

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPLICATION DE LA SUMOYLATION DANS LA MODULATION DE LA RÉPONSE TRANSCRIPTIONNELLE DU
RIZ À LA SUITE D'UN STRESS DE HAUTE TEMPÉRATURE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

MARIAMA DIONGUE

AOÛT 2025

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d’abord à adresser ma plus profonde gratitude aux professeurs Laurent Cappadocia et Zoé Joly-Lopez. Merci pour la confiance que vous m’avez accordée et pour toutes les opportunités que vous m’avez offertes. Ce fut un plaisir de travailler, grandir et évoluer avec vous. Votre soutien, votre bienveillance et votre dévouement m’ont profondément marqués et transformés en la chercheuse que je suis aujourd’hui.

Au professeur François Ouellet, je vous remercie du fond du cœur. Sans vos conseils avisés et vos encouragements, je n’aurais sans doute jamais osé entreprendre cette aventure académique. Votre soutien a grandement contribué à l’aboutissement de ce travail. Je remercie vivement le professeur Steve Bourgault, dont l’expertise a enrichi ce travail, tant en tant qu’évaluateur qu’en tant qu’enseignant. Son accompagnement pédagogique a grandement facilité ma progression tout au long de ce projet.

J’aimerais également remercier les membres des Laboratoires Joly-Lopez et Cappadocia pour leur constant support. Je tiens particulièrement à remercier Souleimen, Fabian, Julien et Antoine en leur qualité de mentors et qui m’ont guidée vers ma réussite. Mention spéciale à Aurore Johary et Marina Goliassé pour leur amitié inébranlable. Merci d’avoir été une source de motivation tout au long de cette maîtrise, de m’avoir soutenue dans les moments les plus intenses et pour tous ces rires autour d’un café. À Gabriel et à mes stagiaires Adriela, Loundja et Ndella, je vous remercie pour votre enthousiasme, votre curiosité et votre précieuse contribution qui ont grandement enrichi ce projet.

À ma famille, mon père, El Ouwaled ; mes frères, Walid, Fallou et Alpha ; mon âme soeur, Sophie ; mes tantes, Ndeye Dieynaba, Mémé et Bintou Ndao ; mes amies Maïmouna, Khadija et Betty ; je vous suis infiniment reconnaissante pour l’amour, la patience et le soutien dont vous avez fait preuve, même dans les moments de doute. Vos sacrifices et votre présence m’ont donné la force de persévérer dans cette aventure académique. Je ne saurais imaginer ce que je serais sans vous.

Enfin, à mon bien aimé Pape, aucun mot ne saurait exprimer toute ma gratitude et mon amour. Ton soutien inébranlable tout au long de ces deux ans et demi a été essentiel à l’aboutissement de ce projet. Merci pour ton amour, ton accompagnement émotionnel et la stabilité dont tu as fait preuve, qui m’ont permis de mener ce travail à bien.

DÉDICACE

À mon vaillant père, El Ouwaled et ma défunte mère, Raby Mbaye.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE	iii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	x
RÉSUMÉ	xii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	2
1.1 Défis environnementaux.....	2
1.1.1 Stress environnementaux	2
1.1.2 Stress de haute température et conséquences du changement climatique sur les cultures	2
1.2 Mécanismes de réponse aux stress environnementaux.....	5
1.2.1 Mécanismes de défense des plantes	5
1.2.2 Importance de la réponse transcriptionnelle	6
1.2.3 Modifications post-traductionnelles.....	10
1.3 La SUMOylation.....	12
1.3.1 Définition et mécanisme.....	12
1.3.2 Rôle de la SUMOylation dans la réponse aux stress environnementaux	15
1.3.2.1 Régulation des protéines par SUMOylation	15
1.3.2.2 Synthèse des travaux sur la SUMOylation et la tolérance aux stress environnementaux	17
1.3.3 Les SUMO E3 ligases	19
1.3.3.1 MMS21.....	20
1.3.3.2 PIAL	20
1.3.3.3 Les SIZs.....	21
1.4 Outils de génomique fonctionnelle pour l'étude de la régulation transcriptionnelle	24
1.4.1 RNA-Seq	26
1.4.2 ATAC-Seq.....	26
1.4.3 ChIP-Seq.....	26
1.5 But de l'étude.....	27
1.5.1 Problématique et hypothèse	27
1.5.2 Objectif de l'étude	29
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES	31
2.1 Modélisation structurale et sélection des antigènes via AlphaFold2	31

2.2	Croissance des plantes et conditions de stress de haute température.....	31
2.3	Biologie moléculaire.....	32
2.3.1	Extraction d'ARN total des cellules à partir de feuilles de riz.....	32
2.3.2	Synthèse de l'ADN complémentaire à partir de l'ARN total.....	33
2.3.3	Amplification des séquences par PCR.....	33
2.3.4	Digestion de l'ADN par enzyme de restriction.....	34
2.3.5	Extraction sur gel de bandes d'ADN	34
2.3.6	Réaction de Gibson	34
2.3.7	Préparation de bactéries chimio-compétentes	35
2.3.8	Transformation bactérienne.....	35
2.3.9	Extraction de plasmides par minipreps	35
2.3.10	Repiquage et glycérol stock	36
2.4	Expression et purification des protéines recombinantes	36
2.4.1	Optimisation de l'expression protéique	36
2.4.2	Optimisation du protocole de purification des protéines recombinantes	37
2.4.2.1	Chromatographie d'affinité Ni-NTA.....	37
2.4.2.2	Clivage des étiquettes des protéines recombinantes.....	37
2.4.2.3	Optimisation des conditions de dialyse.....	38
2.4.2.4	Chromatographie d'exclusion stérique.....	38
2.4.2.5	Électrophorèse SDS-PAGE sur gel d'acrylamide	39
2.4.2.6	Production d'anticorps polyclonaux	39
2.5	Essais d'immunobuvardages et d'immunoprécipitation	39
2.5.1	Immunoprécipitation de la chromatine.....	39
2.5.1.1	Fixation des interactions Protéine-ADN	39
2.5.1.2	Préparation de la chromatine.....	40
2.5.1.3	Analyse et quantification de la chromatine.....	40
2.5.1.4	Immunoprécipitation.....	40
2.5.1.5	Récupération des complexes immunoprécipités	41
2.5.1.6	Purification de l'ADN immunoprécipité.....	41
2.5.1.7	Analyses qPCR.....	42
2.5.1.8	Préparation des bibliothèques d'ADN et séquençage	42
2.5.1.9	Analyses des données de séquençage ChIP-Seq avec Galaxy	44
2.5.2	Western Blot	45
2.5.3	Validation de la spécificité par immunoprécipitation suivie de qPCR (IP-qPCR)	45
	CHAPITRE 3 RÉSULTATS.....	47
3.1	Caractérisation des sites de liaison à l'ADN des protéines SUMOylées du riz lors d'un stress de haute température	47
3.1.1	Reconnaissance des protéines SUMO1 et SUMO2 du riz.....	47
3.1.2	Analyse de la SUMOylation <i>in vivo</i> par ChIP-qPCR	50
3.1.3	Identification des régions génomiques ciblées par SUMO lors d'un stress de HT	55
3.2	Production d'anticorps spécifiques anti-OsSIZ1/2.....	64
3.2.1	Modélisation par AlphaFold des protéines recombinantes OsSIZ1 et OsSIZ2.....	64
3.2.2	Expression et purification des protéines recombinantes OsSIZ1 et OsSIZ2	68
3.2.2.1	Optimisation du protocole de clonage	68

3.2.2.2 Optimisation des protocoles d'expression et de purification des protéines recombinantes ..	70
3.3 Détermination de la spécificité des anticorps anti-OsSIZ1/2.....	82
CHAPITRE 4 DISCUSSION	91
4.1 Reconnaissance des protéines SUMO et identification des cibles génomiques sous stress de haute température	91
4.2 Optimisation de l'expression et de la purification des protéines recombinantes OsSIZ1/2	100
4.3 Validation fonctionnelle des anticorps anti-OsSIZ1/2 et perspectives d'application	106
CONCLUSION	110
ANNEXE A Similarité des séquences SUMO du riz et d'Arabidopsis	113
ANNEXE B Séquences des protéines recombinantes SUMO	114
ANNEXE C Exemple de %Input, p-value et amorces pour la ChIP-qPCR	115
ANNEXE D Optimisation du protocole de sonication pour ChIP-Seq	117
ANNEXE E Préparation des librairies de séquençage	118
ANNEXE F Mesure de la taille des librairies par Agilent TapeStation	119
ANNEXE G Titration ELISA des sérums immuns et préimmuns fournis par Médimabs.....	121
ANNEXE H Courbe d'étalonnage pour l'IP-qPCR	122
BIBLIOGRAPHIE.....	123

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Effets morphologiques et physiologiques du stress de haute température sur le riz.	3
Figure 1.2 Projections des vagues de chaleur dans les principales régions rizicoles d'ici la fin du siècle.....	5
Figure 1.3 Réseau de régulation moléculaire impliqué dans la réponse au stress de haute température chez les plantes.....	10
Figure 1.4 Différents types de modifications post-traductionnelles réversibles pouvant affecter les protéines.....	11
Figure 1.5 Comparaison structurale des protéines SUMO1 et SUMO2 du riz.	13
Figure 1.6 Cascade enzymatique de la voie de SUMOylation (S Jmii, L Cappadocia, 2021).	14
Figure 1.7 Schéma conceptuel de la régulation par SUMOylation et désSUMOylation en réponse aux stress environnementaux chez <i>Oryza Sativa</i>	17
Figure 1.8 Les type SUMO E3 ligases et leur domaines fonctionnels (S Jmii, L Cappadocia, 2021).	22
Figure 1.9 Modèles proposés pour la régulation transcriptionnelle par les ligases E3 de type SIZ.	24
Figure 1.10 Modèle de régulation de la réponse transcriptionnelle d' <i>Oryza sativa</i> par SUMOylation en situation de stress de haute température.	28
Figure 3.1 Expression et purification d'OsSUMO1 et OsSUMO2.	49
Figure 3.2 Reconnaissance des protéines SUMO du riz par l'anticorps commercial anti-SUMO par immunobuvardage	50
Figure 3.3 Expression relative des promoteurs des gènes cibles sous stress de haute température par rapport à des conditions contrôle par ChIP qPCR avec l'anticorps anti-SUMO.	55
Figure 3.4 Evaluation de la reproductibilité des réplicats ChIP-Seq en conditions contrôle et stress de haute température.	61
Figure 3.5 Caractérisation des régions différenciellement SUMOylées sous stress de haute température.	63
Figure 3.6 Conservation du domaine SP-ring entre OsSIZ1, OsSIZ2 et AtSIZ1.	68
Figure 3.7 Gel d'agarose 1 % des amplifications par PCR des gènes codant pour OsSIZ1, OsSIZ2 et AtSIZ1.	69
Figure 3.8 Représentation du vecteur d'expression pRSF-trx Il s'agit d'un vecteur pRSF-duet modifié. ...	70
Figure 3.9 Gels 12 % représentant les essais d'expression et de purification par chromatographie d'affinité au nickel des protéines recombinantes.....	72

Figure 3.10 Tests de différentes conditions de clivage à la TEV des étiquettes sur gel SDS-page 12%.....	74
Figure 3.11 Séparation par tamis moléculaire d'OsSIZ1 court après dialyse présenté sur gel 12%.	76
Figure 3.12 Gel 12% du test de solubilité d'AtSIZ1 (SP-ring).....	77
Figure 3.13 Evaluation de l'effet des différents tampons de dialyse sur le clivage d'OsSIZ2 à la TEV.....	80
Figure 3.14 Expression et purification d'OsSIZ1 et OsSIZ2 à l'aide du protocole optimisé.....	82
Figure 3.15 Western Blot avec les anticorps des sérums préimmun et immun.	84
Figure 3.16 Comparaison entre des valeurs de cycle seuil input et IP par gène et par condition après ChIP-qPCR avec le sérum immun du lapin.	86
Figure 3.17 Expériences d'immunobuvardage des tests de reconnaissance d'OsSIZ1 et OsSIZ2 par les anticorps anti-OsSIZ1/2 purifiés.	87
Figure 3.18 Enrichissement relatif des régions promotrices des gènes cibles sous stress de haute température par rapport à des conditions contrôle par ChIP qPCR avec les anticorps anti-OsSIZ1/2 purifiés.	88
Figure 3.19 Validation de la spécificité des anticorps anti-OsSIZ1/2 par immunoprécipitation suivie de qPCR (IP-qPCR).	90
Figure A.1 Optimisation de la taille des fragments d'ADN obtenus après sonication à intensité maximale.	117
Figure A.2 Electrophorégrammes présentant la taille des bibliothèques de ChIP-Seq ciblant SUMO.	120
Figure A.3 . Courbe standard de l'IP-qPCR utilisée pour le calcul de la concentration en ADN dans les échantillons.	122

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Récapitulatifs des différentes classes de HSFs	8
Tableau 2.1 Amorces utilisées lors de PCR pour l'amplification des inserts	33
Tableau 2.2 Liste des codes-barres i7/i5 et tailles moyennes des fragments envoyés au séquençage	43
Tableau 3.1 Sélection de gènes potentiellement régulés par SUMOylation lors du stress de haute température chez le riz.....	53
Tableau 3.2 Statistiques de qualité des données ChIP-Seq obtenues à partir de feuilles de riz traitées en conditions contrôle.....	57
Tableau 3.3 Statistiques de qualité des données ChIP-Seq obtenues à partir de feuilles de riz traitées en conditions de stress de haute température	58
Tableau 3.4 Impact de la composition du tampon sur la solubilité d'OsSIZ2	78
Tableau A.1 Pourcentage de similarité entre les protéines SUMO d' <i>Oryza sativa</i> et de leurs homologues d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	113
Tableau A.2 Liste des % input et p-value calculés à la suite de la ChIP-qPCR avec l'anticorps anti-SUMO	115
Tableau A.3 Amorces utilisées pour les qPCR	116
Tableau A.4 Liste des adapteurs (codes-barres) utilisés pour la préparation des librairies de séquençage et concentrations des différents échantillons	118

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ABA	Acide abscissique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ChIP-Seq	Immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage
FT	Facteur de transcription
HSF	Facteur de choc thermique
HSP	Protéine de choc thermique
HT	Haute température
MMS21	Methyl Methanesulfonate Sensitivity 21
Ni-NTA	Acide Nickel-Nitrilotriacetic
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PIAL 1/2	<i>Protein Inhibitor of Activated like-STAT 1/2</i>
PINIT	Pro-Ile-Asn-Ile-Thr
PTMs	Modifications post-traductionnelles
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RPM	Tours par minute
SAP	SAF-A/B (<i>Scaffold Attachment Factor A/B</i>) Acinus PIAS
SIZ	SAP et Miz 1 E3 ligase
SP-RING	SIZ/PIAS RING finger

SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i> (petit modificateur de type ubiquitine)
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
Trx	Thiorédoxine

RÉSUMÉ

L'exposition des plantes à des températures élevées entraîne des changements dans l'expression des gènes. Ces changements sont dus à une réorganisation des régulateurs transcriptionnels en partie sous l'action de modifications post-traductionnelles comme la SUMOylation. Celle-ci dépend d'une cascade enzymatique qui comprend une E3 ligase facilitant le transfert d'une petite protéine, SUMO, sur des substrats protéiques. Considérant l'importance des SUMO E3 ligases dans la réponse au stress de haute température (HT) chez la plante *Arabidopsis thaliana*, ce projet vise à déterminer comment deux SUMO E3 ligases chez le riz, OsSIZ1 et OsSIZ2, contribuent à la modulation transcriptionnelle des gènes dans des conditions de stress de HT. Pour déterminer les changements transcriptionnels liés à un stress de HT, nous avons utilisé l'approche ChIP-Seq (Immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage à haut débit) au moyen d'un anticorps commercial anti-SUMO, amorçant la cartographie des sites SUMO. Des ChIP-qPCR ciblées ont confirmé l'enrichissement attendu sur les promoteurs d'OsHSFA2d et OsHSFA6 et suggéré un axe mitochondrie-noyau via OsETFβ. Pour relier ces signaux à l'activité enzymatique, nous avons modélisé les structures tridimensionnelles des protéines afin de sélectionner le domaine le plus conservé des deux protéines homologues (SP-RING) des ligases. Les protéines obtenues après expression et purification ont été injectées dans des lapins pour produire des anticorps polyclonaux. Ces anticorps anti-OsSIZ1/2, validés par IP-qPCR *in vitro*, montrent une coprécipitation d'ADN renforcée pour les constructions SAP+ (contenant le domaine de liaison à l'ADN), attestant de leur spécificité. Les outils développés permettront prochainement un ChIP-Seq ciblé sur OsSIZ1/2 en conditions de HT, afin d'identifier les séquences régulées et d'inférer les facteurs de transcription SUMO-dépendants. À long terme, cette étude facilitera le développement de nouvelles stratégies biotechnologiques permettant aux chercheurs et aux agronomes d'augmenter la résilience des plantes dans un contexte de changements climatiques et pourrait également être étendue à d'autres stress, tels que la sécheresse.

Mots clés : SUMOylation, stress de haute température, expression et purification de protéines, modifications post-traductionnelles, régulation transcriptionnelle, immunoprécipitation de la chromatine

INTRODUCTION

La plante *Oryza sativa* (riz asiatique) est une culture domestiquée importante. Elle représente la principale source alimentaire pour environ 3,5 milliards de personnes, en particulier en Asie, où elle peut contribuer jusqu'à 70 % de l'apport énergétique quotidien, mais aussi dans plusieurs pays d'Afrique et d'Amérique latine (Khush, 2005 ; Mosleh *et al.*, 2015 ; Zeigler et Barclay, 2008). Au-delà de son importance nutritionnelle, la culture du riz joue également un rôle socio-économique majeur notamment dans les pays en développement, où elle représente souvent la principale source de revenus pour les petits exploitants (Dawe, 2008 ; Zeigler et Barclay, 2008). De plus, le riz est aussi une espèce modèle en biologie végétale. C'est la première céréale et plante cultivée à avoir vu son génome séquencé dans son intégralité (*The map-based sequence of the rice genome.*, 2005) ce qui a permis de développer de nombreuses ressources génétiques, transcriptomiques et fonctionnelles. Sa petite taille génomique, sa diploïdie, son cycle de vie court (3 à 6 mois) et sa capacité à générer des lignées mutantes par transformation génétique en font un système modèle de choix pour l'étude de la physiologie, du développement ou des réponses au stress (Jackson, 2016 ; Song *et al.*, 2018).

Toutefois, La croissance démographique impose une augmentation constante de la production, alors même que les surfaces cultivables diminuent et que des contraintes environnementales se multiplient (Edwards *et al.*, 2024). En effet, les épisodes de sécheresse, les vagues de chaleur extrêmes, l'augmentation de la salinité des sols ou encore les inondations perturbent les cycles de culture et menacent les rendements des récoltes (Saud *et al.*, 2022). Par exemple, la sécheresse peut réduire le rendement du riz de 21 à 50 % durant la phase végétative (phase de développement des tiges et feuilles chez le riz) à 83 % en période de floraison (Zhang *et al.*, 2018). La salinité peut induire une chute de rendement allant jusqu'à 64% (Zheng *et al.*, 2023). Même des inondations de courte durée peuvent provoquer des baisses de rendement de 15 à 17 % (Yu *et al.*, 2024). Par exemple, une corrélation négative ($0,3 < |r| \leq 0,5$) a été établie entre la température maximale quotidienne et les rendements du riz asiatique démontrant que plus les journées sont chaudes plus les rendements sont bas (Chen *et al.*, 2023).

Dans ce contexte, comprendre les mécanismes de tolérance aux stress environnementaux est indispensable pour développer des variétés de riz plus robustes, capables de s'adapter à des conditions extrêmes tout en assurant la sécurité alimentaire mondiale (Arouna *et al.*, 2021).

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Défis environnementaux

1.1.1 Stress environnementaux

Les stress environnementaux représentent un défi certain pour la croissance des plantes, car elles sont exposées de façon continue aux variations de leur environnement. Certaines de ces variations résultent en stress qui compromettent leur productivité et leur développement (Debnath *et al.*, 2024). Parmi ces stress, on retrouve notamment ceux liés à la chaleur, au froid, à la sécheresse, à la salinité, aux inondations, ainsi que des carences en nutriments nécessaires à la croissance (Chen *et al.*, 2021 ; Huang *et al.*, 2023 ; Zhang *et al.*, 2021 ; Zhou *et al.*, 2020). Ces conditions défavorables affectent les fonctions physiologiques des plantes en perturbant la photosynthèse, la respiration, l'équilibre hydrique, ou encore l'intégrité des membranes cellulaires (Chauhan *et al.*, 2023 ; Su *et al.*, 2022 ; 2025). Le riz, à l'instar d'autres cultures, est particulièrement sensible à ces stress, notamment ceux de sécheresse et de chaleur, qui sont de plus en plus fréquents en raison du dérèglement climatique (Piveta *et al.*, 2020). Pour atténuer les effets de ces stress abiotiques, plusieurs approches sont proposées par des études comme celle de Lamaoui (Lamaoui *et al.*, 2018), soulignant l'importance des stratégies de gestion agricole et biotechnologique. Il s'agit de la sélection de variétés résistantes via l'amélioration génétique, la gestion optimisée de l'irrigation, l'utilisation de paillis (matériaux organiques ou synthétiques étendus sur le sol pour conserver l'humidité et réduire l'évaporation de l'eau) et l'application de régulateurs hormonaux, comme l'acide abscissique (ABA) pour renforcer la tolérance au stress. Le développement de variétés de riz plus résistantes, ainsi que l'optimisation des techniques de culture sont essentiels pour garantir une production stable dans des conditions climatiques de plus en plus extrêmes (Edwards *et al.*, 2024).

1.1.2 Stress de haute température et conséquences du changement climatique sur les cultures

Le stress de haute température (HT) suscite une inquiétude de plus en plus croissante sur l'ensemble du globe. En effet, au-delà d'un certain seuil thermique (généralement au-dessus de 35°C pour le riz), les processus biologiques, essentiels tels que la germination, la fertilité ou encore le rendement des grains sont altérés. Par exemple (Figure 1.1), pour une phase critique dans le développement de la plante, comme la floraison (stade de l'anthesis (ouverture des fleurs formant les panicules) ou d'épiaison), une hausse de

quelques degrés peut induire une stérilité quasi totale des panicules (groupes de fleurs portant les épis de riz) pouvant compromettre toute la récolte (Guo *et al.*, 2024 ; Sun *et al.*, 2022).

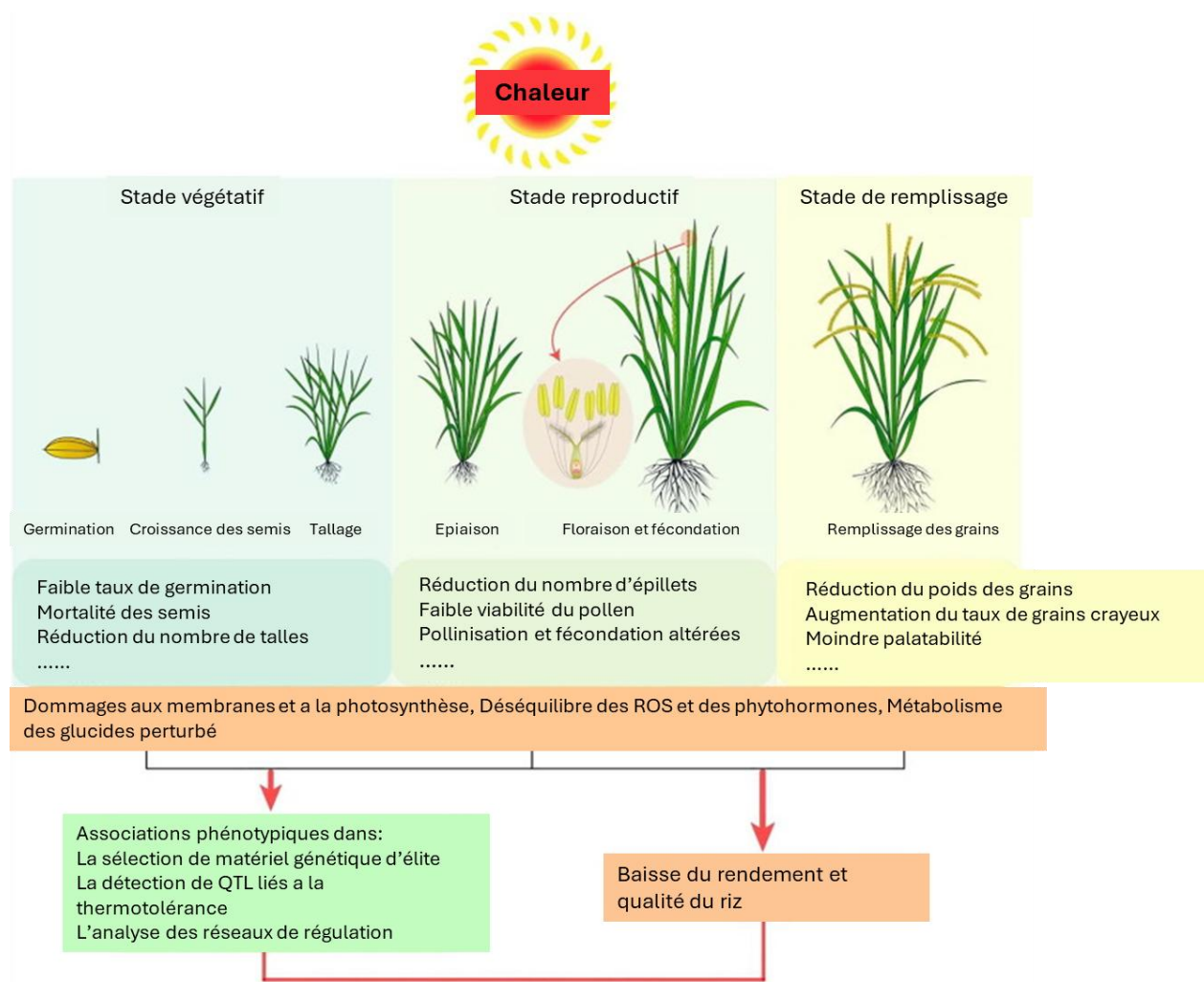


Figure 1.1 Effets morphologiques et physiologiques du stress de haute température sur le riz. Schéma illustrant les principaux impacts du stress de haute température sur le développement du riz, affectant la germination, la fertilité, la photosynthèse et le remplissage des grains. Le stress thermique peut provoquer une stérilité partielle ou totale des panicules et réduire considérablement le rendement final. Traduit et adapté de Xu *et al.*, 2021.

Les prévisions climatiques montrent clairement que les températures mondiales vont continuer à augmenter dans les prochaines décennies. D'après le Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC, 2021), la température moyenne mondiale pourrait augmenter de 1,5 à 2°C d'ici 2050 (Figure 1.2), et ce, même dans les scénarios prévus avec des politiques d'atténuation. Dans les scénarios à fortes émissions, cette hausse pourrait dépasser 3°C d'ici la fin du siècle, avec des températures

encore plus élevées dans certaines régions tropicales et subtropicales ([Climate Change 2021 – The Physical Science Basis, 2023](#) ; [Xu et al., 2018](#)). Pour les régions rizicoles, telles que l'Asie du Sud, l'Afrique de l'Ouest ou encore l'Amérique centrale, ces projections impliquent des vagues de chaleur plus fréquentes, plus intenses et plus précoces durant la saison de croissance. Par exemple, les modèles climatiques prévoient que le nombre de jours avec des températures supérieures à 35°C pourrait doubler, voire tripler d'ici 2100 dans certaines zones agricoles clés, compromettant des périodes sensibles comme la floraison ou la pollinisation ([Liu et al., 2024](#) ; [Mangani et al., 2023](#)). Ces changements risquent non seulement de réduire significativement les rendements, mais aussi de menacer la sécurité alimentaire dans les régions les plus vulnérables d'où l'urgence de comprendre les mécanismes de réponse au stress de HT par les plantes, autant sur le plan physiologique que sur le plan moléculaire. En effet, la survie et la productivité des plantes dépendent principalement de leur capacité à détecter, interpréter puis répondre aux différents signaux de stress. Elles possèdent de nombreux mécanismes d'adaptation complexes qui leur permettent de moduler leur physiologie et leur métabolisme, notamment l'expression génique ([Zhu, 2016](#)). Ces mécanismes sont donc fondamentaux pour identifier les acteurs génétiques ou moléculaires permettant d'améliorer la tolérance des cultures aux conditions environnementales extrêmes ([Liu et al., 2015](#) ; [Sah et al., 2016](#) ; [Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2007](#)).

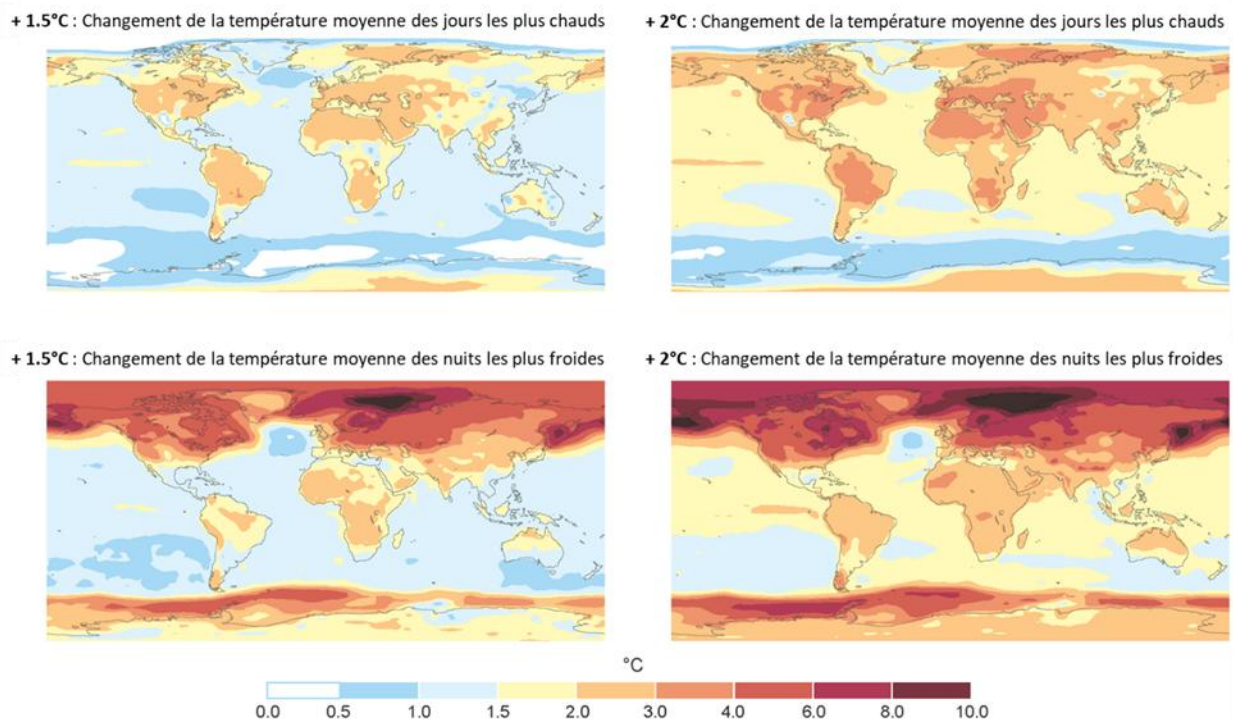


Figure 1.2 Projections des vagues de chaleur dans les principales régions rizicoles d'ici la fin du siècle. Carte illustrant l'augmentation prévue du nombre de jours à température supérieure à 35 °C dans les zones tropicales et subtropicales (Asie du Sud, Afrique de l'Ouest, Amérique centrale), selon les scénarios d'émissions élevés du GIEC. Ces projections indiquent une hausse significative de la fréquence et de l'intensité des vagues de chaleur durant la saison de croissance du riz, pouvant compromettre la production agricole mondiale. Traduit et adapté du GIEC (2021), *Climate Change 2021 – The Physical Science Basis*, 2023, IPCC AR6.

1.2 Mécanismes de réponse aux stress environnementaux

1.2.1 Mécanismes de défense des plantes

Les plantes déploient une large gamme de réponses pour faire face aux stress environnementaux, qui s'expriment à différents niveaux : cellulaire, moléculaire, physiologique et développemental. Ces réponses, qu'elles soient rapides ou différées, localisées ou systémiques, forment un réseau intégré assurant la résilience de la plante face à un environnement hostile (Liu et al., 2015; Sah et al., 2016; Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2007). À l'échelle cellulaire, les stress tels que la chaleur peuvent entraîner la dénaturation des protéines, une accumulation de ROS (espèces réactives de l'oxygène) et des perturbations membranaires. Pour contrer ces effets, les plantes activent des réponses conservées incluant la production de protéines chaperonnes, notamment les HSPs (Protéines de choc thermique), qui stabilisent les protéines altérées et les systèmes antioxydants (enzymatiques ou non) visant à limiter les dommages oxydatifs (Larkindale et al., 2005 ; Lin et al., 2001 ; Niu et Liao, 2016). Sur le plan physiologique, les ajustements incluent la fermeture des stomates pour limiter les pertes hydriques (Cominelli et al., 2005 ; Huang et al., 2008), la préservation de la photosynthèse grâce aux petites protéines de choc thermique dans les chloroplastes (Downs et al., 1999) et le maintien de l'intégrité membranaire via des réponses ABA-dépendantes (Gong et al., 1998). Le stress peut également induire des changements développementaux importants, comme l'accélération de la floraison ou l'entrée en dormance (Riboni et al., 2013 ; Tao et al., 2017). À la base de ces réponses se trouve une cascade de signalisation impliquant des messagers secondaires (calcium, oxyde nitrique, ROS), des kinases, et des hormones telles que l'ABA. Cette cascade mène à une reprogrammation transcriptionnelle qui permet l'activation de gènes protecteurs et la suppression de fonctions non prioritaires (Knight et al., 1997 ; Niu et Liao, 2016 ; Sah et al., 2016).

1.2.2 Importance de la réponse transcriptionnelle

La régulation transcriptionnelle constitue un mécanisme clé dans l'adaptation des plantes aux stress abiotiques, y compris le stress de HT. Elle permet d'ajuster rapidement l'expression d'un grand nombre de gènes afin d'activer des voies de protection cellulaire ou de réprimer des fonctions non prioritaires pour la survie (Lata et Prasad, 2011). Cette régulation aboutit à l'activation de familles spécifiques de facteurs de transcription (FTs). Ces protéines jouent un rôle central dans la transcription car elles se fixent sur des séquences cis-régulatrices spécifiques dans les promoteurs ou enhancers des gènes cibles grâce à leur domaine de liaison à l'ADN (Joly-Lopez *et al.*, 2017 ; Singh *et al.*, 2018 ; Zhu et Huq, 2011). Elles peuvent ensuite recruter ou bloquer le complexe transcriptionnel via leurs domaines d'activation ou de répression, ajustant ainsi l'expression génique en fonction du signal perçu et de l'état chromatinien (Fietze et Farnham, 2011 ; Mindel *et al.*, 2024 ; Talukdar et Chatterji, 2023). Sous l'effet d'un stress de HT, par exemple, des familles spécifiques de FTs comme les HSFs (*Heat Shock Factors*), les DREBs (*Dehydration Responsive Element Binding proteins*) et les NAC (NAM, ATAF1/2 et CUC2) sont rapidement activés (Lata et Prasad, 2011 ; Scharf *et al.*, 2012).

Les HSFs sont des régulateurs clés de la réponse au stress de HT. Ils s'activent rapidement en réponse à une élévation de la température et déclenchent l'expression de gènes codant pour les HSPs favorisant ainsi le bon repliement des protéines et réduisant donc la dénaturation (Scharf *et al.*, 2012). Chez les plantes, les HSFs constituent une famille multigénique de FTs avec plus de 20 membres chez le riz. Elle est structurée en plusieurs classes fonctionnelles, comprenant principalement les classes de HSF A, B et C, différenciées par leurs domaines modulateurs et leurs capacités d'activation transcriptionnelle (Bakery *et al.*, 2024 ; Berz *et al.*, 2019). La classification structurelle a été affinée en sous-classes (Tableau 1.1), selon la nature des motifs conservés : neuf sous-classes pour la classe A (HSFA1 à HSFA9), cinq pour la classe B (HSFB1 à HSFB5), et deux (HSFC1 et HSFC2) pour la classe C (Bakery *et al.*, 2024). Les membres de la classe A (comme HSFA1, HSFA2, HSFA6) sont généralement activateurs transcriptionnels. Ils possèdent un domaine d'activation C-terminal (motif AHA) et sont considérés comme les principaux activateurs de la réponse thermique. HSFA1, en particulier, est souvent décrit comme un régulateur « maître », initiant rapidement la transcription des gènes cibles (notamment ceux des HSPs) dès les premières minutes du stress de HT (Scharf *et al.*, 2012 ; Wu *et al.*, 2022). Certains HSFs, comme HSFA1a et HSFA2 (souvent régulé en aval de HSFA1), peuvent aussi initier une boucle de rétro-activation en se liant à leurs propres promoteurs, renforçant ainsi la réponse au stress (Huang *et al.*, 2023 ; Park *et al.*, 2015). HSFA2 et HSFA3 forment des complexes régulateurs participant à la “mémoire au stress” en maintenant l'activation de

gènes HSP plusieurs jours après l'exposition à un stress de HT (Friedrich *et al.*, 2021). Bien que principalement impliquée dans les réponses à la déshydratation et à la signalisation ABA (Wenjing *et al.*, 2020), la sous-classe HSFA6 peut également intervenir dans la tolérance au stress de HT. Son induction combinée à celle d'autres HSFs active l'expression de gènes comme HVA1, associés à la protection cellulaire et à la limitation des ROS sous chaleur et sécheresse (Samtani *et al.*, 2022). Les HSFs de classe B, comme OsHsfB4b, ne possèdent pas de domaine d'activation transcriptionnelle et sont généralement considérés comme des co-régulateurs. Ils n'activent donc pas directement l'expression des gènes, mais modulent la réponse au stress en influençant l'intensité et la durée de l'induction des HSPs et en régulant la dynamique des ROS (Zhang *et al.*, 2022). La classe C, bien moins représentée et longtemps restée mal caractérisée, regroupe des HSFs dont les fonctions étaient jusqu'à récemment peu documentées. Toutefois, des études récentes suggèrent qu'ils pourraient jouer un rôle modulateur dans les réponses au stress, en coordination avec les HSFs de classe A. Par exemple, LHsFC2 chez *Lilium longiflorum* interagit avec HSFA1 et HSFA2 pour ajuster la réponse au stress de HT et améliorer la tolérance à la chaleur sans suractiver les gènes de stress (Wu *et al.*, 2024). Ces HSFs se lient à des motifs conservés appelés HSEs (éléments de choc thermique), composés de répétitions de séquences nGAAn-nTTCn, souvent organisées en triplet. La reconnaissance efficace de ces éléments nécessite la conformation trimérique des HSFs, rendue possible par leur domaine de liaison à l'ADN et leur domaine d'oligomérisation. La structure du HSE, notamment la disposition des motifs en tandem (même orientation) comme « nGAAn-nGAAn-nGAAn » ou en palindrome inversé (symétrique opposée) comme « nGAAn-nTTCn-nGAAn » influence directement l'affinité de liaison des HSFs et l'intensité de l'activation transcriptionnelle, un paramètre clé dans l'interprétation des résultats issus de d'analyses de promoteurs ciblés (Scharf *et al.*, 2012 ; Wu *et al.*, 2022). Enfin, l'expansion de la famille des HSFs dans les plantes supérieures a été documentée comme un événement adaptatif majeur. Des analyses phylogénétiques récentes ont révélé une augmentation du nombre de gènes HSF chez les angiospermes, accompagnée d'une spécialisation fonctionnelle selon les tissus, les stress ou les conditions environnementales (Liao *et al.*, 2022). Cette complexité fait des HSFs des cibles de choix dans les stratégies de sélection pour améliorer la tolérance thermique des plantes cultivées.

Tableau 1.1 Récapitulatifs des différentes classes de HSFs

Classe de HSF	Nombre de Sous-classes	Caractéristiques principales	Rôles fonctionnels principaux
Classe A	9 (HSFA1 à HSFA9)	Possèdent un domaine d'activation transcriptionnelle C-terminal (motif AHA). Activateurs transcriptionnels majeurs.	Initiation rapide de la réponse au stress thermique, activation des gènes HSP, boucle de rétro-activation, mémoire au stress
Classe B	5 (HSFB1 à HSFB5)	Absence de domaine d'activation transcriptionnelle. Co-régulateurs.	Modulation de l'intensité et durée de la réponse HSP, régulation de la dynamique des ROS.
Classe C	2 (HSFC1, HSFC2)	Moins caractérisés. Jouent un rôle modulateur, interaction avec classe A.	Ajustement de la réponse au stress, amélioration de la tolérance à la chaleur sans suractivation excessive des gènes de stress.

