comparer un organe embryonnaire au stade sensible à la dessiccation avec celles obtenues au stade tolérant tout en découplant les autres processus du développement, nous avons tiré parti de la taille des graines du modèle génétique *Medicago truncatula* (une légumineuse d'origine méditerranéenne dont le génome exprimé est presque entièrement séquencé) et du fait qu'il est possible de ré-induire la TD dans des racines germées sensibles de 2,8 mm par un traitement osmotique au polyéthylène glycol (PEG) (Tableau 3). Se basant sur ce modèle, nous avons comparé les transcriptomes au cours de la maturation de la graine (avant et après acquisition de la TD) avec ceux obtenus au cours de germination (avant et après perte de la TD) et de la ré-induction de la TD (avant et après traitement au PEG) et de l'induction d'une tolérance à la sécheresse (Buitink *et al.*, 2006). Il était donc ainsi possible de définir le répertoire minimal de gènes impliqués dans la TD. Par ailleurs, en suivant la cinétique d'induction et de répression des gènes pendant l'incubation dans le PEG, nous avons

pu dégager les profils d'expression de répertoires de gènes dont la régulation aboutit à la TD, notamment ceux liés à la signalisation et au métabolisme (Buitink *et al.*, 2006). Les résultats montrent que l'induction de la tolérance est caractérisée par une réponse précoce d'adaptation à un stress hydrique suivi par une réponse plus tardive qui voit une profonde modification des gènes différemment exprimés. Si l'on compare nos données avec l'ensemble des transcriptomes tolérants à la dessiccation (Tableau 2), l'accumulation de sucres non-réducteurs et/ou polyols, la synthèse de protéines de stress/défense et la répression coordonnée du métabolisme apparaissent comme des attributs universels de la TD.

Protéines LEA

Les protéines LEA (*late embryogenesis abundant*) doivent leur terminologie au fait que les premiers représentants de cette famille ont été découverts dans les années 1980 comme étant très fortement exprimés pendant la phase de dessiccation des graines de coton en fin de maturation, après leur abscission de la plante mère. Il s'agit de protéines de stress très abondantes dans le règne végétal et très récemment mises en évidence chez des animaux tels que rotifères et nématodes (Tunnacliffe & Wise, 2007). Ce sont des protéines hydrophiles peu complexes, à motifs répétés, appartenant à plusieurs groupes sur la base de leurs séquences primaires. Leur profil d'expression coïncidant avec la dessiccation chez des anhydrobiontes eukaryotes très divergents (Tableau 2), leur hydrophilicité élevée couplée au fait qu'il s'agit de protéines non structurées sont des indices permettant de leur attribuer un rôle en relation avec la TD (Tableau 2) (Tunnacliffe & Wise, 2007).

Les expériences *in vitro* ont montré que les protéines LEA peuvent stabiliser les protéines et membranes phospholipidiques, piéger des ions, notamment ceux catalysant des réactions formant des espèces réactives de l'oxygène (revue dans Tunnacliffe & Wise, 2007) et participer à la formation d'état vitreux à l'état sec (Wolkers *et al.*, 2001; Buitink & Leprince, 2004). Sur la base de modélisation et de leurs propriétés structurales, on a émis l'hypothèse que les protéines LEA pourraient également jouer dans la solvatation des macromolécules afin de les stabiliser pendant le retrait de l'eau (Hoekstra *et al.*, 2001; Tunnacliffe & Wise, 2007). Plus récemment, il a été suggéré que les protéines LEA ont une fonction de type « *moonlighting* » : elles sont capables d'assurer plusieurs fonctions de protection à la fois (Tunnacliffe & Wise, 2007). L'exemple le plus récent est celui d'une protéine LEA (groupe 3) du nématode *Aphelenchus avenae* (AavLEA) co-exprimée chez des cellules humaines avec des extensions polyglutaminiques

Tableau 2. Génomique et tolérance à la dessiccation chez les espèces pour lesquelles la survie à l'état sec a été démontrée.