Les DREBS sont des facteurs de transcription activés en réponse à plusieurs types de stress abiotiques, notamment la sécheresse, le froid et la chaleur. Ils se lient à des éléments cis-régulateurs appelés DRE/CRT (*Dehydration Responsive Element/C-repeat*) pour activer l'expression de gènes de protection cellulaire ([Lata et Prasad, 2011](#)). Les DREBs forment une sous-famille du groupe AP2/ERF de facteurs de transcription, largement impliquée dans la signalisation des stress abiotiques. On distingue principalement deux grands types : DREB1/CBF (facteurs liant le froid) principalement activés par le froid ([Moon et al., 2019](#)) , et DREB2, plus associés à la chaleur, la sécheresse et les stress osmotiques ([Sahid et al., 2021](#) ; [Sato et al., 2014](#)). Chez le riz, OsDREB2A et OsDREB2B ont été identifiés comme des acteurs centraux de cette réponse, activant l'expression de gènes de protection cellulaire tels que OsLEA3, OsP5CS1 ou encore OsRAB21 via leur liaison à des éléments DRE/CRT dans les promoteurs cibles ([Matsukura et al., 2010](#) ; [Zhang et al., 2013](#)).

Enfin les NACs sont une large famille de facteurs de transcription végétaux, dont l'acronyme vient des trois premiers membres identifiés : NAM (*No Apical Meristem*), ATAF1/2 (*Arabidopsis Transcription Activator Factor 1 et 2*) et CUC2 (*Cup-Shaped Cotyledon*). Les NACs interviennent dans une multitude de processus biologiques, allant du développement embryonnaire à la sénescence, mais aussi dans la réponse aux stress abiotiques. Plusieurs membres de cette famille sont spécifiquement induits par le stress de HT, contribuant à la régulation de gènes de réponse et à l'adaptation physiologique de la plante. Par exemple, les facteurs

de transcription ONAC127 et ONAC129 sont exprimés dans les graines de riz et forment un hétérodimère lors du remplissage des dits grains. Ces facteurs régulent l'expression de gènes impliqués dans le transport des sucres et la réponse au stress, tels que OsMST6, OsSWEET4, OsMSR2, et OsEATB. Des analyses transcriptomiques ont montré que la perturbation de l'expression de ONAC127 et ONAC129 entraîne un remplissage incomplet des grains et une sensibilité accrue au stress HT ([Ren et al., 2021](#)). Un autre exemple est le facteur de transcription SNAC3 (alias ONAC003, LOC_Os01g09550) qui est un NAC ubiquitaire dont l'ARNm augmente significativement sous stress hydrique, chaleur, salinité et traitement à l'ABA. Des lignées de riz surexprimant SNAC3 montrent une meilleure tolérance à la chaleur, à la sécheresse et au stress oxydatif, tandis que l'inhibition de SNAC3 par RNAi (une technique qui consiste à utiliser des molécules d'ARN spécifiques pour bloquer l'expression du gène SNAC3) les rend plus sensibles à ces contraintes. Les analyses transcriptomiques indiquent que SNAC3 module l'expression de gènes de la défense antioxydante, favorisant ainsi l'homéostasie des ROS et la résistance au stress ([Fang et al., 2015](#)).

Cette activation sélective de familles de FTs permet aux plantes de réorienter rapidement leurs programmes transcriptionnels face au stress. Les études de génomique fonctionnelle permettent aujourd'hui de relier directement ces régulateurs à leurs cibles génomiques et d'élucider les réseaux de transcription (Figure 1.3) impliqués dans la tolérance à la chaleur ([Han et al., 2021](#)).

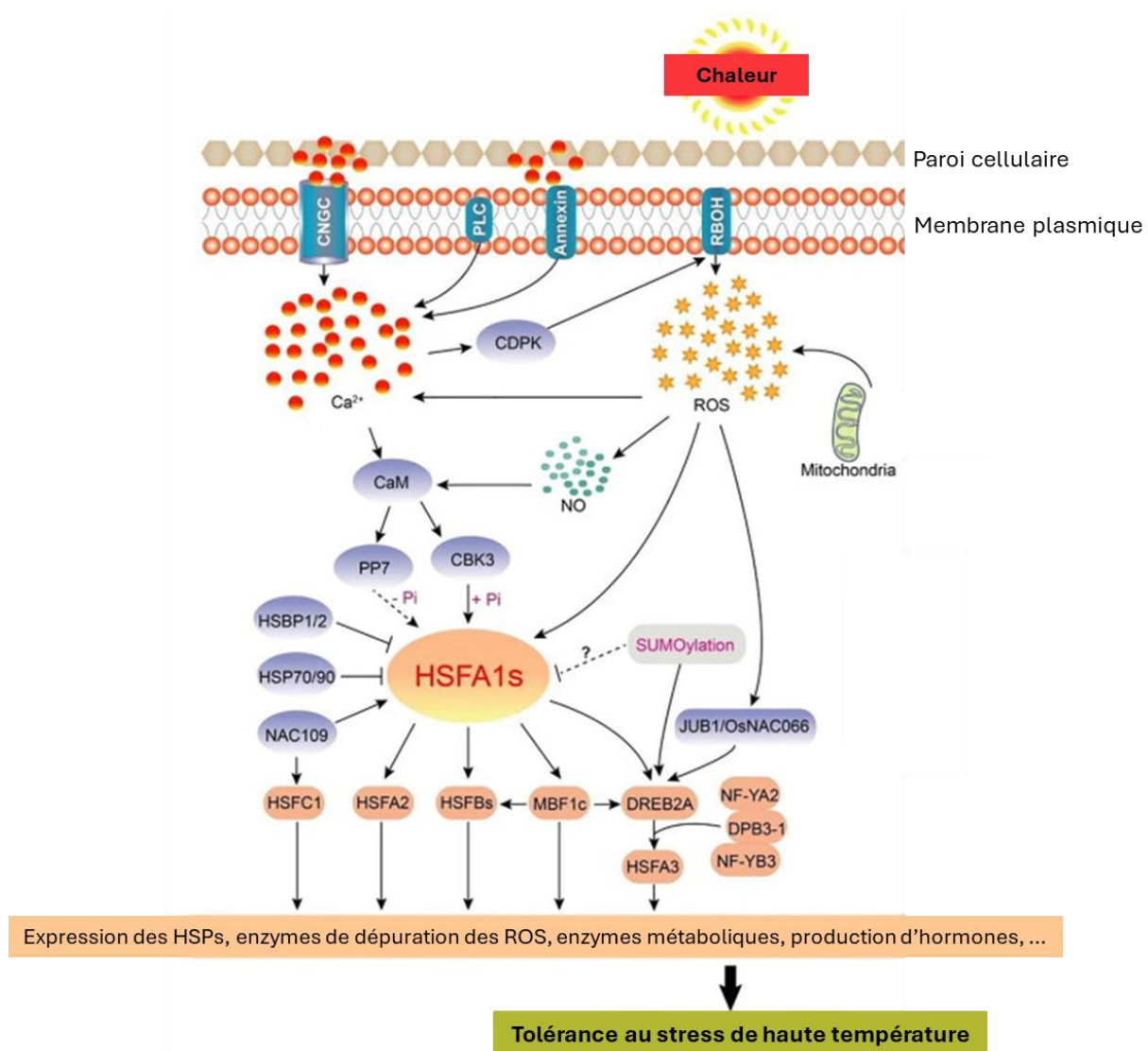


Figure 1.3 Réseau de régulation moléculaire impliqué dans la réponse au stress de haute température chez les plantes. Le stress de chaleur entraîne une accumulation de Ca^{2+} , ROS et NO dans la cellule, activant les facteurs de transcription HSFA1 et leurs régulateurs en amont. Ceux-ci déclenchent l'expression de gènes de protection (HSPs, enzymes antioxydantes, etc.) conduisant à une meilleure tolérance à la chaleur. Adapté et traduit de [Xu et al., 2021](#) (CC BY-NC-ND 4.0).

1.2.3 Modifications post-traductionnelles

En réponse aux stress environnementaux, les plantes ne se contentent pas d'ajuster l'expression de leurs gènes, elles régulent aussi l'activité de leurs protéines à travers des modifications post-traductionnelles (PTMs) ([Han et al., 2022](#)). Ces modifications, ajoutées après la traduction des protéines, permettent d'adapter rapidement et réversiblement les fonctions protéiques, sans nécessiter la synthèse de nouvelles

protéines. Parmi les principales PTMs (Figure 1.1), on retrouve la phosphorylation, qui module l'activité enzymatique ou les interactions protéiques; l'ubiquitination, souvent associée à la dégradation ciblée via le protéasome; l'acétylation et la méthylation, qui affectent notamment les histones et donc la structure de la chromatine; ou encore la SUMOylation, qui sera explorée plus en détail dans la section suivante (He *et al.*, 2017 ; Hu *et al.*, 2015 ; Shi *et al.*, 2024). Par exemple, la phosphorylation de FTs peut activer ou inhiber leur capacité à se lier à l'ADN, modifiant ainsi l'expression génique de manière ciblée. De même, l'ubiquitination de certains régulateurs négatifs de la réponse au stress peut entraîner leur dégradation, levant ainsi un frein à l'activation de gènes protecteurs (He *et al.*, 2017). Les PTMs sont souvent interconnectées, formant des réseaux de régulation complexes (Song *et al.*, 2016). Une même protéine peut recevoir plusieurs types de modifications, parfois de manière compétitive ou coopérative, générant ainsi une combinaison qui conditionne sa fonction dans un contexte donné. Dans les réponses au stress de HT, ces mécanismes permettent opérer des ajustements temporaires et réversibles, ce qui est essentiel pour maintenir l'intégrité cellulaire et rétablir l'homéostasie une fois le stress dissipé. La diversité et la plasticité des PTMs en font donc des éléments clés dans la résilience des plantes face aux conditions changeantes de leur environnement (He *et al.*, 2017 ; Shi *et al.*, 2024).

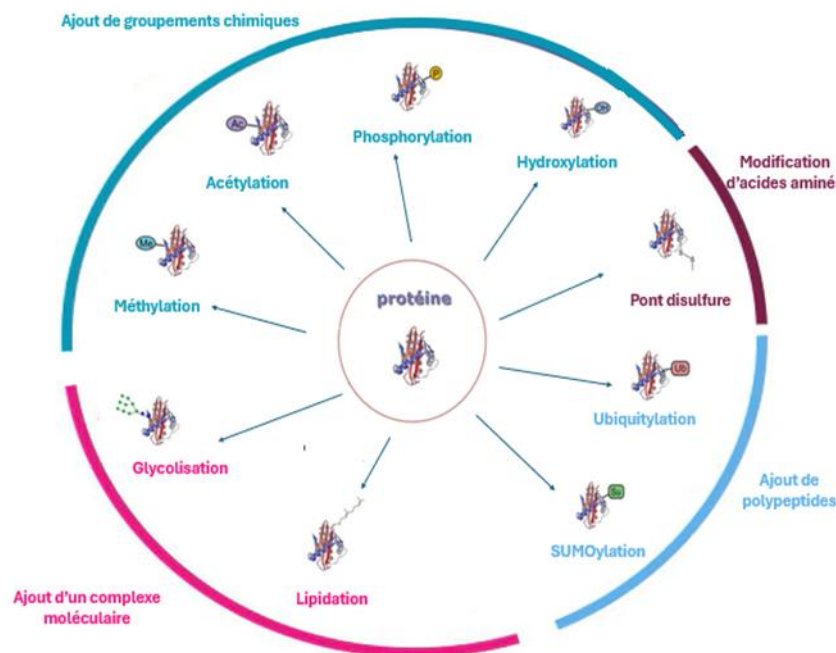


Figure 1.4 Différents types de modifications post-traductionnelles réversibles pouvant affecter les protéines. Adapté de Ribet et Cossart, 2010.

1.3 La SUMOylation

1.3.1 Définition et mécanisme

La SUMOylation est une PTM qui consiste à attacher une petite protéine appelée SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) à des protéines cibles. Contrairement à l'ubiquitination, qui signale souvent la dégradation des protéines, la SUMOylation n'entraîne pas leur élimination, mais module plutôt leur activité, leur localisation cellulaire ou encore les interactions protéine-protéine, souvent via la formation de complexes multiprotéiques impliquant des motifs d'interaction avec SUMO (SIMs) (Miura *et al.*, 2007 ; Yau *et al.*, 2021). Chez les plantes, la famille des protéines SUMO est relativement restreinte comparée à d'autres familles de protéines Ubiquitine-like, mais elle présente une diversité fonctionnelle non négligeable. Chez *Arabidopsis thaliana*, huit gènes codant pour des protéines SUMO ont été identifiés (AtSUMO1 à AtSUMO8), bien que seules quelques isoformes jouent un rôle majeur dans la conjugaison. Les paralogues AtSUMO1 et AtSUMO2, très proches (> 80 % d'identité en acides aminés), sont abondamment exprimées et actives pour la conjugaison, représentant l'essentiel des conjugués SUMO détectés dans les cellules (Kurepa *et al.*, 2003 ; Shimada et Tanaka, 2023). AtSUMO3, bien que moins abondante que SUMO1/2, a été impliquée dans des réponses immunitaires spécifiques, notamment via la SUMOylation de NPR1, un régulateur central de l'immunité végétale, et pourrait moduler l'activité des SUMO1/2 (Saleh *et al.*, 2015). Les autres SUMOs (AtSUMO4 à AtSUMO8) sont beaucoup moins caractérisés, bien que AtSUMO5 et AtSUMO6 soient conservés dans les plantes (Shimada et Tanaka, 2023) et ne possèdent pas les motifs nécessaires à la conjugaison.

Chez le riz, sept gènes SUMO ont été rapportés à ce jour : OsSUMO1 à OsSUMO7 (Shimada et Tanaka, 2023). OsSUMO1 et OsSUMO2 (Figure 1.5), très similaires, sont considérés comme les homologues fonctionnels d'AtSUMO1/2 et seraient principalement impliqués dans la mono-SUMOylation. Des analyses transcriptomiques et fonctionnelles montrent qu'OsSUMO1 et OsSUMO2 sont les plus abondantes et probablement les plus actives dans les processus de SUMOylation, notamment en réponse aux stress abiotiques comme la chaleur (Han *et al.*, 2021 ; Park *et al.*, 2021 ; Rosa *et al.*, 2018). OsSUMO3, quant à lui, présente un profil d'expression plus restreint, souvent non détectable dans certaines variétés (Rosa *et al.*, 2018), ce qui pourrait refléter un rôle spécialisé ou redondant dans des contextes particuliers. OsSUMO4, OsSUMO5 et OsSUMO6, récemment caractérisés, sont capables de modifier des cibles spécifiques *in vitro* et *in vivo*, notamment des FTs liés à la réponse au stress, suggérant un rôle possible dans la polySUMOylation (Teramura *et al.*, 2021). OsSUMO7, identifié plus récemment (Ibrahim *et al.*, 2021), est peu exprimé, mais sa conservation et son activité observée en système hétérologue suggèrent

une fonction encore mal comprise. Cette diversité au sein des isoformes, que ce soit chez *Arabidopsis* ou chez le riz, semble refléter une spécialisation fonctionnelle, certains isoformes étant probablement dédiés à des contextes cellulaires ou environnementaux spécifiques (Roy et Sadanandom, 2021 ; Shimada et Tanaka, 2023).

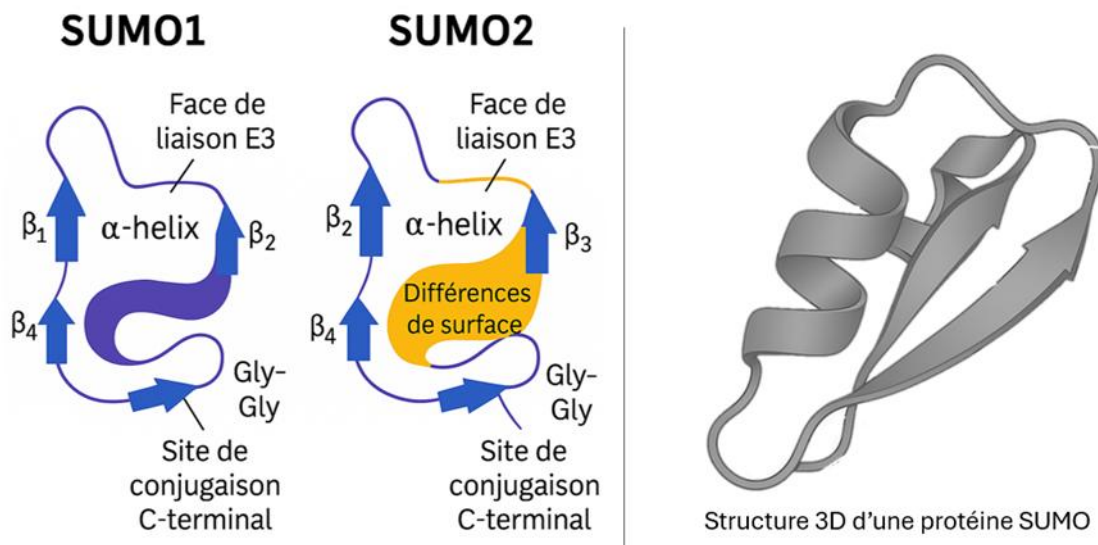


Figure 1.5 Comparaison structurale des protéines SUMO1 et SUMO2 du riz. Représentation schématique des structures secondaires des protéines SUMO1 et SUMO2 du riz (à gauche), illustrant les principales différences au niveau de la surface (en orange) entre les deux isoformes, notamment dans la région de liaison à la ligase E3. Les deux protéines possèdent une hélice α centrale entourée de quatre feuillets β et un site de conjugaison C-terminal caractérisé par une double glycine (Gly-Gly). À droite, vue en 3D de la structure d'une protéine SUMO montrant le repliement typique en forme de fer à cheval.

La SUMOylation repose sur une cascade enzymatique hautement conservée (Figure 1.6), impliquant d'abord une enzyme d'activation E1 qui active la protéine SUMO de manière ATP-dépendante, puis une enzyme de conjugaison E2 qui transfère le SUMO vers la protéine cible. L'efficacité et la spécificité de ce transfert sont généralement assurées par des enzymes ligases de type E3, qui facilitent la reconnaissance des substrats et le positionnement du SUMO (Jmii et Cappadocia, 2021). La SUMOylation est induite rapidement en conditions de stress (notamment chaleur, sécheresse, salinité), souvent en quelques minutes, avant même les réponses transcriptionnelles majeures. Cette réactivité rapide permet une adaptation précoce et transitoire, essentielle à la survie cellulaire (Augustine *et al.*, 2016 ; Miura *et al.*,

2007). Le processus de SUMOylation cible des lysines spécifiques, souvent dans des motifs consensus de type Ψ -K-X-E, et modifie les propriétés des protéines cibles (Miura *et al.*, 2007). Ce motif consensus se compose d'un acide aminé hydrophobe (Ψ), suivi d'une lysine (K), d'un acide aminé quelconque (X), puis d'un glutamate (E) (Yau *et al.*, 2021). Par exemple, une séquence comme IKAE (Isoleucine-Lysine-Alanine-Glutamate) pourrait représenter un bon site de SUMOylation. Ce motif guide la machinerie enzymatique vers des lysines préférentielles à modifier, bien que tous les motifs potentiels ne soient pas toujours utilisés *in vivo*. La SUMOylation est aussi réversible grâce à des protéases spécifiques de type ULP (*Ubiquitin-Like Protease*), qui retirent la protéine SUMO une fois le stress dissipé, rétablissant ainsi l'homéostasie (Hickey *et al.*, 2012). Par ailleurs, elle se coordonne avec d'autres PTMs, comme la phosphorylation ou l'ubiquitination, pour permettre l'intégration des signaux cellulaires (Castro *et al.*, 2012). Enfin, son rôle devient particulièrement évident lors des stress de HT, où la SUMOylation permet de protéger les protéines sensibles à la dénaturation, de stabiliser des facteurs de transcription clés, ou encore de réprimer temporairement des fonctions non essentielles, comme le montrent plusieurs études chez *Arabidopsis thaliana* et le riz (Augustine *et al.*, 2016 ; Castro *et al.*, 2012).

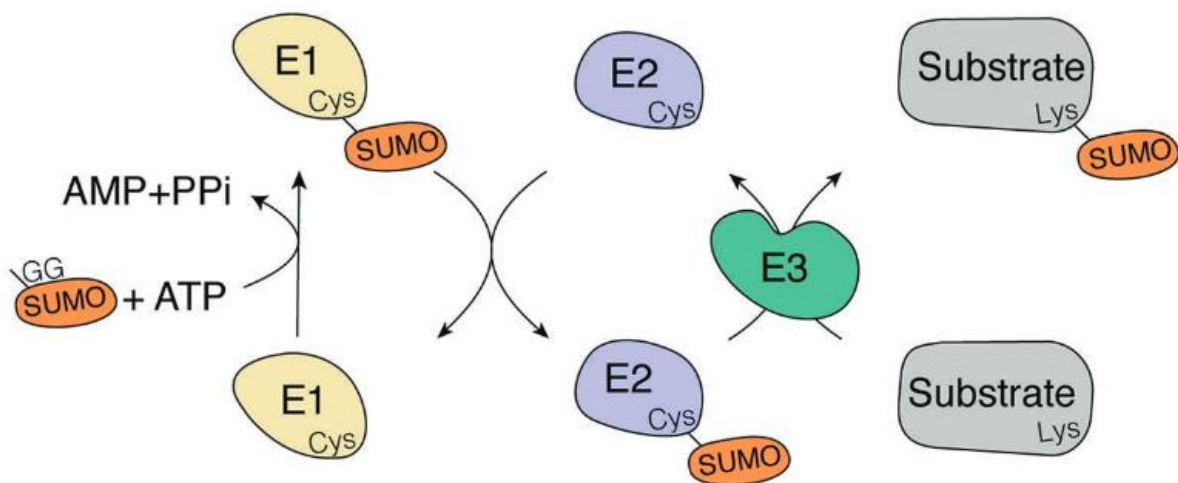


Figure 1.6 Cascade enzymatique de la voie de SUMOylation (Jmii et Cappadocia, 2021). L'enzyme E1 utilise une molécule d'ATP pour activer la molécule SUMO. La SUMO activée est par la suite transférée sur l'enzyme de conjugaison E2. L'enzyme E2 et l'enzyme E3 ligase permettent la fixation de la protéine SUMO sur un résidu lysine des protéines substrats.

1.3.2 Rôle de la SUMOylation dans la réponse aux stress environnementaux

1.3.2.1 Régulation des protéines par SUMOylation

La SUMOylation joue un rôle central dans la manière dont les plantes perçoivent et répondent aux stress environnementaux tels que la chaleur, la sécheresse ou encore l'hypoxie. L'accumulation rapide et réversible de protéines SUMOylées lors d'un stress est un phénomène désormais reconnu comme un marqueur moléculaire de la réponse au stress (Han *et al.*, 2021 ; Miller *et al.*, 2013 ; Park *et al.*, 2011 ; Tomašítková *et al.*, 2023). Cette accumulation résulte souvent d'une régulation coordonnée de l'activité des enzymes du système SUMO, notamment une induction des E3 ligases spécifiques (Augustine *et al.*, 2016 ; Tomanov *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2021) ou une inhibition des protéases responsables du retrait de SUMO (Srivastava *et al.*, 2017) comme présenté dans la Figure 1.7. Sur le plan fonctionnel, la SUMOylation agit comme un interrupteur moléculaire qui ajuste en temps réel l'activité de protéines clés impliquées dans la transcription, la signalisation cellulaire, le cycle cellulaire ou encore la réparation de l'ADN (Han *et al.*, 2021 ; Liu *et al.*, 2016 ; Tomašítková *et al.*, 2023). En modulant la conformation ou les interactions de ces protéines cibles, elle permet une réorganisation rapide de l'expression génique, orientée vers la survie plutôt que vers la croissance. La SUMOylation induite par le stress peut également moduler des processus complexes liés à la biologie de l'ARN. Des facteurs de l'ARN, impliqués dans la régulation de l'expression génétique, sont des cibles dynamiques de la SUMOylation sous stress, influençant ainsi leur activité et leur stabilité dans *Arabidopsis* (Miller *et al.*, 2013). Cela suggère que la SUMOylation affecte non seulement les protéines de réponse au stress mais aussi des mécanismes plus subtils de régulation de l'ARN, essentiels pour l'adaptation des plantes aux conditions environnementales changeantes. Ce lien entre SUMOylation, transcription et stress de HT a été démontré de façon expérimentale chez *Arabidopsis thaliana* et stipule que la SUMOylation associée à la chromatine, et plus précisément médiée par la ligase SIZ1, joue un rôle central dans la transition transcriptionnelle entre les mécanismes de développement et les réponses au stress de HT (Han *et al.*, 2021). Grâce à des analyses combinées de ChIP-Seq (immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage) et de RNA-Seq, ils ont observé une redistribution des sites de SUMOylation sur le génome en réponse à une élévation de température, notamment une accumulation au niveau des promoteurs de gènes de stress de HT et une déplétion au niveau des promoteurs des gènes liés à la croissance. Lorsque SIZ1 est absente, cette redistribution ne se fait plus, ce qui empêche la plante de répondre efficacement au stress. Ce type de régulation contribue à basculer l'activité transcriptionnelle de la cellule vers l'activation de gènes de protection comme les protéines chaperonnes, tout en réprimant les processus non essentiels (Han *et al.*, 2021). Des études menées notamment chez *Arabidopsis thaliana* ont montré que des mutants affectés

dans les composants du système SUMO présentent une sensibilité accrue au stress de HT ou à la sécheresse, mettant en lumière l'importance physiologique de cette voie dans la résilience des plantes (Han *et al.*, 2021 ; Miller *et al.*, 2013). Ce rôle protecteur semble d'ailleurs conservé dans plusieurs espèces cultivées, ce qui en fait une cible prometteuse pour le développement de variétés plus robustes via des approches biotechnologiques ou de sélection génétique.

Dans ce contexte, une étude (Kurepa *et al.*, 2003) a montré que l'accumulation des homologues SUMO1 et SUMO2 est augmentée en réponse au stress dans *Arabidopsis*. Cependant, cette accumulation seule ne permet pas de conclure à leur rôle essentiel. Les preuves fonctionnelles proviennent surtout des analyses génétiques : les mutants simples *sumo1* ou *sumo2* présentent des défauts de croissance et une sensibilité accrue à divers stress, tandis que les doubles mutants *sumo1/sumo2* sont létaux (Burg *et al.*, 2010 ; Saracco *et al.*, 2007). De plus, ces protéines représentent la majorité des protéines SUMOylées détectées dans les analyses protéomiques sous stress alors qu'aucune autre isoforme n'a montré de capacité équivalente à compenser leur perte (Shimada et Tanaka, 2023). Ces observations combinées ont mis en évidence que SUMO1 et SUMO2 sont indispensables à l'homéostasie cellulaire et jouent un rôle majeur dans la régulation des protéines liées au stress.

Cette régulation est importante non seulement pour la protection contre les facteurs de stress, mais aussi pour l'ajustement dynamique des mécanismes de signalisation et de transcription cellulaire. Plusieurs FTs clés ont été identifiés comme des cibles directes de la SUMOylation dans des conditions de stress, en particulier celui de HT. Par exemple, DREB2A est SUMOylé sur la lysine 163 lors d'un stress de sécheresse ou de HT, ce qui stabilise la protéine en bloquant sa dégradation via la voie ubiquitine-protéasome, renforçant ainsi la transcription des gènes de réponse au stress (Wang *et al.*, 2020). De même, AtHsfA2, un FT central dans la tolérance acquise à la chaleur, est modifié par SUMO sur la lysine 315, ce qui atténue son activité transcriptionnelle et permet une régulation fine de la réponse à un stress de HT prolongé (Cohen-Peer *et al.*, 2010). Chez la tomate, la SUMOylation de SlHsfA1 par SlSIZ1 augmente la tolérance au stress de HT en stimulant l'expression de gènes HSP tels que HSP70 (Zhang *et al.*, 2018). ABI5, impliqué dans la signalisation ABA, est SUMOylé par SIZ1 sur la lysine 391, lors d'un stress hydrique, modulant négativement l'activation de gènes ABA-dépendants, ce qui participe à l'ajustement hormonal en réponse aux stress abiotiques (Miura *et al.*, 2009). Enfin, des analyses récentes suggèrent que des FTs de la famille WRKY pourraient être SUMOylés sous stress de HT, illustrant la diversité des cibles de cette modification (Liu *et al.*, 2021 ; Singh *et al.*, 2022). D'ailleurs, le FT BAG7, en interaction avec bZIP28, est SUMOylé lors

du stress de HT, ce qui favorise son entrée nucléaire pour activer WRKY29 et induire des gènes de choc thermique (Li *et al.*, 2017). En outre, NF-YC10, un sous-unité du complexe NF-Y, est SUMOylé par SIZ1 sous stress de HT, ce qui favorise son interaction avec NF-YB3 (Figure 1.3) et la formation du complexe NF-Y (avec NF-YA2). Ce complexe actif est transloqué dans le noyau pour induire la transcription de gènes de réponse à la chaleur, jouant un rôle clé dans la tolérance au stress de HT.

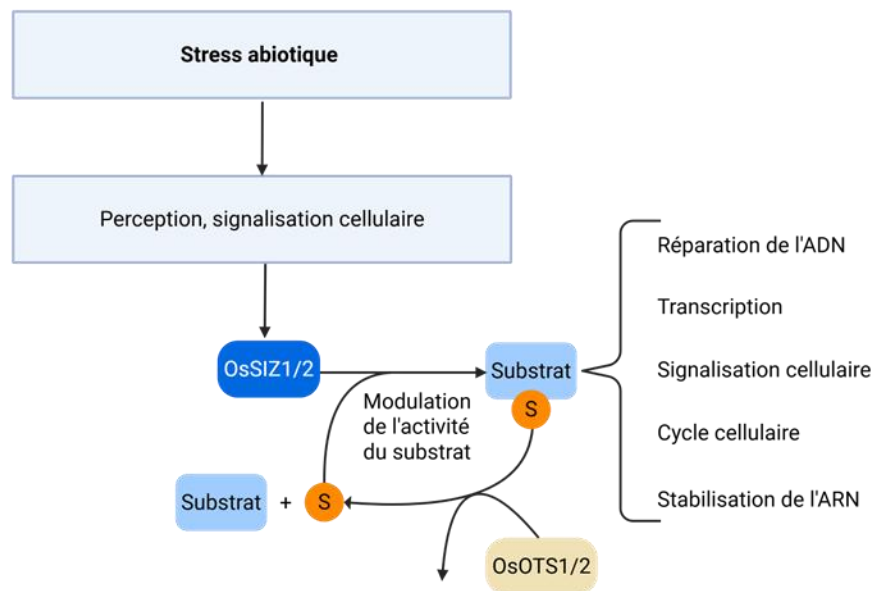


Figure 1.7 Schéma conceptuel de la régulation par SUMOylation et déSUMOylation en réponse aux stress environnementaux chez *Oryza Sativa*. OsSIZ1/2 représente l'enzyme SUMO E3 ligase, OsOTS1/2 sont des enzymes de déSUMOylation et S les peptides SUMO.

1.3.2.2 Synthèse des travaux sur la SUMOylation et la tolérance aux stress environnementaux

Outre les observations spécifiques faites chez *Arabidopsis thaliana*, plusieurs travaux de synthèse ont récemment mis en lumière le rôle central de la SUMOylation dans l'organisation des réponses adaptatives des plantes face aux stress environnementaux. Des études (Rosa et Abreu, 2019) ont notamment proposé une vision intégrée de la régulation par SUMOylation, qui agit à trois niveaux. Tout d'abord au niveau transcriptionnel pour contrôler l'expression des enzymes du système SUMO, ensuite au niveau post-

transcriptionnel pour moduler la stabilité des ARNm, et enfin au niveau post-traductionnel pour ajuster directement l'activité des protéines cibles, offrant ainsi une réponse rapide et précise adaptée au type, à la durée et à la sévérité du stress. Cette plasticité confère aux plantes une capacité accrue à faire face à des environnements changeants, mais elle pose aussi des défis pour l'exploitation biotechnologique de cette voie : une manipulation inadéquate peut entraîner des effets secondaires indésirables sur la croissance, la fertilité ou le développement global de la plante (Rosa et Abreu, 2019). Parmi les acteurs majeurs de ce système figurent les ligases E3 de type SIZ, telles que AtSIZ1 chez *Arabidopsis thaliana* et ses homologues OsSIZ1 et OsSIZ2 chez le riz. Ces enzymes jouent un rôle central dans la spécificité de la SUMOylation en situation de stress, en permettant la modification ciblée de régulateurs clés comme les facteurs de transcription. Leur structure, leurs domaines fonctionnels ainsi que leurs mécanismes d'action seront détaillés dans la section 1.3.3.

Des études fonctionnelles ont démontré que les mutants déficients en composants du système SUMO, comme la E3 ligase AtSIZ1 chez *Arabidopsis*, présentent une sensibilité accrue à divers stress environnementaux, notamment la chaleur, la sécheresse (Miura *et al.*, 2007) ou la salinité (Srivastava *et al.*, 2017). AtSIZ1 exerce ses effets en SUMOylant des facteurs de transcription comme ICE1 ou DREB2A (Miura *et al.*, 2007). Des approches par spectrométrie de masse ont permis d'identifier un large ensemble de protéines SUMOylées en réponse au stress thermique, notamment des facteurs HSF. Chez *Arabidopsis*, l'analyse du SUMOylome après 30 minutes à 37 °C a révélé une accumulation massive de conjugués SUMO1/2, ciblant en particulier des facteurs de transcription, des régulateurs de la chromatine et des histones (Miller et Vierstra, 2011 ; Rytz *et al.*, 2018). Des analyses de liaison spectrale ont quantifié des enrichissements spécifiques d'HSF parmi les cibles de SIZ1, suggérant une SUMOylation directe de ces régulateurs clefs (Miller *et al.*, 2010 ; Rytz *et al.*, 2018). Bien que les données directes sur la SUMOylation de HSFs spécifiques comme OsHSFA2d ou OsHSFA6 fassent encore défaut chez le riz, leur forte induction transcriptionnelle en réponse à la chaleur (Wilkins *et al.*, 2016) suggère qu'ils pourraient faire partie des cibles potentielles de ce mécanisme adaptatif, à l'instar de leurs homologues chez *Arabidopsis* (Miller et Vierstra, 2011).

Dans les cultures, et en particulier chez *Oryza sativa*, ces mécanismes semblent conservés et tout aussi essentiels (Park *et al.*, 2011). La SUMO E3 ligase OsSIZ1, orthologue fonctionnel de AtSIZ1, a été particulièrement étudiée pour son rôle dans la tolérance à la sécheresse. Des études ont montré que sa surexpression améliore considérablement la tolérance hydrique du riz en stimulant l'expression de gènes

ABA-dépendants comme OsRAB16A, OsLEA3 ou OsNCED3, tout en favorisant l'accumulation de proline, un composé protecteur clé pour le maintien de l'homéostasie cellulaire et la protection antioxydante sous stress de sécheresse (Feng *et al.*, 2024 ; Xiang *et al.*, 2024). Inversement, les lignées mutantes OsSIZ1 présentent un phénotype hypersensible au stress, avec un développement racinaire réduit, un retard de croissance et une fertilité affaiblie, soulignant le rôle fondamental de cette enzyme dans l'homéostasie physiologique du riz (Wang *et al.*, 2011). Des données protéomiques confirment également une accumulation massive et transitoire de protéines SUMOylées en réponse au stress de HT chez le riz, en particulier dans le noyau cellulaire, où ces PTMs ciblent notamment des FTs, des histones et des protéines impliquées dans la régulation de la chromatine (Han *et al.*, 2021 ; Miller et Vierstra, 2011 ; Raorane *et al.*, 2013). Ce remodelage transcriptionnel induit par la SUMOylation suggère un rôle adaptatif majeur dans l'ajustement de l'expression génique en conditions de stress de HT chez le riz (Han *et al.*, 2021). L'analyse du protéome d'organes sensibles comme les anthères montre une forte induction de protéines de choc thermique et d'autres protéines de stabilité (Kim *et al.*, 2015). De plus, (Miura *et al.*, 2007) montrent que la SUMOylation de ICE1 par SIZ1 empêche sa polyubiquitination, stabilisant ainsi ce FTs clé et renforçant la tolérance au froid. et soutenant l'idée d'une réponse coordonnée impliquant diverses PTMs.

Par ailleurs, certaines de ces cibles sont elles-mêmes des régulateurs du stress de HT, comme les HSFs, dont OsHSFA2d et OsHSFA6, qui sont susceptibles de former des boucles de rétroaction transcriptionnelle (Park *et al.*, 2015) , des mécanismes dans lesquels la SUMOylation pourrait jouer un rôle modulateur. Au-delà du riz, des réponses SUMO-dépendantes similaires ont été observées dans d'autres cultures, telles que la tomate (Zhang *et al.*, 2018) , le blé (Xiao *et al.*, 2025) ou le maïs (Augustine *et al.*, 2016), ce qui renforce l'idée que ce mécanisme est conservé au sein des plantes à graines. Néanmoins, la complexité de ce système et ses nombreuses interactions contextuelles rendent son exploitation délicate en biotechnologie végétale. Une activation non spécifique du système SUMO peut provoquer des effets secondaires indésirables, notamment sur le développement végétatif, la floraison ou la réponse hormonale (Rosa et Abreu, 2019). Ainsi, une meilleure compréhension des cibles spécifiques des E3 ligases et de leur régulation spatio-temporelle est indispensable pour développer des stratégies d'amélioration ciblée, durables et sans compromis sur la productivité.

1.3.3 Les SUMO E3 ligases

La section précédente a mis en lumière le rôle de la SUMOylation dans la réponse aux stress environnementaux, en soulignant notamment l'implication des E3 ligases de type SIZ. Nous détaillons ici

leur structure, leur spécificité et leur mécanisme d'action, afin de mieux comprendre leur contribution à cette régulation adaptative. Dans le processus de SUMOylation, les E3 ligases jouent un rôle crucial par rapport à la spécificité du ciblage. Bien que l'enzyme E2 soit capable de transférer SUMO directement sur certaines protéines substrats, l'efficacité et la sélectivité du processus dépendent largement de la présence des E3 ligases (Jmii et Cappadocia, 2021 ; Kurepa *et al.*, 2003). Ces ligases servent de plateformes adaptatrices entre l'E2-SUMO et les substrats, stabilisant leur interaction et facilitant la modification post-traductionnelle. Chez les plantes, plusieurs familles de E3 ligases ont été identifiées, dont certaines spécifiques aux espèces végétales. Parmi ces familles, on distingue principalement les ligases de type SIZ (SAP et Miz1), MMS21 (partie du complexe Smc5/6) et PIAL (*Protein Inhibitor of Activated STAT-Like*) (Castro *et al.*, 2012 ; Jmii et Cappadocia, 2021). Ces ligases sont spécialisées et se différencient par des domaines fonctionnels particuliers, ayant des rôles biologiques distincts, qui influencent leur activité et leur localisation dans la cellule. Elles se caractérisent par une organisation en modules de leurs domaines, ce qui conditionne leur localisation nucléaire, leur interaction avec l'ADN, et leur activité catalytique (Jmii et Cappadocia, 2021). Par exemple, le domaine SAP des ligases de type SIZ leur permet de se lier à la chromatine, facilitant ainsi leur implication dans la régulation transcriptionnelle (Miura *et al.*, 2005 ; Suzuki *et al.*, 2009). Le domaine SP-RING est quant-à-lui crucial pour la conjugaison de SUMO, assurant l'activité de SUMOylation. Ces ligases ne se limitent pas à apposer des PTMs, elles jouent également un rôle d'intégrateurs de signaux, reliant la signalisation nucléaire à des réponses transcriptionnelles et physiologiques essentielles pour la survie de la plante.

1.3.3.1 MMS21

La ligase MMS21, également appelée HPY2 chez *Arabidopsis thaliana*, est une composante du complexe Smc5/6, essentiel pour la maintenance de l'intégrité génomique (Ishida *et al.*, 2009). Elle intervient notamment dans la réponse aux dommages de l'ADN, la stabilisation de la chromatine et la régulation du cycle cellulaire. Des études ont montré qu'elle participe à des mécanismes de tolérance au stress génotoxique et à certains stress abiotiques. Sa fonction reste cependant moins explorée que celle des SIZs dans la réponse transcriptionnelle au stress environnemental (Jmii et Cappadocia, 2021 ; Zhao et Blobel, 2005).