Espèce	Matériel et dispositif expérimental	Observations marquantes	Références
<u>Bactérie</u>			
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Micropuce contenant l'ensemble du génome exprimé (8,480 ORF) Analyse transcriptomique pendant la dessiccation	Importance du métabolisme du tréhalose et des polysaccharides. Protection membranaire, réparation de l'ADN, réponse à un stress oxydant	Cytryn <i>et al.</i> , 2007
<u>Champignon</u>			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Puce Affymetrix contenant 7000 ORF. Analyse du transcriptome pendant la dessiccation et réhydratation et comparaison avec une souche commerciale déshydratée	Similarité entre le transcriptome induit par le séchage et celui essentiel à la phase stationnaire de croissance. Activation du catabolisme des acides gras, et de la gluconéogenèse. Importance du métabolisme soufré	Singh <i>et al.</i> , 2005
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Comparaison du transcriptome déshydraté de la levure avec celui de cellules humaines HEK déshydratées et stabilisées à 0,6 g H ₂ O /g poids sec avec survie partielle de la culture : soit 664 gènes	Similarité du transcriptome sec de levure avec celui de la phase quiescence en phase stationnaire. 45 des 664 gènes communs sont différenciellement exprimés chez les deux espèces : activation des antioxydants, répression de gènes impliqués dans le cycle et la prolifération cellulaire et de gènes codant pour des protéines mitochondriales	Potts <i>et al.</i> , 2005
<u>Mousse</u>			
<i>Tortula ruralis</i>	10 368 EST correspondant à 5 563 TC unigènes* obtenus pendant la dessiccation/réhydratation des thalles. Analyse bioinformatique des clones	Identification de protéines LEA. Importance de l'intégrité membranaire, de la machinerie protéique, du métabolisme et des processus de réparation cellulaire	Oliver <i>et al.</i> , 2004
<i>Selaginella lepidophylla</i>	Analyse de 1046 EST correspondant à 864 unigènes obtenus après 2 heures de dessiccation et comparés à 1300 unigènes obtenus chez une espèce apparentée (<i>S. moellendorffii</i>) sensible à la dessiccation	Expression préférentielle de gènes codant des protéines de type LEA et HSP et de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire	Iturriaga <i>et al.</i> , 2006
<u>Tissus végétatifs</u>			
<i>Sporobolus stapfianus</i>	144 clones ADNc spécifiquement surexprimés dans les feuilles sèches	Protéines LEA et protéines hydrophiles, protéines de défense et de détoxification ; Phosphatase PP2C	Neale <i>et al.</i> , 2000
<i>Xerophyta humilis</i>	10 900 clones ADNc provenant de différents organes déshydratés. 424 ADNc annotés et arrangés sur une micropuce pour une comparaison du transcriptome avant et après dessiccation	Activation de gènes LEA, réponse à un stress oxydant, répression de gènes impliqués dans la photosynthèse et le métabolisme primaire	Collett <i>et al.</i> , 2004
<u>Graines</u>			
<i>Medicago truncatula</i>	Microarray contenant 16 053 TC couvrant environ 50 % du génome exprimé. Analyse comparative du transcriptome à différents stades, tolérant et sensible à la dessiccation pendant le développement de la graine et au cours de l'induction de la tolérance à la dessiccation dans les graines germées	Importance de la régulation du métabolisme carboné et de la synthèse de molécules protectrices (sucres non réducteurs, protéines LEA, système antioxydant) Répression de gènes impliqués dans le transport, cycle cellulaire, métabolisme primaire La TD et la réponse aux stress hydriques partagent les mêmes voies de régulation.	Buitink <i>et al.</i> , 2006

* Tentative consensus qui représentent un gène unique à plusieurs EST.