1.3.3.2 PIAL

Les protéines PIAL1 et PIAL2 appartiennent à une autre classe de SUMO E3 ligases spécifiques aux plantes (Jmii et Cappadocia, 2021). Contrairement aux autres E3 qui favorisent l'ajout d'un seul groupement SUMO,

les PIALs sont impliquées dans la formation de chaînes poly-SUMOylées. Ces modifications en chaîne peuvent servir de signal pour des interactions protéine-protéine ou pour le recrutement de facteurs de dégradation (Tomanov *et al.*, 2014). Bien que leur rôle exact dans les réponses au stress reste encore à clarifier, des éléments indiquent une implication dans la régulation de certains réseaux de signalisation et dans l'organisation nucléaire.

1.3.3.3 Les SIZs

Parmi les E3 ligases identifiées chez les plantes, celles de type SIZ sont les plus étudiées et les plus pertinentes dans le contexte de la régulation transcriptionnelle en réponse aux stress (Castro *et al.*, 2012). Initialement décrites chez la levure, SIZ1 a été la première SUMO E3 ligase identifiée et caractérisée chez *Arabidopsis thaliana* (Miura *et al.*, 2005). Cette protéine multifonctionnelle joue un rôle clé dans divers processus physiologiques, allant de la croissance et du développement à la réponse à de multiples stress abiotiques, notamment le stress de HT (Wang *et al.*, 2011). Les protéines SIZs possèdent plusieurs domaines fonctionnels, chacun jouant un rôle déterminant dans leur activité et leur spécificité (Figure 1.8). Le domaine SAP (SAF-A/B, Acinus, PIAS) est un motif de liaison à l'ADN qui permet à la ligase de se localiser au sein du noyau et d'interagir avec la chromatine (Suzuki *et al.*, 2009). Cette capacité de ciblage confère aux SIZs une fonction de régulation transcriptionnelle directe, notamment en situation de stress, où elles peuvent moduler l'accessibilité de certains promoteurs. Le domaine PINIT, bien que moins bien caractérisé, est associé à la régulation de la localisation subcellulaire de la ligase. Il intervient dans l'organisation structurale de la protéine et dans le positionnement précis de la ligase au sein de sous-compartiments nucléaires, ce qui peut influencer ses interactions fonctionnelles (Jr et Lima, 2016). Le domaine SP-RING (*SIZ/PIAS-type RING finger*) constitue le domaine le plus conservé et le cœur catalytique de l'activité des E3. Ce domaine est indispensable pour l'activité de SUMOylation, car il stabilise l'enzyme E2 chargée de SUMO et positionne correctement le substrat pour faciliter la conjugaison (Jr et Lima, 2016). Le domaine SP-CTD (*SP C-terminal domain*) est une région structurale située immédiatement après le domaine catalytique SP-RING. Bien que le rôle précis du SP-CTD chez les plantes n'est pas clair, des études sur la SIZ1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* suggèrent qu'il interagit avec le SUMO de manière similaire à un motif SIM (SUMO-interacting motif), maintenant ainsi le SUMO dans une conformation favorable à la catalyse (Jmii et Cappadocia, 2021). Enfin, le domaine PHD (*Plant Homeodomain*) est unique aux SUMO E3 ligases végétales. Il se lie spécifiquement à l'histone H3 triméthylée en position K4, jouant un rôle essentiel dans la SUMOylation des FTs et dans la régulation des réponses au stress (Jmii et Cappadocia, 2021 ; Roy et Sadanandom, 2021).

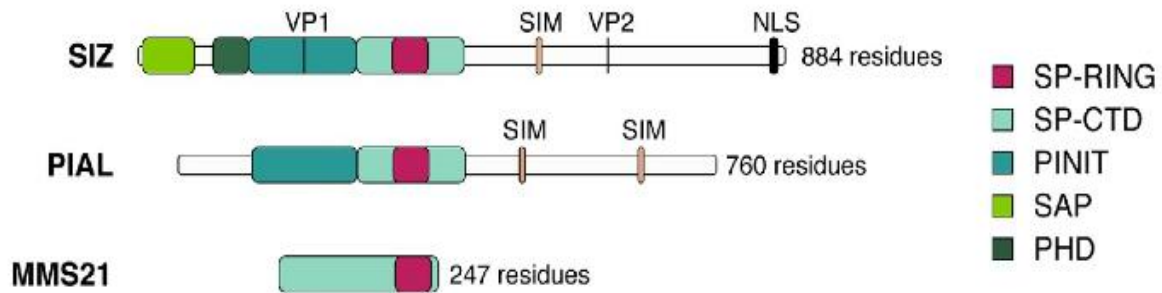


Figure 1.8 Les type SUMO E3 ligases et leur domaines fonctionnels (Jmii et Cappadocia, 2021). Les domaines fonctionnels sont représentés par des boîtes, tandis que les motifs spécifiques sont indiqués par des traits verticaux. Les domaines couramment retrouvés chez les ligases SUMO E3 végétales incluent le domaine SAP (SAF-A/B, Acinus, PIAS), le domaine homéodomaine de type plante (PHD), le domaine PINIT, ainsi que le domaine SP-RING.

La ligase SIZ1 est particulièrement importante dans la réponse au stress de HT. Des études ont dressé un profil du SUMOylome d'*Arabidopsis* en situation de stress de HT, identifiant une large gamme de cibles modifiées par SIZ1 (Rytz *et al.*, 2018). Dans le contexte du stress de HT, les SIZs, et notamment les homologues d'*OsSIZ1* et *OsSIZ2* chez le riz, ont été identifiées comme des régulateurs majeurs de la SUMOylation nucléaire, jouant un rôle essentiel dans la protection des fonctions cellulaires sensibles à la chaleur et potentiellement sur les réponses au développement et l'homéostasie (Miura *et al.*, 2007 ; Park *et al.*, 2010 ; Pei *et al.*, 2017). Bien que partageant une forte homologie avec *AtSIZ1* d'*Arabidopsis thaliana*, *OsSIZ1* et *OsSIZ2* présentent des profils d'expression distincts et des fonctions partiellement différentielles. *OsSIZ1* est principalement exprimée dans les feuilles et les jeunes organes, et son expression est rapidement induite en condition de stress de HT, ce qui suggère un rôle majeur dans les réponses immédiates à ce stress (Park *et al.*, 2010 ; Pei *et al.*, 2017). Cette ligase a été impliquée dans plusieurs processus biologiques clés, notamment la régulation du métabolisme du phosphate, le contrôle de la floraison, ainsi que la tolérance à la chaleur via la SUMOylation de régulateurs transcriptionnels critiques (Gao *et al.*, 2021 ; Rytz *et al.*, 2018 ; Zheng et Liu, 2021).

OsSIZ2, quant à elle, présente un profil d'expression plus étendu, incluant les racines, les tiges et les graines, ce qui laisse penser qu'elle pourrait intervenir dans des processus développementaux étalés dans le temps (Pei *et al.*, 2017). Certaines études suggèrent qu'elle joue un rôle partiel dans la réponse aux stress, mais

de manière moins marquée que OsSIZ1, ce qui alimente l'hypothèse d'un rôle redondant ou complémentaire encore peu élucidé. OsSIZ2 possède bien une activité E3 ligase fonctionnelle et peut partiellement compenser l'absence de SIZ1 chez Arabidopsis soumis à un stress de HT ([Park et al., 2010](#)). Cette observation suggère un rôle conservé de OsSIZ2 dans la régulation des réponses environnementales, bien que plus atténué que celui de OsSIZ1. Une revue du système SUMO chez les plantes ([Castro et al., 2012](#)) renforce cette idée, en indiquant que OsSIZ1 est majoritairement responsable de l'accumulation de conjugués SUMO en réponse à une température élevée, tandis que OsSIZ2 pourrait agir de manière accessoire ou complémentaire. Ces observations rejoignent les résultats de Rytz ([Rytz et al., 2018](#)) qui montrent chez Arabidopsis que la majorité des protéines SUMOylées sous stress de HT dépendent de SIZ1, bien qu'une activité résiduelle demeure, laissant supposer l'existence d'autres ligases secondaires impliquées, telles que OsSIZ2 dans le contexte rizicole.

Une analyse des promoteurs de gènes du système SUMO chez le riz a révélé des différences importantes entre OsSIZ1 et OsSIZ2 ([Rosa et al., 2018](#)). Le promoteur de OsSIZ1 est nettement enrichi en motifs cis-régulateurs liés à la lumière, à l'énergie (sucre) et à la signalisation hormonale ou au stress (acide abscissique, acide gibbérellique), alors que celui de OsSIZ2 contient un nombre plus restreint de ces éléments. Cela suggère que OsSIZ1 pourrait répondre plus activement aux signaux environnementaux, tandis que OsSIZ2 semble moins directement régulé par ces stimuli. Comme mentionné plus haut, notamment via l'observation des phénotypes mutants associées à la perte de fonction OsSIZ2 par [Pei et al. \(2017\)](#), OsSIZ2 joue un rôle significatif dans le développement végétatif et reproducteur. Ainsi, bien que [Rosa et al., 2018](#) ne spécifient pas la régulation spatio-temporelle de OsSIZ2, la convergence des données suggère que son contrôle transcriptionnel pourrait répondre à des nécessités développementales ou tissulaires, plutôt qu'à des signaux environnementaux immédiats. Ces différences suggèrent une régulation transcriptionnelle divergente, en réponse à des signaux environnementaux distincts.

Bien que l'on ait démontré que les ligases de type SIZ participent activement à la régulation transcriptionnelle, notamment en contexte de stress de HT, les mécanismes précis par lesquels elles exercent cette régulation ne sont pas encore élucidés. Deux modèles parallèles sont actuellement envisagés (Figure 1.9). Le premier postule que la SUMOylation des FTs se produit principalement dans le nucléoplasme, avant leur recrutement à l'ADN. Dans ce scénario, les E3 ligases n'agissent pas directement sur les sites cibles des gènes, mais modifient les FTs dans un compartiment soluble, influençant indirectement leur affinité ou leur capacité de liaison à l'ADN ([Cubefias-Potts et Matunis, 2013](#) ; [Flotho et](#)

Melchior, 2013). Le second modèle propose que les SUMO E3 ligases comme les SIZ soient directement recrutées à des loci génomiques spécifiques, par exemple via leur domaine SAP, interagissant avec l'ADN ou les complexes transcriptionnels pour SUMOyler localement leurs cibles déjà liées à la chromatine (Niskanen et Palvimo, 2017 ; Rosonina *et al.*, 2017). Ces deux mécanismes ne sont pas nécessairement exclusifs, mais leur contribution n'a pas été élucidée selon les contextes biologiques et les partenaires impliqués. Cette question centrale, qui touche à la dynamique et à la spatialisation de la régulation transcriptionnelle par SUMOylation, est justement au cœur du projet présenté ici.

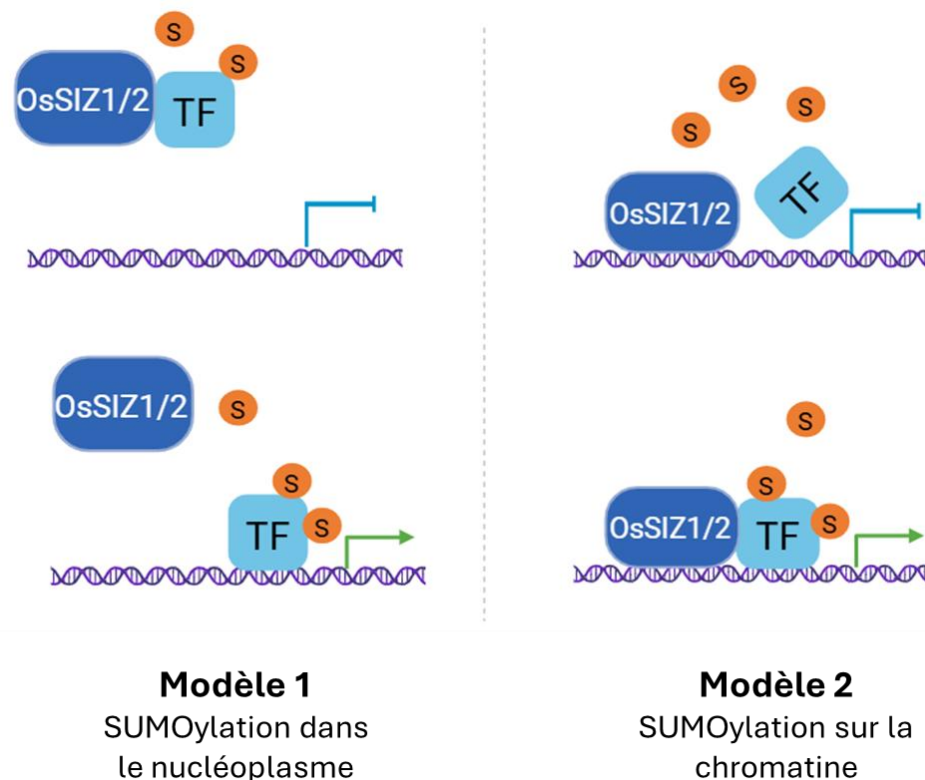


Figure 1.9 Modèles proposés pour la régulation transcriptionnelle par les ligases E3 de type SIZ. Dans le premier modèle, la SUMOylation des facteurs de transcription (TF) se produit principalement dans le nucléoplasme, avant leur recrutement sur l'ADN, les ligases agissant ainsi dans un compartiment soluble et modulant indirectement leur capacité de liaison à la chromatine. Dans le second modèle, les ligases SIZ sont directement recrutées sur des loci spécifiques, où elles SUMOylent localement les TFs déjà liés à la chromatine, influençant de manière ciblée l'expression des gènes.

1.4 Outils de génomique fonctionnelle pour l'étude de la régulation transcriptionnelle

La régulation de l'expression génique chez les plantes repose non seulement sur la présence et l'activité des FTs, mais aussi sur leur capacité à accéder physiquement à leurs séquences cibles dans l'ADN. Cette

accessibilité dépend fortement de l'organisation tridimensionnelle de la chromatine, c'est-à-dire de l'état de compaction de l'ADN autour des histones et de son agencement spatial dans le noyau (Lee et Seo, 2023 ; Liu et Weigel, 2015 ; Sijacic *et al.*, 2018). Les régions d'ADN condensées (hétérochromatine) sont généralement transcriptionnellement inactives, tandis que les régions plus ouvertes (euchromatine) permettent la fixation des FTs et l'initiation de la transcription (Luger *et al.*, 1997 ; McCarthy *et al.*, 2021 ; Puri *et al.*, 2021 ; Wu *et al.*, 2024). Cet état d'ouverture ou de fermeture est contrôlé par des mécanismes épigénétiques réversibles, qui modifient l'expression des gènes sans altérer la séquence de l'ADN. Ces mécanismes incluent principalement des modifications covalentes des histones (par exemple, l'acétylation de H3K9 ou la triméthylation de H3K4, associées à l'activation transcriptionnelle, et la triméthylation de H3K27, associée à la répression), ainsi que la méthylation cytosinique de l'ADN. Ces marques influencent la compaction locale de la chromatine, l'accessibilité des promoteurs et le recrutement de coactivateurs ou corépresseurs, modulant ainsi finement l'activité transcriptionnelle (Kappel *et al.*, 2023 ; McCarthy *et al.*, 2021 ; Ramakrishnan *et al.*, 2022 ; Zheng *et al.*, 2024). Leur nature dynamique leur permet de répondre rapidement aux signaux environnementaux. Par exemple, une élévation de température peut induire l'apparition rapide de marques actives (H3K4me3, H3K9ac) en amont de gènes de protection, tandis que des marques répressives (H3K27me3) se renforcent sur les gènes de croissance afin de rediriger les ressources cellulaires vers la survie (Friedrich *et al.*, 2021). Certaines de ces modifications sont stables dans le temps, constituant une "mémoire épigénétique" qui permet une réponse plus rapide lors d'expositions répétées à un même stress (Friedrich *et al.*, 2021 ; Ramakrishnan *et al.*, 2022).

Ainsi, la réponse adaptative des plantes au stress de HT émerge d'un réseau régulateur multi-niveaux intégrant des signaux cellulaires, une modulation épigénétique de la chromatine et l'action coordonnée de multiples FTs. Des analyses récentes de type multi-omics (transcriptomes, protéomes, métabolomes) ont montré que ces réponses mobilisent l'expression coordonnée de centaines à milliers de gènes en quelques minutes à quelques heures, traduisant un ajustement transcriptionnel massif orchestré par une signalisation interconnectée (Zander *et al.*, 2020). L'étude de ces processus nécessite donc de considérer conjointement l'état épi-génomique, l'accessibilité de la chromatine et l'activité des FTs pour comprendre les programmes de transcription qui permettent la tolérance au stress chez les plantes. Pour décrypter ces réseaux complexes et comprendre comment l'état de la chromatine, l'accessibilité de l'ADN et l'action des facteurs de transcription se combinent pour moduler l'expression génique sous stress de HT, plusieurs outils de génomique fonctionnelle ont été développés (Lee et Bailey-Serres, 2019 ; Qiu *et al.*, 2023). Parmi eux, les approches de séquençage à haut débit telles que le séquençage de l'ARN (RNA-Seq), le séquençage

d'ADN accessible à la transposase (ATAC-Seq) et l'immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage (ChIP-Seq) permettent d'explorer différentes couches de régulation et d'identifier les mécanismes directs qui sous-tendent la réponse adaptative des plantes (Tannenbaum *et al.*, 2018).

1.4.1 RNA-Seq

RNA-Seq permet de quantifier l'expression globale des gènes à l'échelle du transcriptome. Elle repose sur l'extraction de l'ARN total d'un échantillon, sa conversion en ADN complémentaire, sa fragmentation puis son séquençage à haut débit. Les lectures obtenues sont alignées sur le génome ou le transcriptome de référence, permettant une quantification précise de l'abondance de chaque transcrit et l'identification de gènes différentiellement exprimés. Introduite pour la première par une étude (Nagalakshmi *et al.*, 2008) qui avait pour but de définir le paysage transcriptionnel de la levure, cette technologie est devenue incontournable en biologie végétale, avec plus de 45 000 bibliothèques publiques disponibles pour de nombreuses espèces et conditions environnementales (Yu *et al.*, 2022). Par exemple, chez le riz, RNA-Seq a permis de révéler des réseaux complexes de régulation génique activés lors de stress hydrique et de HT, identifiant ainsi des modules de gènes corégulés par différents FTs (Wilkins *et al.*, 2016). Bien que cette approche fournisse une vue d'ensemble du transcriptome actif, elle ne permet pas d'identifier directement les FTs responsables de ces changements d'expression.

1.4.2 ATAC-Seq

ATAC-Seq permet d'identifier les régions d'ADN accessibles, révélant les sites ouverts potentiellement ciblés par les facteurs de transcription (Buenrostro *et al.*, 2013). La méthode repose sur l'utilisation de la transposase Tn5, qui fragmente l'ADN et insère des adaptateurs de séquençage directement dans les zones de chromatine ouverte, générant un profil de l'accessibilité à l'échelle du génome. Récemment, cette approche a été appliquée chez le riz et Arabidopsis pour cartographier les changements d'accessibilité induits par le stress de HT et mettre en évidence des régulateurs clés de la tolérance à la chaleur (Farmer *et al.*, 2021 ; Liang *et al.*, 2021 ; Qiu *et al.*, 2023 ; Yen *et al.*, 2025). Bien que non utilisée dans ce projet, elle constitue un outil complémentaire à ChIP-Seq, permettant d'interpréter les données de fixation des protéines dans un contexte chromatinien dynamique.

1.4.3 ChIP-Seq

ChIP-Seq est la méthode de référence pour cartographier à l'échelle du génome les sites où une protéine donnée (FT, histone ou ligase SUMO) se fixe à l'ADN (Johnson *et al.*, 2007). La méthode repose sur plusieurs

étapes clés. Tout d'abord, une réticulation est réalisée pour stabiliser les interactions protéine-ADN présentes au moment du traitement. Ensuite, la chromatine est fragmentée de façon contrôlée (sonication ou digestion enzymatique). Une immunoprécipitation ciblée des complexes protéine-ADN est effectuée en utilisant un anticorps spécifique de la protéine étudiée (par exemple OsSIZ1, OsSIZ2 ou des protéines SUMOylées) pour enrichir les fragments d'ADN associé. Ces complexes sont alors purifiés avant d'être séquencés à haut débit. Enfin, on analyse les données par bio-informatique pour aligner les lectures et générer une carte des régions génomiques enrichies en interactions protéine-ADN (Desvoyes *et al.*, 2018). Contrairement au RNA-Seq, qui mesure uniquement l'abondance des transcrits sans révéler leurs régulateurs directs, ChIP-Seq fournit une preuve causale du contrôle transcriptionnel en amont en identifiant les séquences cis-régulatrices réellement occupées *in vivo*. Cette technique permet ainsi d'établir un lien direct entre une protéine donnée et ses cibles génomiques, d'inférer les réseaux régulateurs activés et de mieux comprendre les mécanismes épigénétiques et transcriptionnels à l'œuvre (Ouyang *et al.*, 2009 ; Singh *et al.*, 2018 ; Song *et al.*, 2016). Des travaux récents en biologie végétale ont démontré la robustesse de ChIP-Seq pour cartographier la liaison différentielle de facteurs de transcription impliqués dans des réponses hormonales ou environnementales (Dergilev *et al.*, 2021 ; Hartwig *et al.*, 2023 ; Ouyang *et al.*, 2022). Ces approches contribuent à relier des variations de liaison protéine-ADN à des traits phénotypiques ou adaptatifs, et à compléter l'information obtenue par RNA-Seq ou ATAC-Seq dans des contextes de stress.

1.5 But de l'étude

1.5.1 Problématique et hypothèse

La régulation transcriptionnelle en réponse aux stress environnementaux constitue un enjeu central pour l'adaptation des plantes à des conditions environnementales défavorables. Parmi les mécanismes impliqués, la SUMOylation se distingue par sa capacité à moduler rapidement et de manière réversible l'activité de nombreux régulateurs nucléaires, notamment des facteurs de transcription. Chez *Arabidopsis thaliana*, plusieurs études ont démontré que les SUMO E3 ligases de type SIZ, en particulier AtSIZ1, jouent un rôle majeur dans l'organisation des réponses au stress de HT, en influençant la stabilité, la localisation ou l'interaction de protéines clés impliquées dans la réponse au stress. Cependant, chez *Oryza sativa*, culture majeure et particulièrement vulnérable aux épisodes de chaleur extrême, les mécanismes transcriptionnels régulés par la SUMOylation, et en particulier le rôle des SUMO E3 ligases homologues OsSIZ1 et OsSIZ2, demeurent encore mal caractérisés. Les données existantes suggèrent une implication probable de ces ligases dans la régulation de l'expression génique en condition de stress, mais les

interactions moléculaires spécifiques et les cibles transcriptionnelles restent à élucider. L'hypothèse principale de ce projet est que les SUMO E3 ligases OsSIZ1 et OsSIZ2 participent activement à la réponse transcriptionnelle du riz en condition de stress de HT, en régulant la fixation de certains facteurs de transcription sur les gènes cibles (Figure 1.10).

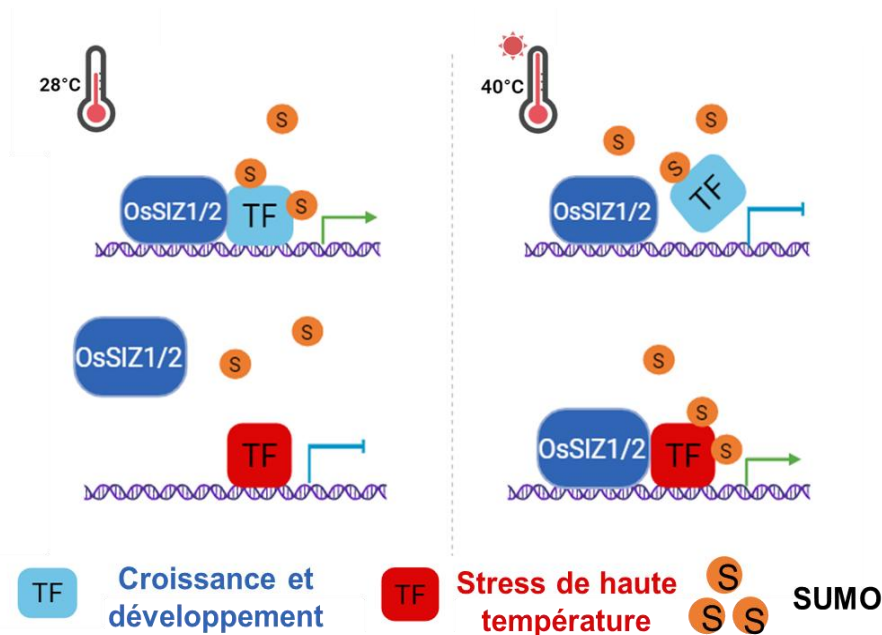


Figure 1.10 Modèle de régulation de la réponse transcriptionnelle d'*Oryza sativa* par SUMOylation en situation de stress de haute température. À température optimale (28 °C), les facteurs de transcription associés à la croissance et au développement (TF, en bleu) sont SUMOylés par les enzymes OsSIZ1/2, ce qui favorise l'expression des gènes impliqués dans la croissance et le développement. En condition de stress de HT (40 °C), la SUMOylation des facteurs de transcription change : certains TF liés au stress (en rouge) deviennent cibles d'OsSIZ1/2, entraînant une répression des gènes de développement et l'activation des gènes de réponse au stress. Cette modulation dépendante de la température illustre le rôle clé de la SUMOylation dans l'adaptation transcriptionnelle au stress thermique chez le riz.

Pour tester cette hypothèse, l'approche ChIP-Seq a été choisie car elle permet de dresser une carte exhaustive et non biaisée des régions génomiques occupées par ces ligases ou associées à la SUMOylation sous stress de HT. Contrairement à la ChIP-qPCR, qui cible quelques promoteurs présélectionnés sur la base de connaissances préalables, ChIP-Seq n'exige pas de supposer à l'avance quels gènes sont régulés par les ligases OsSIZ1/2. Cette absence d'*a priori* est essentielle dans ce projet, car peu de cibles transcriptionnelles directes des SUMO E3 ligases sont connues chez *Oryza sativa*. En capturant l'ensemble des complexes protéine-ADN enrichis en OsSIZ1, OsSIZ2 et/ou en protéines SUMOylées, ChIP-Seq offre la

possibilité de découvrir de nouveaux régulateurs ou modules transcriptionnels jusqu'ici non décrits, au-delà des quelques FTs déjà identifiés (HSFs, DREBs, NACs). Cette approche permet de relier directement les événements de SUMOylation à la réorganisation de réseaux transcriptionnels de grande ampleur, fournissant une vue mécanistique du contrôle exercé par ces ligases. De plus, le choix de ChIP-Seq se justifie par le fait que l'impact des ligases SUMO ne se limite probablement pas à un ou deux FTs connus. Elles peuvent affecter simultanément plusieurs FTs et coactivateurs, moduler l'accessibilité de vastes régions chromatinienne et donc influencer des centaines de gènes. Une approche ciblée par ChIP-qPCR, par exemple, passerait à côté de cette complexité, ne validant que des hypothèses restreintes. En combinant ChIP-Seq avec l'exposition au stress de HT, ce projet établira un catalogue des régions génomiques directement associées à OsSIZ1 et OsSIZ2, reliant ces événements à la réorganisation transcriptionnelle observée à grande échelle dans le riz. Cette cartographie permettra d'identifier à la fois des cibles attendues et des acteurs insoupçonnés de la tolérance à la chaleur, apportant une base rationnelle pour de futures validations ciblées (par exemple par ChIP-qPCR ou édition génomique). Pour élaborer un modèle transcriptionnel appliqué à *Oryza sativa*, des campagnes ChIP-Seq menées respectivement avec les anticorps anti-SUMO et anti-OsSIZ1/2 dresseront une carte des sites SUMOylés sous HT et testera directement l'hypothèse d'un rôle localisé des ligases OsSIZ1/2 dans le recrutement ou la stabilisation de facteurs de transcription clés. Ainsi, ChIP-Seq constitue la seule approche capable d'explorer de façon globale, mécanistique et non biaisée le rôle des ligases SUMO dans la régulation transcriptionnelle du riz soumis à un stress de HT, répondant directement à la problématique posée.

1.5.2 Objectif de l'étude

L'objectif général de cette étude est de mieux comprendre le rôle des SUMO E3 ligases OsSIZ1 et OsSIZ2 dans la régulation transcriptionnelle du riz en réponse au stress de HT. Pour cela, plusieurs étapes ont été réalisées afin de caractériser ces protéines sur le plan fonctionnel, de produire des anticorps qui leur sont spécifiques et de poser les bases d'une approche de type ChIP pour identifier leurs cibles potentielles dans le génome. Pour cela, plusieurs objectifs spécifiques ont été poursuivis.

D'une part, la modélisation tridimensionnelle des protéines OsSIZ1 et OsSIZ2 a permis d'identifier les domaines les plus conservés, notamment le domaine SP-RING, qui ont été sélectionnés pour la production d'antigènes recombinants. Ces protéines purifiées ont ensuite été utilisées pour générer des anticorps polyclonaux chez le lapin. L'un des objectifs majeurs était de valider ces anticorps pour des applications en ChIP afin de pouvoir capturer les complexes protéine-ADN dans lesquels sont impliquées les ligases SIZs.

Dans un premier temps, les anticorps dirigés contre OsSIZ1 et OsSIZ2 ont été testés par ELISA, Western blot et immunoprécipitation *in vitro*. Une attention particulière a été portée à leur capacité à reconnaître les protéines cibles dans leur conformation native, condition indispensable à leur utilisation en CHIP-qPCR ou CHIP-Seq.

En parallèle, des CHIP-Seq avec des anticorps anti-SUMO ont également été testés dans l'optique de détecter plus globalement les modifications SUMOylées sur la chromatine après exposition au stress de HT. Cette approche permettra à terme de cartographier non seulement les sites d'action des SIZ, mais aussi les régions enrichies en protéines SUMOylées au niveau de la chromatine, fournissant un cadre plus global pour interpréter les effets transcriptionnels du stress. Ces efforts expérimentaux ont posé les bases pour des analyses futures en CHIP-Seq visant à identifier les séquences génomiques associées à ces E3 ligases et à SUMO, et par conséquent, à inférer les facteurs de transcription modulés via SUMOylation. À long terme, cette étude contribue à la mise en place d'outils moléculaires (anticorps polyclonaux) destinés à mieux comprendre l'organisation transcriptionnelle et épigénétique du stress de HT chez le riz. Elle offre également une base expérimentale pour étendre ces analyses à d'autres types de stress abiotiques, dans l'optique de développer des variétés plus résilientes face aux aléas climatiques.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Modélisation structurale et sélection des antigènes via AlphaFold2

Les séquences primaires des protéines OsSIZ1 (Q6L4L4), OsSIZ2 (Q6ASW7) provenant d'*Oryza sativa* et AtSIZ1 (Q680Q4) provenant d'*Arabidopsis thaliana*, disponibles sur la base de données UniProt (<https://www.uniprot.org> (Consortium et al., 2024)) ont été utilisées pour prédire leurs structures tridimensionnelles complètes à l'aide de l'outil AlphaFold2 (Jumper et al., 2021 ; Varadi et al., 2021 ; 2023). Les fichiers de structures générés ont été visualisés et analysés avec le logiciel PyMOL 3.0.4 (Schrödinger, s. d.), en appliquant une coloration par score de conservation (commande spectrum b, intervalle 70-100) afin d'identifier les régions structurellement conservées, soit un gradient du blanc (résidus les moins conservés, score proche de 70) au vert foncé (résidus les plus conservés, score de 100). L'alignement des domaines SP-RING des trois protéines a été réalisé à l'aide du logiciel T-Coffee 11.00 (<https://tcoffee.crg.eu/> (Floden et al., 2016)), puis visualisé avec ESPript 3.0 (<https://esprict.ibcp.fr> (Robert et Gouet, 2014)) pour évaluer la conservation des résidus. Les pourcentages d'identité ont été déterminés pour chaque comparaison binaire. Ces analyses de conservation structurale et de séquence ont permis de sélectionner des régions structurées et hautement conservées entre les orthologues végétaux, dans le but de générer des anticorps capables de reconnaître indistinctement les trois homologues. Les domaines choisis incluent des versions courtes (SP-RING seul) et longues (PINIT + SP-RING), en tenant compte de leur repliement, de leur solubilité attendue, et de leur accessibilité. Il ne s'agissait pas ici de prédire directement les épitopes antigéniques, mais de cibler des régions structurées et conservées comme candidats antigéniques potentiels pour l'expression des protéines recombinantes.

2.2 Croissance des plantes et conditions de stress de haute température

Des graines de riz (*Oryza sativa* L. ssp. japonica cv. Nipponbare batch A21FA3 de *US department of agriculture*) ont été mises dans un tube Falcon de 15 ml dans un four à 50 °C pendant 5 jours afin de briser leur dormance et ainsi synchroniser la germination. Les graines ont ensuite été stérilisées à l'eau de Javel (hypochlorite de sodium à 10 %) pendant 5 minutes avec agitation, puis rincées 3 fois à l'eau distillée stérile. Les graines ont ensuite été placées sur du papier humidifié dans une boîte recouverte de papier d'aluminium et laissées à germer dans l'obscurité pendant 3 jours dans une chambre de croissance Conviron GEN1000 à 28 °C à 75 % d'humidité. Les plantules germées ont ensuite été transférées dans des pots remplis de sol (PRO-MIX BX MYCORRHIZAE 10381RG, composé de tourbe de mousse de sphaigne (75-

85 %), perlite, chaux dolomitique et calcique, et agent mouillant), enrichi avec de l'engrais *Jack's Professional GENERAL PURPOSE Fertilizer* (20-20-20 pour 20% Azote total (N), 20 % Phosphate disponible (P_2O_5) et 20 % Potasse soluble (K_2O)) à raison de 384,7 mg/kg, ainsi que du $FeSO_4$ à 67,2 mg/kg. Ce sol avait été préalablement séché pendant 5 jours dans un four à 50 °C, puis humidifié en ajoutant de l'eau selon un rapport de 1 : 2,5 (poids/poids) par rapport à la terre sèche. Les plantules ont ensuite été cultivées dans des conditions contrôlées en chambre de croissance *Conviron GEN1000* (28 °C/26 °C, 80 % d'humidité relative, photopériode 12 h lumière 100 %/12 h obscurité). À 14 jours après germination, une partie des plantes ont été soumises à un stress de haute température de 40 °C pendant 60 minutes. Ce traitement a été choisi sur la base des travaux de (Wilkins *et al.*, 2016), qui ont utilisé des conditions similaires pour étudier la réponse du riz au stress de HT. Dr Olivia Wilkins, collaboratrice de ce projet, a permis l'adaptation rigoureuse de ce protocole. Les feuilles ont été récoltées immédiatement après traitement et refroidies rapidement dans de l'azote liquide avant d'être stockées dans un ultra congélateur à -80 °C. Pour *Arabidopsis thaliana*, un protocole similaire a été utilisé avec 28 jours de croissance en chambre de croissance (20 °C, 70 % d'humidité relative, photopériode 16 h lumière 100 %/8 h obscurité), à l'exception du fait que les graines ont été stratifiées à 4 °C pendant 3 jours dans l'obscurité pour synchroniser la germination. Aussi, contrairement au riz, les plants d'*Arabidopsis* n'ont pas été soumis au stress de HT, et ont été récoltés à 28 jours de croissance en conditions contrôlées.

2.3 Biologie moléculaire

2.3.1 Extraction d'ARN total des cellules à partir de feuilles de riz

L'ARN total a été extrait à partir de feuilles d'*Oryza sativa* ou d'*Arabidopsis thaliana*, âgées respectivement de 14 et 28 jours, au moyen du RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Cat. 74904). Un total de 75 mg de feuilles a été utilisé pour l'extraction, en suivant les procédures établies par le manufacturier. Le culot d'ARN résultant de l'extraction a ensuite été traité avec la Turbo DNase (Invitrogen, Cat. AM2238) afin d'éliminer toute contamination par l'ADN génomique. L'ARN purifié a été finalement solubilisé avec de l'eau stérile sans RNase (Invitrogen, Cat. AM9937). L'intégrité de l'ARN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % préparé dans 50 mL de tampon TAE 1X (Tris/acide Acétique/EDTA dilué du stock 50 X (Bio-Rad Cat.1610773)), contenant 1,5 µL de GelRed (Miliopore Sigma Cat.SCT123). La migration a été réalisée pendant 30 minutes, et la visualisation du gel a été effectuée à l'aide d'un système ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad). La quantification de l'ARN a ensuite été réalisée à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop One (Thermo Scientific). Les échantillons présentant un ratio d'absorbance 260/280 compris entre 1,9 et 2,2 ont été considérés comme acceptables pour les étapes ultérieures.

2.3.2 Synthèse de l'ADN complémentaire à partir de l'ARN total

Les synthèses d'ADN complémentaire ont été effectuées avec le kit *Super Script III First strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen 18080051) grâce aux amorces oligo (dT)₂₀. Pour le kit *SuperScript*, 2,2 µg d'ARN ont été utilisés pour une réaction de 50 minutes à 50 °C suivi de 5 minutes à 85 °C. L'ADNc obtenu a été utilisé comme matrice dans les réactions de PCR, à raison de 10 µL par réaction.

2.3.3 Amplification des séquences par PCR

Les amplifications d'ADN ont été effectuées avec une première étape de dénaturation à 95 °C pendant 5 minutes suivie de 35 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes, d'appariement à 55 °C 30 secondes et une extension à 72 °C de 1 minute par 1 kb de taille d'amplicon attendues. Par la suite, une étape d'extension finale a eu lieu à 72 °C pendant 10 minutes. La PCR a été faite en rajoutant 2 µM d'amorce sens et 2 µM antisens (Tableau 2.1) ainsi que 1 µL de matrice dans un volume final de 50 µL avec une concentration de 200 µM de dNTPs, 1 µg/mL de polymérase Pfu purifiée. Cette réaction a lieu dans un tampon composé de 50 mM TRIS-HCl pH 8.0, 20 mM KCl, 15 mM (NH₄)₂SO₄, 1.2 mM MgSO₄ et 0.14 mg/mL de BSA.

Tableau 2.1 Amorces utilisées lors de PCR pour l'amplification des inserts

ADNc	Amorce sens	Amorce antisens
OsSIZ1 court (SP-RING)	5'- GGTACCGAAAACCTTGATTTCAG GGATCCTTTACTGTTGCTCAGTTTTGAACT TAG -3'	5'- GCTTGTGACGAGCTCGAATTCGGATCCTCA GGCAGGTTTGACATCTTCCTTAGG-3'
OsSIZ1 long (PINIT + SP-RING)	5'- GGTACCGAAAACCTTGATTTCAG GGATCCGTTGCTGCATTTGCAGTAGCACA ATG -3'	5'- GCTTGTGACGAGCTCGAATTCGGATCCTCA GGCAGGTTTGACATCTTCCTTAGG-3'
OsSIZ2 court (SP-RING)	5'- GGTACCGAAAACCTTGATTTCAGGGATC CTTTTCTGTAGAACAGGTCCTATCTTTGGT G -3'	5'- GCTTGTGACGAGCTCGAATTCGGATCCTCA GGGCTTGGACCTTGATCTGTAGG-3'
OsSIZ2 long (PINIT + SP-RING)	5'- GGTACCGAAAACCTTGATTTCAGGGATC CGTCCGTTGTCCCTGTGGTTATTCCATGG -3'	5'- GCTTGTGACGAGCTCGAATTCGGATCCTCA GGGCTTGGACCTTGATCTGTAGG-3'

AtSIZ1 court (SP-RING)	5'- GGTACCGAAAACCTTGATTTCCAGGGATC CTTTACTCTACAACAGGTTCTAAATTG - 3'	5'- GCTTGTGCGACGGAGCTCGAATTCGGATCCTCA GCAAAGGCTACCATCAGGTGCATG -3'
AtSIZ1 long (PINIT + SP-RING)	5'- GGTACCGAAAACCTTGATTTCCAGGGATC CAAAGTTCGATGTGTTTGTGGAACTCGC -3'	5'- GCTTGTGCGACGGAGCTCGAATTCGGATCCTCA GCAAAGGCTACCATCAGGTGCATG -3'

2.3.4 Digestion de l'ADN par enzyme de restriction

La digestion a été faite dans un volume final de 100 µL avec 50 µL d'ADN (amplicons ou plasmides à digérer), 10 µL de tampon CutSmart (NEB Cat.B6004S), 1 µL de chaque enzyme de restriction (Bam HI pour les vecteurs pRSF et pRSF-trx) qui ont été complétés avec de l'eau nanopure. La réaction a été incubée à 37 °C pendant au moins 1 heure. À la suite de la digestion, une migration a eu lieu sur gel d'agarose 1 % contenant du SYBR-Safe (Invitrogen Cat.S33102) pendant 20 minutes à 120 V. La révélation du gel a été faite au moyen d'un ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) et les bandes voulues sont excisées.

2.3.5 Extraction sur gel de bandes d'ADN

Les bandes d'ADN d'intérêt ont été excisées manuellement à l'aide d'une lame de rasoir propre, puis purifiées à l'aide du kit *EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit* (BioBasic, Cat.BS354), conformément aux instructions du manufacturier.

2.3.6 Réaction de Gibson

L'amplicon intact (provenant de la PCR) a été incubé avec 50 ng de plasmide digéré par une ou des enzymes de restriction afin d'avoir une stœchiométrie de 3 amplicons pour 1 plasmide dans un volume de 5 µL. Un témoin négatif sans insert a également été réalisé. Par la suite, 5 µL d'un mix de Gibson 2X (constitué de 0.04 U T5 exonucléase (NEB Cat.M0363S), 0.25 U Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher Cat.F-530L), 10 U Taq DNA Ligase (NEB Cat.M0208S) dans 0.2 M Tris-HCl pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 10 % w/v PEG-8000, 20 mM DTT, 0.132 % w/v NAD, 0.1 mM dNTPs) ont été incubés pendant 1 h à 50 °C avec un volume final de réaction de Gibson de 10 µL. Suivant cette incubation, une transformation a eu lieu avec le produit de Gibson.

2.3.7 Préparation de bactéries chimio-compétentes

Les bactéries *E. coli* de type DH5α ou BL21 (DE3) Codon Plus ont été utilisées pour toutes les manipulations subséquentes. Les bactéries ont étéensemencées dans du LB (10 g/L de NaCl, 5 g/L d'extraits de levures et 10 g/L de peptone) à 37 °C avec agitation jusqu'à l'obtention d'une D.O 600 de 0.6, et ensuite centrifugées à 3000 x g pendant 15 minutes à 4 °C. Les bactéries ont ensuite été resuspendues dans du TFB I froid (30 mM KOAc, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 15 % [v/v] de glycérol). Par la suite, les bactéries ont été centrifugées à vitesse maximale pendant 8 minutes à 4 °C pour ensuite être resuspendues dans du TFB II froid (10 mM Na MOPS pH 7.0, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % [v/v] glycérol) et aliquotées. L'entreposage des bactéries rendues compétentes se fait à -80 °C.

2.3.8 Transformation bactérienne

Les bactéries *E. coli* DH5α ont été utilisées pour la production de plasmide. Les bactéries *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus ont été utilisées pour l'expression de protéines. Pour chaque aliquot de 10 µL de bactéries compétentes, 1 µL d'ADN à une concentration de 60 ng/µL a été ajouté. Ces bactéries ont ensuite été incubées sur glace pendant 30 minutes afin de permettre l'adsorption de l'ADN. Un choc thermique a ensuite été appliqué pendant 45 secondes à 42 °C pour favoriser l'entrée du plasmide dans les cellules, suivi immédiatement d'une incubation de 1 minute sur glace pour stabiliser les membranes cellulaires. Après cette étape, 300 µL de milieu LB stérile ont été ajoutés aux cellules transformées, qui ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 1 heure afin de permettre l'expression des gènes de résistance aux antibiotiques. L'ensemble du volume a ensuite été étalé sur une boîte de pétri contenant du milieu LB-Agar complété avec un antibiotique approprié (kanamycine à 50 µg/mL, chloramphénicol à 34 µg/mL), en fonction de la résistance conférée par le plasmide. La composition du LB-Agar était la suivante : 10 g/L de NaCl, 5 g/L d'extrait de levure, 10 g/L de peptone et 15 g/L d'Agar. Les géloses ont été incubées à 37 °C pendant la nuit avant d'être utilisées pour les étapes expérimentales ultérieures.

2.3.9 Extraction de plasmides par minipreps

Une colonie de bactéries *E. coli* DH5α transformées a été prélevée et cultivée dans 3 mL de milieu de culture LB-Antibiotique pendant la nuit à 200 rpms (rotations par minute) à 37 °C. Le kit de minipreps (Promega Cat.A1465) a été utilisé pour la purification des plasmides des bactéries en suivant les directives du fabricant. La quantification des plasmides a été faite à l'aide d'un NanoDrop One (ThermoFisher).

2.3.10 Repiquage et glycérol stock

Une colonie unique de BL21 (DE3) Condon Plus ou DH5 α contenant le plasmide cible a été inoculée dans 2 mL de milieu LB, supplémenté avec l'antibiotique approprié. Cette préculture a été incubée pendant une nuit à 37 °C. Un volume de 800 μ L de cette préculture a été supplémenté de 800 μ L de milieu LB à 40 % de glycérol et introduits dans un cryotube. Le cryotube a ensuite été placé dans un bain d'azote liquide avant d'être conservé dans un ultra congélateur à -80 °C.

2.4 Expression et purification des protéines recombinantes

2.4.1 Optimisation de l'expression protéique

L'expression des protéines recombinantes a été réalisée dans la souche bactérienne *Escherichia coli* BL21 (DE3) Codon Plus transformée avec les plasmides d'intérêt. Deux protocoles successifs ont été utilisés : un protocole de base, suivi d'un protocole optimisé visant à améliorer les rendements d'expression. Dans le protocole initial, la préculture a été amorcée directement à partir d'un stock bactérien congelé en glycérol. Une petite quantité a été prélevée à l'aide d'un embout stérile et inoculée dans 100 mL de milieu LB supplémenté avec de la kanamycine à 50 μ g/mL et du chloramphénicol à 34 μ g/mL. Cette préculture a été incubée pendant une nuit à 28 °C. Ensuite, 30 mL de cette culture ont été transférés dans 1 L de milieu SB (*Super Broth*) ajusté à pH 7,5, contenant 5 g/L de NaCl, 20 g/L d'extrait de levure et 32 g/L de peptone, ainsi que les antibiotiques nécessaires. La culture a été incubée à 37 °C avec une agitation de 200 rpm jusqu'à ce que la densité optique atteigne $DO_{600} = 1,0$. L'induction de l'expression a été initiée par l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 100 μ M, suivie d'une incubation à 18 °C pendant la nuit (environ 16 heures). Après induction, les cellules ont été récoltées par centrifugation à 5000 x g pendant 40 minutes. Le culot bactérien a été resuspendu dans une solution de sucrose 20 % (p/v) contenant 50 mM Tris pH8, 1 % (p/v) de lysozyme, congelé à l'azote liquide et stocké à -20 °C jusqu'à utilisation.

Dans le protocole optimisé, afin d'accroître les rendements en protéines recombinantes, les conditions de culture ont été ajustées. La culture a été amorcée directement à partir d'un stock bactérien congelé en glycérol. Une petite quantité a été prélevée à l'aide d'un embout stérile et inoculée dans 250 mL de milieu SB complété avec 2% de glucose, de la kanamycine à 50 μ g/mL, du chloramphénicol à 34 μ g/mL et incubée à 30 °C pendant la nuit. Le lendemain, 750 mL de milieu SB froid, supplémenté avec les mêmes antibiotiques, 10 μ M de zinc (Zn²⁺) et l'IPTG à une concentration finale baissée à 20 μ M puis remontée à 100 μ M, ont été ajoutés. L'induction de l'expression a été poursuivie pendant 24 heures à 18 °C. Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 5000 x g pendant 20 minutes et les culots obtenus ont été

resuspendus dans une solution de sucrose 20 % (p/v) contenant 50 mM Tris pH8, 1 % (p/v) de lysozyme, congelé à l'azote liquide et stockés à -20°C. Ce protocole optimisé a permis d'augmenter significativement les rendements protéiques, atteignant des poids de culots triples par rapport à ceux obtenus avec le protocole initial.

2.4.2 Optimisation du protocole de purification des protéines recombinantes

2.4.2.1 Chromatographie d'affinité Ni-NTA

Les culots bactériens conservés dans une solution de sucrose à 20 % ont été utilisés pour cette étape. Après décongélation, la concentration de la solution a été ajustée pour atteindre 500 mM de NaCl, 40 mM d'imidazole, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0) et 5 mM de β -mercaptoéthanol, afin de favoriser la solubilité des protéines lors de la lyse cellulaire. La lyse a été effectuée par sonication (*Branson sonifier 450*, cycle de service à 50 %, puissance réglée à 5), en deux cycles de 10 minutes séparés par une pause de 5 minutes. Le lysat obtenu a été centrifugé à $39\,191 \times g$ pendant 30 minutes à 4 °C. Le surnageant, contenant les protéines solubles, a été récupéré pour la purification par chromatographie d'affinité. Ce surnageant a été appliqué sur une colonne contenant 5 mL de billes de nickel (Ni-NTA Qiagen Cat.30210), préalablement lavées et équilibrées avec un tampon de lavage. Après chargement de l'échantillon, la colonne a été lavée avec cinq volumes de tampon de lavage (500 mM de NaCl, 20 mM d'imidazole, 20 mM de Tris-HCl pH 8,0, et 5 mM de β -mercaptoéthanol) afin d'éliminer les protéines non spécifiques. Enfin, les protéines liées ont été éluées à l'aide d'un tampon d'élution contenant 500 mM de NaCl, 500 mM d'imidazole, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0) et 5 mM de β -mercaptoéthanol. L'éluat a été collecté par fractions de 1 mL.

2.4.2.2 Clivage des étiquettes des protéines recombinantes

Le clivage enzymatique des étiquettes de purification thiorédoxine (Trx) et 6xHis a été réalisé à l'aide de la protéase TEV (site de clivage ENLYFQG). Les protéines recombinantes, préalablement purifiées par chromatographie d'affinité, ont été incubées avec la protéase TEV dans différentes conditions expérimentales afin d'optimiser l'efficacité du clivage. Dans un premier jeu d'essais, la durée d'incubation a été évaluée à température ambiante (~22 °C). Les protéines OsSIZ1 court ont été incubées avec une concentration finale de protéase TEV de 10 μ M pendant 15, 30, 60, 120 minutes, puis jusqu'à 6 heures. Les produits de clivage ont été analysés par SDS-PAGE 12 %. Par la suite, l'impact de la température a été évalué lors d'incubations effectuées toute une nuit à 4 °C, à température ambiante et à 30 °C. La composition du tampon a également été prise en compte : le tampon d'élution initialement composé de 10 % de glycérol a été dilué 1 : 10 afin d'obtenir une concentration finale de 1 %. En parallèle, des versions

courtes des protéines OsSIZ1 et OsSIZ2 ont été purifiées directement avec un tampon contenant 1 % de glycérol. L'efficacité du clivage enzymatique a été vérifiée par analyse SDS-PAGE sur gel à 12 %. Les conditions retenues pour les étapes ultérieures comprenaient une incubation toute une nuit à 4 °C, une concentration en glycérol ≤ 1 % et une concentration finale de TEV de 10 μ M.

2.4.2.3 Optimisation des conditions de dialyse

Les protéines purifiées ont été soumises à une étape combinée de clivage enzymatique et de dialyse afin d'éliminer les composants du tampon d'élution (500 mM NaCl, 500 mM imidazole, 10 % glycérol) et de favoriser le retrait des étiquettes de purification par la protéase TEV. Le mélange réactionnel comprenait les protéines recombinantes (5 mg/mL), de la protéase TEV (10 μ M finale), et du β -mercaptoéthanol (5 mM). Ce mélange a été introduit dans une membrane de dialyse *Spectra/Por 1 RC* (Spectrum Laboratories Cat.132655), présentant un seuil de coupure moléculaire (MWCO) de 6 kDa à 8 kDa et placé dans un volume de 2 L de tampon de dialyse. La dialyse a été réalisée toute une nuit à 4 °C sous agitation douce. Le tampon de dialyse standard était composé de 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl et 5 mM de β -mercaptoéthanol. Afin d'optimiser la solubilité des protéines et l'efficacité du clivage, plusieurs tampons ont été testés en parallèle dans une plaque 96 puits. Chaque puits contenait 10 μ L de solution protéique, 40 μ L de tampon modifié, 2 μ L de protéase TEV à 10 μ M finale (ou 2 μ L d'eau pour les conditions témoins) et 5 mM de β -mercaptoéthanol. Deux concentrations de NaCl (100 mM et 350 mM) ont été testées pour chaque condition. Les tampons testés incluaient le tampon Tris de base enrichi de divers additifs (10 % glycérol, 0,1 % Tween 20, 2 mM EDTA, 1 M urée) ainsi que des variantes de pH (5,0 ; 6,8 ; 8,0). De l'eau nanopure, du PBS 1X (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na_2HPO_4 et 1,8 mM de KH_2PO_4 , ajustée à un pH de 7,4) et du PBS 1X ajusté à 350 mM NaCl ont également été testés. La formation d'agrégats a été évaluée visuellement et confirmée par SDS-PAGE sur gel 12 %. Les résultats ont montré une agrégation systématique d'OsSIZ2 à 100 mM NaCl, indépendamment des additifs. En revanche, à 350 mM NaCl, l'agrégation était supprimée, sauf à pH 5,0. Le tampon PBS 1X, complété avec 5 mM de β -mercaptoéthanol, a permis de maintenir les protéines recombinantes en solution tout en conservant l'activité de la protéase TEV. Ce tampon a été retenu comme condition optimale pour les étapes combinées de clivage et de dialyse réalisées toute une nuit à 4 °C.

2.4.2.4 Chromatographie d'exclusion stérique

À la suite du clivage enzymatique, les protéines ont été purifiées par chromatographie d'exclusion stérique (filtration sur gel ou tamis moléculaire) à l'aide d'un système FPLC AKTA (Cytiva). Les protéines ont été

injectées sur une colonne Superdex 75 ou Superdex 200, préalablement équilibrée avec un tampon PBS 1 X contenant 5 mM β -mercaptoéthanol. Les échantillons ont ensuite été injectés en volume de 5 mL. Le débit de séparation était de 0,5 mL/min à 4 °C, et les fractions de 5 mL ont été collectées pour analyse. Les fractions contenant les protéines d'intérêt ont été combinées, concentrées à l'aide de filtres Amicon Ultra-15 (10 kDa) et stockées à -80 °C après refroidissement rapide dans l'azote liquide.

2.4.2.5 Électrophorèse SDS-PAGE sur gel d'acrylamide

La migration des protéines s'est faite à courant constant de 180 V pour des gels à épaisseur 1 mm pendant 55 minutes pour des gels de 12 % ou 15 %. Pour la détection des protéines, la coloration a été faite par un ajout de TCE (2, 2, 2 Trichloroéthane) dans les gels pour permettre la visualisation des protéines grâce à une exposition aux rayons UV. La visualisation des protéines sur gel a été faite à l'aide du ChemiDoc XRS+ ou MP (Bio-Rad).

2.4.2.6 Production d'anticorps polyclonaux

La génération des anticorps polyclonaux a été confiée à la société MediMabs (Montréal, Canada), qui a procédé aux immunisations et aux prélèvements selon ses protocoles standards, à partir des protéines recombinantes fournies. Le processus implique l'immunisation d'un animal avec un antigène, la collecte et la purification du sérum pour isoler les anticorps via chromatographie d'affinité et où chromatographie échangeuse d'ion, puis des tests de contrôle qualité comme ELISA.

2.5 Essais d'immunobuvardages et d'immunoprécipitation

2.5.1 Immunoprécipitation de la chromatine

2.5.1.1 Fixation des interactions Protéine-ADN

Pour fixer les interactions protéine-ADN, des feuilles de riz âgées de 14 jours ont été récoltées, puis soumises à une fixation croisée selon un protocole adapté de ([Desvoyes et al., 2018](#)) 1 g de tissu frais a été placé dans un tube de 50 mL contenant 35,5 mL de PBS 1 X froid, et maintenu sur glace durant toute l'étape de fixation. Le formaldéhyde a été ajouté à une concentration finale de 1 % (v/v), et un morceau de *Miracloth* (taille des pores 22 μ m) imprégné de PBS 1 X froid a été utilisé pour maintenir le tissu immergé dans la solution. La fixation a été réalisée par infiltration sous vide en 3 x 5 minutes, avec 4 minutes de repos sans vide entre chaque cycle. La réaction de fixation a été stoppée par l'ajout de glycine 5 M à une concentration finale de 125 mM, et l'infiltration sous vide a été prolongée pendant 5 minutes.

Après avoir rincé les échantillons avec de l'eau stérile froide, les tissus ont été séchés avec du papier absorbant et refroidis rapidement dans de l'azote liquide. Le matériel a ensuite été congelé dans de l'azote liquide et stocké à -80 °C.

2.5.1.2 Préparation de la chromatine

Pour extraire la chromatine selon le protocole adapté de (Desvoyes *et al.*, 2018), les échantillons de feuilles (environ 2 g) ont été broyés dans de l'azote liquide, puis resuspendus dans un tampon d'extraction (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.25 M sucrose, 10 mM MgCl₂ et 1 % Triton X-100 supplémenté de 1 mM PMSF et 1 x *protease inhibitor cocktail EDTA-free* (Roche Cat.11873580001)) à raison de 10 ml par gramme de tissu fixé. Après une incubation de 30 minutes à 4 °C sur un agitateur rotatif à la puissance la plus basse (10 pour le *Turbo Revolver* de Thermo Scientific), le mélange a été homogénéisé manuellement à l'aide d'un homogénéiseur en verre de type Dounce, en utilisant successivement le piston à ajustement serré puis le piston à ajustement lâche, et filtré à travers une couche double de *Miracloth*. Les noyaux ont été isolés par centrifugation à 3000 x g pendant 20 minutes à 4 °C. Le culot nucléaire a été resuspendu dans un tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8.0 et 10 mM EDTA supplémenté de 1 mM PMSF et 1 x *protease inhibitor cocktail*) à raison de 500 µL par gramme de tissu, puis incubé pendant 25 minutes à 4 °C après l'ajout de SDS 10 % à une concentration finale de 1 %. La chromatine a été fragmentée par sonication à l'aide d'un Bioruptor Pico (Diagnode B01080010) après une étape préalable d'optimisation des paramètres (Annexe D) pour obtenir une taille de fragments adaptée. Une sonication en 5 cycles de 30 secondes ON/30 secondes OFF à une intensité moyenne, pendant un total de 5 minutes a permis d'obtenir un spectre de grandeur de nos fragments d'ADN entre 100 et 500 pb. Après centrifugation à 19 000 x g pendant 5 minutes à 4 °C, le surnageant a été collecté pour évaluer l'efficacité de la sonication.

2.5.1.3 Analyse et quantification de la chromatine

La taille des fragments de chromatine a été vérifiée selon le protocole adapté de (Desvoyes *et al.*, 2018) par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 %, et la concentration d'ADN a été quantifiée à l'aide du système Qubit avec le kit *dsDNA Quantification Assay high sensitivity* (Invitrogen Q32851). Les échantillons ont été analysés pour s'assurer que les fragments de chromatine étaient dans la plage de 100 à 500 pb.

2.5.1.4 Immunoprécipitation

Pour l'immunoprécipitation selon le protocole adapté de (Desvoyes *et al.*, 2018), les extraits de chromatine ont été dilués dans un tampon de dilution ChIP (16.7 mM Tris-HCl pH 8.0, 167 mM NaCl, 1.2 mM EDTA et

1.1 % Triton X-100 supplémenté de 1 mM PMSF et 1 x *protease inhibitor* cocktail) pour atteindre une concentration finale de SDS de 0,1 % maximum. Les échantillons ont été incubés toute une nuit à 4 °C avec l'anticorps anti-SUMO (ab5316) ou anti-OsSIZ1/2 sur un agitateur rotatif à la puissance la plus basse (10 pour le *Turbo Revolver* de Thermo Scientific). Un aliquot d'échantillon "input" a été conservé avant l'immunoprécipitation pour représenter la fraction totale de chromatine utilisée dans l'essai. Cet input sert de référence pour évaluer l'efficacité de l'immunoprécipitation et pour normaliser les données obtenues, en permettant une comparaison directe entre la quantité d'ADN cible présente dans l'échantillon initial et celle récupérée après IP. Les complexes immunoprécipités ont été capturés sur des billes magnétiques Protéine A Dynabeads (Invitrogen Cat.3092770), puis lavés avec plusieurs tampons de lavage à faibles (20 mM Tris-HCl pH 8.0 ; 2 mM EDTA ; 150 mM NaCl ; 0,1 % SDS ; 1 % de Triton-X-100 ; 1 mM PMSF et 1 X *protease inhibitor* cocktail) et fortes concentrations de sel (20 mM Tris-HCl pH 8.0 ; 2 mM EDTA ; 500 mM NaCl ; 0,1 % SDS ; 1 % de Triton-X-100 ; 1 mM PMSF et 1 X *protease inhibitor* cocktail). Des lavages au tampon de lavage LiCl (10 mM Tris-HCl pH 8.0 ; 1 mM EDTA ; 0,25 M LiCl ; 1 % de Triton-X-100 ; 1 % sodium deoxycholate ; 1 mM PMSF et 1 X *protease inhibitor* cocktail) et au tampon TE (Tris-EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 ; 1 mM EDTA ; 1 mM PMSF et 1 X *protease inhibitor* cocktail) ont ensuite été effectués.

2.5.1.5 Récupération des complexes immunoprécipités

Les complexes immunoprécipités ont été élués avec 50 µL de billes magnétiques Protéine A Dynabeads (Invitrogen Cat.3092770), selon le protocole adapté de (Desvoyes *et al.*, 2018) en utilisant un tampon d'éluat (1 % SDS, 0.1 M NaHCO₃) préchauffé à 65 °C. Après une incubation de 15 minutes à 65 °C, l'éluat a été transféré dans un tube frais. Cette étape a été répétée pour s'assurer de la récupération complète de l'ADN. Le volume de l'échantillon "input" a été ajusté à 400 µl avec le tampon d'éluat.

2.5.1.6 Purification de l'ADN immunoprécipité

L'ADN a été déréticulé selon le protocole adapté de (Desvoyes *et al.*, 2018) en incubant l'échantillon à 65 °C avec 0,2 M NaCl pendant toute une nuit. L'ARN a été digéré avec 100 U/mL de RNase A/T1 mix (Thermo Scientific, Cat.EN0551). Les protéines ont été digérées par 0,05 mg/mL protéinase K (Cell Signaling Cat.10012S), et l'ADN a été extrait avec une solution phénol-chloroforme-Isoamyl 25 : 24 : 1 (Thermo Scientific Cat.17908). L'ADN purifié a été précipité avec 2,5 volumes d'éthanol absolu, 0,1 volumes de 3 M CH₃COONa et 2 µg de glycogène (Thermo Scientific, Cat.R0561), puis resuspendu dans 80 µl de tampon TE (Tris-EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 et 1 mM EDTA.) à 10 mM. Les échantillons ont été quantifiés par le

système Qubit (Kit dsDNA HS (high sensitivity) Invitrogen Cat. Q32851) et conservés à -20 °C pour des analyses ultérieures.

2.5.1.7 Analyses qPCR

Les échantillons d'ADN immunoprécipités ont été analysés par qPCR (CFX96, Bio-Rad) en triplicate technique, avec *SYBR Green Supermix* (Bio-Rad Cat.1725274). Les amorces ont été conçues pour cibler les régions promotrices des gènes OsHSFA2d et OsHSFA6 (motifs HSE), OseEF-1 α et OsUBQ5 (comme gènes de référence) et enfin le gène OsETF β (contrôle négatif). Les séquences des amorces sont listées dans le Tableau 3.1. Des courbes standard ont été générées à partir d'ADN de plasmides vides pRNA2, et dilué en série (1 : 10) pour permettre une quantification relative fiable et vérifier l'efficacité des amorces. L'ADN des échantillons « Input » a été préalablement dilué au besoin pour s'assurer que les valeurs de Ct obtenues se situaient dans la plage linéaire de détection de la courbe standard mais aussi afin de les normaliser avec les échantillons d'ADN immunoprécipités. Des contrôles techniques ont été inclus dans chaque réaction : un contrôle sans ADN ou *No Template Control* (NTC) pour exclure toute contamination des réactifs et un contrôle négatif (*SYBR Green* + eau sans RNase) pour vérifier l'absence de contamination dans l'eau et le réactif. L'enrichissement relatif a été calculé par rapport aux inputs de chaque échantillon. Pour évaluer les différences d'enrichissement entre conditions (contrôle vs. stress de HT), un test t de *Student* bilatéral non apparié a été appliqué à chaque gène cible. Les tests ont été réalisés à l'aide de la fonction « *ttest_ind* » du module « *scipy.stats* » de Python (SciPy). Les seuils de significativité ont été définis comme suit : $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p > 0,05$ (ns, non significatif). L'annotation des barres de la figure (astérisques) a été réalisée à l'aide du module « *statannotations* ».

2.5.1.8 Préparation des librairies d'ADN et séquençage

Les librairies pour le séquençage à haut débit ont été préparées à partir d'ADN double brin fragmenté en utilisant le *sparQ DNA Library Prep Kit* (Quantabio, 95191). Les inputs ADN utilisés sont de 3,5 ng à 2,058 ng. Le protocole a été suivi selon les recommandations du fabricant. L'étape de polissage de l'ADN a été réalisée en une seule réaction enzymatique. Les adaptateurs (*sparQ UDI adapters*, Quantabio, Cat. 95211) ont été dilués au 1 : 100 puis ajoutés par ligation directe, suivie d'un nettoyage à l'aide de billes magnétiques (*sparQ PureMag Beads*, Quantabio, 95196). Une amplification de la librairie a été réalisée avec l'*HiFi PCR Master Mix* fourni, selon le nombre de cycles recommandé par le fournisseur en fonction

de la quantité d'ADN initiale. Après amplification par PCR de 13 cycles, une seconde purification sur billes magnétiques a été effectuée avec 80 µL. Une troisième purification a été ajoutée avec 50 µL de billes pour le retrait des dimères d'amorces de tailles autour de 200 pb (Annexe E). Les librairies obtenues ont été quantifiées par Qubit (Kit *dsDNA HS (high sensitivity)* Invitrogen Cat. Q32851) et leur taille moyenne a été évaluée par un *TapeStation Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies) à l'aide du *High Sensitivity D1000 ScreenTape* (Annexe F). Toutes les étapes critiques ont été réalisées en environnement dépourvu de RNase et DNase, avec un nettoyage préalable des surfaces et équipements à l'éthanol 70 %. Les échantillons présentés dans le Tableau 2.2, dont 3 réplicats en conditions contrôles et 3 réplicats traités à la chaleur ont été normalisés à 10 nM et combinées avec leurs inputs respectifs avant d'être envoyés au séquençage Illumina NovaSeq chez Génome Québec. Le séquençage a été réalisé avec un pool de 12 librairies sur une plateforme Illumina NovaSeq 6000 avec configuration *Paired-end*, avec une longueur de lecture de 2 × 100 pb.

Tableau 2.2 Liste des codes-barres i7/i5 et tailles moyennes des fragments envoyés au séquençage

Échantillon	Barcode i7 Index	Barcode i5 Index	Taille moyenne (pb)
Input contrôle 1	ACTGGCGAAC	GATAAGTCGA	320
ChIP contrôle 1	GCGTTAGGCA	TCACGCCTTG	355
Input HT 1	TTATCGGCCT	AGGAACACAA	298
ChIP HT 1	GAGGTATAAG	CTCAGTAGGC	338
Input contrôle 2	GAGCCAAGTT	AGGCACCTTC	320
ChIP contrôle 2	AAGGCCGTAG	CTGTTGGTAA	353
Input HT 2	TCAAGGATTC	GAAGTGCCTG	298
ChIP HT 2	CGAACCGAGA	TCTCTGCCT	358
Input contrôle 3	TTAGAGAAGC	GCTGGTACCT	304
ChIP contrôle 3	TCTAAGACCA	TAAGGAGCGG	315

Input HT 3	TGTAACCACT	AATCGCTCCA	304
------------	------------	------------	-----

2.5.1.9 Analyses des données de séquençage ChIP-Seq avec Galaxy

Les données brutes de ChIP-Seq (lectures appariées R1/R2 au format FASTQ) ont été analysées à l'aide de la plateforme *Galaxy* (<https://usegalaxy.ca>). Un premier contrôle qualité a été réalisé avec l'outil FastQC (Galaxy Version 0.74 + galaxy0), afin d'évaluer la qualité globale des séquences. Cet outil examine plusieurs indicateurs, tels que la distribution des scores Phred (valeur logarithmique reflétant la probabilité d'une erreur de lecture, par exemple un score Phred de 20 correspond à une probabilité d'erreur de 1/100), la présence d'adaptateurs résiduels, la composition en bases (GC/AT), les niveaux de duplication des séquences ou encore les longueurs de fragments. Ces paramètres permettent de détecter d'éventuels artefacts techniques ou biais de séquençage. Le nettoyage des lectures a été effectué à l'aide de l'outil FastP (Galaxy Version 0.23.4), en utilisant les paramètres par défaut, soit une qualité minimale correspondant à un score Phred de 15 et une longueur minimale de 15 pb. L'option *force PolyG trimming* a été activée afin de supprimer les artefacts typiques des séquenceurs à flux inversé. Cette étape a été réalisée à la suite de la détection de résidus d'adaptateurs et de séquences polyG résiduelles dans les lectures R1 et R2. Les séquences indésirables présentent pour certains échantillons, notamment le motif d'adaptateur GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACGCGTTAGGCAATCTGGG, ont ainsi été éliminées pour améliorer la qualité des lectures en vue de l'alignement. Les lectures nettoyées ont été alignées sur le génome de référence d'*Oryza sativa ssp. japonica* (cultivar Nipponbare) à l'aide de l'outil *Bowtie 2* (Galaxy Version 2.5.3 + galaxy1), en paramètres par défaut sauf pour le mode réglé sur "*very sensitive end-to-end*". Les statistiques d'alignement générées ont permis de vérifier le pourcentage de lectures alignées pour chaque échantillon. Les fichiers *BAM* produits ont ensuite été filtrés pour exclure les lectures de faible qualité définies par un score MAPQ (*Mapping Quality*) < 1 à l'aide de l'outil *Filter SAM/BAM* (Galaxy Version 1.8 + galaxy1). Ce score, sur une échelle logarithmique, reflète la probabilité qu'une lecture soit correctement alignée sur une position unique du génome.

Les alignements ont été triés par coordonnées génomiques avec *SortSAM* (Galaxy Version 3.1.1.0), puis les doublons ont été marqués et retirés à l'aide de l'outil *MarkDuplicates*, afin d'éliminer les redondances techniques. L'identification des régions génomiques enrichies en signal ChIP a été réalisée à l'aide de *MACS2v* (*Model-based Analysis for ChIP-Seq* (Galaxy Version 2.2.9.1 + galaxy0)). Les trois réplicats biologiques pour ChIP (fichiers *BAM* après détection des doublons) ont été regroupés pour l'analyse, en

utilisant également les réplicats correspondants "Input" comme contrôle de signal endogène. L'appel de pics a été effectué avec les paramètres suivants : taille du génome fixée à 4.0e8 (valeur adaptée pour *Oryza sativa*), exclusion des régions larges (*broad regions*), détection des sommets de pics (*summits*), et autorisation de l'ensemble des lectures dupliquées à la même position. Les fichiers de sortie incluent les positions des pics, leurs sommets, ainsi que des profils de scores au format *bedGraph*.

Pour évaluer la reproductibilité entre réplicats biologiques et comparer les conditions (contrôle vs stress thermique), les données post-MACS2 ont été analysées avec DiffBind (Galaxy v3.16.0). Cet outil fusionne les pics enrichis, compte les lectures ChIP dans chaque région et normalise les données pour corriger la profondeur de séquençage. Il permet aussi d'évaluer la corrélation entre réplicats, de générer une PCA et d'identifier les pics consensus. L'analyse a été réalisée sur des fichiers *BAM* filtrés pour ne garder que les lectures uniques, suivie d'un nouvel appel de pics avec MACS2. Les paramètres de DiffBind ont été modifiés pour utiliser la p-value (seuil de 0,1) au lieu du padj, et le paramètre mapQCh a été abaissé à 10.

2.5.2 Western Blot

Les protéines ont été transférées du gel SDS-PAGE vers une membrane PVDF à l'aide du TransBlot Turbo (Bio-Rad) selon les procédures du manufacturier. Le transfert a été fait à 2.5 A avec un maximum de 25 V pendant 7 minutes. Le transfert des protéines sur la membrane a été vérifié par détection du 2,2,2-trichloroéthanol à l'aide du ChemiDoc MP (Bio-Rad). Les membranes ont été bloquées grâce à une solution 5 % de lait dans du TBST (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 140 mM NaCl et 0.3 % Tween-20) pendant 1 heure à température pièce. Par la suite, la membrane a été lavée 3 x 5 minutes dans du TBS-T et incubée pendant 1 heure à température pièce avec l'anticorps primaire dilué 1 : 1000 ou au 1 : 100 dans du TBST contenant 0.5 % NaN₃. Suivant les 3 lavages, la membrane est incubée pendant 1 heure à température pièce avec l'anticorps secondaire (Cell Signaling Technology Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody Cat. 7076) dilué 1 : 10000 dans du TBS-T. La révélation des protéines se fait à l'aide du kit *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad Cat.1705061) et à l'aide du ChemiDoc MP (Bio-Rad).

2.5.3 Validation de la spécificité par immunoprécipitation suivie de qPCR (IP-qPCR)

Pour tester la spécificité des anticorps purifiés, des immunoprécipitations in vitro ont été réalisées selon le protocole adapté de [Desvoyes et al., 2018](#) à l'aide de 100 nM protéines recombinantes OsSIZ1 et OsSIZ2, exprimées sous forme longue (SAP + PINIT + SP-RING) ou courte (SP-RING seul), combinées avec de l'ADN plasmidique à 100 nM (vecteurs pRSF-Duet vides) dans un tampon de dilution ChIP (16.7 mM Tris-HCl

pH 8.0, 167 mM NaCl, 1.2 mM EDTA et 1.1 % Triton X-100 supplémenté de 1 mM PMSF et 1 x *protease inhibitor* cocktail). Après incubation avec les anticorps purifiés anti-OsSIZ1/2 (15 µL du sérum total), toute une nuit à 4 °C sur un agitateur rotatif à la puissance la plus basse (10 pour le *Turbo Revolver* de Thermo Scientific), l'ADN co-précipité a été capturé sur billes magnétiques (50 µL de billes pour 1 mL de solution échantillon) Protéine A Dynabeads (Invitrogen Cat.3092770) pendant 2 heures à 4 °C sur agitateur rotatif, puis lavés 2 fois au PBS 1 X (supplémenté avec 1 mM PMSF et 1 X *protease inhibitor* cocktail) puis 2 fois au tampon TE (Tris-EDTA) (10 mM Tris-HCl pH 8.0 ; 1 mM EDTA ; 1 mM PMSF et 1 X *protease inhibitor* cocktail). Les complexes immunoprécipités ont été élués en utilisant un tampon d'éluion (1 % SDS, 0.1 M NaHCO₃) préchauffé à 65 °C. Après une incubation de 15 minutes à 65 °C, les billes ont été centrifugées et l'éluat a été transféré dans un tube frais. Cette étape a été répétée pour s'assurer de la récupération complète de l'ADN. Les protéines ont été digérées par 0,05 mg/mL protéinase K (Cell Signaling Cat.10012S), et l'ADN a été extrait avec une solution phénol-chloroforme-Isoamyl 25 : 24 : 1 (Thermo Scientific Cat.17908). L'ADN purifié a été précipité avec 2,5 volumes d'éthanol absolu, 0,1 volumes de 3 M CH₃COONa et 2 µg de glycogène (Thermo Scientific, Cat.R0561), puis resuspendu dans 80 µl de tampon TE (Tris-EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, and 1 mM EDTA.) à 10 mM. L'ADN obtenu a été quantifié par qPCR comme indiqué en 2.5.1.2 à l'aide d'amorces Down1 et ACYC ciblant les vecteurs pRSF-Duet. Les données de ChIP-qPCR (% Input) ont été obtenues à partir de trois réplicats biologiques indépendants. Une courbe standard de quantification absolue a été générée par dilution logarithmique, avec une efficacité d'amplification de 104 % et un R² de 0,9663 (voir Annexe H). Les concentrations d'ADN (ng/µL) ont été interpolées à partir de cette courbe. Pour chaque forme de protéine recombinante (OsSIZ1/2 longue ou courte), un test t de Student bilatéral non apparié a été appliqué pour comparer la quantité d'ADN précipitée entre les conditions avec ou sans ADN ajouté.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Caractérisation des sites de liaison à l'ADN des protéines SUMOylées du riz lors d'un stress de haute température

3.1.1 Reconnaissance des protéines SUMO1 et SUMO2 du riz

Dans le but d'étudier le rôle de la SUMOylation dans la réponse au stress de haute température (HT) dans la plante *Oryza sativa*, il est important d'identifier les régions du génome ciblées par SUMO lors de ce stress. Connaître ces régions permettra de mieux comprendre le mécanisme de régulation induit par SUMO, en identifiant des protéines potentiellement SUMOylées lors d'un stress de HT. Plus précisément, on s'attend à repérer des zones du génome où s'accumulent des protéines SUMOylées, en particulier près de certains gènes sensibles à la chaleur. En étudiant ces régions, il devrait être possible d'identifier des facteurs de transcription ou des complexes régulateurs modifiés par SUMO, et d'avoir ainsi un aperçu plus concret des mécanismes qui contrôlent la réponse transcriptionnelle au stress de HT chez le riz. La méthode utilisée pour identifier ces régions est l'immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage (ChIP-Seq) qui permet de cartographier précisément ces interactions génomiques. Bien que des techniques récentes comme CUT&RUN ou CUT&Tag offrent une meilleure sensibilité et une réduction du bruit de fond (Meers *et al.*, 2019), la ChIP-Seq présente des avantages notables, notamment une couverture génomique complète et une meilleure résolution pour détecter les interactions complexes et transitoires. De plus, cette approche bénéficie de protocoles et d'outils bio-informatiques bien établis, assurant une analyse précise et reproductible des données. Pour isoler les protéines SUMO du riz, l'anticorps commercial anti-SUMO (Abcam, ab5316) a été utilisé. L'anticorps Abcam ab5316 est un polyclonal de lapin disponible depuis 2003, produit à partir d'une protéine recombinante complète de SUMO1 d'*Arabidopsis thaliana*, et validé pour des analyses en Western blot, notamment à une dilution de 1/1000. Cet anticorps a déjà été employé dans des expériences de ChIP-Seq dans *Arabidopsis thaliana* pour étudier l'effet de la SUMOylation sur le changement transcriptionnel qui se produit entre les mécanismes de croissance et développement et ceux concernant la réponse au stress de HT (Han *et al.*, 2021). Cet anticorps étant dirigé contre SUMO1 d'*Arabidopsis thaliana*, il était important de vérifier expérimentalement sa capacité à reconnaître les différents homologues de SUMO présents dans le riz. En effet, bien que les protéines OsSUMO1 et OsSUMO2 partagent une forte identité de séquence avec leur homologue d'*Arabidopsis* (Annexes A et B), aucune validation explicite de l'anticorps ab5316 pour la détection des protéines SUMO chez *Oryza sativa* n'a été documentée à ce jour dans la littérature

scientifique. Après avoir réalisé une analyse de similarité de séquence (Tableau A.1) entre OsSUMO1, OsSUMO2 et les protéines recombinantes AtSUMO1 et AtSUMO2, qui sont deux isoformes de la protéine SUMO d'Arabidopsis, nous avons constaté qu'OsSUMO1 et OsSUMO2 partageaient environ 97 % d'identité. AtSUMO1 présentait respectivement 95 % et 93,6 % de similarité avec OsSUMO1 et OsSUMO2. AtSUMO2 était légèrement plus distant de ses orthologues provenant du riz.