Tableau 3. Évolution de la tolérance à la dessiccation et du seuil de tolérance à la perte en eau (défini par teneur en eau seuil) de radicules de *M. truncatula* avant et après traitement osmotique (incubation dans une solution de PEG à -1,7 MPa pendant 3 jours à 10 °C) à différents stades de germination. La TD correspond à la capacité des radicules à survivre un séchage à 42 % humidité relative. La « teneur en eau seuil » correspond à la teneur en eau pour laquelle on observe une perte de 50 % de viabilité de la radicule dans un lot de graines germées (Buitink *et al.*, 2003).

Stades de germination	% de tolérance à la dessiccation		Teneur en eau seuil (g eau/g MS)	
	Témoin	+ PEG	Témoin	+ PEG
Graines non germées	100	–	<0,03	–
Graines germées, radicules de 2,8 mm	0	91 ± 6	0,3	<0,03
Graines germées, radicules de 5 mm	0	0	3,6	0,8

de la hungtintine, une protéine impliquée dans la maladie neurodégénérative d'Huntington (Chakrabortee *et al.*, 2007). Sur ce système, il a ainsi été montré que AavLEA était capable non seulement d'inhiber l'agrégation spontanée des extensions polyQ mais également de rendre ces cellules plus tolérantes à des chocs hyperosmotiques.

En dehors de *Tortula ruralis*, une mousse anhydrobiotique (Oliver *et al.*, 2004), l'expression de bon nombre de gènes LEA est également induite lors de stress abiotiques moins poussés (froid, sels, déficit hydrique). En nous appuyant sur le modèle de réinduction de la TD dans les graines germées (Tableau 3), nous avons mieux précisé l'implication des protéines LEA chez *M. truncatula*. L'analyse comparative du protéome stable à la chaleur extrait de radicules sensibles à la dessiccation et rendues tolérantes par le traitement osmotique nous a permis de mettre en évidence 15 polypeptides LEA dont l'abondance est associée à la TD. Ils correspondent à quatre groupes différents : Em6 (groupe 1), une isoforme de DHN3 (groupe 2, déhydrines), PM25 (groupe 5), et trois membres de groupe 3 : MP2, une isoforme de PM18, et plusieurs isoformes de SBP65 (Boudet *et al.*, 2006). Cette dernière protéine est très abondante dans les semences et se caractérise par le fait qu'elle est biotinylée au niveau d'un domaine atypique. Son rôle et l'importance de la biotinylation dans la TD restent encore à déterminer. En ce qui concerne EM6 et PM25 dont on n'a pas relevé la présence d'isoformes, l'analyse du transcriptome a classé ces deux gènes dans un cluster d'expression caractérisé par une induction génique très tardive pendant le traitement au PEG, alors que les autres gènes LEA identifiés sont exprimés de manière précoce pendant les premières heures du traitement avant l'apparition de radicules tolérantes (Boudet *et al.*, 2006). Em6 et PM25 semblent spécifiquement exprimés dans les semences de *M. truncatula*. Par ailleurs, le seul gène commun exprimé de manière spécifique chez la plante reviviscente *Xerophyta humilis* et les semences est un orthologue de PM25, ce qui suggère un rôle fondamental de cette protéine LEA dans la TD (Illing *et al.*, 2005). Enfin, MP2 et PM18 font partie du seul groupe de protéines LEA

qui est commun à tous les anhydrobiotes chez lesquels ce genre de protéines a été détecté (signature PFAM = 02987). L'ensemble de ces résultats jette une lumière nouvelle sur notre compréhension du rôle des protéines LEA. D'une part, ils suggèrent qu'elles pourraient exercer, selon leur nature, des rôles différents selon la teneur en eau de la graine. Certaines pourraient avoir un rôle (prépondérant ou non) pendant les phases précoces du séchage, ce qui expliquerait leur nécessité dans la tolérance aux stress osmotiques peu poussés. D'autre part, vu que les protéines LEA existent sous plusieurs isoformes dont les quantités respectives changent de manière différentielle en fonction de la TD (Boudet *et al.*, 2006; Röhrig *et al.*, 2006), on imagine que les mécanismes de régulation sont complexes. Les protéines LEA peuvent ainsi être spécifiquement synthétisées *de novo* ou subir des modifications post-traductionnelles pendant l'induction de la TD ou en réponse au choc osmotique. Des observations récentes ont d'ores et déjà démontré l'importance du degré de phosphorylation des déhydrines dans leur fonction protectrice contre les stress hydriques (Riera *et al.*, 2004) et dans la TD chez *Crateostigma plantagineum* (Röhrig *et al.*, 2006).