Pour ce faire, les formes matures des protéines OsSUMO1 et OsSUMO2 d'*Oryza sativa* ont été couplées à une étiquette de poly-histidine et ont été exprimées dans des souches *E. coli* puis purifiées par chromatographie d'affinité au nickel. La Figure 3.1 montre les différentes étapes de productions de ces protéines recombinantes. Les fractions 3 à 6 obtenues à la sortie de la colonne de nickel ont été combinées pour former l'échantillon protéines de fusion (6x-his-OsSUMO). Nous avons obtenu 10 mg pour la protéine de fusion OsSUMO1 et 10,7 mg pour la protéine de fusion OsSUMO2. Ces protéines ont ensuite été mises en présence d'une protéase TEV (*Tobacco Etch Virus* protéase) pendant une nuit à 4 °C avant d'être injectées sur une colonne de tamis moléculaire S75 (adapté à des protéines entre 1 et 30 kDa) pour une séparation efficace de nos protéines d'intérêt. La protéase TEV a clivé les étiquettes histidine permettant ainsi de récupérer nos protéines natives. Les fractions de 10 à 12 à la sortie du tamis ont été combinées puis concentrées. On a ainsi obtenu, 4,3 mg d'OsSUMO1 et 3,182 mg d'OsSUMO2. Les protéines recombinantes AtSUMO1 et AtSUMO2, déjà disponibles au laboratoire, avaient été préalablement validées pour leur fonctionnalité. Il s'agissait de premières tentatives d'expression et de purification pour ces protéines chez *E. coli*. Aucun rendement précis n'était attendu à ce stade, l'objectif principal étant d'obtenir des quantités suffisantes et une pureté compatible avec les essais fonctionnels ultérieurs. Les concentrations obtenues ont été jugées adéquates pour la suite des expérimentations. Ces rendements sont comparables à ceux généralement rapportés pour des protéines de petite taille exprimées dans des conditions similaires. Néanmoins, la capacité de ces antigènes recombinants à induire une réponse immunitaire spécifique et fonctionnelle demeure incertaine. Bien que privilégier les domaines conservés maximise la probabilité de reconnaissance, ce choix ne garantit pas la présence d'épitopes B-cell efficaces. Les régions les plus conservées peuvent être moins exposées ou immunogènes. Une approche complémentaire basée sur la prédiction bio-informatique d'épitopes B-cellulaires aurait permis de cibler des régions plus susceptibles de générer une réponse anticorps robuste (Jespersen *et al.*, 2017). Cette considération est particulièrement importante pour les applications nécessitant la reconnaissance de la protéine native, comme la ChIP.

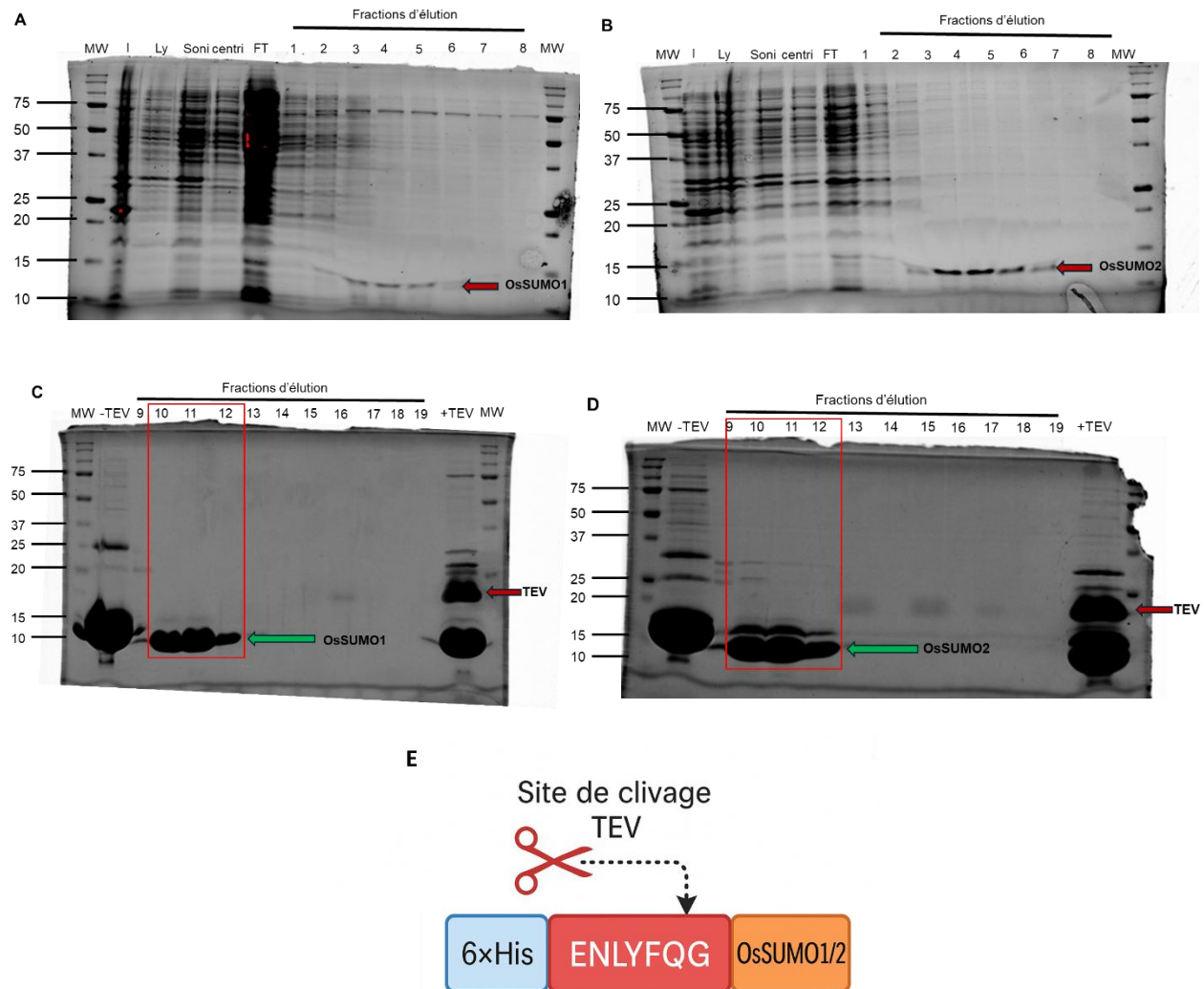


Figure 3.1 Expression et purification d'OsSUMO1 et OsSUMO2. Les souches *E. coli* BL21 contenant les plasmides d'intérêt ont été cultivées à 37 °C (Fraction NI = Non-induit). L'expression a été induite avec 100 µM d'IPTG (fraction I = Induit) et a duré toute une nuit à 18 °C. Les bactéries ont ensuite été lysées (Ly) dans un tampon de sucrose 20 % contenant du lysozyme puis soniquées (Soni). Le lysat a été centrifugé 30 minutes à 39191 x g (centri). Le surnageant a été purifié à l'aide d'une colonne de nickel et les déchets non-retenus (FT = *Flow through*) récupérés. Les protéines de fusion sont éluées en fractions de 1 mL avec un tampon contenant 500 mM d'Imidazole. Des aliquots provenant des différentes étapes précédentes ont été chargés sur un gel SDS page 15 % contenant du 2,2,2-trichloroéthanol (TCE). Les protéines SUMO, pauvres en tryptophanes, sont faiblement fluorescentes avec cette méthode ; elles restent néanmoins détectables. Les flèches rouges montrent les protéines de fusion obtenues avec **A**. OsSUMO1 et **B**. OsSUMO2 ainsi que la protéase TEV. Les fractions d'élution combinées à la sortie de la colonne de nickel ont ensuite été mis en présence de protéase TEV toute une nuit à 4 °C avant d'être injectées dans un tamis moléculaire Sephadex 75. Les flèches vertes montrent les protéines clivées et purifiées **C**. OsSUMO1 et **D**. OsSUMO2. **E**. Un schéma représentatif de la construction protéique OsSUMO1/2 + étiquette 6x-His obtenue post-expression met en évidence le clivage entre le Q et le G de la séquence ENLYFQG. L'encadré rouge présente les protéines collectées puis concentrées.

Sur la base de ces résultats, nous avons ensuite vérifié si l'anticorps commercial anti-SUMO1 (Abcam ab5316) reconnaissait bien les isoformes du riz. Les protéines recombinantes AtSUMO1 et AtSUMO2, ont été utilisées comme contrôles positifs (Figure 3.2). Le Western Blot (immunobuvardage de type Western) a révélé des bandes caractéristiques de SUMO à environ 12 kDa aussi bien pour les SUMOs du riz que ceux d'*Arabidopsis* avec une plus faible affinité avec AtSUMO2. Ce résultat démontre que l'anticorps commercial anti-SUMO1 ab5316 est capable de reconnaître les isoformes présents dans le riz et ont donc renforcé la pertinence de l'utilisation de cet anticorps pour les expériences de ChIP réalisées dans *Oryza sativa*.

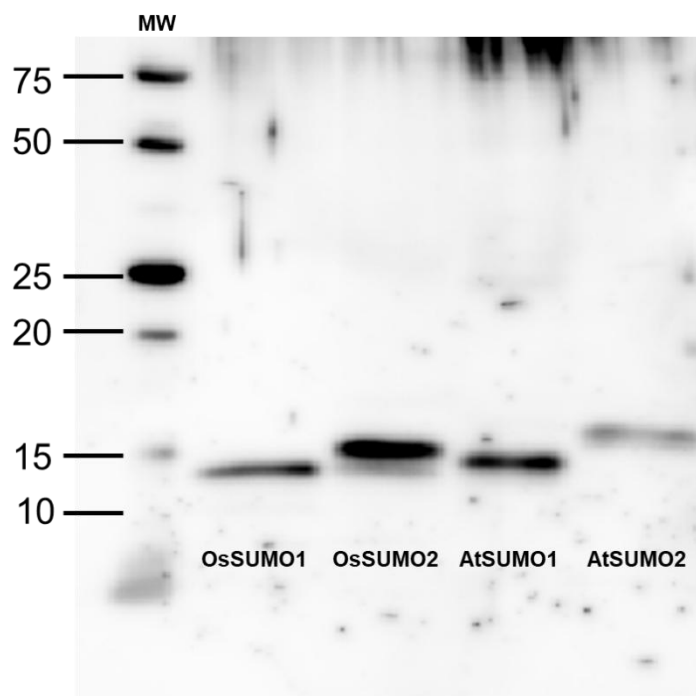


Figure 3.2 Reconnaissance des protéines SUMO du riz par l'anticorps commercial anti-SUMO par immunobuvardage. Les protéines recombinantes OsSUMO1, OsSUMO2, AtSUMO1 et AtSUMO2 ont été transférées sur une membrane PVDF puis incubées avec l'anticorps commercial anti-SUMO ab5316 à 4 °C pendant la nuit. Les quantités de protéines ont été normalisées à 24 ng. L'anticorps commercial a été dilué au 1 : 1000 dans un tampon TBST contenant 5% de lait pour la détection des protéines SUMO. Les résultats montrent la capacité de l'anticorps à reconnaître AtSUMO1, ainsi que les différentes formes de SUMO dans les extraits.

3.1.2 Analyse de la SUMOylation *in vivo* par ChIP-qPCR

Nous avons ensuite cherché à déterminer si des FTs ou d'autres protéines potentiellement impliquées dans la régulation de la réponse au stress de HT étaient effectivement SUMOylées, et si notre anticorps commercial anti-SUMO était capable de reconnaître ces protéines SUMOylées associées à l'ADN *in vivo*. Il

est important de noter ici qu'un anticorps performant en immunobuvardage, où les protéines sont dénaturées, n'est pas nécessairement efficace pour des applications comme l'immunoprécipitation ou la ChIP, qui nécessitent la reconnaissance de protéines à l'état natif. La capacité d'un anticorps à reconnaître un épitope dans un contexte tridimensionnel conservé peut donc différer, et il est essentiel de tester sa spécificité et son efficacité dans chaque type d'application. Pour cela, nous avons effectué une ChIP-qPCR, pour déterminer si un traitement à la chaleur a une incidence significative sur les taux de SUMOylation en quantifiant, au niveau des régions génomiques ciblées, l'enrichissement des protéines SUMOylées liées à l'ADN en fonction des conditions expérimentales. Des études antérieures ont montré que plusieurs facteurs de transcription, notamment DREB2A et certains HSFs, sont SUMOylés de manière constitutive chez *Arabidopsis*, et que cette modification est fortement amplifiée lors d'un stress de HT (Miller et Vierstra, 2011 ; Rytz et al., 2018). Sur cette base, nous avons formulé l'hypothèse que des régulateurs similaires pourraient être SUMOylés chez le riz, même en absence de stress, et que cette SUMOylation pourrait s'intensifier en condition de HT. L'hypothèse sous-jacente est que certaines protéines régulatrices, notamment des FTs, sont SUMOylées de façon constitutive, mais que leur SUMOylation s'accroît en situation de stress de HT, ce qui pourrait influencer leur capacité à se lier à l'ADN, ou leur stabilité sur des promoteurs de gènes cibles impliqués dans la réponse au stress. En utilisant un anticorps dirigé contre les protéines SUMOylées, la ChIP-qPCR nous permet donc de quantifier l'enrichissement en ADN co-immunoprécipité correspondant à des régions promotrices spécifiques. Une augmentation de cet enrichissement dans des conditions de stress de HT par rapport à la condition témoin serait alors interprétée comme un indicateur d'une augmentation de la SUMOylation de protéines associées à ces régions. Cette approche peut permettre à la fois de valider l'utilisation de notre anticorps dans un contexte *in vivo* dans le riz, mais aussi d'explorer l'implication potentielle de la SUMOylation dans la régulation transcriptionnelle induite par le stress de HT.

Le Tableau 3.1 présente les séquences amplifiées par qPCR. Les amorces sens et antisens ont été synthétisées par IDT et ont été conçues pour cibler des régions promotrices de gènes connus pour être impliqués dans la réponse au stress de HT chez le riz. Dans ce contexte, les promoteurs ont été définis comme les 1000 pbs situés en amont du site d'initiation de la transcription. Ces régions contiennent des éléments de réponse au stress de HT, notamment des motifs HSE, reconnus par les facteurs de transcription de type HSF (*Heat Shock Factor*). Parmi les gènes sélectionnés, Os03g0161900 et Os06g0565200 codant pour les protéines OsHSFA2d et OsHSFA6 ont été choisis comme contrôles positifs, car fortement induits en réponse à un stress de HT et jouent un rôle central dans l'activation de gènes

cibles, tels que les HSPs (*Heat Shock Protein*). Une analyse transcriptomique réalisée sur différents cultivars d'*Oryza sativa* soumis à un stress de HT montre une surexpression marquée de ces deux gènes dès les premières heures (notamment dès 1 heure après induction du stress, ce qui correspond au temps de collecte utilisé dans notre protocole) d'exposition à la chaleur (Wilkins *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'étude identifie dans les promoteurs de ces gènes la présence des motifs canoniques HSE de type « TTCnnGAAnnTTC », motifs spécifiques de liaison pour les protéines HSFs (surlignés en vert). Ces motifs sont donc associés à des sites de recrutement de complexes transcriptionnels actifs. Chez *Arabidopsis*, des études (Han *et al.*, 2021) ont montré que des facteurs HSF, notamment HSFA6A, présentent une forte association entre leur motif de fixation et des régions enrichies en SUMOylation sous stress de HT ($p < 1E-23$). Cela soutient l'idée que des facteurs similaires, comme OsHSFA6 chez le riz, pourraient être SUMOylés au niveau de leurs sites cibles, en lien avec la régulation transcriptionnelle induite par la chaleur. Le choix de ces promoteurs comme cibles pour nos expériences de ChIP-qPCR visait donc à évaluer la présence de protéines SUMOylées associées à ces loci, en condition de stress de HT. Une augmentation de l'enrichissement en SUMO sur ces régions pourrait indiquer l'implication de la SUMOylation dans la régulation de ces gènes, renforçant leur rôle clé dans la réponse transcriptionnelle au stress. Nous avons utilisé FIMO (*Find Individual Motif Occurrences*) v5.5.1, un outil de la suite MEME (*Multiple EM for Motif Elicitation*) v5.5.1, pour trouver l'emplacement de ces motifs canoniques de liaison des HSFs au niveau des promoteurs des gènes Os03g0161900 et Os06g0565200. La suite MEME regroupe plusieurs algorithmes conçus pour détecter, analyser et classer les motifs dans des séquences biologiques, dont MEME pour la découverte de novo (Bailey *et al.*, 2006) et FIMO qui explore les séquences d'ADN pour y repérer des motifs déjà caractérisés, en attribuant à chaque site un score de vraisemblance et une *p*-valeur d'occurrence (Grant *et al.*, 2011).

À l'inverse, le gène Os04g0182800, codant pour la sous-unité β de l'*Electron-Transfer Flavoprotein* (OsETF β), a été sélectionné comme contrôle négatif. Ce gène, impliqué dans le métabolisme énergétique mitochondrial, n'est pas connu pour être régulé par le stress de HT. Les données transcriptomiques disponibles, notamment celles issues de bases de données comme RiceXPro (Sato *et al.*, 2011), indiquent que son expression reste stable. Dans d'autres bases de données comme Rice eFP (*Rice electronic Fluorescent Pictograph Browser*; (Winter *et al.*, 2007)), un outil de visualisation d'expression génique basé sur les résultats de transcriptomique, les données spécifiques au stress de HT ne sont pas disponibles, mais les niveaux d'expression dans d'autres stress abiotiques comme la sécheresse ont permis de spéculer un profil généralement stable en condition de stress de HT. Par ailleurs, l'analyse de son promoteur ne révèle

pas de motifs HSE typiques, suggérant qu'il n'est pas une cible des facteurs HSFs. En complément, pour nos qPCR, nous avons également utilisé comme gènes de référence internes la polyUbiquitine 5 (OsUBQ5) et le facteur d'élongation 1-alpha d'*Oryza sativa* (OSeEF-1 α). En effet, dans une étude cherchant à déterminer la stabilité d'expression de gènes de référence chez *Oryza sativa*, couvrant divers tissus et plusieurs conditions de stress, y compris le stress de HT, OsUBQ5 et OSeEF-1 α se sont révélés les plus stables par rapport aux autres gènes évalués, avec les valeurs de stabilité (M) les plus faibles. Cette valeur M, représente l'écart-type moyen des rapports d'expression entre un gène donné et tous les autres du panel de candidats. Plus M est faible, plus l'expression du gène est considérée comme constante, justifiant ainsi leur choix comme contrôles fiables pour la normalisation de l'expression génique en tant que témoins biologiques dans notre ChIP-qPCR (Jain *et al.*, 2006). Il est important de noter qu'aucun gène de référence n'a été utilisé pour la normalisation, car il ne s'agissait pas d'une analyse d'expression (pas de RT-qPCR) et que les résultats ont été exprimés en % Input (voir section Méthodes et Annexe C).

Tableau 3.1 Sélection de gènes potentiellement régulés par SUMOylation lors du stress de haute température chez le riz

Gène	Séquence promotrice	Position génomique	Publications
OsHSFA2d Os03g0161900	Cgaacctcagccacactccaggcttcgcttccgg aagcttcgccgatccggccgcccgcacgaaccgc gcggtctagaacctccattcctctctctgg	chr03 : 3,342,131...3,342,235 (brin +)	Wilkins <i>et al.</i> , 2016
OsHSFA6 Os06g0565200	gccttctctagtagcttccagaatgttcggttcct cctataaattacaaaatcccacttcttctccgccca aaagcacgccgatggactactcgacgggtga	chr06 : 21,761,214...21,761,319 (brin +)	Wilkins <i>et al.</i> , 2016
OsETF β Os04g0182800	caagctaattggtctcgattccgccatcgacctctc tctccacagtagccttttctgttcaatataacct gccagaatcaaacagc	chr04 : 5,637,287...5,637,364 (brin -)	(Araújo <i>et al.</i> , 2011)
OseEF-1 α Os03g08050	ttaagtaacctgatctgtgagcttacctgtaatat ttatttgtttctaattcttgtttcattctatgccga gttagctacctcttattcaaccatg	chr3 : 4,111,404...4,111,502 (brin +)	Jain <i>et al.</i> , 2006
OsUBQ5 Os01g0328400	cgggagaaaccacaggttaagggaagcgccgcc gccgctgcggccgcccgaagatgcagatcttc gtgaagaccctgacggggaagacgatcacgctg gag	chr1 : 12,646,764... 12,646,866 (brin -)	Jain <i>et al.</i> , 2006

Légende : Les régions promotrices des gènes OsHSFA2d et OsHSFA6 ont été sélectionnées comme cibles potentielles de la SUMOylation lors de la réponse au stress de haute température chez *Oryza sativa*. OsHSFA2d et OsHSFA6 sont impliquées dans la régulation du stress de HT. Leurs promoteurs possèdent le

motif canonique de liaison à l'ADN « TTCnnGAAnnTTC » des HSFs surligné en vert. OsETF β , lui, est un gène codant pour la sous-unité β de l'*Electron-Transfer Flavoprotein* et impliqué dans la respiration mitochondriale et la gestion énergétique et utilisé comme contrôle négatif. OsEF-1 α et OsUBQ5 sont des gènes de référence d'*Oryza sativa* utilisé comme contrôle négatif. Les délimitations d'amorces sont présentées en bleu. Ces amorces ont été utilisées par la suite pour les ChIP-qPCR avec l'anticorps anti-SUMO.

La Figure 3.3 présente les résultats de la ChIP-qPCR réalisée à partir de plants de riz soumis ou non à un stress thermique (40 °C pendant 1 h). L'enrichissement en protéines SUMOylées au niveau de régions promotrices ciblées a été évalué par qPCR, en utilisant les amorces listées dans le Tableau 2.1. Les résultats de la ChIP-qPCR ont montré un enrichissement attendu des protéines SUMOylées au niveau des promoteurs des gènes codant pour les protéines OsHSFA2d et OsHSFA6 ($p = 0,048$ et $p = 0,017$ respectivement) à la suite du traitement à la chaleur, par rapport aux conditions optimales confirmant une SUMOylation accrue sous stress de HT. À l'inverse, OsETF β et OsEF-1 α , utilisés comme gènes de référence, ne présentent pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les deux conditions. OsETF β apparaît plutôt comme un marqueur de SUMOylation constitutive qu'un témoin négatif. En effet, il affiche un enrichissement élevé (≈ 135 % en contrôle, ≈ 127 % en stress) proche de celui des vrais loci SUMOylés en stress de HT (HSFA2d/HSFA6) contrairement à OsEF-1 α et UBQ5, qui restent à un pourcentage « Input » très bas ($\approx 5-8$ %) en contrôle comme en stress. Enfin, le pourcentage « Input » de UBQ5, attendu stable, varie significativement sous stress ($p = 0,048$), suggérant que son utilisation comme référence devra être réévaluée. Ces résultats ont confirmé que l'anticorps anti-SUMO utilisé est capable d'immunoprécipiter des complexes protéines-ADN dans un contexte in vivo chez le riz. Cette validation a donc ouvert la possibilité d'étendre l'approche à des analyses à plus grande échelle, telles que le ChIP-Seq.

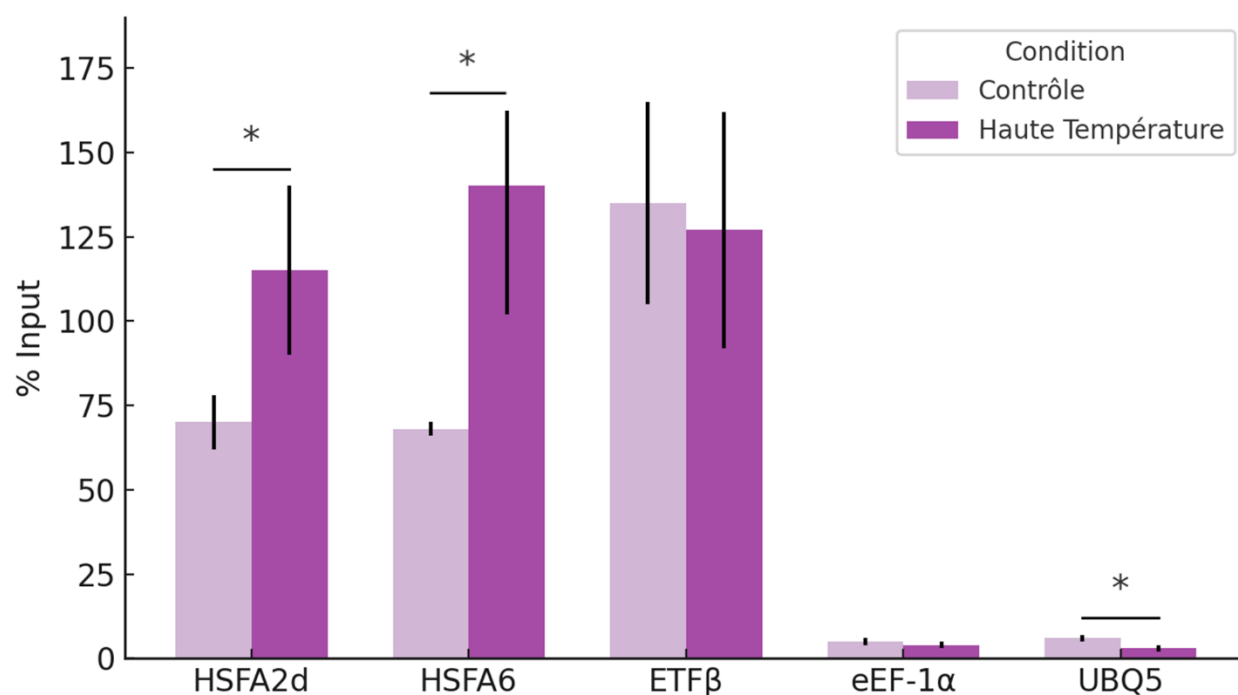


Figure 3.3 Expression relative des promoteurs des gènes cibles sous stress de haute température par rapport à des conditions contrôle par ChIP qPCR avec l'anticorps anti-SUMO. Des graines de riz ont été germées et cultivées à 28 °C pendant 14 jours, puis soumises ou non à un stress de haute température de 40 °C pendant 1 h. Après immunoprécipitation avec l'anticorps anti-SUMO, L'ADN a été nettoyé puis récupéré à raison de 0,036 ng/μL en contrôle et 0,070 ng/μL en stress. Des « Inputs » non précipité ont également été récupéré à raison de 2,22 ng/μL en contrôle et 2,70 ng/μL en stress. Chaque échantillon a été analysé par qPCR avec des amorces ciblant les promoteurs listés au Tableau 3.1. Le % Input correspond à la quantité d'ADN précipitée rapportée à l'input initial et corrigée avec le facteur de dilution (respectivement 62 et 39 pour conditions contrôle et stress). Les barres indiquent la moyenne des trois réplicats et les tirets verticaux représentent l'écart-type (n = 3). Les astérisques signalent les différences significatives entre contrôle et stress (* p ≤ 0,05 ; ** p ≤ 0,01), calculées à l'aide d'un test t de *Student* bilatéral non-apparié.

3.1.3 Identification des régions génomiques ciblées par SUMO lors d'un stress de HT

Dans le but d'identifier les régions du génome du riz ciblées par des protéines SUMOylées lors d'un stress thermique, un ChIP-Seq a été réalisé à partir de feuilles cultivées en condition contrôle ou soumises à un stress de HT d'une heure. L'anticorps anti-SUMO, validé précédemment par ChIP-qPCR, a été utilisé pour immunoprécipiter les complexes protéines-ADN. La librairie contenant l'ADN enrichi et comportant des fragments allant de 298 pb à 358pb (Tableau 2.2) a été séquencée sur plateforme Illumina, générant des lectures paires de 2 x 100 pb. Les fichiers bruts ont été analysés en utilisant la plateforme UseGalaxy

Canada, un service offert par Calcul Québec (CalculQuebec.ca), l'Alliance de recherche numérique du Canada (Alliancecan.ca) et l'Université de Sherbrooke (USherbrooke.ca). Ces fichiers ont été soumis à un contrôle qualité (FastQC), puis nettoyés avec FastP pour retirer les adaptateurs et les lectures de faible qualité. Les lectures nettoyées ont été alignées au génome de référence IRGSP-1.0 d'*Oryza sativa* Nipponbare à l'aide de Bowtie2. Les Tableaux 3.2 et 3.3 résument les principales statistiques de qualité. Seuls les réplicats présentant un taux de lectures conservées après FastP $\geq 90\%$, un taux d'alignement $\geq 95\%$, plus de 10 M de lectures alignées et au moins 10 000 pics (FDR < 0,05) ont été conservés selon les recommandations de ([An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome., 2012](#) ; [Landt et al., 2012](#)). Le 3^e réplicat en condition de stress de HT (1,64 M lectures brutes, 5,5 % de lectures conservées, 88 000 lectures alignées, 0 pic) et le réplicat 1 en condition contrôle (117 M lectures brutes, 93,5 % de lectures conservées, 107 M lectures alignées, 48 pics) ont été exclus pour couverture insuffisante et nombre trop limité de pics. Pour les réplicats conservés, le taux de rétention post-nettoyage était supérieur à 90 %, le taux d'alignement dépassait 95 %, et le taux de duplication se situait entre 21 % et 25 %, des valeurs compatibles avec les seuils généralement attendus pour des jeux de données ChIP-Seq ([Landt et al., 2012](#)), y compris dans des études réalisées chez *Oryza sativa*. L'appel des pics a été effectué à l'aide de l'algorithme MACS2, en comparant les conditions HT aux échantillons « inputs », avec une valeur seuil de FDR inférieure à 0,05. Un pic en ChIP-Seq, correspond à une zone du génome où on observe un grand nombre de lectures de séquençage par rapport au reste de l'ADN. Concrètement, lorsqu'on aligne les lectures obtenues post séquençage sur le génome, certaines régions accumulent beaucoup plus de lectures que d'autres formant ainsi des « collines » de lecture à des positions génomiques spécifiques. Ces zones de forte accumulation s'appellent des pics et correspondent aux sites probables de liaison de la protéine. MACS2 est un outil qui identifie ces pics d'accumulation de lectures ChIP-Seq en comparant le signal observé à un bruit de fond local à l'aide des « inputs », soit les échantillons d'ADN avant immunoprécipitation avec l'anticorps anti-SUMO. Le nombre de pics détectés variait ainsi avec en condition contrôle 28 103 pour le 2^e réplicat et 80 721 pour le 3^e réplicat. En situation de stress de HT nous avons obtenu 81 421 pour le réplicat 1 et 76 494 pour le réplicat 2. On note une différence notable de 52 618 pics (soit +187 %) entre les deux réplicats contrôle (réplicat 2 vs réplicat 3).

Tableau 3.2 Statistiques de qualité des données ChIP-Seq obtenues à partir de feuilles de riz traitées en conditions contrôle

Échantillons sortie ChIP- Seq	Input contrôle 1	ChIP contrôle 1	Input contrôle 2	ChIP contrôle 2	Input contrôle 3	ChIP contrôle 3
Lectures bruts (FastQ)	210,999,000	117,152,505	137,584,545	124,744,402	101,898,534	59,090,791
Lectures après FastP	206,067,390	109,473,652	131,898,219	120,196,527	100,544,903	56,621,801
Taux de conservation des lectures (%)	97,65 %	93,45 %	95,88 %	96,36 %	98,69 %	95,82 %
Lectures alignés (Bowtie2)	59,14 %	97,69 %	99,32 %	97,34 %	99,55 %	95,02 %
Taux de duplication (%)	31,36 %	22,08 %	19,52 %	25,21 %	18,28 %	24,07 %
Taille estimée de la bibliothèque	60 015 681	83 681 854	905 907 986	91 051 652	460 975 730	40 495 134

Nombre de pics détectés (MACS2)	—	48	—	28 103	—	80 721
--	---	----	---	--------	---	--------

Légende : Trois réplicats ChIP-Seq ont été réalisés sur des feuilles de riz en condition contrôle. Les lectures brutes (FastQ) correspondent aux lectures paires générées par la plateforme Illumina. Les lectures après FastP représentent les lectures conservées après nettoyage. Le taux de conservation des lectures indique la proportion de lectures conservées après filtration. Les lectures alignées et le taux d'alignement correspondent à l'alignement des lectures nettoyées sur le génome de référence d'*Oryza sativa* (IRGSP-1.0) via Bowtie2. Les duplicats ont été identifiés à l'aide de MarkDuplicates. Le nombre de pics détectés a été obtenu avec MACS2 (q-value < 0,05), comparant chaque réplicat traité (ChIP) à son input contrôle respectif. Seuls les réplicats présentant des critères de qualité suffisants ont été retenus pour les analyses en aval.

Tableau 3.3 Statistiques de qualité des données ChIP-Seq obtenues à partir de feuilles de riz traitées en conditions de stress de haute température

Échantillons sortie ChIP-Seq	Input Heat 1	ChIP Heat 1	Input Heat 2	ChIP Heat 2	Input Heat 3	ChIP Heat 3
Lectures bruts (FastQ)	137 584 545	134 608 542	137 584 545	133 304 707	101 898 534	1 640 656
Lectures après FastP	109 129 688	126 404 168	131 898 219	126 402 335	100 544 903	90 655
Taux de conservation des lectures (%)	98,19 %	93,91 %	95,88 %	94,83 %	98,69 %	5,53 %

Lectures alignés (Bowtie2)	99,60 %	96,56 %	99,32 %	97,93 %	99,55 %	97,09 %
Taux de duplication (%)	16,46 %	23,47 %	15,61 %	21,35 %	17,11 %	16,70 %
Taille estimée de la bibliothèque	647 567 452	572 785 460	825 192 647	800 871 826	555 060 416	431 148
Nombre de pics détectés (MACS2)	–	81 421	–	76 494	–	0

Légende : Trois réplicats ChIP-Seq ont été réalisés sur des feuilles de riz soumises à un stress de Haute température (HT). Les lectures brutes (FastQ) correspondent aux lectures paires générées par la plateforme Illumina. Les lectures après FastP représentent les lectures conservées après nettoyage. Le taux de conservation des lectures indique la proportion de lectures conservées après filtration. Les lectures alignées et le taux d'alignement correspondent à l'alignement des lectures nettoyées sur le génome de référence d'*Oryza sativa* (IRGSP-1.0) via Bowtie2. Les duplicats ont été identifiés à l'aide de MarkDuplicates. Le nombre de pics détectés a été obtenu avec MACS2 (q-value < 0,05), comparant chaque réplicat traité (ChIP) à son input contrôle respectif. Seuls les réplicats présentant des critères de qualité suffisants ont été retenus pour les analyses en aval.

Pour évaluer la qualité et la cohérence de nos données ChIP-Seq, nous avons tout d'abord comparé les deux réplicats biologiques en condition contrôle et les deux sous stress de HT retenus précédemment. Nous avons utilisé DiffBind pour faire cette comparaison de l'occupation de l'ADN par la SUMOylation entre conditions et réplicats. Il s'agit d'un outil bio-informatique qui réunit toutes les régions enrichies (pics) détectées dans chaque échantillon, mesure le nombre de lectures ChIP dans chacune de ces régions pour chaque réplicat, puis ajuste ces valeurs pour corriger les différences de profondeur de séquençage. DiffBind repose sur deux méthodes statistiques principales pour l'analyse différentielle : edgeR et DESeq2

(Ross-Innes *et al.*, 2012 ; Stark et Brown, s. d.). DESeq2 ajuste les données à l'aide d'un modèle de régression généralisée à partir d'une loi binomiale négative, en estimant les facteurs de normalisation et la dispersion à travers les échantillons. Cela permet une détection fiable des différences d'occupation des pics entre conditions. La Figure 3.4 montre la reproductibilité entre nos différents réplicats. Nous avons constaté que seuls 11 920 pics (30 %) sont partagés entre les réplicats 2 et 3 en conditions contrôle (Figure 3.4.A), alors que 24 935 pics (59 %) le sont entre les deux réplicats en stress de HT (Figure 3.4.B). L'analyse en composantes principales confirme cette tendance. Une analyse en composantes principales (PCA) réalisée sur les comptages normalisés de l'ensemble des régions détectées par DiffBind (Figure 3.4.C) ne montre pas un regroupement des réplicats de chaque condition. Sur le premier axe (48 % de variance) qui démontre la variabilité entre conditions, les deux contrôles sont très dispersés avec le réplicat 3 qui se retrouve du côté de ceux en condition de stress. Les réplicats stress, eux restent plutôt groupés. La deuxième composante (PC2, 30%) démontre la variabilité interne à chaque groupe et on remarque une certaine disparité entre les différents réplicats d'une même condition. Enfin, la matrice de corrélation des lectures normalisées (Figure 3.4.D) révèle une corrélation très faible ($< 0,5$) pour les contrôles (absence de reproductibilité satisfaisante) contre une corrélation plus forte (entre 0,6 et 0,7) pour les réplicats stress (forte cohérence). Cette faible concordance de nos réplicats contrôle suggère qu'il faut interpréter ces résultats différentiels préliminaires avec prudence et en nous appuyant sur les pics « consensus » pour limiter les erreurs.

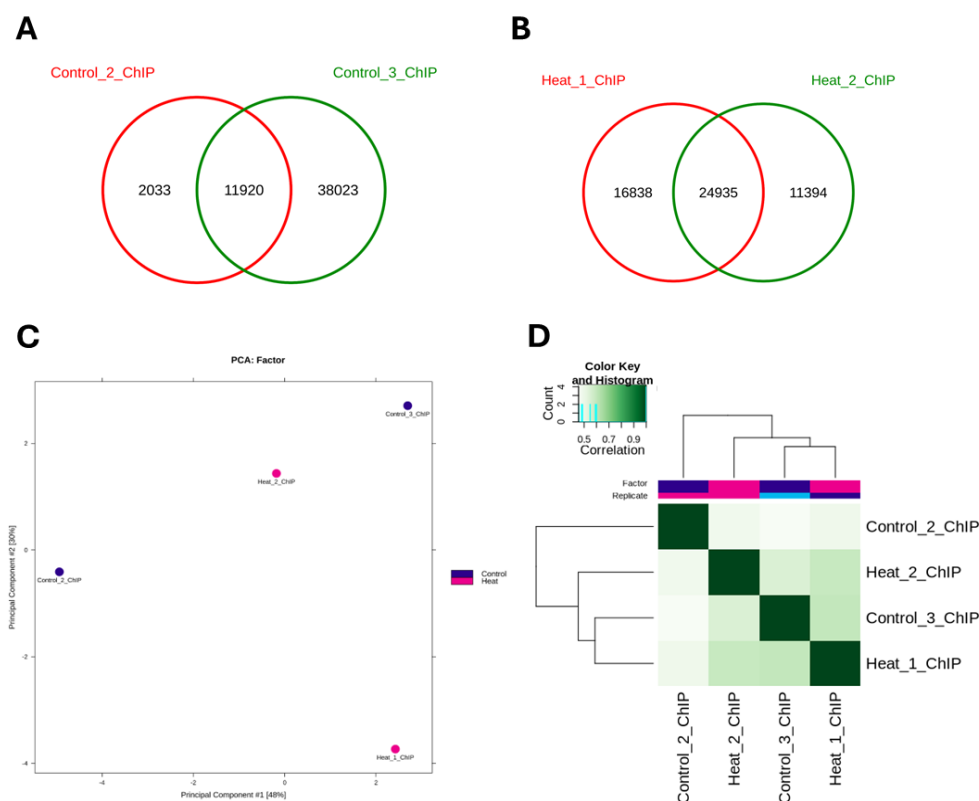


Figure 3.4 Evaluation de la reproductibilité des réplicats ChIP-Seq en conditions contrôle et stress de haute température. **A.** Diagramme de Venn illustrant le chevauchement des pics détectés entre les réplicats Contrôle 2 et Contrôle 3. **B.** Diagramme de Venn pour les réplicats Haute Température 1 et 2. **C.** Analyse en composantes principales (PCA) réalisée sur l'ensemble des régions enrichies, montrant la variabilité entre les réplicats d'un même groupe (PC1 48 % de variance) et la variabilité entre des conditions différentes (PC2 30% de variance). **D.** Matrice de corrélation et clustering hiérarchique des lectures normalisées.