Rôle des sucres solubles non réducteurs

On sait depuis une quarantaine d'années que la TD s'accompagne d'une accumulation de sucres non réducteurs. Le saccharose est synthétisé de manière universelle dans les tissus tolérants à la dessiccation chez les végétaux alors que le tréhalose s'accumule chez les champignons, micro-organismes et animaux anhydrobiotes. Ces sucres peuvent constituer entre 2 et 50 % du poids sec (Hoekstra *et al.*, 2001; Tunnacliffe & Lapinski, 2003; Walters *et al.*, 2005). Seules deux espèces de rotifères (*Philodina roseola* et *Adi. Vaga*) parmi les anhydrobiontes analysés ne semblent pas accumuler des sucres non réducteurs (Tunnacliffe *et al.*, 2005).

Les modes d'actions moléculaires par lesquels les sucres non-réducteurs jouent un rôle protecteur contre la dessiccation ont fait l'objet de plusieurs décennies

d'études *in vitro* sur des modèles biomimétiques (Hoekstra *et al.*, 2001). Cependant, il n'existe pas de consensus sur le mode d'action *in vivo*. Selon le niveau d'hydratation pendant le séchage, les sucres solubles joueraient un rôle stabilisateur en tant qu'effecteur osmotique compatible, en remplaçant au niveau moléculaire les molécules d'eau des assemblages macromoléculaires (membranes et protéines) et par la formation d'un état vitreux à l'état sec (Hoekstra *et al.*, 2001). Cependant, en analysant très finement les corrélations entre teneurs en sucres, propriétés des états vitreux, niveau de tolérance au séchage et quantité de macromolécules à protéger (Hoekstra *et al.*, 2001; Tunnacliffe & Lapinski, 2003; Buitink & Leprince, 2004), il a été démontré que ces sucres semblent nécessaires mais pas suffisants pour conférer la TD. Par exemple, au cours de la réinduction de la tolérance chez les radicules germées de *M. truncatula* (Tableau 3), le saccharose s'accumule avant l'apparition de celle-ci lors du traitement osmotique (Buitink *et al.*, 2006). Tout comme pour les protéines LEA, il se pourrait que les sucres jouent des rôles différents en fonction de la teneur en eau pendant le séchage (Hoekstra *et al.*, 2001). Une autre hypothèse serait que les sucres agissent en synergie avec d'autres molécules chaperonnes telles que les protéines LEA et HSP. Ainsi, la présence de 8 μ M tréhalose dans des cellules de rein humain exprimant p26, une protéine HSP représentant 12 % de contenu protéique de l'anhydrobionte *A. franciscana*, augmente la viabilité de 40 % à 60 % après séchage à 1 g H₂O/g poids sec (Ma *et al.*, 2005). Par ailleurs, le tréhalose augmente la capacité de p26 à replier la citrate synthétase inactivée et dénaturée par la chaleur (Viner & Clegg, 2001). Des résultats similaires ont été obtenus après dessiccation de la citrate synthétase en présence de tréhalose et de la protéine AAvLEA de nématode (Goyal *et al.*, 2005). Enfin, la densité et la mobilité moléculaire au sein de l'état vitreux intracellulaire de graine de pois sont plus proches de celles mesurées *in vitro* dans une matrice composée de saccharose et protéines LEA plutôt que de saccharose seul (Buitink & Leprince, 2004) ou de la protéine LEA seule (Wolkers *et al.*, 2001).

Régulation du métabolisme : trait d'union entre les mécanismes de protection ?

Une des caractéristiques les plus importantes de la TD est l'arrêt progressif et réversible du métabolisme pendant le séchage (Leopold, 1986; Leprince *et al.*, 2000). De plus, l'activité métabolique avant dessiccation est toujours plus élevée dans les stades sensibles par rapport aux stades tolérants (Leprince *et al.*, 2000; Hoekstra *et al.*, 2001). Les mécanismes conduisant à l'arrêt progressif du métabolisme sont encore

très mal connus. Chez les graines d'*Arabidopsis* en fin de développement, le métabolome subit un changement profond lors de la transition de la phase de remplissage à la phase de dessiccation. Celle-ci favorise une diminution du rapport C/N, une augmentation en acides aminés libres plutôt qu'une mobilisation dans les protéines et la production de métabolites secondaires (Fait *et al.*, 2006). Chez la radicule germée de concombre, le traitement osmotique, selon qu'il induit ou non la TD, va provoquer une réponse différentielle pour ce qui concerne l'homéostasie des phospholipides (Avalanche-Macherel *et al.*, 2006). Ces observations et l'ensemble des données biochimiques laissent à penser que la régulation du métabolisme dans un organisme tolérant à la dessiccation est différente de celle d'un organisme sensible, ne fût-ce que parce que les anhydrobiotes doivent accumuler des sucres ou des polyols en grande quantité. Ainsi, les analyses du transcriptome (Tableau 2) et du protéome lors du séchage d'anhydrobiontes (Jiang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007) montrent d'une part que parmi les gènes différentiellement exprimés, une proportion importante (*ca.* 30 %) est liée à la synthèse des sucres ou protéines protectrices (Tableau 2) et d'autre part que tous les processus cellulaires consommant de l'ATP sont progressivement arrêtés. Par exemple, dans les graines germées de *M. truncatula*, l'apparition des radicules tolérantes à la suite du traitement osmotique est accompagnée par la répression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et dans le métabolisme primaire et énergétique (Buitink *et al.*, 2006). Chez les anhydrobiontes photosynthétiques, la situation est plus complexe car ces plantes ont adopté différentes stratégies vis-à-vis du sort de leur appareil photosynthétique pendant la dessiccation. Les espèces dites poikilochlorophylliennes telles que *Xerophyta. ssp* voient leurs thylakoïdes se démanteler pendant le séchage. Ainsi 30 % des gènes réprimés pendant la dessiccation de *X. humilis* appartiennent au métabolisme primaire, à la photosynthèse et la division cellulaire (Collett *et al.*, 2004). Chez les espèces homéochlorophylliennes (*Craterotigma ssp*), le système photosynthétique demeure intact à l'état sec. Cependant, l'assimilation du CO₂ ainsi que l'activité de PSII est stoppée (références dans Georgieva *et al.*, 2006).

Une des raisons invoquées pour expliquer la nécessité de réprimer les gènes de manière coordonnée pendant le séchage serait un mécanisme adaptatif permettant d'atténuer les risques de stress oxydatif qui dépend des activités des chaînes transporteuses d'électrons. Corroborant cette hypothèse, la plupart des études transcriptomiques montrent effectivement que les gènes impliqués dans la défense contre les stress oxydatifs sont activés (Tableau 2). Cependant, les gènes impliqués dans le métabolisme des systèmes antioxydants sont considérés comme des gènes de

ménage qui répondent à une gamme extrêmement variée de stress sans lien direct avec la TD. Dès lors, selon Illing *et al.*, (2005) et Potts *et al.*, (2005), les gènes du métabolisme antioxydant, tout en étant indispensables à la survie d'un organisme, ne peuvent pas être considérés comme faisant partie du répertoire de gènes spécifiquement impliqués dans la TD. Par ailleurs, les activités antioxydantes ne sont pas toujours corrélées à la TD. Ceci est encore plus vrai si on considère le fait qu'il n'y pas suffisamment d'eau libre pour assurer une activité métabolique à l'état sec. En revanche, la majorité des études transcriptomiques (Tableau 2) montre que la régulation du métabolisme secondaire semble être liée à la TD. Son rôle reste encore à déterminer mais pourrait jouer un rôle comme antioxydant à l'état sec.