Après avoir évalué la reproductibilité de notre jeu de données, nous avons ensuite effectué des analyses différentielles préliminaires afin de comparer les sites de SUMOylation détectés en condition de stress et en condition contrôle (Figure 3.5). Le diagramme de Venn présente un ensemble de 9 301 pics « consensus » présents dans au moins un réplicat de chaque condition définis à l'aide de DiffBind. Les analyses différentielles qui suivent ont été basées sur ces régions. Une analyse en composantes principales (PCA) réalisée sur les comptages normalisés de ces régions (Figure 3.5.B) confirme la séparation nette des deux conditions. La première composante (PC1, 82 % de la variance) isole clairement les réplicats contrôle de ceux stress de HT, tandis que la deuxième composante (PC2, 15 %) démontre la variabilité interne à

chaque groupe. En situation de stress les réplicats sont plutôt proches alors qu'en condition contrôle, la variabilité est maximale ce qui vient appuyer les résultats présentés dans la Figure 3.4. Pour identifier les changements statistiques significatifs relatifs à la distribution de SUMO, nous avons appliqué à ces données le modèle edgeR, également intégré à DiffBind. EdgeR repose sur une loi binomiale négative pour modéliser les comptages, et utilise une approche de modération de la dispersion pour augmenter la puissance statistique, particulièrement dans les jeux de données avec un faible nombre de réplicats. Le graphique en volcan (*volcano plot*, Figure 3.5.C) met en évidence 249 sites avec un $\log_2 FC \geq 1$ et une valeur p non ajustée $\leq 0,1$. Ce seuil volontairement plus permissif a été retenu à cette étape exploratoire afin d'augmenter la sensibilité de détection dans un contexte à faible nombre de réplicats biologiques. Nous reconnaissons que ce seuil est supérieur à la norme statistique conventionnelle ($p \leq 0,05$), mais les résultats ainsi obtenus ont été interprétés avec prudence, comme le suggèrent également les distributions distinctes des signaux observées au niveau des sites sélectionnés (Figure 3.5.D). Parmi ces 249 sites, 157 présentent un enrichissement sous stress de HT ($\log_2 FC > 0$, amplitudes jusqu'à +7) et 92 sont plus occupés en contrôle ($\log_2 FC < 0$, amplitudes jusqu'à -5). Enfin, la boîte à moustaches (*boxplot*, Figure 3.5.D) compare, pour ces 249 régions, la distribution des lectures ChIP normalisées ($\log_2$). Les sites enrichis sous stress présentent une médiane de signal plus élevée ($\approx 6,2$) et une dispersion plus large (IQR $\approx 1,5$), tandis que les sites enrichis en contrôle affichent une médiane plus basse ($\approx 4,8$) et une variabilité plus faible (IQR $\approx 0,9$). L'IQR, ou étendue interquartile, correspond à la différence entre le 75^e et le 25^e percentile, soit le 3^e et le 1^{er} quartile. Ici, elle indique que 50 % des valeurs de signal ChIP normalisées pour les sites sous stress s'étalent sur 1,5 unité $\log_2$, contre seulement 0,9 unité $\log_2$ pour les sites contrôle indiquant ainsi une dispersion plus resserrée autour de la médiane en contrôle plutôt qu'en stress de HT. À ce stade, les résultats sont présentés sans correction pour les tests multiples (p -values non ajustées), ce qui implique que les conclusions doivent être interprétées avec prudence. Ils offrent malgré tout un aperçu utile des tendances de redistribution de la SUMOylation sous stress de HT. Une validation indépendante de ces sites candidats sera nécessaire pour confirmer leur pertinence fonctionnelle.

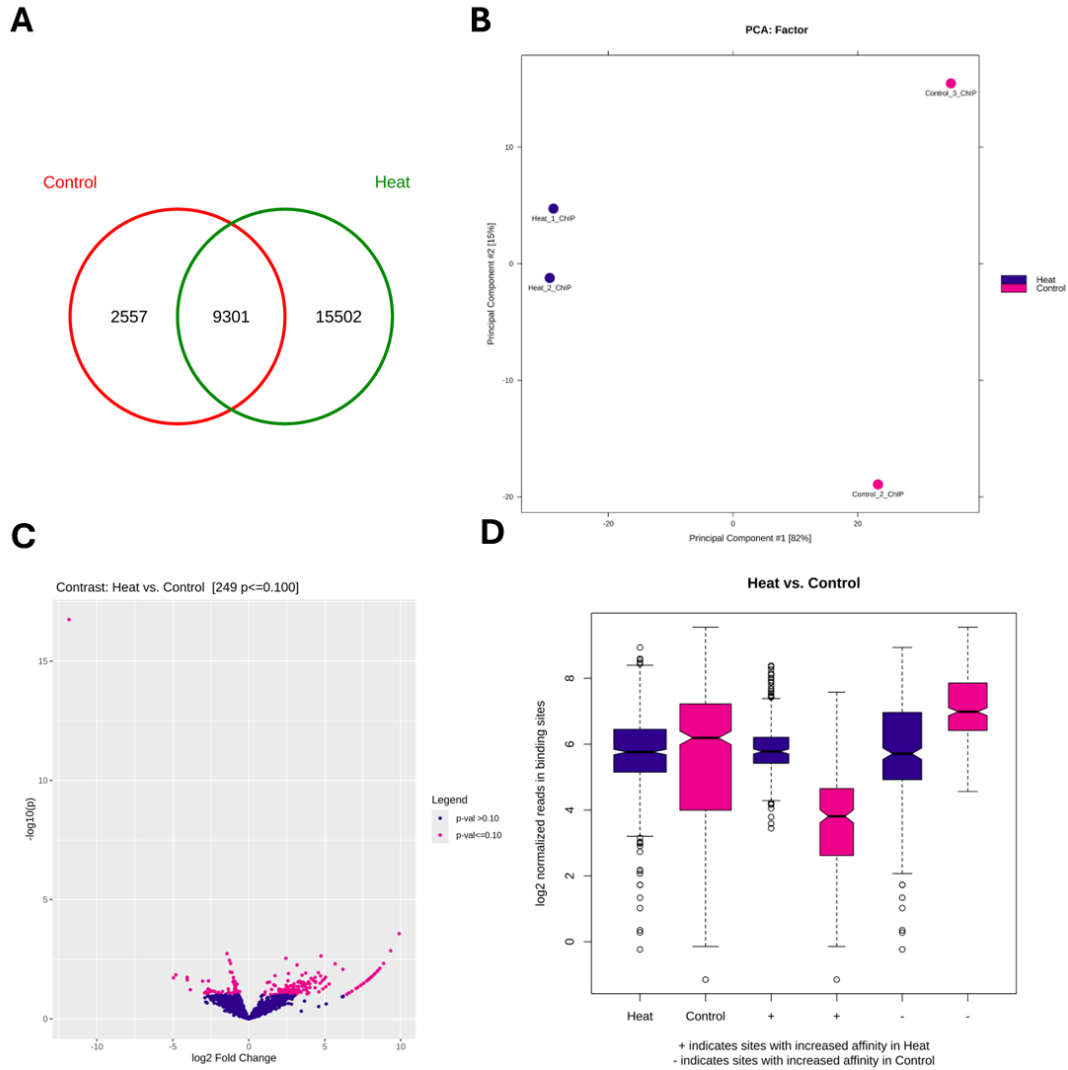


Figure 3.5 Caractérisation des régions différenciellement SUMOylées sous stress de haute température. **A.** Diagramme de Venn montrant le recouvrement des pics « consensus » entre conditions contrôle et stress de HT. **B.** Analyse en composantes principales (PCA) sur les comptages normalisés des 9 301 régions partagées : la composante 1 (82 % de la variance) sépare nettement les échantillons contrôles réplicats 2 et 3 (à droite) des échantillons en stress de HT réplicats 1 et 2 (à gauche). **C.** Graphique en volcan issu d'edgeR pour le contraste stress vs contrôle. chaque point représente un site SUMOylé. Sur l'axe horizontal, la variation moyenne de l'occupation entre stress et contrôle ($\log_2$ Fold Change) : à droite, les sites plus enrichis sous Stress ; à gauche, ceux plus enrichis en Contrôle. Sur l'axe vertical, la significativité de ce changement ($-\log_{10}(\text{p-value})$) : plus un point est haut, plus la différence est fiable. Les points roses sont les 249 sites dont la p-value non ajustée $\leq 0,1$, c'est-à-dire les pics véritablement impactés par la chaleur. **D.** Boîte à moustaches des lectures normalisées ($\log_2$) dans les 249 pics différenciellement enrichis sous stress (« + ») versus les 205 pics détectés uniquement par DESeq2 (« - »). Chaque boîte correspond à la distribution des comptages ChIP normalisés dans les deux catégories de sites. La boîte de gauche regroupe les sites enrichis sous stress de HT ($\log_2 \text{FC} > 0$), la boîte de droite ceux plus abondants en condition contrôle ($\log_2 \text{FC} < 0$).

3.2 Production d'anticorps spécifiques anti-OsSIZ1/2

Afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation impliquant la SUMOylation lors d'un stress de haute température, nous nous sommes également intéressés aux sites de liaison à l'ADN des protéines SUMO E3 ligases OsSIZ1 et OsSIZ2. En effet, ces protéines facilitent l'ajout de protéines SUMO en reconnaissant des substrats spécifiques et en stimulant l'apposition de SUMO sur ces cibles. Comme mentionné dans l'introduction, elles possèdent un domaine SAP, connu pour sa capacité à interagir directement avec l'ADN, suggérant qu'elles pourraient se fixer à des régions régulatrices précises du génome. L'identification de leurs sites de liaison à l'ADN par ChIP-Seq permet de localiser les régions où ces ligases exercent potentiellement leur activité. Tandis que le ChIP-Seq utilisant l'anticorps anti-SUMO permet d'étudier comment la SUMOylation régule la réponse au stress en ciblant des gènes spécifiques, un ChIP-Seq utilisant des anticorps dirigés contre les SUMO E3 ligases nous renseigne sur les sites exacts où la SUMOylation se produit, ajoutant ainsi une dimension supplémentaire sur les mécanismes de régulation en amont. La combinaison des profils de fixation des protéines SUMOylées et des ligases OsSIZ1/2 permettrait d'identifier les régions de chevauchement susceptibles de correspondre à des sites de régulation transcriptionnelle actifs. Cette approche intégrée offrirait une vue d'ensemble des mécanismes associés à la SUMOylation, en reliant les enzymes responsables du dépôt à leurs cibles potentielles. Une telle analyse permettrait, par exemple, d'inférer des facteurs de transcription SUMOylés impliqués dans la réponse au stress thermique. Dans cette optique, nous avons donc entrepris de produire un anticorps capable de reconnaître spécifiquement OsSIZ1 et OsSIZ2, afin de cartographier leurs sites de fixation dans le génome du riz.

3.2.1 Modélisation par AlphaFold des protéines recombinantes OsSIZ1 et OsSIZ2

Les expériences de ChIP-Seq nécessitent l'utilisation d'anticorps hautement spécifiques, un facteur critique influençant la qualité et la fiabilité des résultats obtenus. En effet, la moindre variabilité dans la spécificité ou l'affinité des anticorps peut se traduire par des enrichissements artificiels, entraînant des faux positifs ou des pertes de signal dans l'analyse des profils ChIP-Seq. La production d'anticorps polyclonaux requiert une quantité suffisante de protéines purifiées pour permettre plusieurs immunisations. Bien qu'en générale, environ 1 mg de protéine totale puisse suffire pour la production d'un anticorps polyclonal (réparti sur plusieurs injections), le fournisseur MediMabs, qui a assuré la production de nos anticorps, recommande l'utilisation de 3 à 5 mg de protéine purifiée afin de garantir un taux d'immunisation optimal dans le cadre de leurs procédures standard. Ce seuil plus élevé reflète une volonté de standardiser les protocoles et d'augmenter la probabilité de succès, car certains fournisseurs

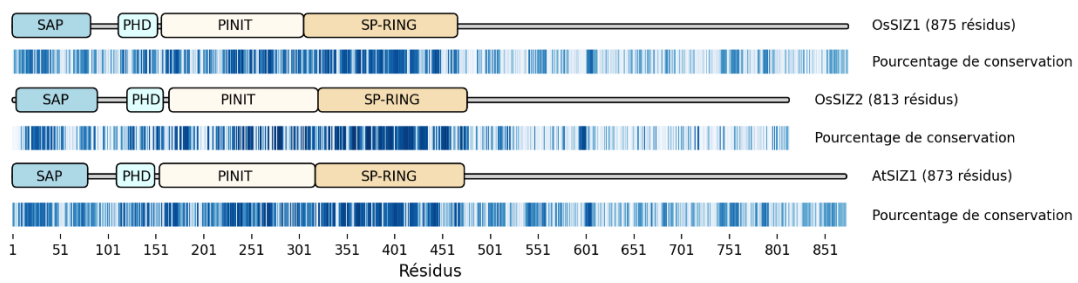
appliquent des recommandations différentes selon leurs propres critères de rendement. Par ailleurs, la spécificité des anticorps dépend principalement de la pureté et de la nature des épitopes présentés lors de l'immunisation, et non simplement de la quantité de protéine injectée. La sélection d'épitopes stables et bien structurés constitue donc un facteur déterminant, car elle limite la reconnaissance de régions désordonnées souvent non pertinentes sur le plan fonctionnel.

Pour répondre à ces exigences, nous avons opté pour la production de protéines recombinantes, une méthode rapide, fiable et économique permettant l'obtention de protéines en grande quantité et avec un niveau de pureté compatible avec les applications immunologiques. Ce choix présente aussi un avantage par rapport à l'extraction de protéines natives, qui reste souvent limitée par la faible abondance endogène et la complexité de purification à partir de tissus végétaux. Dans le cadre de cette étude, les protéines OsSIZ1, OsSIZ2 et AtSIZ1 ont été produites sous forme recombinante en vue de générer un anticorps capable de détecter spécifiquement ces homologues. En amont de la production, ces protéines ont été modélisées à l'aide de l'outil de prédiction de la structure 3D d'une protéine AlphaFold2 pour prédire leurs structures tridimensionnelles à partir des séquences primaires. Cette étape n'a pas pour but de prédire directement les épitopes antigéniques, mais d'identifier des régions structurées et conservées entre ces protéines homologues. En effet, l'analyse combinée des modèles 3D, de la conservation structurale et de l'alignement des séquences a permis de sélectionner des domaines candidates à une immunisation efficace. Ces régions, hautement conservées et structurellement stables, sont en effet de bons candidats pour générer des anticorps capables de reconnaître les trois homologues végétaux.

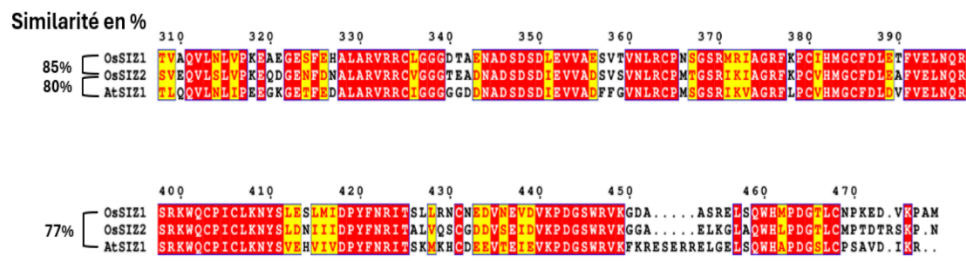
La Figure 3.6 illustre l'alignement des séquences des domaines SP-RING des SUMO E3 ligases OsSIZ1, OsSIZ2 et AtSIZ1 ainsi que leur pourcentage de conservation. Le fichier d'alignement a été généré à l'aide du logiciel T-Coffee (<https://tcoffee.crg.eu/>) et la visualisation avec Esript 3.0 (<https://esript.ibcp.fr>). L'alignement montre une conservation substantielle des résidus au sein de ce domaine fonctionnel avec une similarité de séquence de 85 % entre les séquences choisies d'OsSIZ1 et OsSIZ2, 80 % entre OsSIZ2 et AtSIZ1 et 77 % entre OsSIZ1 et AtSIZ1 (Figure 3.6.B). Ces valeurs supérieures à 75 % sont considérées comme un niveau de conservation élevé en biologie structurale, renforçant l'idée que ces régions ont conservé des fonctions essentielles à travers l'évolution. Elles traduisent donc une similarité de séquence élevée entre les domaines SP-RING des trois protéines, ce qui en fait une cible pertinente pour la production d'anticorps susceptibles de reconnaître les SUMO E3 ligases du riz, et peut-être aussi celles d'autres espèces. L'analyse des profils de conservation (Figure 3.6.C), visualisés avec PyMOL à l'aide du

gradient B-spectrum, montre un fort degré de conservation sur l'ensemble des domaines fonctionnels des trois protéines, et en particulier sur le domaine SP-RING, avec un score de conservation supérieur à 70 % sur la quasi-totalité de sa séquence. À l'inverse, les régions faiblement conservées (zones blanches, score ≤ 70) correspondent majoritairement à des segments désorganisés, potentiellement non fonctionnels. Cette conservation élevée renforce l'hypothèse d'un rôle fonctionnel commun entre ces homologues, et suggère que les mécanismes de SUMOylation pourraient être conservés entre le riz et Arabidopsis. Sur cette base, nous avons ensuite défini les régions minimales à retenir pour la production des protéines recombinantes, de manière à optimiser l'expression tout en conservant les éléments structuraux pertinents pour l'immunisation. Afin d'examiner les éventuelles interactions entre domaines fonctionnels, nous avons modélisé les structures complètes des protéines OsSIZ1, OsSIZ2 et AtSIZ1 à l'aide d'AlphaFold2. En considérant l'organisation tridimensionnelle des protéines dans leur ensemble, d'éventuelles interactions structurales, notamment hydrophobes, entre les domaines SP-RING et PINIT ont été visualisées. Toutefois, bien que le domaine SP-RING soit le plus conservé et représente une cible idéale pour la production d'anticorps, sa production de manière isolée reste incertaine en raison de son enchevêtrement potentiel avec le domaine PINIT. Afin d'augmenter les chances d'obtenir une protéine recombinante soluble et correctement repliée, nous avons donc opté pour deux types de constructions : des versions courtes contenant uniquement le domaine SP-RING, et des versions longues incluant à la fois les domaines PINIT et SP-RING. Cette approche parallèle maximise les probabilités de succès, puisqu'elle garantit qu'au moins une des versions exprimées présentera un repliement stable et une solubilité suffisante pour être utilisée dans les étapes d'immunisation. Ces designs ont été retenus pour la suite des expériences d'expression et de purification.

A



B



C

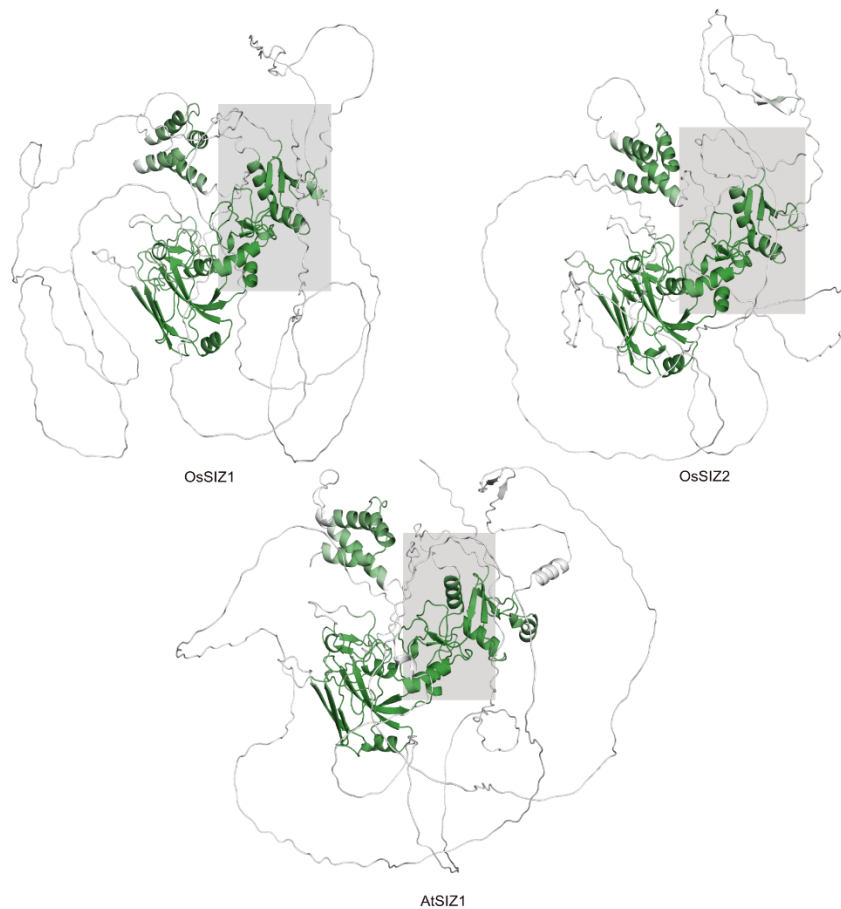


Figure 3.6 Conservation du domaine SP-ring entre OsSIZ1, OsSIZ2 et AtSIZ1. **A.** Organisation des domaines protéiques d'OsSIZ1, OsSIZ2 et AtSIZ1. Le pourcentage de conservation est indiqué pour chaque résidu et reflète la fraction des 500 protéines les plus similaires (identifiées par MMSeqs2/AlphaFold) présentant le même acide aminé à cette position. Le code de couleur (barres bleues sous les domaines) indique le degré de conservation : plus la teinte est foncée, plus la conservation est élevée. Une teinte bleu foncé correspond à une conservation proche ou égale à 100 %, tandis qu'un bleu pâle reflète une faible conservation. **B.** Alignement des domaines SP-RING d'OsSIZ1, OsSIZ2 et AtSIZ1. Les résidus sur fond rouge indiquent une identité complète entre les séquences alignées. Les résidus en rouge sur fond jaune correspondent à une conservation forte, mais partielle, avec des similitudes chimiques (hydrophobicité, charge, etc.). Les résidus en noir sur fond blanc ne présentent aucune conservation. Les pointillés signalent des décalages dans l'alignement (gaps). L'encadré bleu met en évidence une région conservée d'intérêt, susceptible de contenir des résidus fonctionnels impliqués dans l'activité enzymatique, la liaison à des ligands ou des interactions structurales. **C.** Cartographie de la conservation des résidus sur les structures tridimensionnelles complètes d'OsSIZ1, OsSIZ2 et AtSIZ1, modélisées par AlphaFold et colorées selon le score de conservation par PyMOL à l'aide du gradient B-spectrum. Les résidus hautement conservés (score > 70 %) apparaissent en vert, tandis que les segments faiblement conservés (score ≤ 70) sont en blanc. Les quadrillés en gris mettent en évidence les domaines SP-ring des différentes protéines.

3.2.2 Expression et purification des protéines recombinantes OsSIZ1 et OsSIZ2

3.2.2.1 Optimisation du protocole de clonage

Afin de produire des anticorps spécifiques dirigés contre OsSIZ1 et OsSIZ2, l'obtention de protéines recombinantes de haute qualité et en quantité suffisante est nécessaire. Nous avons donc entrepris le clonage des régions codantes des domaines SP-RING des protéines OsSIZ1, OsSIZ2 et AtSIZ1. L'ADN complémentaire (ADNc) a été généré par RT-PCR à partir d'ARN total extrait de tissus d'*Oryza sativa* (pour OsSIZ1 et OsSIZ2) et d'*Arabidopsis thaliana* (pour AtSIZ1). Le clonage selon la méthode de Gibson consistait tout d'abord en une amplification de gènes cibles. Des amorces spécifiques pour chaque fragment d'ADN ont été conçues en s'appuyant sur les régions identifiées à partir des modélisations AlphaFold. Les fragments d'ADN cibles ont été amplifiés par PCR et les produits obtenus ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les résultats de PCR présentés dans la Figure 3.7 ont permis de confirmer la taille et la spécificité des amplicons. Les tailles attendues étaient autour de 1000 pb pour les versions longues des protéines (PINIT + SP-RING) et autour de 500 pb pour les versions courtes (SP-RING seul). Les premières amplifications ayant généré une faible quantité du produit désiré, les bandes d'ADN ont été extraites du gel et réamplifiées afin d'obtenir une quantité suffisante d'inserts. Les inserts sélectionnés ont ensuite été insérés dans un plasmide via la technique de clonage de Gibson.

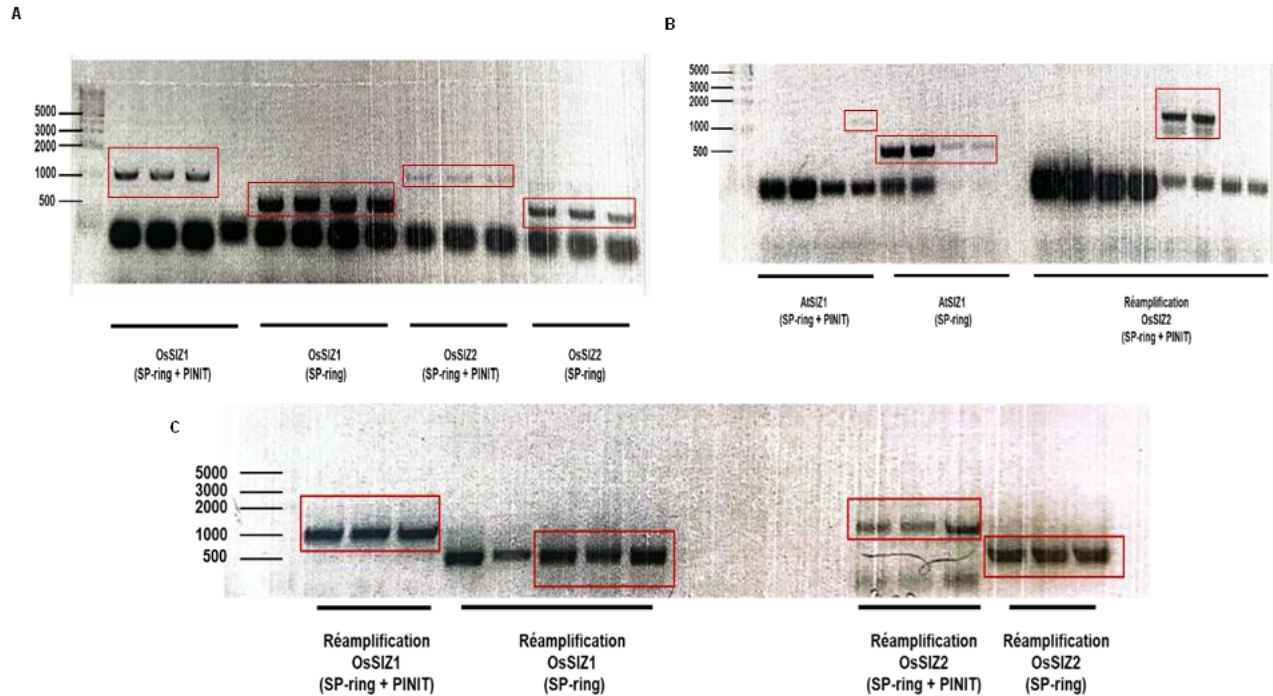


Figure 3.7 Gel d'agarose 1 % des amplifications par PCR des gènes codant pour OsSIZ1, OsSIZ2 et AtSIZ1. A. Les amplifications par PCR des gènes codants pour les domaines SP-RING seuls et les domaines PINIT + SP-RING d'OsSIZ1, OsSIZ2 ont été migrés pendant 20 min à 120 V sur un gel d'agarose 1 %. Les bandes à environ 1000 bp pour les versions longues et environ 500 bp pour les versions courtes ont été excisées. B. Les amplifications par PCR des gènes codants pour les domaines SP-RING seuls et les domaines PINIT + SP-RING d'AtSIZ1 ainsi qu'une réamplification OsSIZ2 PINIT+ SP-RING ont été migrés dans les mêmes conditions qu'en A. C. Les fragments d'ADN qui ont été extrait de A ont été réamplifiés. Les bandes excisées après la 1^{ère} et la 2^{ème} amplification sont représentées par des carrés rouges.

Nous avons utilisé un vecteur d'expression pRSF-Trx, tel que présenté dans la Figure 3.8, pour plusieurs raisons. Tout d'abord parce que c'est un vecteur possédant une origine de réplication p15A, qui est une séquence d'ADN qui permet de répliquer lentement l'ADN de façon autonome chez *E. coli*, permettant ainsi que la cellule hôte ne soit pas surchargée en plasmide et donc, de favoriser une expression plus contrôlée des gènes d'intérêts. Il est équipé d'un système d'expression puissant (promoteur T7) inductible à l'IPTG et contient deux étiquettes permettant de former des protéines de fusion. Les vecteurs pRSF-TRX contiennent généralement une étiquette composée de six résidus histidine soit une étiquette 6x-His qui facilite l'isolement de la protéine d'intérêt par sa forte affinité avec le nickel permettant ainsi de la purifier par chromatographie d'affinité en utilisant des colonnes de nickel et une étiquette de thiorédoxine (Trx) qui aide à améliorer la solubilité des protéines recombinantes exprimées dans *E. coli*. En fusionnant la protéine d'intérêt avec cette étiquette, la solubilité de la protéine est augmentée, facilitant ainsi son

isolation et son étude (LaVallie et al., 1993). Ce plasmide modifié a ensuite été introduit dans des cellules bactériennes par transformation, ce qui a permis la production de la protéine dans ces cellules. Il est à noter que les séquences codantes des domaines SP-RING ont été amplifiées à partir d'ADNc sans modification de codon. Aucune optimisation n'a été réalisée pour l'expression chez *E. coli*. L'expression obtenue a néanmoins été suffisante pour permettre la purification des protéines d'intérêt, probablement en raison de la taille modeste des domaines exprimés et de l'ajout d'une étiquette Trx favorisant la solubilité.

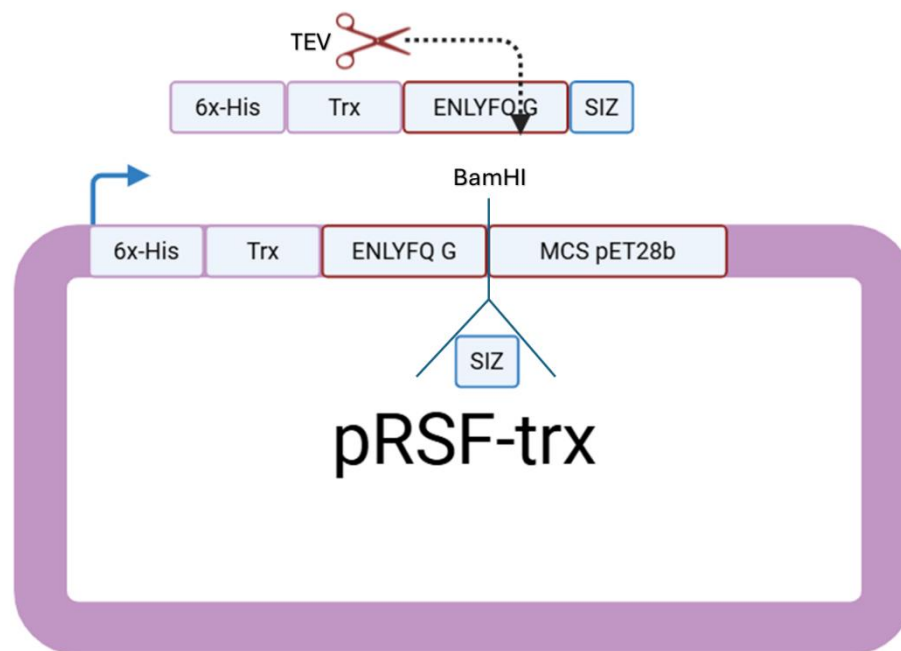


Figure 3.8 Représentation du vecteur d'expression pRSF-trx Il s'agit d'un vecteur pRSF-duet modifié. L'étiquette 6x-His est une étiquette contenant 6 résidus histidines. L'étiquette thiorédoxine (Trx) est une étiquette de solubilité. Le site de multi-clonage permet de cloner facilement un gène cible dans le plasmide en utilisant différentes enzymes de restriction comme BamHI. Il s'agit donc du point d'insertion de nos amplicons. La protéase TEV clive entre les résidus glutamine et glycine de la séquence ENLYFQG permettant ainsi le retrait des étiquettes.

3.2.2.2 Optimisation des protocoles d'expression et de purification des protéines recombinantes

Les protéines sont ensuite exprimées puis purifiées par chromatographie d'affinité avec une résine liant le nickel. Les souches bactériennes ont été incubées à 37 °C pendant toute une nuit. L'expression des protéines a été induite durant 24 heures à 18 °C par ajout de 100 µM d'IPTG pour les premiers essais avant d'être réduite à 20 µM afin de réduire l'expression des protéines autres que celles d'intérêt. La Figure 3.9

présente les différentes étapes d'expression et de purification des protéines OsSIZ1, OsSIZ2 et AtSIZ1 dans leurs versions longues (PINIT + SP-RING) et courtes (SP-RING seul). Ainsi, l'apparition de bandes dans les fractions « induites » (I), à 50 kDa pour les versions longues et à 32 kDa pour les versions courtes, absentes dans les fractions « non induites » (NI), confirme que l'expression de nos protéines d'intérêt s'est bien produite après l'ajout de l'IPTG. Les culots bactériens obtenus ont été lysés/soniqués puis centrifugé. Ces tailles apparentes sont supérieures à celles attendues pour les domaines seuls (environ 37 kDa pour les versions longues et 18 kDa pour les versions courtes), en raison de la présence des étiquettes de fusion N-terminales (6x-His et Trx), qui augmentent significativement le poids moléculaire des protéines recombinantes. Il a été noté ici une petite perte d'intensité des bandes entre le lysat (Ly) / sonication (So) et la centrifugation pour OsSIZ1 et AtSIZ1, suggérant une potentielle perte de protéines insolubles lors de cette étape. Cette perte d'intensité pourrait résulter d'une agrégation partielle des protéines recombinantes sous forme insoluble, phénomène fréquemment observé lors de leur surexpression en système bactérien. Bien que certaines protéines agrégées puissent rester immunogènes, une préparation soluble est généralement préférée pour la production d'anticorps, car elle permet d'obtenir une solution homogène, stable et facilement quantifiable, tout en conservant d'éventuels épitopes conformationnels. Les protéines ont été purifiées par chromatographie d'affinité aux ions nickels avant d'être éluées à raison de 1 mL par fraction. Les 5 à 6 fractions contenant le plus de protéines ont été recueillies et combinées afin d'obtenir la fraction de 6x-His-Trx-protéines (étiquette histidine + étiquette thiorédoxine + SIZ).

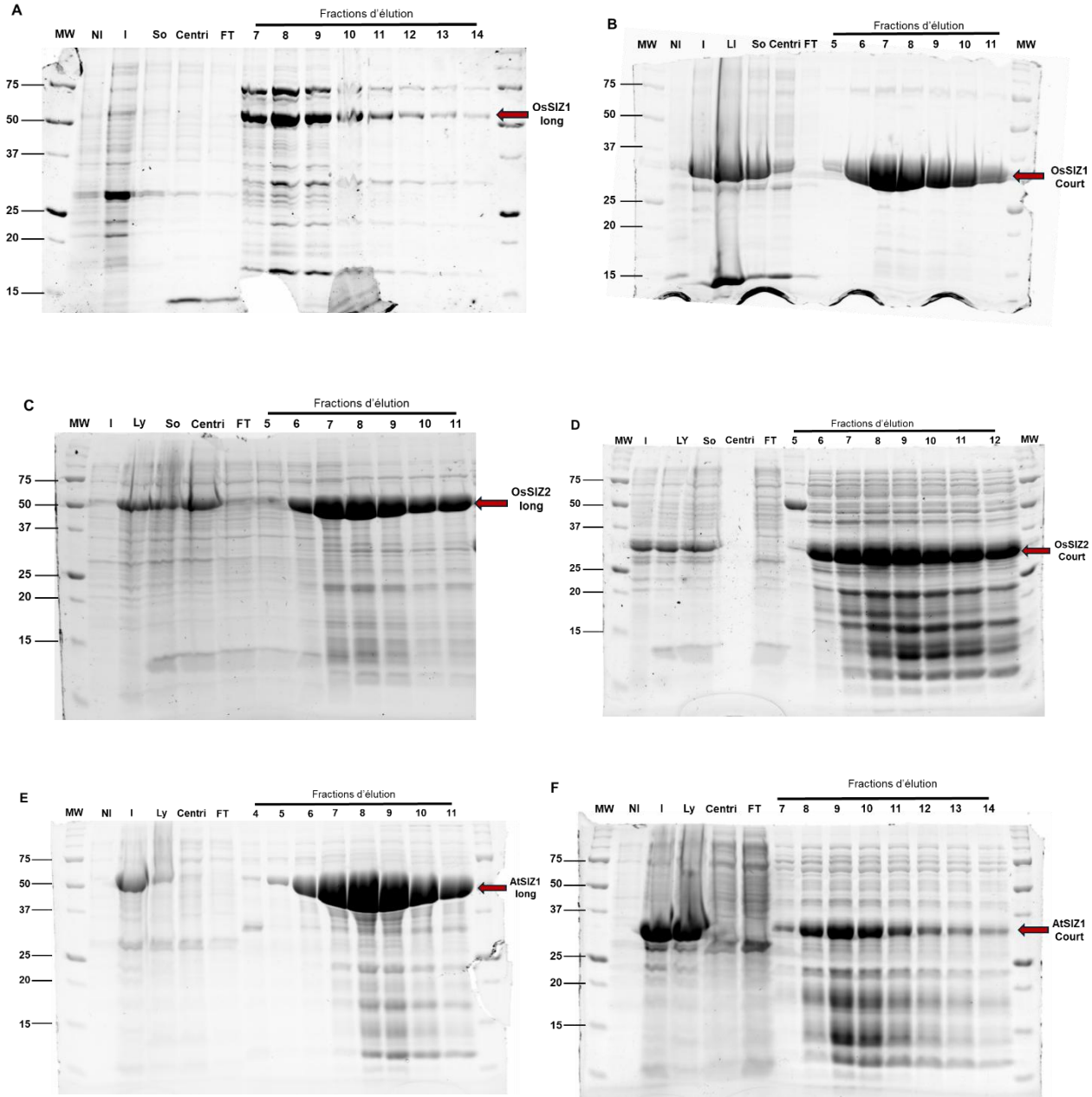


Figure 3.9 Gels 12 % représentant les essais d'expression et de purification par chromatographie d'affinité au nickel des protéines recombinantes. Les souches *E. coli* contenant les plasmides d'intérêt ont été cultivées à 37 °C toute la nuit (Fraction NI = Non-induit). L'expression a été induite avec 20 μ M d'IPTG (fraction I = Induit). Les bactéries sont ensuite lysées (Ly) dans un tampon de sucrose 20 % contenant du lysozyme puis soniquées (So). Le lysat a ensuite été centrifugé 30 min à 39191 x g (centri). Le surnageant a ensuite été injecté sur colonne de nickel et les déchets non-retenus (FT = Flow through) ont été récupérés. Les protéines de fusion ont ensuite été éluées avec un tampon contenant 500mM d'Imidazole et des fractions d'1 mL ont été collectées. Des aliquots provenant des différentes étapes précédentes ont été chargés sur un gel SDS page 12 % contenant du 2,2,2-trichloroéthanol (TCE) qui est un révélateur fluorescent de protéines. Les flèches rouges montrent les protéines de fusion obtenues avec **A.** OsSIZ1 long, **B.** OsSIZ1 court, **C.** OsSIZ2 long, **D.** OsSIZ2 court, **E.** AtSIZ1 long et **F.** AtSIZ1 court.

Une fois la protéine purifiée, la protéase TEV a été ajoutée pour cliver entre les résidus Q et G de la séquence ENLYFQG présente dans le vecteur pRSF-Trx, ce qui détacha les étiquettes Trx et 6x-His de la protéine d'intérêt. Dans la Figure 3.10, nous avons comparé différentes conditions de clivages afin d'en déterminer les meilleurs paramètres. Nous avons d'abord déterminé si la durée de clivage avait une incidence quelconque sur son efficacité (A). Pour cela, les protéines recombinantes OsSIZ1 (SP-RING seul) ont été exposées à de la protéase TEV pendant 15, 30, 60, 120 min et jusqu'à la fin de la journée (soit environ 6 h) et ce à température pièce. L'absence de bandes attendues à ~20 kDa, indique une absence de clivage. Ceci suggère que soit le site de clivage n'est pas accessible, soit que les autres paramètres (composition du tampon, température) ne sont pas optimaux. Nous nous sommes donc intéressés à la température de clivage (B). Les quantités de protéase TEV ont été normalisées à 1mg/mL et le clivage s'est fait toute la nuit. Les versions PINIT + SP-RING et SP-RING seul d'OsSIZ1 ont été testées. Pendant que l'absence de clivage (ou d'apparition d'une bande ~ 35 kDa) persiste pour OsSIZ1 (PINIT + SP-RING), on observe l'apparition du fragment correspondant à SIZ1 clivées à ~20 kDa ainsi qu'une diminution de la protéine fusionnée entre les puits avec et sans protéase TEV pour OsSIZ1 (SP-RING seul). Ce résultat suggère un clivage partiel des étiquettes pour la version SP-RING seul. La protéine clivée constituant moins de 50 % des protéines recombinantes présentes dans les puits, nous nous intéressons alors à la composition du tampon en vue d'améliorer ce rendement.