Chez les radicules germées de *M. truncatula*, le saccharose s'accumule très tôt pendant l'incubation dans le PEG avant l'induction de la TD. En parallèle, l'amidon et les lipides sont dégradés, probablement via l'activation précoce de l'expression de la β -amylase et des gènes codant pour les enzymes intervenant dans la β -oxydation (Buitink *et al.*, 2006). Chez les graines d'*Arabidopsis* et de colza (Fait *et al.*, 2006), la phase de dessiccation est accompagnée d'une dégradation des lipides de réserve et d'une activation des activités du glyoxysome. De manière similaire, la dessiccation progressive de cellules de levure induit une activation des gènes impliqués dans l'oxydation en acides gras et dans le cycle des glyoxylates, suggérant ainsi une augmentation du catabolisme des acides gras (Singh *et al.*, 2005). Ces résultats sont très semblables aux données obtenues chez les mammifères qui démontrent que l'entrée en hibernation est régulée au niveau du métabolisme des réserves impliquant un changement dans l'utilisation des sources carbonées pour utiliser préférentiellement les lipides et assurer ainsi les besoins énergétiques en phase de quiescence. De la même manière, la signature du transcriptome de levure après séchage correspond à celle observée dans les cellules en phase stationnaire (Singh *et al.*, 2005).

Conclusions

Potts *et al.* (2005) ont inventé le concept de « desiccome » pour désigner l'ensemble des attributs nécessaires à la survie à l'état sec. L'enjeu est maintenant de savoir si ce terme répond à une réalité biologique. Il est à peu près certain que des prokaryotes primitifs aient été soumis à des cycles de dessiccation/réhydratation, suggérant que la TD est apparue très tôt pendant l'évolution, indépendamment des changements en teneur en oxygène sur terre. Les études « omiques » ont jusqu'à présent permis de mettre en évidence un répertoire de mécanismes im-

pliqués dans la TD. L'accumulation de sucres non-réducteurs et polyols, accumulation de protéines LEA et HSP, répression coordonnée du métabolisme apparaissent comme des facteurs universels. Cependant, il est fort probable que des stratégies adaptatives ont permis de faire évoluer un certain nombre de mécanismes qu'il faudra encore décrypter. Comment la cellule en dessiccation tient compte des changements structuraux et stress mécaniques subis par les membranes et parois? Y-a-il des métabolites secondaires jouant un rôle spécifique dans la TD? Enfin, selon les études, au moins 30 % des gènes différentiellement exprimés pendant la dessiccation ou l'acquisition de la TD n'ont pas encore une fonction connue et mériteraient plus d'attention.

Pour savoir si le « desiccome » existe vraiment, il apparaît également important de déterminer dans quelle mesure la réponse à des stress hydriques fait partie de la réponse induisant la TD. Les voies de signalisation induisant celle-ci sont encore inconnues. L'acide abscissique joue certes un rôle prépondérant chez les plantes. Mais qu'en est-il des micro-organismes et animaux anhydriobiotiques? Si on connaît un certain nombre de gènes et de voies métaboliques impliqués à la fois dans la TD et la réponse au stress hydrique moins poussé, à notre connaissance, il n'existe pas de régulateur *trans* spécifique à la TD. Le nombre de gènes codant pour des facteurs de transcription dont l'expression varie en fonction de la TD semble même très élevé chez les graines (Buitink *et al.*, 2006). Ceux-ci appartiennent principalement à deux catégories : ceux connus pour leur implication dans les stress hydriques (facteurs DREB1/CBF) et ceux liés au développement et à la maturation des graines. Dès lors, le fait qu'il semble exister un fort recouvrement entre TD et tolérance à la sécheresse permet d'entrevoir la création de variétés de grande culture plus aptes à des climats secs. Par ailleurs, une meilleure compréhension de l'état sec et de la façon dont l'acquisition de la TD est régulée permettra d'améliorer la qualité des graines et leur aptitude au stockage.

Références

- Avelange-Macherel M.-H., Ly-Vu B., Delaunay J., Richomme P. & Leprince O., NMR metabolite profiling analysis reveals changes in phospholipid metabolism associated with the reestablishment of desiccation tolerance upon osmotic stress in germinated radicles of cucumber. *Plant, Cell Environ.* 2006, 29, 471–482.
- Boudet J., Buitink J., Hoekstra F.A., Rogniaux H., Larre C., Sator P. & Leprince O., Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryo-

- genesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant Physiol.*, 2006, 140, 1418–1436.
- Buitink J. & Leprince O., Glass formation in plant anhydrobiotes : survival in the dry state. *Cryobiology*, 2004, 48, 215–228.
- Buitink J., Ly Vu B., Satour P. & Leprince O., A physiological model to study the re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. *Seed Sci. Res.*, 2003, 13, 273–286.
- Buitink J., Leger J.L., Guisle I., Ly-Vu B., Wuillème S., Lamirault G., Le Bars A., Le Meur N., Becker A., Küster K. & Leprince O., Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation sensitive to – tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. *Plant J.*, 2006, 47, 735–750.
- Chakrabortee S, Boschetti C., Walton L.J., Sarkar S., Rubinsztein D.C. & Tunnacliffe A., Hydrophylic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104, 18073–18078.
- Clegg J.S., Cryptobiosis - a peculiar state of biological organization. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 2001, 128, 613–624.
- Collett H., Shen A., Gardner M., Farrant J.M., Denby K.J. & Illing N., Towards transcript profiling of desiccation tolerance in *Xerophyta humilis* : construction of a normalized 11 k *X. humilis* cDNA set and microarray expression analysis of 424 cDNAs in response to dehydration. *Physiol. Plant.*, 2004, 122, 39–53.
- Cytryn, E.J., Sangurdekar, D.P., Streeter J.G., Franck W.L., Chang W.-S., Stacey G., Emerich D.W., Joshi T., Xu D. & Sadowsky M.J., Transcriptional and physiological responses of *Bradyrhizobium japonicum* to desiccation-stress. *J. Bacteriol.*, 2007, 6751–6762.
- Fait A., Angelovici R., Less H., Ohad I., Urbanczyk-Wochniak E., Fernie A.R. & Galili G., Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiol.*, 2006, 142, 839–854.
- Farrant J.J.M. & Kruger L.A., Longevity of dry *Myrothamnus flabellifolius* in simulated field conditions. *Plant Growth Regul.*, 2001, 35, 109–120.
- Guidetti R. & Jönsson K.I., Long-term anhydrobiotic survival in semi-terrestrial micrometazoans. *J. Zool.*, 2002, 257, 181–187.
- Goyal K., Walton L.J. & Tunnacliffe A., LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem. J.*, 2005, 388, 151–157.
- Georgieva K., Szigeti Z., Sarvari E., Gaspar L., Maslenkova L., Peeva V., Peli E. & Tuba Z., Photosynthetic activity of homoiochlorophyllous desiccation tolerant plant *Haberlea rhodopensis* during dehydration and rehydration. *Planta*, 2007, 225, 955–964.
- Hoekstra F.A., Golovina E.A. & Buitink J., Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.*, 2001, 6, 431–438.
- Illing, N., Denby K.J., Collet H., Shen A. & Farrant J.M., The signature of seeds in resurrection plants : a molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. *Integr. Comp. Biol.*, 2005, 45, 771–787.
- Iturriaga G., Cushman M.A.F. & Cushman J.C., An EST catalogue from the resurrection plant *Selaginella lepidophylla* reveals abiotic stress-adaptive genes. *Plant Sci.*, 2006, 170, 1173–1184.
- Jiang G., Wang Z., Shang H., Yang W., Hu Z., Phillips J. & Deng W., Proteome analysis of leaves from the resurrection plant *Boea hygrometrica* in response to dehydration and rehydration. *Planta*, 2007, 225, 1405–1420.
- Leopold A.C., Membrane, Metabolism and Dry Organisms, 1986, Cornell University Press, 376p.
- Leprince O., Harren F.J.M., Buitink J., Alberda M. & Hoekstra F.A., Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. *Plant Physiol.* 2000, 122, 597–608.
- Ma X.C., Kamran J., MacRae T.H., Clegg J.S., Russell J.M., Villeneuve T.S., Euloth M., Sun Y., Crowe J.H., Tablin F. & Oliver A.E., A small stress protein acts synergistically with trehalose to confer desiccation tolerance on mammalian cells. *Cryobiol.*, 2005, 51, 15–28.
- Neale A.D., Blomstedt C.K., Bronson P., Le T.-N., Guthridge K., Evans J., Gaff D.F. & Hamill J.D., The isolation of genes from the resurrection grass *Sporobolus stapfianus* which are induced by severe drought stress. *Plant Cell Environ.*, 2000, 23, 265–277.
- Oliver M.J., Dowd S.E., Zaragoza J., Mauget S.A. & Payton P.R., The rehydration transcriptome of the desiccation-tolerant bryophyte *Tortula ruralis*: transcript classification and analysis. *BMC Genomics*, 2004, 5, 89.
- Potts M., Slaughter S.M., Hunneke F.-U., Garst J.F. & Helm R.F., Desiccation tolerance of prokaryotes: application of principles to human cells. *Integr. Comp. Biol.* 2005, 45, 800–809.
- Proctor M.C.F. & Pence V.C., Vegetative tissues: Bryophytes, vascular resurrection plants and vegetative propagules. In Desiccation and survival in Plants. Drying without dying. Black M. & Pritchard H.W. CABI Oxon, 2002 pp 207–238.
- Riera M., Figueras M., López C., Goday A. & Pagès M., Protein kinase CK2 modulates developmental functions of the abscisic acid responsive protein Rab17 from maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, 9879–9884.
- Röhrig H., Schmidt J., Colby T., Brautigam A., Hufnagel P. & Bartels D., Desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* induces dynamic changes in protein phosphorylation. *Plant Cell Environ.*, 2006, 29, 1606–1619.
- Shen-Miller J., Mudgett M.B., Schopf J.W., Clarke S. & Berger R., Exceptional seed longevity and robust growth : ancient sacred lotus from China. *Amer. J. Bot.* 1995, 82, 1367–1380.