Le tampon d'élution utilisé pour la chromatographie d'affinité contenait 10 % de glycérol. Le glycérol est souvent utilisé dans les tampons de stockage et de purification des protéines recombinantes en tant que cryoprotecteur et stabilisateur des protéines contre la dégradation ou la perte de conformation. Cependant, à des concentrations trop élevées, le glycérol peut affecter l'activité de l'enzyme et donc interférer avec le clivage de nos étiquettes. Étant donné que OsSIZ1 (SP-RING seul) était le seul à présenter un début de clivage, le protocole a d'abord été optimisé pour les versions SP-RING seul (C). Ainsi nous avons dilué au 1 : 10 l'échantillon d'OsSIZ1 SP-RING seul utilisé pour (A) et (B), avec le tampon d'élution à 10 % de glycérol, afin d'obtenir une teneur de glycérol de 1 %. Nous avons également procédé à une élution d'OsSIZ2 SP-RING seul directement avec un tampon d'élution à 1 % de glycérol et une dilution au 1 : 10 de celle-ci avec ce même tampon à des fins de comparaison. On remarque que la protéase TEV a été plus efficace pour la protéine recombinante élue avec un tampon à 1 % de glycérol avec les produits clivés majoritaires même si le clivage reste partiel. De plus, la température semble affecter particulièrement l'efficacité du clivage. En effet, le clivage a mieux fonctionné à température pièce, moyennement à 4 °C et faiblement à 30 °C. On constate également qu'il semble y avoir une disparition progressive de la protéase

TEV au-dessus de 4 °C pour les versions SP-RING seul. Étant donné que la protéase est généralement stable entre 4 et 30 °C, cette diminution ne semble pas être liée à la température. D'autres causes pourraient l'expliquer comme une potentielle non-homogénéité de la protéase TEV au moment de la décongélation. Le reste des essais a alors été effectué à 4 °C afin de préserver l'intégrité de nos protéines durant la nuit. Les résultats des tests de clivage suggèrent que l'enzyme fonctionne, vu qu'il y a clivage même s'il est partiel, mais peut être gênée par le glycérol et potentiellement d'autres contaminants.

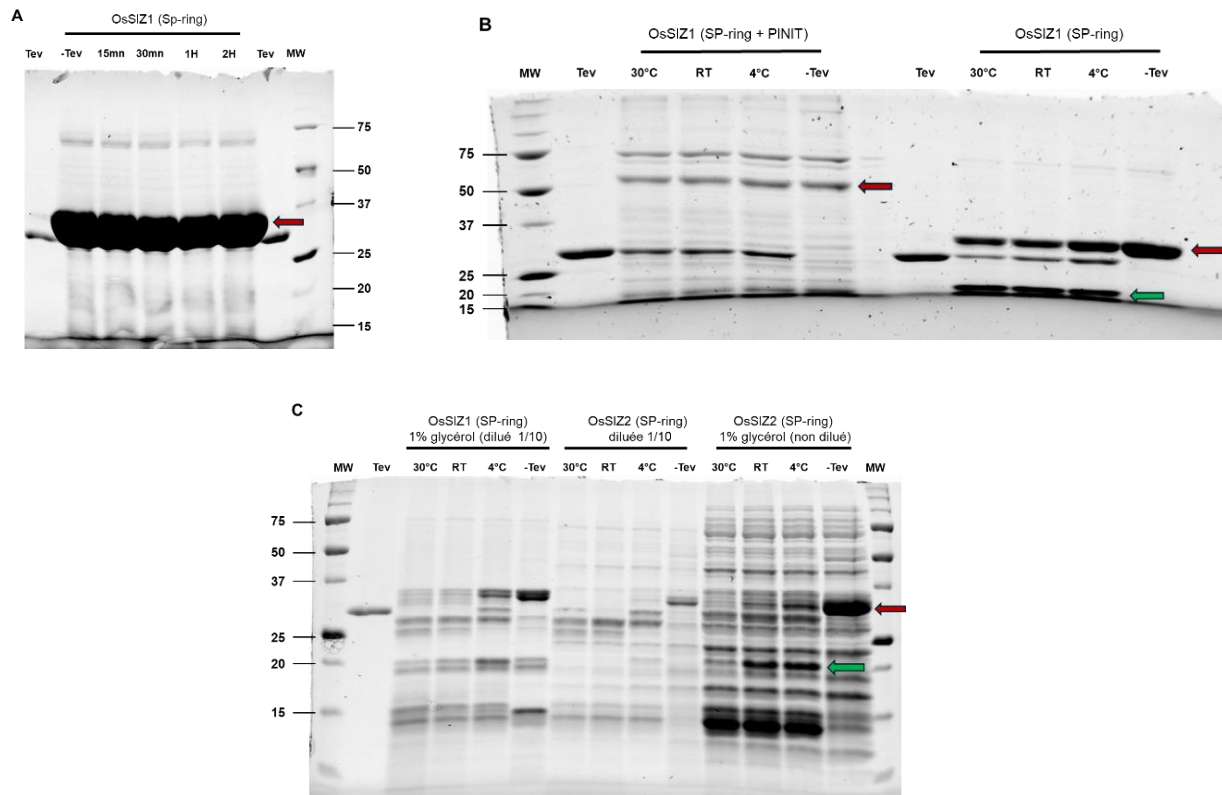


Figure 3.10 Tests de différentes conditions de clivage à la TEV des étiquettes sur gel SDS-page 12%. **A.** Les tests de clivage ont été effectués sur OsSIZ1 court en ajoutant 10µL de la protéase TEV à 250 µM dans 300 µL d'échantillon. 20 µL de la réaction ont été prélevés à 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 2 heures et en fin de journée (FDJ). **B.** Des tests complémentaires ont été effectuées sur OsSIZ1 long et OsSIZ1 court en s'intéressant cette fois-ci à la température de clivage. Des quantités normalisées à 0,930 mg/mL de la protéase TEV sont ajoutées aux échantillons et les essais sont laissés toute la nuit à 30 °C, température pièce (RT) et à 4 °C. **C.** Les essais se sont poursuivis avec OsSIZ1 court et OsSIZ2 court car il y'a absence de clivage pour les versions longues. Les mêmes conditions qu'en (B) ont été utilisées sauf pour la concentration d'OsSIZ1 court qui a été diluée à 1 % de glycérol et qu'OsSIZ2 court a été élué avec un tampon à 1 % de glycérol au lieu de 10 % afin d'en vérifier l'incidence sur l'action de la protéase TEV. Les protéines sont chargées sur un gel SDS page 12 % contenant du 2,2,2-trichloroéthanol (TCE) qui est un révélateur fluorescent de protéines. Les flèches rouges représentent les protéines non-clivées et les flèches vertes celles clivées

Pour pallier ce problème, une dialyse a été ajoutée après l'étape de séparation par chromatographie d'affinité au nickel afin de purifier la solution de protéine durant le processus de clivage. Le tampon de dialyse, constitué de 20 mM de tris pH 8,0 ; 100 mM NaCl et 5 mM de β -mercaptoéthanol, a permis de baisser la teneur en sels (500 mM), Imidazole (500 mM) et glycérol (10 %) du tampon d'élution. La Figure 3.11 illustre les résultats obtenus après dialyse d'OsSIZ1 (SP-RING seul) et séparation par tamis moléculaire. Les parties A et B de la figure présentent les fractions d'élution de 5 mL à la sortie du tamis avec une colonne S200. Le tamis S200 est généralement utilisé pour séparer des protéines de tailles allant de 10 à 600 kDa. Même si le clivage a bien fonctionné durant la dialyse, la séparation protéique dans le tamis moléculaire était insuffisante. En effet, la protéine clivée est dispersée entre les fractions de 4 à 15 et se retrouve mélangée avec la protéase TEV, la protéine non-clivée et la thiorédoxine. Afin de pouvoir isoler la protéine non clivée, les protéines dialysées ont été injectées sur un tamis S75, adapté à des protéines plus petites, généralement entre 1 et 30 kDa. Cette étape a permis une meilleure séparation des protéines non clivées qui sont supérieures à 30 kDa. On constate une séparation plus efficace de la thiorédoxine et de nos protéines clivées. Cette fois-ci, OsSIZ1 (SP-RING seul) est isolée dans les puits 8, 9 et 10 que l'on a pu combiner et concentrer. Pour le reste des protéines recombinantes, les versions longues (PINIT + SP-RING) d'AtSIZ1, OsSIZ1 et OsSIZ2 agrégeaient presque totalement et systématiquement durant la dialyse. Le peu de protéines qui restait étant < 0,5 mg/mL n'était pas suffisant pour des fins d'immunisation. De plus la protéase TEV semblait ne pas pouvoir couper les étiquettes et donc accéder au site de clivage pour ces formes-là. Nous avons donc continué uniquement avec les protéines contenant le domaine SP-RING seul soit les formes courtes. A partir d'ici, chaque mention d'AtSIZ1, OsSIZ1 et OsSIZ2 se référera aux formes SP-RING seul, sauf mention contraire.

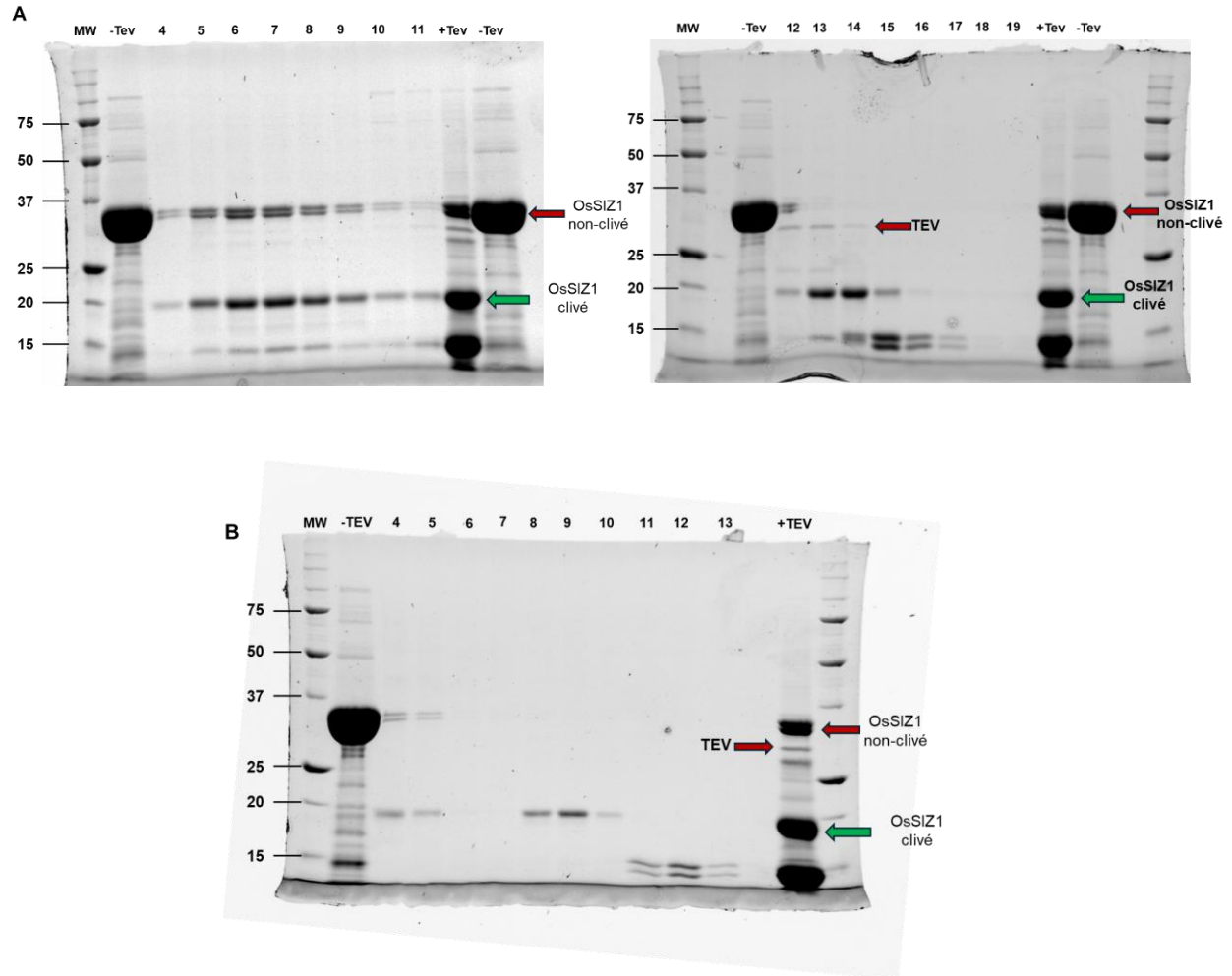


Figure 3.11 Séparation par tamis moléculaire d'OsSIZ1 court après dialyse présenté sur gel 12%. Des fractions de protéines recombinantes OsSIZ1 court ont été combinées à la sortie d'une colonne de nickel à la suite d'une purification par chromatographie d'affinité. Ce « pool » a ensuite été dialysé à travers une membrane dialyse présentant un seuil de coupure moléculaire (MWCO) de 6 kDa à 8 kDa, après ajout de la protéase TEV, dans un tampon contenant 20 mM de Tris-HCL, 100 mM NaCl et 5 mM de β -mercaptoéthanol pendant toute la nuit. **A.** Les protéines ainsi clivées sont injectées dans un tamis moléculaire S200 pour filtrer les protéines allant de 10 à 600 kDa. **B.** Un autre « pool » traité dans les mêmes conditions est injecté cette fois-ci sur un tamis moléculaire S75 pour filtrer les protéines allant de 1 et 30 kDa. Les protéines sont chargées sur un gel SDS page 12 % contenant du 2,2,2-trichloroéthanol (TCE) qui est un révélateur fluorescent de protéines. Les flèches rouges représentent les protéines non-clivées et les flèches vertes celles clivées.

Contrairement aux autres formes courtes, AtSIZ1 (SP-RING seul) semblait également présenter des problèmes de solubilité après retrait de l'étiquette de thiorédoxine. La protéine s'agrège majoritairement après clivage et les rendements sont plutôt bas avec des concentrations inférieures à 0,5 mg/mL. Pour confirmer ce constat, un test de solubilité a été réalisé sur AtSIZ1 (SP-RING seul) dans la Figure 3.12. Les protéines recombinantes AtSIZ1 ont été collectées en sortie de dialyse puis centrifugées afin de séparer

les protéines agrégées et celles solubles. L'analyse montre que la totalité d'AtSIZ1 non clivée s'est retrouvée dans le culot, indiquant que le problème de solubilité n'est pas uniquement dû au retrait de la thiorédoxine. De plus, la majorité de la protéine clivée s'agrégeait également, ce qui confirme une solubilité intrinsèquement faible d'AtSIZ1 (SP-RING seul).

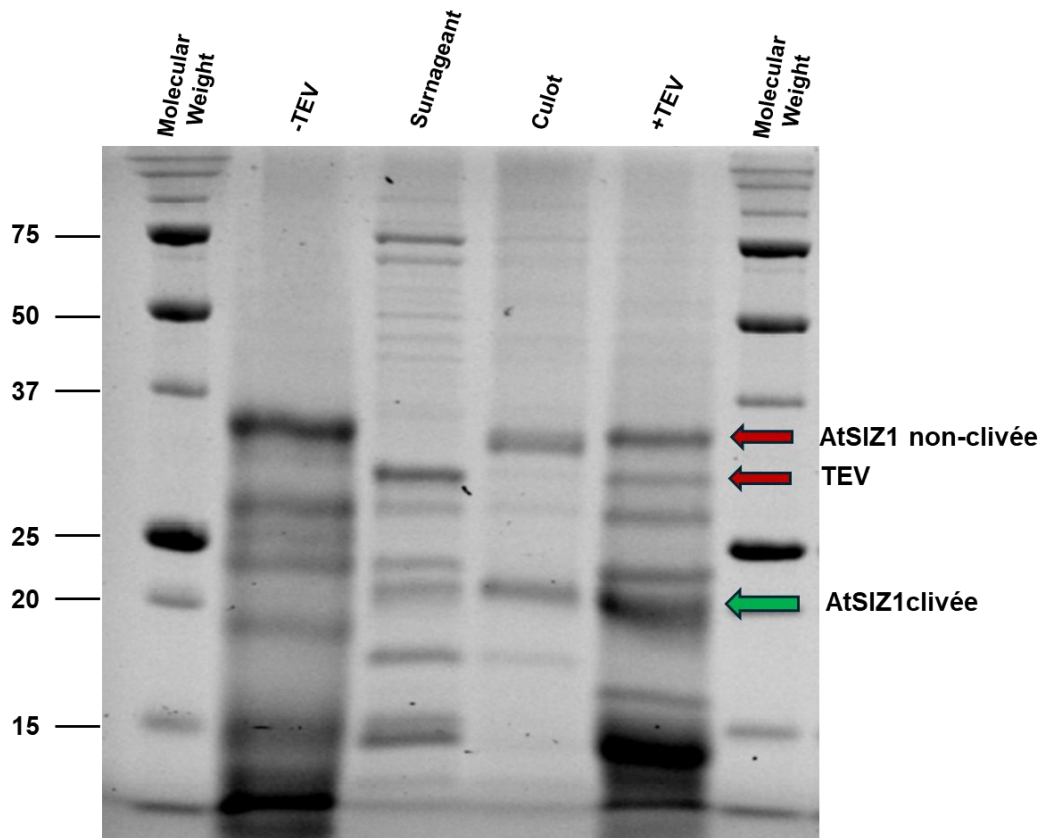


Figure 3.12 Gel 12% du test de solubilité d'AtSIZ1 (SP-ring). Les protéines AtSIZ1 ont été clivées toute une nuit à 4 °C avec de la protéase TEV en excès dans un tampon de dialyse. Les protéines ayant agrégé ont été centrifugées à 4424 x g pendant 20 minutes. On récupère le surnageant et on resuspend le culot dans le même tampon. Des aliquots des différentes étapes sont chargés sur un gel SDS page 12 % contenant du 2,2,2-trichloroéthanol (TCE) qui est un révélateur fluorescent de protéines. Les flèches rouges représentent les protéines non-clivées et les flèches vertes celles clivées.

La priorité s'est alors portée sur OsSIZ1 et OsSIZ2 plutôt que AtSIZ1. Toutefois, en augmentant les rendements de protéines, on remarque qu'une partie des OsSIZ2 agrège durant la dialyse. Lorsqu'on injecte le surnageant d'OsSIZ2 sur le tamis moléculaire, la quantité de protéines obtenue à la sortie est faible. Un test est effectué afin de déterminer les conditions optimales de dialyse permettant de préserver la solubilité des SIZs. Le Tableau 3.5 indique les différentes conditions testées. Malgré les modifications

apportées au tampon de dialyse (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl et 5 mM β -mercaptoéthanol), que ce soit par l'ajout d'EDTA, de glycérol, de Tween ou d'urée, ou par une modification du pH, il apparaît qu'OssiZ2 s'agrège systématiquement à une concentration de 100 mM de NaCl. En revanche, lorsque la concentration en NaCl est augmentée à 350 mM, l'agrégation disparaît, sauf pour le tampon à pH 5,0. Dans la même logique, les puits sans NaCl (eau) présentent des protéines agrégées alors que les puits contenant du PBS à 350 mM de NaCl ne présentent pas de traces d'agrégation. OssiZ2 est donc insoluble à 100 mM de NaCl et en dessous, révélant une dépendance marquée à la force ionique du tampon. Le test de solubilité a permis d'identifier un seuil critique autour de 100 mM de NaCl, en dessous duquel la protéine précipite systématiquement. Cela explique rétroactivement les pertes observées lors des étapes de purification et met en lumière l'importance de maintenir une concentration en sel suffisante dans les tampons pour préserver la protéine en solution. Cette découverte permet désormais de réajuster les conditions expérimentales pour maximiser la récupération de protéines solubles et fonctionnelles, notamment en privilégiant des tampons à force ionique élevée lors des étapes critiques.

Tableau 3.4 Impact de la composition du tampon sur la solubilité d'OssiZ2

Tampon	100 mM NaCl (sans TEV)	100 mM NaCl (avec TEV)	350 mM NaCl (sans TEV)	350 mM NaCl (avec TEV)
Glycérol 10%	+	+	-	-
EDTA (2mM)	+	+	-	-
Tween 20 0,1%	+	+	-	-
Urée 1M	+	+	-	-
pH 5,0	+	+	+	+
pH 6,8	+	+	-	-
pH 8,0	+	+	-	-
Eau (Sans NaCl)	+	+	N/A	N/A
PBS 1X	N/A	N/A	-	-

Légende : 10 μ L d'une solution de protéines OssiZ2 (SP-ring) concentrées à 5 mg/mL (à partir d'une solution à 1 mg /mL) contenues dans un tampon d'élution (20 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 500 mM NaCl et 5 mM β -mercaptoéthanol) sont déposées dans une plaque 96 puits. On y ajoute 40 μ L du tampon dialyse modifié correspondant, 2 μ L de protéase TEV à 250 μ M pour les puits +TEV ou 2 μ L d'eau pour les puits -TEV et 5 mM de β -mercaptoéthanol. La plaque est mise sous agitation à 4 °C durant la nuit. On teste également

différentes teneurs en sels (100 ou 350 mM) pour chaque tampon. Le signe « + » signifie qu'une agrégation visible à l'œil nu a été observée, et le signe « - » indique une solution restée claire après incubation. Cette évaluation visuelle visait à identifier rapidement les conditions les plus défavorables à la solubilité. De l'eau nanopure seule a également été testée ainsi que du tampon PBS (Phosphate-Buffered Saline à 1X) supplémenté à 350 mM de NaCl.

La Figure 3.13 montre l'incidence du changement de tampon sur le clivage des étiquettes d'histidine et de thioredoxine de la protéine recombinante OsSIZ2 par la protéase TEV. Des aliquots de certains des échantillons présentés dans le Tableau 3.5 ont été prélevés et déposés sur gel afin de vérifier l'efficacité du clivage (Figure 3.13.A). Des tests supplémentaires ont été effectués pour s'assurer qu'on peut utiliser le PBS directement comme tampon de dialyse durant le clivage (Figure 3.13.B). En effet, le PBS est le tampon utilisé couramment pour injecter des protéines à des organismes vivants à des fins d'immunisation et de productions d'anticorps. Sa concentration en sels s'apparente à celle des fluides corporels ce qui joue sur la stabilité des protéines en préservant l'osmolarité. La présence de phosphate lui permet de maintenir un pH stable et il n'interfère pas avec le système immunitaire du lapin. Les gels montrent que le clivage n'a pas été entravé dans les différentes conditions testées, qu'il s'agisse des tampons contenant 10 % de glycérol à 100 ou 350 mM NaCl, de tampons Tris à pH 8,0 avec différentes concentrations de sel, de tampons contenant 0,1 % de Tween 20 ou encore de PBS à 350 mM NaCl. Quelle que soit la concentration en NaCl, la protéase TEV reste fonctionnelle. Ces résultats indiquent que les conditions de tampon utilisées, y compris les concentrations en sel testées, ne compromettent pas l'activité enzymatique de la protéase TEV. Le changement de tampon ne nuit donc pas au clivage et pourrait même simplifier les étapes ultérieures de purification.

Afin de comparer les effets du tampon PBS 1X sur la dialyse et le clivage comparativement au PBS supplémenté avec 350 mM de sel, deux dialyses ont été effectuées toute une nuit à 4 °C : l'une dans du PBS 1X (137 mM NaCl), l'autre dans du PBS enrichi à 350 mM NaCl. Dans ce dernier, aucune agrégation visible n'est observée, tandis qu'un léger précipité apparaît avec le PBS 1X. Toutefois lorsqu'on mesure les quantités de protéines présentes en solution après dialyse, on obtient 0,607 mg/mL pour OsSIZ2 dans le PBS à 350 mM NaCl et 0,564 mg/mL pour OsSIZ2 dans du PBS 1X par rapport 0,7 mg/mL de départ. Étant donné que le clivage à la protéase TEV a l'air presque total sur le gel, la différence de concentration n'est pas considérée comme limitante. Nous en concluons que les protéines SIZ nécessitent une concentration minimale en sel pour rester solubles et pour permettre un clivage efficace par la protéase TEV. Ainsi, le tampon PBS 1X supplémenté avec 5 mM de β -mercaptoéthanol a été retenu comme condition optimale de dialyse pour les étapes suivantes.

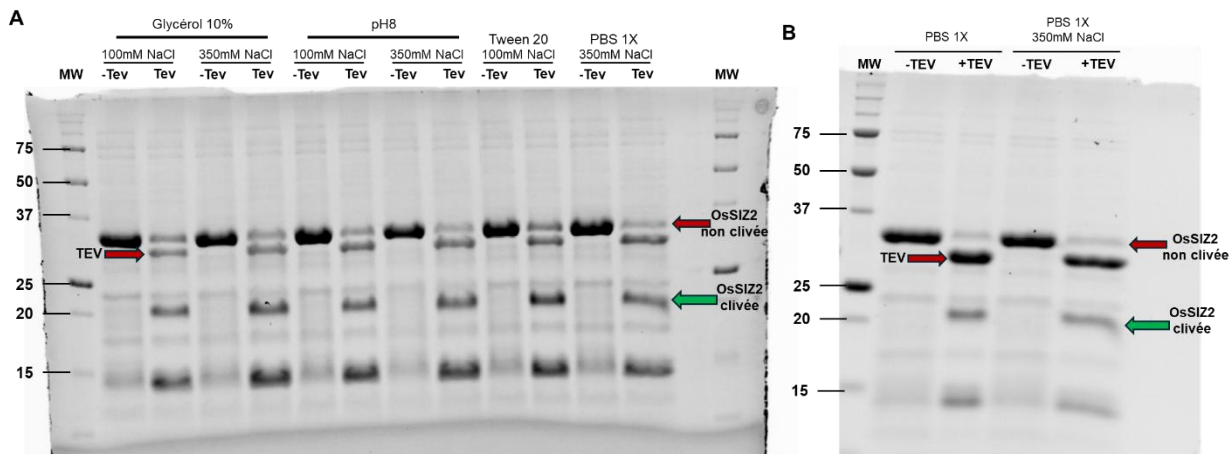


Figure 3.13 Evaluation de l'effet des différents tampons de dialyse sur le clivage d'OsSIZ2 à la TEV. **A.** La protéine de fusion OsSIZ2 à 1mg/mL a été clivée par la protéase TEV toute une nuit à 4 °C dans différents tampons. Les flèches rouges représentent les protéines non-clivées et les flèches vertes celles clivées. Des aliquots post clivage d'OsSIZ2 dans les tampons de glycérol 10 % (100 ou 350 μ M NaCl), ou à pH 8,0 (100 ou 350 μ M NaCl), ou contenant 0,1 % de tween à 100 μ M NaCl ou dans un tampon de PBS à 350 μ M NaCl ont été prélevés. **B.** La protéine de fusion à 0,702 mg/mL a ensuite été clivée par la protéase TEV toute une nuit à 4 °C dans des tampons PBS en faisant varier la concentration en sels. Les tampons utilisés sont du PBS 1X classique (137 mM NaCl) et du PBS 1X à 350 mM NaCl. Ces aliquots ont été déposés sur gel SDS-page 12 % et migrés par électrophorèse 55 min à 180 V. Les gels sont colorés au 2,2,2-trichloroéthanol (TCE) qui est un révélateur fluorescent de protéines.

Précédemment, les rendements protéiques avaient été améliorés en optimisant les conditions d'expression. Pour cela, les protéines OsSIZ1 et OsSIZ2 ont été réexprimées avec une concentration d'IPTG augmentée de 20 μ M à 100 μ M et une température de culture abaissée à 30 °C au lieu de 37 °C. Ces ajustements ont permis de multiplier par deux voire trois les culots bactériens, ainsi que les rendements protéiques obtenus après purification sur colonne de nickel. Le protocole ainsi optimisé, combiné aux conditions de clivage, a été appliqué aux deux protéines, et les résultats sont présentés dans la Figure 3.14. Les cultures réalisées à 30 °C ont permis d'obtenir des culots de 31,5 et 33,6 g, soit près du triple par rapport aux rendements initiaux (7 à 13 g) à volume de culture égales. De plus, l'augmentation de la concentration en IPTG a entraîné une nette amélioration des concentrations protéiques dans les fractions d'élution : les pools combinés passent d'environ 5 mg à plus de 17,5 mg. Ces pools ont ensuite été introduits dans une membrane à dialyse après ajout de protéase TEV à 10 μ M. La membrane a alors été introduite dans 2 L de tampon PBS 1X + 5 mM β -mercaptoéthanol. La dialyse a été effectuée toute la nuit à 4 °C sous faible agitation magnétique. On note une absence totale d'agrégats dans les deux échantillons le lendemain. Un volume de 5 mL de la solution protéique a ensuite été injecté sur le système FPLC pour une purification par chromatographie d'exclusion stérique à l'aide d'une colonne S75. Les protéines sont

éluées dans des fractions de 5 mL avec un tampon PBS 1X contenant 5mM de β -mercaptoéthanol. Nous avons réussi à isoler les protéines clivées de manière satisfaisante. Les fractions 8, 9 et 10 contenant soit OsSIZ1 soit OsSIZ2 sont collectées. On combine les fractions les plus pures soit 9 et 10 pour la production d'anticorps. Les protéines sont alors concentrées à l'aide d'un concentrateur Amicon ultra-15 à 10 kDa. En combinant les deux homologues, on obtient 3 mL d'un mélange de protéines OsSIZ1 et OsSIZ2 à 1,402 mg/mL soit environ 4 mg de protéines. Ce choix de les mélanger pour l'immunisation repose sur l'objectif expérimental de générer un anticorps polyclonal capable de reconnaître à la fois OsSIZ1 et OsSIZ2, sans distinction entre les deux homologues, afin d'étudier leur répartition et leur enrichissement chromatinien global. Ces protéines recombinantes ont alors été congelées dans un bain d'azote liquide avant d'être envoyées à un laboratoire partenaire spécialisé (MediMabs) pour l'immunisation de lapins et la production d'anticorps anti-OsSIZ1/2.

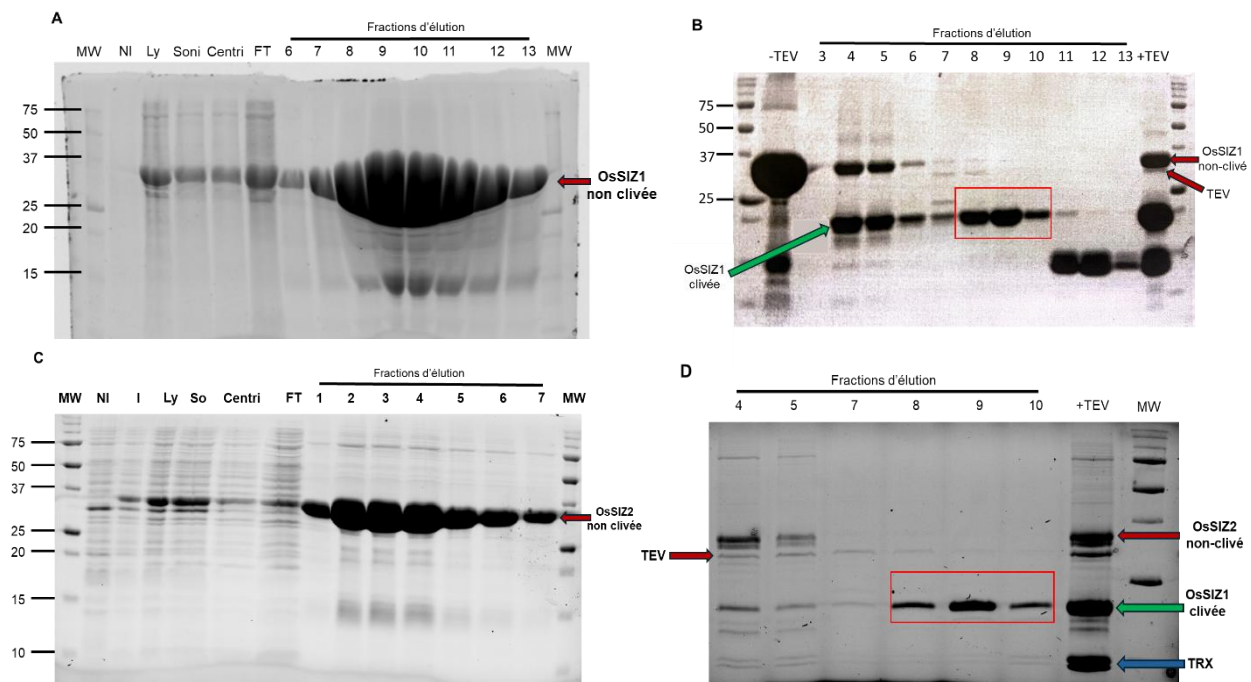


Figure 3.14 Expression et purification d'OsSIZ1 et OsSIZ2 à l'aide du protocole optimisé. Les souches *E. coli* contenant les plasmides d'intérêt ont été cultivées à 30 °C toute la nuit (Fraction NI = Non-induit). L'expression des domaines SP-RING des protéines OsSIZ1 et OsSIZ2 a été induite pendant 24 heures avec 100 µM d'IPTG (fraction I = Induit). Les bactéries sont ensuite lysées (Ly) dans un tampon de sucrose 20 % contenant du lysozyme puis soniquées (So). Le lysat est ensuite centrifugé 30 minutes à 31919 x g (centri). Le surnageant est injecté sur colonne de nickel et les déchets non-retenus (*FT* = *Flow through*) sont récupérés. Les protéines de fusion sont éluées avec un tampon contenant 500 mM d'imidazole et des fractions d'1 mL ont été collectées. Les flèches rouges montrent les protéines de fusion obtenues avec **A.** OsSIZ1 court et **C.** OsSIZ2 court. Les fractions d'élution de 2 à 6 sont combinées pour (A) et (C). Ces pools sont mis sous dialyse dans un tampon PBS 1X contenant 5 mM de β-mercaptoéthanol toute une nuit à 4 °C en présence de TEV à 10 µM final. Les pools de protéines sont ensuite injectés sur tamis moléculaire S75 (filtre de 1 à 30 kDa). Il s'agit de **B.** OsSIZ1 court et **D.** OsSIZ2 court. Les protéines sont chargées sur un gel SDS-PAGE 12 % contenant du 2,2,2-trichloroéthanol (TCE) qui est un révélateur fluorescent de protéines. Les flèches vertes indiquent les protéines clivées. Les flèches bleues indiquent la thiorédoxine clivée. L'encadré rouge montre les fractions collectées présentant nos protéines cibles qui ont par la suite été concentrées en utilisant un filtre centrifugal Amicon ultra-15 à 10 kDa.

3.3 Détermination de la spécificité des anticorps anti-OsSIZ1/2

Les sérums immuns et préimmuns résultant des premières saignées des lapins ont été testés. Les résultats des tests ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) fournis par le laboratoire partenaire lors de la livraison des sérums montrent une différence marquée entre les réponses du préimmun et de l'immun (Annexe G). En effet, le signal dans le préimmun reste relativement faible comparé à celui du sérum immun, avec un écart d'au moins un facteur de 10. Cela suggère une réponse immunitaire possiblement significative et spécifique après immunisation. Les données indiquent un titre (en référence à la concentration ou à la quantité d'anticorps présents dans un sérum généralement mesurée à l'aide de dilutions successives) élevé, avec une réponse détectable par ELISA à des dilutions allant jusqu'à 1 : 1,024,000 du sérum immun. Autrement dit, même à cette dilution, une reconnaissance spécifique de nos protéines d'intérêt pourrait être encore observée, ce qui laisse entrevoir un potentiel intéressant par rapport à une production robuste d'anticorps anti-OsSIZ1/2. Il est toutefois important de s'assurer que les sérums contiennent bien des anticorps anti-OsSIZ1/2 fonctionnels et spécifiques. La spécificité de reconnaissance a donc été testée d'abord dans le cadre d'applications d'immunobuvardage, puis envisagée pour des immunoprécipitations, telles que les expériences de ChIP. Pour cela, des immunobuvardages ont été réalisés. Les protéines recombinantes OsSIZ1 long, OsSIZ1 court et OsSIZ2 court, en présence ou en absence de clivage par la protéase TEV. La Figure 3.15 présente les résultats de ces immunobuvardages. Les anticorps ont soit été dilués au 1 : 100 soit au 1 : 1000 et semblent reconnaître certaines formes des SIZs, bien que la spécificité ne puisse pas être clairement établie à ce stade. Un signal détectable est observé dans les sérums préimmun aux deux dilutions testées. Ces sérums,

collectés avant l'immunisation des animaux avec les protéines recombinantes, ne devraient théoriquement pas contenir d'anticorps dirigés contre les SIZs du riz ou d'*Arabidopsis*. La faible intensité du signal, comparée à celle obtenue avec les sérums immuns, va dans le sens de cette hypothèse. En effet, les temps d'exposition nécessaires pour visualiser les signaux issus des sérums préimmun varient entre 5 et 20 minutes, contre 20 à 40 secondes pour les sérums post-immunisation. La présence de bandes supplémentaires (à d'autres poids moléculaires que ceux des protéines d'intérêt) suggère que les sérums contiennent des anticorps reconnaissant d'autres protéines. Cette réactivité pourrait être due à des protéines bactériennes co-purifiées avec nos protéines recombinantes. Cependant, étant donné que les sérums utilisés ici n'ont pas été purifiés, ces signaux doivent être interprétés avec prudence, car la présence d'anticorps non spécifiques est fréquente dans ce type de matrice. Néanmoins, leur reconnaissance par les anticorps ne devrait pas compromettre les analyses en ChIP-Seq, celles-ci étant réalisées sur des extraits de cellules végétales. En effet, les ChIP sont effectuées à partir de chromatine isolée à partir de tissus végétaux fixés, dans lesquels la présence de protéines bactériennes est exclue. Par ailleurs, l'immunoprécipitation cible spécifiquement des complexes ADN-protéines associés à la chromatine nucléaire végétale, ce qui limite fortement la probabilité de coprécipitation de protéines non spécifiques, notamment bactériennes. Pour renforcer cette spécificité, un pré-blot (dot blot ou Western) sur des extraits végétaux natifs ou fixés pourrait être réalisé, pour vérifier que les anticorps reconnaissent bien une protéine unique de la bonne taille dans un contexte cellulaire pertinent. De plus, une étape de pré-adsorption des anticorps sur des extraits bactériens pourrait être envisagée pour éliminer les réactifs croisés, si une contamination excessive était suspectée. Ces considérations montrent les limites de l'approche basée sur des sérums non purifiés, ce qui justifie pleinement l'étape suivante de purification des anticorps. Enfin, même en cas de faible réactivité croisée, le risque de compétition directe pour des sites d'intérêt sur la chromatine végétale reste très limité. En effet, les protéines bactériennes, souvent cytoplasmiques ou membranaires, ne sont ni présentes dans le noyau végétal ni associées à la chromatine, ce qui rend leur coprécipitation hautement improbable dans un protocole ChIP correctement exécuté (Orlando, 2000). De plus, la spécificité d'une immunoprécipitation repose non seulement sur la reconnaissance antigénique, mais aussi sur l'accessibilité structurale de la cible dans son contexte natif (Park, 2009), ce qui confère une couche de sélectivité supplémentaire. La protéine MBP-AtSIZ1 (environ 170 kDa), apparentée aux OsSIZs mais issue d'*Arabidopsis*, a également été incluse dans les tests afin d'évaluer une éventuelle réactivité croisée. Un signal a pu être détecté, notamment avec les sérums immuns, bien que son intensité reste faible, en particulier avec les sérums non purifiés ou fortement dilués.

La reconnaissance de cette protéine devra être confirmée de manière plus spécifique à l'aide d'anticorps purifiés.