- Singh J., Kumar D., Ramakrishnan N., Singhal V., Jervis J., Garst J.F., Slaughter S.M., DeSantis A.M., Potts M. & Helm R.F., Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to desiccation and rehydration. *App. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 8752–8763.
- Smith-Espinoza C.J., Phillips J.R., Salamini F. & Bartels D., Identification of further *Craterostigma plantagineum* cdt mutants affected in abscisic acid mediated desiccation tolerance. *Mol. Genet. Genomics* 2005, 274, 364–372.
- Tunnacliffe A. & Lapinski J., Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 2003, 358, 1755–1771.
- Tunnacliffe A. & Wise M.J., The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 2007, 94, 791–812.
- Tunnacliffe A., Lapinski J. & McGee B., A putative LEA protein, but no trehalose, is present in anhydrobiotic bdelloid rotifers. *Hydrobiologia*, 2005, 546, 315–321.
- Viner R.I. & Clegg J.S., Influence of trehalose on the molecular chaperone activity of p26, a small heat shock/ α -crystallin protein. *Cell Stress Chap.*, 2001, 6, 126–135.
- Walters C., Wheeler L.M. & Grotenhuis J.M., Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Sci. Res.*, 2005, 15, 1–20.
- Wang W., Meng B. Chen W., Ge X., Liu S. & Yu J., A proteomic study on postdiapaused embryonic development of brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Proteomics* 2007, 7, 3580–3591.
- Wolkers W.F., McCreedy S., Brandt W.F., Lindsey G.G. & Hoekstra F.A., Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1544, 196–206.