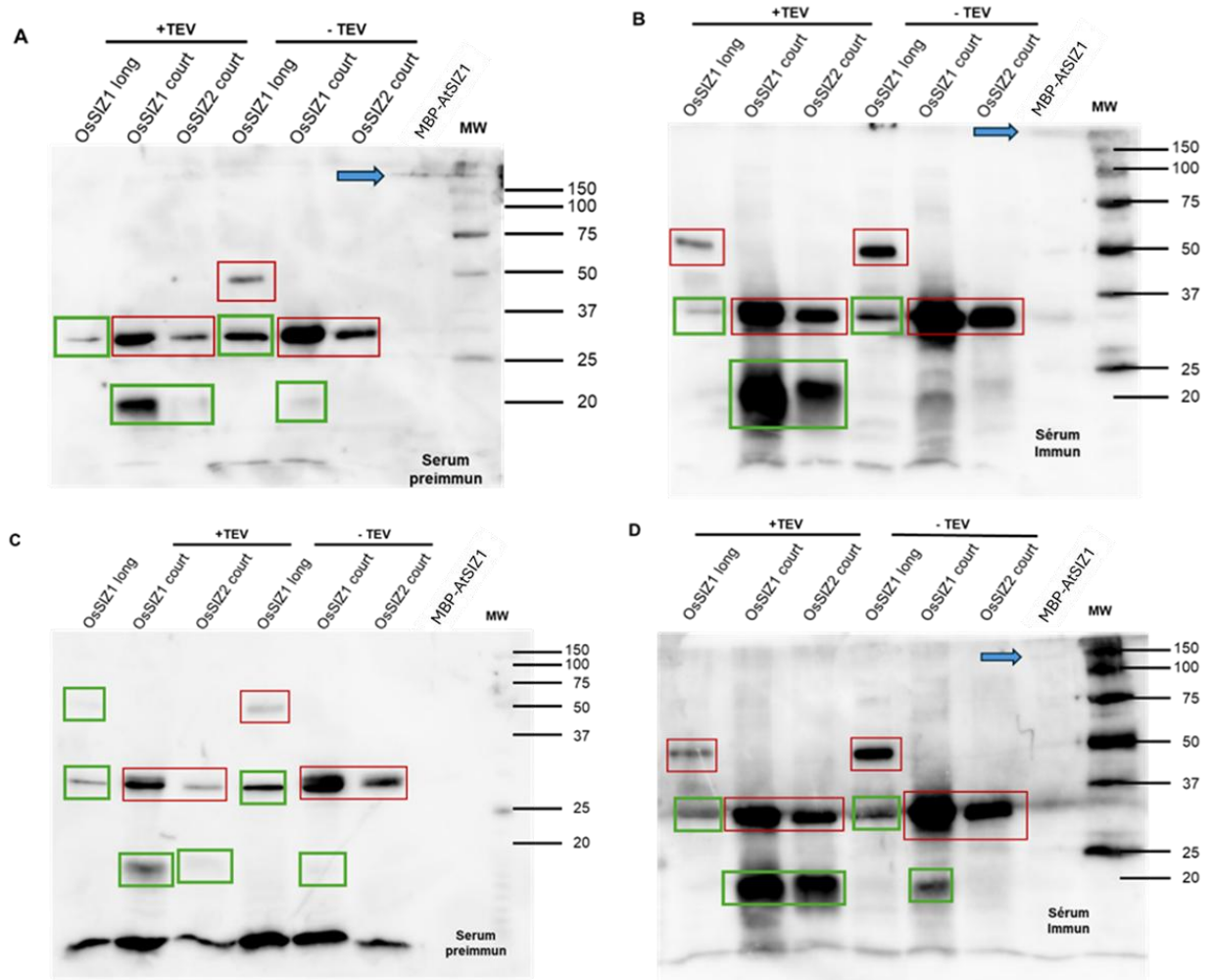


Figure 3.15 Western Blot avec les anticorps des sérums préimmun et immun. On observe des immunobuvardages fait à partir de gels SDS-PAGE 12 % chargés avec 4 μ g de protéines OsSIZ1 long, OsSIZ1 court et OsSIZ2 court. Un contrôle positif (100 nM de MBP-AtSIZ1) a été ajouté. Les sérums préimmun et immuns (anticorps anti-OsSIZ1/2) ont été dilués au 100^e (A et B) et au 1000^e (C et D) dans un tampon de blocage contenant 5 % de lait écrémé. L'immunobuvardage s'est faite sous agitation toute une nuit à 4 °C. Les flèches bleues représentent MBP-AtSIZ1. Les encadrés rouges représentent les protéines non clivées et les encadrés verts celles clivées.

Nous avons émis l'hypothèse que les anticorps générés pourraient reconnaître les protéines cibles dans leur conformation native, ce qui est essentiel pour leur utilisation en ChIP. Bien que les résultats obtenus par ELISA et Western blot aient montré une certaine reconnaissance des protéines, ces tests ne

permettent pas de confirmer leur spécificité ou une reconnaissance dans leur forme native : le Western blot utilise des protéines dénaturées, et l'adsorption des antigènes sur les plaques et ELISA peut altérer partiellement leur structure tridimensionnelle. C'est pourquoi nous avons réalisé une immunoprécipitation en conditions non dénaturantes (ChIP-qPCR), afin de valider la capacité des anticorps à reconnaître les protéines dans leur conformation native et dans un contexte chromatinien. Cette étape est cruciale pour tester la spécificité des anticorps avant de procéder au ChIP-Seq. Des ChIP-qPCR ont été effectuées avec les différents sérums de la Figure 3.15. Ces tests ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment, où nous avons utilisé un anticorps anti-SUMO pour évaluer la SUMOylation des protéines associées à l'ADN sous stress de HT. Cette fois-ci, nous avons utilisé des sérums immuns dirigés contre les SIZs. Les régions ciblées pour cette expérience incluent les promoteurs des gènes OsHSFA2d, OsHSFA6 et OsETF β , comme décrit précédemment. La Figure 3.16 présente les tests de spécificité des anticorps anti-OsSIZ1/2 par ChIP-qPCR. Les données de ChIP-qPCR ont montré une absence d'enrichissement clair, ce qui suggère que les sérums testés ne permettent pas une immunoprécipitation efficace ou spécifique des protéines SIZs. En effet, les différences de Ct (nombre de cycles de PCR effectués) entre IP et input sont ≤ 1 cycle, bien en deçà de ce qui avait été observé avec l'anticorps anti-SUMO (≈ 5 cycles). Toutefois, les barres d'erreur suggèrent que certaines différences de Ct pourraient être significatives, notamment pour HSFA6 et ETF β , ce qui mériterait une confirmation statistique. Par ailleurs, un profil différentiel est observé entre les deux conditions expérimentales : les Ct des IP augmentent légèrement en condition contrôle, mais diminuent en stress de HT, ce qui pourrait refléter une légère amélioration de la reconnaissance ou un changement d'abondance des protéines SIZs sous stress. Ces résultats indiquent que les anticorps non purifiés présentent une spécificité insuffisante pour les applications ChIP. Ces résultats suggèrent que les anticorps anti-OsSIZ1/2 pourraient soit interagir avec des protéines non ciblées mais capables de lier l'ADN et donc être non spécifiques, soit voir leur spécificité réduite en raison de la présence d'autres anticorps dans le sérum, ce qui compliquerait l'identification d'un enrichissement spécifique des OsSIZs. En d'autres termes, bien que ces anticorps semblent capables de reconnaître les OsSIZs, leur efficacité pourrait être altérée par la complexité du sérum, ce qui pourrait introduire des interférences dues à la reconnaissance d'autres cibles. Cette observation a conduit à la décision de purifier les anticorps, afin d'enrichir spécifiquement les IgG d'intérêt et éliminer les composants sériques interférents.

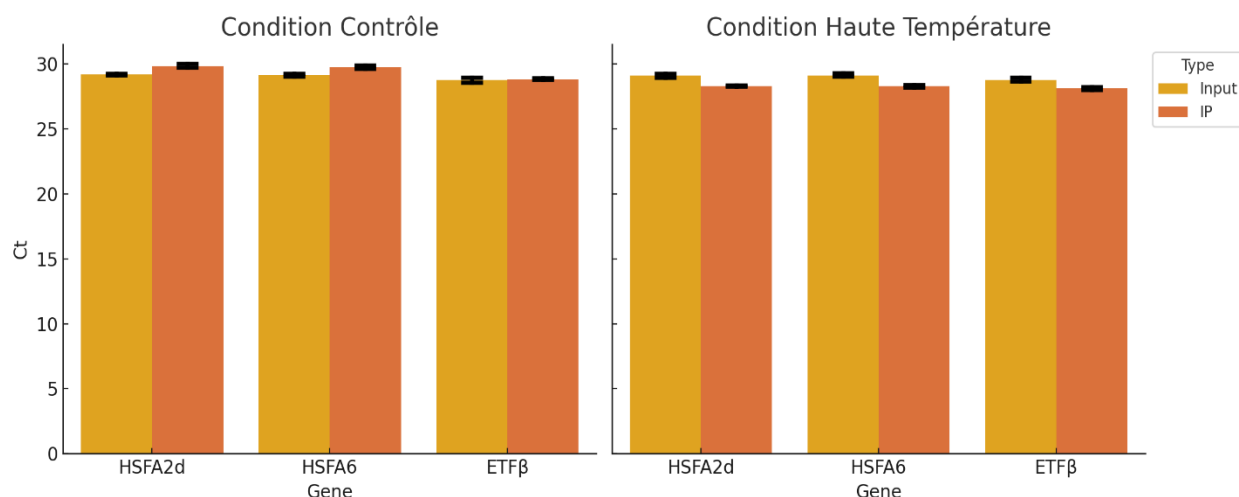


Figure 3.16 Comparaison entre des valeurs de cycle seuil input et IP par gène et par condition après ChIP-qPCR avec le sérum immun du lapin. Des graines de riz ont été germées et cultivées à 28 °C pendant 14 jours, puis soumises ou non à un stress de haute température de 40 °C pendant 1 h. Après immunoprécipitation avec le sérum immun contenant les anticorps anti-OsSIZ1/2, l'ADN a été nettoyé puis récupéré à raison de 0,130 ng/μL en contrôle et 0,150 ng/μL en stress. Des « Inputs » non précipité ont également été récupéré à raison de 2,14 ng/μL en contrôle et 2,02 ng/μL en stress. Les inputs sont normalisés aux mêmes concentrations que leurs IP respectifs. Chaque échantillon a été analysé par qPCR avec des amorces ciblant les promoteurs listés au Tableau 3.2 pour HSFA2d, HSFA6 et ETFβ. Les deux panneaux distinguent le nombre de Ct (Cycle seuil) pour la condition contrôle (gauche) de la condition haute température (droite). Chaque barre représente la moyenne de trois réplicats biologiques, et les barres d'erreur correspondent à l'écart-type.

Afin d'isoler spécifiquement la fraction d'anticorps dirigée contre OsSIZ1 et OsSIZ2, une purification par affinité a été envisagée à partir des sérums immuns. Pour cela, la compagnie MediMabs, chargée de produire les anticorps nécessitait des quantités suffisantes de protéines recombinantes OsSIZ1 et OsSIZ2, purifiées et adaptées à une immobilisation sur une matrice chromatographique. Nous avons donc exprimé et purifié à nouveau ces protéines en *E. coli*. Au total, 3,75 mg d'OsSIZ1 et 3,2 mg d'OsSIZ2 ont été obtenus. Les deux protéines ont ensuite été combinées et envoyées à MediMabs. Celles-ci ont été fixées sur la résine, puis les sérums immuns ont été appliqués sur la colonne. Seuls les anticorps reconnaissant spécifiquement OsSIZ1 et OsSIZ2 ont été retenus, puis élués, permettant ainsi d'obtenir une fraction d'anticorps purifiés supposés spécifiques de ces deux protéines. Les anticorps anti-SIZs ainsi obtenus sont testés à nouveau par immunobuvardage (Figure 3.17). La présence de bandes à environ 20 kDa sur la membrane, correspondant à la taille attendue des protéines OsSIZ1 et OsSIZ2 observée sur gel, suggère

(comme dans la Figure 3.15) que les anticorps anti-OsSIZ1/2 reconnaissent bien les protéines d'intérêt. Ces résultats, obtenus après purification par affinité, suggèrent une reconnaissance plus marquée des protéines OsSIZ1 et OsSIZ2, bien qu'une certaine réactivité envers d'autres protéines, possiblement des contaminants bactériens, soit encore visible sur la membrane. Nous avons donc entrepris de réaliser de nouvelles ChIP-qPCR avec les anticorps purifiés, afin de vérifier leur spécificité dans un contexte chromatinien.

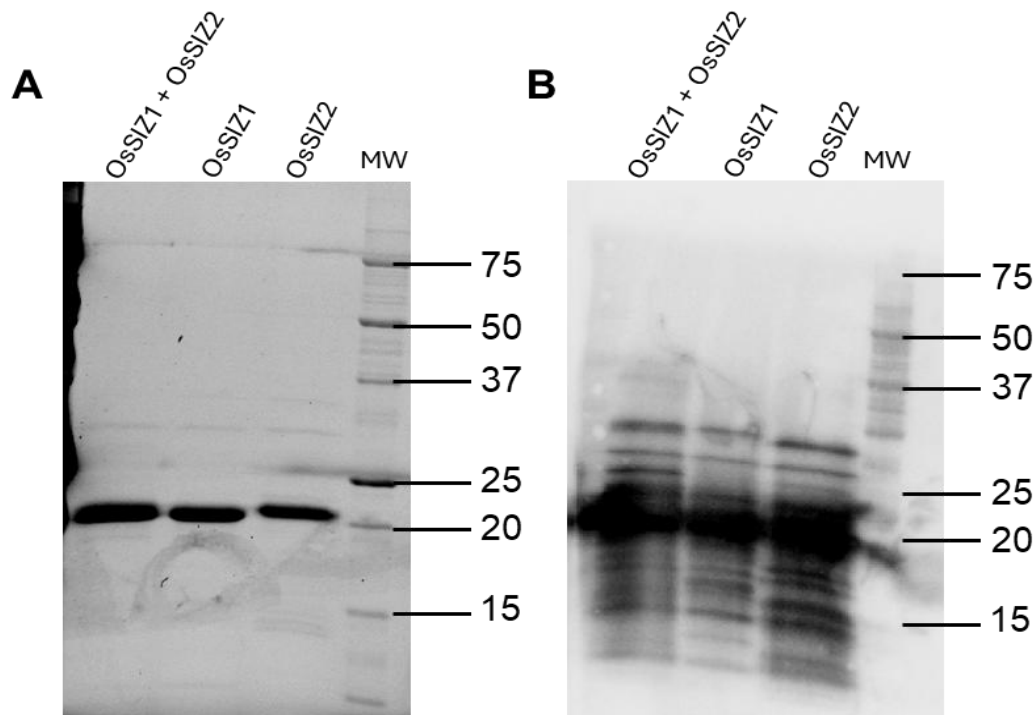


Figure 3.17 Expériences d'immunobuvardage des tests de reconnaissance d'OsSIZ1 et OsSIZ2 par les anticorps anti-OsSIZ1/2 purifiés. **A.** On peut observer le gel SDS-PAGE chargé avec 4 µg de protéines OsSIZ1, OsSIZ2 ou du mélange OsSIZ1 + OsSIZ2 (aliquot provenant de l'échantillon d'OsSIZs combinées envoyées pour l'immunisation des lapins). **B.** On observe le Western blot fait à partir de ce gel avec les anticorps purifiés pAB213 (anti-OsSIZ1/2). Les anticorps, dilués à 1/1000 dans un tampon de blocage TBST 1X contenant 5 % de lait écrémé, ont été incubés durant 16 heures avec agitation avec la membrane.

Les résultats de ChIP-qPCR (Figure 3.18) sont similaires à ceux obtenus dans la Figure 3.17. Comme précédemment, il semble qu'il y'ai une absence de spécificité de nos anticorps anti-OsSIZ1/2 pour les protéines OsSIZ1 et OsSIZ2 avec des Ct proches entre input et IP qui se traduisent par des % Input faibles (en dessous de 5 %) comparativement à la ChIP-qPCR dirigée contre SUMO où le pourcentage d'input varie

entre 70 et 140 % (Figure 3.3). Il n'y a pas non plus de différence significative détectée entre les conditions contrôle et stress de HT.

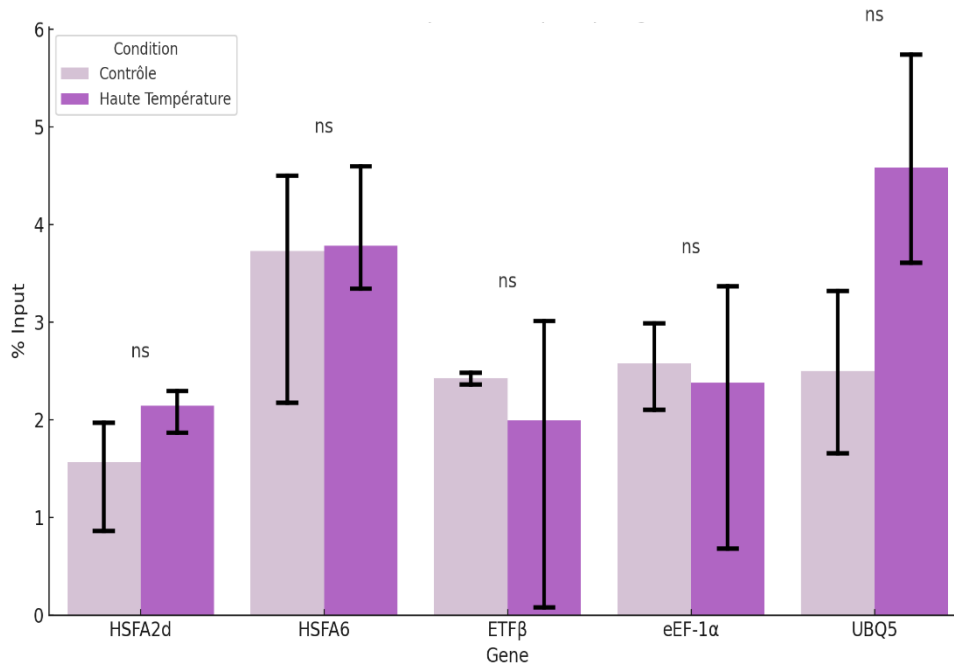


Figure 3.18 Enrichissement relatif des régions promotrices des gènes cibles sous stress de haute température par rapport à des conditions contrôle par ChIP qPCR avec les anticorps anti-OsSIZ1/2 purifiés. Des graines de riz ont été cultivées à 28 °C pendant 14 jours, puis soumises ou non à un stress de haute température (40 °C, 1 h). Après immunoprécipitation avec l'anticorps anti-OsSIZ1/2, l'ADN a été nettoyé puis récupéré à raison de 0,0520 ng/μL en contrôle et 0,104 ng/μL en stress. Des « inputs » non précipité ont également été récupéré à raison de 3,48 ng/μL en contrôle et 3,40 ng/μL en stress. Chaque échantillon a été analysé par qPCR avec des amorces ciblant les promoteurs listés au Tableau 3.2. Le pourcentage d'input (% Input) correspond à la quantité d'ADN précipitée rapportée à l'input initial et corrigée avec le facteur de dilution. Les barres indiquent la moyenne des trois réplicats et les tirets verticaux représentent l'écart-type (n = 3). Les comparaisons statistiques entre les conditions Contrôle et Haute Température ont été réalisées pour chaque gène cible à l'aide d'un test t de *Student* bilatéral non apparié (fonction *ttest_ind* du module *SciPy*). Les seuils de significativité sont : * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns : non significatif ($p > 0,05$). À noter : une variance élevée a été observée pour UBQ5, utilisé ici comme témoin négatif. Bien qu'un enrichissement apparent soit détecté en condition de stress, cette variation n'est pas significative au seuil de confiance utilisé.

Nous avons donc cherché à évaluer cette absence de spécificité en utilisant une approche complémentaire. Pour ce faire, des essais d'immunoprécipitation ont été réalisés avec des protéines recombinantes d'OsSIZ1 et d'OsSIZ2 contenant le domaine SAP (domaine de liaison à l'ADN), en plus des domaines PINIT et SP-RING (Figure 3.19). Ces protéines ont été purifiées par un autre membre du laboratoire, en suivant le protocole optimisé présenté en section 3.2.2.2. Le domaine SAP étant spécifique aux ligases SUMO de

type SIZ, nous avons mis en place un système *in vitro* combinant de l'ADN (vecteurs pRSF-Duet vides) avec les protéines recombinantes (formes PINIT + SP-RING + SAP ou SP-RING seules), puis procédé à une immunoprécipitation à l'aide des anticorps purifiés. Si les SIZs interagissent avec l'ADN via leur domaine SAP, les complexes protéines-ADN devraient être précipités par les anticorps anti-SIZs. L'ADN co-précipité est ensuite récupéré et quantifié par qPCR à l'aide d'amorces spécifiques du vecteur, ciblant les régions ACYC (sens) et Down1 (antisens). L'efficacité de l'amplification a été vérifiée à l'aide d'une courbe standard générée à partir de dilutions logarithmiques d'un ADN standard (vecteurs vides pRSF-Duet), avec une efficacité calculée de 104 % et un coefficient de corrélation R^2 de 0,9663 (Annexe H).

L'obtention d'un signal d'enrichissement significatif en ADN, en présence des formes d'OsSIZ1 ou OsSIZ2 contenant le domaine SAP, indique que les anticorps purifiés reconnaissent spécifiquement les protéines cibles dans leur conformation native. Ce résultat suggère que les SIZs se lient effectivement à l'ADN plasmidique via leur domaine SAP, et que les anticorps sont capables de précipiter ces complexes protéines-ADN. Une telle spécificité confirmerait la qualité des anticorps obtenus, ainsi que leur potentiel d'application dans des expériences de ChIP à plus grande échelle, notamment pour identifier les cibles génomiques d'OsSIZ1/2 par ChIP-Seq. Un signal plus faible a également été détecté pour les formes d'OsSIZ1 et OsSIZ2 dépourvues du domaine SAP. Bien que ce signal reste inférieur à celui observé pour les formes avec SAP, sa présence pourrait refléter un niveau d'interaction non spécifique ou résiduel. Il est important de noter qu'aucun contrôle avec ADN seul (sans protéines recombinantes) n'a été inclus dans cette expérience. Cette absence empêche d'exclure entièrement une éventuelle interaction non spécifique entre les anticorps et l'ADN. Néanmoins, les contrôles sans ADN ainsi que sans anticorps permettent de limiter partiellement ce biais. Ces résultats viennent ainsi clore la phase de validation des anticorps produits, en confirmant leur spécificité ainsi que leur aptitude à immunoprécipiter des complexes protéines-ADN. Ils valident leur potentiel pour des applications ultérieures en ChIP, notamment pour l'identification de cibles génomiques par ChIP-Seq visant à cartographier les cibles génomiques des ligases OsSIZ1 et OsSIZ2 chez le riz.

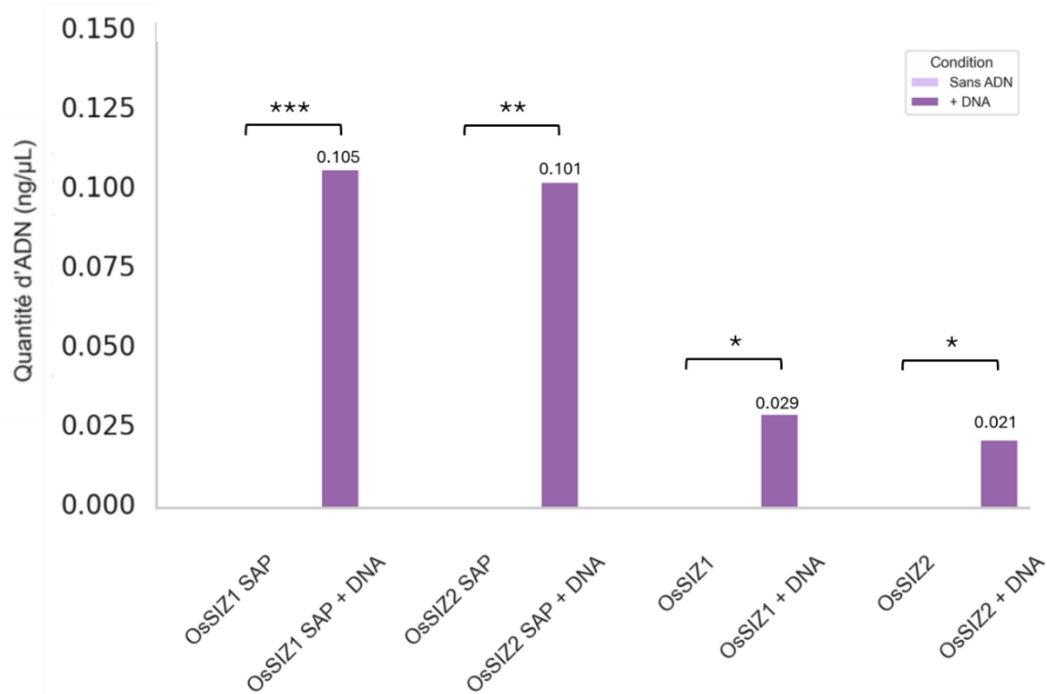


Figure 3.19 Validation de la spécificité des anticorps anti-OsSIZ1/2 par immunoprécipitation suivie de qPCR (IP-qPCR). Des immunoprécipitations *in vitro* ont été réalisées à l'aide de 100 nM de protéines recombinantes OsSIZ1 ou OsSIZ2, exprimées soit sous forme longue (PINIT + SP-RING + SAP), soit sous forme courte (SP-RING seul), en présence de 100 nM d'ADN plasmidique (vecteurs pRSF-Duet vides). Les barres représentent la quantité d'ADN mesurée (en ng/μL) pour chaque condition. Les conditions indiquées « + DNA » correspondent à des échantillons où de l'ADN a été ajouté, tandis que les conditions sans cette mention sont des contrôles négatifs (sans ADN ajouté). Les échantillons ont été incubés toute la nuit à 4 °C avec les anticorps anti-OsSIZ1/2. L'ADN co-précipité a ensuite été quantifié par qPCR. Les barres représentent les concentrations d'ADN mesurées (en ng/μL) pour chaque condition. Les comparaisons statistiques ont été effectuées entre chaque paire ±ADN pour une même protéine, à l'aide d'un test t de Student bilatéral non apparié. Les seuils de significativité sont : * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns : non significatif ($p > 0,05$).

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 Reconnaissance des protéines SUMO et identification des cibles génomiques sous stress de haute température

Afin de comprendre le rôle de la SUMOylation dans la régulation transcriptionnelle induite par le stress de haute température (HT) dans le riz, *Oryza sativa*, nous avons cherché à identifier les régions génomiques associées aux protéines SUMOylées par une approche ChIP-Seq. L'anticorps anti-SUMO1 (ab5316), initialement développé contre AtSUMO1 d'*Arabidopsis thaliana* (Kurepa et al., 2003) a été validé pour détecter les différentes SUMO du riz, OsSUMO1 et OsSUMO2, qui partagent une forte similarité de séquence avec leurs homologues provenant d'*Arabidopsis* ($\geq 93\%$). Notre choix s'appuie sur une étude (Han et al., 2021), dans laquelle cet anticorps a été utilisé avec succès pour caractériser l'enrichissement en protéines SUMOylées au niveau de la chromatine lors de la transition transcriptionnelle entre la croissance et le développement de la plante et sa réponse au stress de HT. Bien que les deux études partagent un objectif similaire et utilisent un anticorps commun, les conditions expérimentales diffèrent. Han et al. ont appliqué un stress de HT à 37 °C pendant 30 minutes, suivi d'une phase de récupération à 23 °C pendant 90 minutes. En comparaison, notre protocole utilise une température de contrôle légèrement plus élevée (28 °C), un stress de HT plus intense (40 °C) pendant une durée plus longue (1 heure), et ne comprend pas de phase de récupération. Ces différences pourraient influencer la nature et la dynamique des protéines SUMOylées détectées.

En reproduisant cette stratégie dans le contexte du riz, notre objectif était d'examiner si une régulation similaire par la SUMOylation chromatinienne intervient également dans la réponse au stress de HT chez *O. sativa*. Dans l'étude de (Wilkins et al., 2016), les facteurs de transcription OsHSFA2d et OsHSFA6 montrent une forte induction après 30 minutes de stress de HT à 37 °C, avec un pic d'activité suivi d'un déclin progressif. Cette dynamique a été observée dans un protocole incluant une phase de récupération à 23 °C, au cours de laquelle l'activité des HSFs chute rapidement en dessous du niveau basal. Notre protocole, ne comprenant pas de phase de récupération et appliquant un stress de HT plus intense (40 °C pendant 1 heure), pourrait entraîner une activité soutenue de ces HSFs au moment de la ChIP. Ces gènes ont donc été retenus comme loci cibles pertinents pour évaluer l'enrichissement en protéines SUMOylées associées à la chromatine. Nos résultats obtenus par Western blot (Figure 3.2) ont validé que l'anticorps reconnaît OsSUMO1 et OsSUMO2 et présente en outre une affinité pour AtSUMO2 légèrement réduite,

ce qui est en accord avec les différences de séquence entre ces protéines. Cette validation a confirmé l'utilisation de cet anticorps pour des analyses plus poussées, telles que la ChIP-qPCR ciblée chez le riz (Figure 3.3). Toutefois, une analyse comparative plus poussée entre anticorps bruts et purifiés, ou une validation fonctionnelle croisée (par exemple avec des mutants déficients en SUMOylation), aurait renforcé la confiance dans la spécificité du signal ChIP. Cette limitation souligne la nécessité de considérer plus systématiquement les caractéristiques structurales des protéines cibles lors de la sélection ou la production d'anticorps pour des applications en ChIP-Seq.

De plus, les expériences de ChIP-qPCR ayant été réalisées avec un anticorps dirigé contre une protéine issue d'une dicotylédone (*Arabidopsis thaliana*), il est important de considérer les différences potentielles entre la machinerie SUMO des monocotylédones et celle des dicotylédones. À ce jour, il n'existe pas d'études comparatives directes et systématiques permettant de caractériser précisément les différences des patrons de SUMOylation entre *Arabidopsis thaliana* et *Oryza sativa*, ni plus largement entre monocotylédones et dicotylédones. La majorité des travaux se focalisent sur une espèce donnée, souvent *Arabidopsis*, en raison de son statut de modèle végétal bien étudié. Cela étant dit, plusieurs éléments biologiques et génomiques suggèrent que des différences sont plausibles. La SUMOylation repose sur un ensemble d'enzymes conservées (E1, E2, E3, protéases de maturation et de dé-SUMOylation), mais des analyses génomiques comparatives révèlent des variations dans le nombre de copies et la composition de certains modules, notamment pour les ligases SUMO de type SIZ/PIAS et certaines protéases ULP/OTS (Garrido *et al.*, 2018 ; Novatchkova *et al.*, 2012). Chez *Arabidopsis*, un seul gène codant pour l'enzyme E2 (SCE1) est impliqué dans la SUMOylation (Novatchkova *et al.*, 2012). En revanche, les monocotylédones comme le riz possèdent au moins deux gènes SCE, ce qui suggère une diversification fonctionnelle de cette catégorie enzymatique. Cette divergence est corroborée par des études fonctionnelles : par exemple, chez le riz, l'OsSCE1 sur-exprimée augmente la sensibilité à la sécheresse, tandis que l'OsSCE3 confère une tolérance accrue à ce stress (Joo *et al.*, 2019). Ces différences entre monocotylédones et dicotylédones renforcent l'idée que les patrons de SUMOylation peuvent varier non seulement en termes de composition enzymatique, mais aussi en raison de l'expression fonctionnelle des isoformes E2. De plus, certaines protéines cibles SUMOylées, notamment des facteurs de transcription impliqués dans la réponse au stress (par exemple HSF2, DREB2 (Wang *et al.*, 2020)), sont conservées et SUMOylées dans les deux espèces, indiquant un socle fonctionnel commun. Cependant, il est raisonnable de penser que la dynamique, l'intensité, et le contexte cellulaire de la SUMOylation diffèrent, car ces processus sont régulés finement par des réseaux de signalisation et des conditions environnementales spécifiques à chaque espèce. Dans

ce contexte, l'utilisation d'un anticorps anti-SUMO provenant d'une dicotylédone repose sur l'hypothèse d'une conservation suffisante de l'épitope entre les SUMO de monocotylédones et dicotylédones. Cette hypothèse est soutenue par la forte identité de séquence mais n'exclut pas des différences d'accessibilité ou de conformation en contexte chromatinien (Novatchkova et al., 2012). Ainsi, bien que cette approche soit pertinente et courante en systèmes hétérologues, elle introduit un facteur à considérer dans l'interprétation des résultats et leur transposabilité entre lignées évolutives. Notre étude ne visant pas une comparaison fonctionnelle directe, les données actuelles ne permettent pas de conclure sur d'éventuelles divergences de profils de SUMOylation entre monocotylédones et dicotylédones.

Nos résultats de ChIP-qPCR ont révélé un enrichissement qualitatif de la SUMOylation sur les régions promotrices contenant des motifs HSE canoniques en condition de stress de HT, suggérant une régulation transcriptionnelle directe médiée par les protéines SUMOylées, possiblement des facteurs de transcription (FTs) ou des coactivateurs, recrutées sur ces promoteurs pendant le stress. La quantification de cet enrichissement a été réalisée en comparant les échantillons immunoprécipités à un contrôle non immunoprécipité (input) permettant de distinguer un enrichissement spécifique par rapport au bruit de fond. Bien que cette approche n'offre pas la couverture génomique et la résolution globale d'un séquençage de type ChIP-Seq, elle présente une sensibilité suffisante pour détecter des enrichissements spécifiques. Elle permet ainsi de mettre en évidence des modifications localisées sur des régions promotrices ciblées, en lien avec une régulation transcriptionnelle potentielle. Ces observations renforcent l'hypothèse que la SUMOylation peut moduler directement l'activité transcriptionnelle en agissant sur les complexes régulateurs liés à l'ADN. Toutefois, il convient de préciser que ces données ne constituent pas une démonstration directe de causalité. Une confirmation définitive nécessiterait des approches complémentaires telles qu'un ChIP-Seq global pour identifier l'ensemble des loci SUMOylés, suivi d'analyses transcriptomiques (RNA-Seq) afin d'évaluer la corrélation entre SUMOylation et modulation de l'expression génique, ou encore des co-immunoprécipitations permettant d'identifier les facteurs de transcription SUMOylés impliqués.

Au niveau moléculaire, la SUMOylation est connue pour influencer la dynamique d'assemblage des complexes transcriptionnels de plusieurs façons. Elle peut par exemple faciliter ou inhiber la formation de ces complexes en créant des interfaces de reconnaissance spécifiques (via des domaines portant des motifs d'interaction SIM/SUMO), modulant ainsi les interactions entre les facteurs de FTs, les coactivateurs et la machinerie transcriptionnelle de base (Aguilar-Martinez et al., 2015 ; Chen et al., 2024 ; Cong et al.,

2011). Cette modification post-traductionnelle peut également réguler la stabilité des FTs en les protégeant de la dégradation par le protéasome, ou à l'inverse, en facilitant leur reconnaissance par des facteurs de dégradation dans certains contextes cellulaires (Boulanger *et al.*, 2021 ; Rosonina *et al.*, 2017). Par ailleurs, la SUMOylation peut modifier la localisation subnucléaire de ces protéines, favorisant leur accumulation dans des zones transcriptionnellement actives ou répressives, comme les corps nucléaires ou des sites de chromatine spécifiques. Ces effets combinés contribuent à moduler la réponse transcriptionnelle de manière fine et rapide en situation de stress, comme observé ici dans les conditions de haute température. Dans Arabidopsis, il a été démontré que certains FTs comme DREB2A sont stabilisés via la SUMOylation, leur conférant une plus grande persistance dans le noyau en condition de stress de HT (Wang *et al.*, 2020). D'autres travaux ont démontré, toujours dans Arabidopsis, que la SUMOylation, notamment sur des régions de chromatine active, peut restreindre l'expression transcriptionnelle en réponse au stress de HT, permettant d'ajuster l'expression génique en situation dans ces mêmes conditions (Niskanen *et al.*, 2015). Cette double capacité à activer ou restreindre la transcription souligne la nature contextuelle et dynamique de la SUMOylation. Le fait que les HSFs se lient à leurs propres promoteurs suggère aussi une régulation croisée au sein de cette famille de protéines. En outre, la présence de motifs HSE multiples dans les régions promotrices de ces gènes soulève la possibilité d'une autorégulation ou d'une régulation croisée entre membres de la famille HSF. Des travaux antérieurs ont montré que certains HSFs peuvent se lier à leur propre promoteur ou à celui d'autres HSFs, créant ainsi des boucles de rétrocontrôle positives ou négatives (Cohen-Peer *et al.*, 2010 ; Han *et al.*, 2021). Dans un tel scénario, la SUMOylation pourrait servir de commutateur moléculaire modulant cette boucle de rétrocontrôle selon l'intensité et la durée du stress de HT. L'hypothèse d'une boucle de rétrocontrôle par lequel les HSFs réguleraient leur propre expression via la SUMOylation, pourrait être explorée par plusieurs approches. Il serait possible de réaliser un ChIP temporel afin de suivre la dynamique d'enrichissement en SUMO sur les promoteurs de HSFs pendant la phase de stress et lors de la récupération (Chang *et al.*, 2013). Aussi, des approches de double ChIP (re-ChIP) pourraient être mises en œuvre pour déterminer si la SUMOylation et la liaison directe des HSFs coexistent sur les mêmes loci (Wu et Donohoe, 2016). Ces expériences contribueraient à clarifier le rôle fonctionnel de la SUMOylation dans la boucle de régulation des HSFs.

Enfin nos résultats suggèrent également que OsHSFA2d et OsHSFA6 exercent leur fonction de manière complémentaire, tant sur le plan spatial que temporel. D'une part, OsHSFA2d fait l'objet d'un épissage alternatif produisant la forme active OsHSFA2dl sous stress, qui s'accumule dans le noyau pour activer

rapidement les gènes de choc thermique, tandis que sa forme inactive prédomine en condition contrôle, soulignant un mécanisme adaptatif temporel (Cheng *et al.*, 2015). D'autre part, OsHSFA6 présente un profil d'expression plus restreint, avec une prédilection pour les tissus vasculaires et les jeunes feuilles (structures où le stress de HT engendre généralement les premiers symptômes de détresse cellulaire) suggérant qu'il renforce localement l'action d'OsHSFA2d dans ces organes particulièrement sensibles au stress (Singh *et al.*, 2018 ; Wang *et al.*, 2009). Des études sur *Arabidopsis* montrent que HSF1 et HSF2 forment un complexe qui renforce la transcription des gènes de choc thermique (Chan-Schaminet *et al.*, 2009). Chez le riz, on peut imaginer qu'OsHSFA2d et OsHSFA6 s'associent de la même manière, leur interaction étant contrôlée par la SUMOylation, pour ajuster et renforcer la réponse aux différentes intensités et localisations du stress de HT. Des analyses transcriptomiques plus fines, pourraient permettre de distinguer ces patrons d'expression tissulaire et temporelle, et aider à clarifier leurs rôles respectifs (Chandran *et al.*, 2024 ; Wang *et al.*, 2009). En résumé, les résultats obtenus sur OsHSFA2d et OsHSFA6 mettent en lumière leur rôle potentiel comme régulateurs centraux de la réponse au stress de HT dans le riz, possiblement modulés via la SUMOylation. Cette PTM pourrait influencer leur activité et la répartition fonctionnelle des HSFs, influençant à la fois leur capacité à activer la transcription des gènes cibles et leur interaction entre elles mais aussi leur capacité à s'autoréguler, en fonction de la sévérité du stress.

Un résultat notable est celui de l'analyse d'un gène supposé contrôle négatif, OsETF β (Os04g0182800), codant pour la sous-unité β de l'Electron-Transfer Flavoprotein. Ce gène avait été initialement sélectionné comme contrôle négatif dans notre approche, en raison de plusieurs critères. Tout d'abord, il n'est pas répertorié parmi les gènes régulés transcriptionnellement en réponse au stress de HT dans les bases de données transcriptomiques comme RiceXPro, ni dans les études antérieures (Wilkins *et al.*, 2016), et son promoteur est dépourvu de motifs HSE canoniques, normalement reconnus par les facteurs de transcription HSF. Son choix visait donc à évaluer la spécificité du signal de SUMOylation détecté par ChIP-qPCR. Contrairement à un témoin négatif neutre, le promoteur d'OsETF β présente un enrichissement SUMO élevé et constant (≈ 135 % en contrôle vs. ≈ 127 % sous HT, $p > 0,05$), révélant une SUMOylation constitutive de ce locus. En effet, certaines enzymes et régulateurs métaboliques mitochondriaux sont eux-mêmes soumis à SUMOylation (Yu *et al.*, 2020) ; (Seager *et al.*, 2024) ce qui suggère l'existence d'un dialogue bidirectionnel entre les fonctions mitochondriales et la régulation nucléaire via des signaux post-traductionnels. Ce signal permanent peut résulter de la présence de facteurs transcriptionnels ou de cofacteurs SUMOylés en conditions basales, assurant le contrôle de l'expression d'OsETF β en lien avec son rôle clé dans le métabolisme mitochondrial (Araújo *et al.*, 2010), ou d'une architecture chromatinienne

particulièrement riche en histones SUMOylées (Shiio et Eisenman, 2003). Des études antérieures ont montré qu'ETFβ est une sous-unité structurale clé du complexe ETF/ETFQO, qui assure le transfert d'électrons entre la β-oxydation des acides gras et la chaîne respiratoire mitochondriale, contribuant à la production d'ATP (Araújo et al., 2010). Son rôle est crucial durant les phases de forte mobilisation énergétique, telles que la germination ou les réponses adaptatives au stress. Des travaux récents ont d'ailleurs montré que l'activité du complexe ETF/ETFQO est indispensable au bon développement des graines et à leur capacité à germer en l'absence de sucres exogènes, ce qui souligne l'importance d'un métabolisme énergétique efficace en présence ou en absence de stress (Fonseca-Pereira et al., 2022). Sur le plan fonctionnel, cette SUMOylation constitutive pourrait refléter un rétrocontrôle mitochondrie/noyau, où la SUMOylation module la transcription de gènes énergétiques en fonction du statut métabolique basal (He et al., 2020). Pour valider ces hypothèses, plusieurs approches sont envisageables. Tout d'abord, un ChIP-Seq ciblé du promoteur d'OsETFβ, pour cartographier précisément les sites SUMOylés et comparer la couverture génomique. Nous pourrions également faire l'analyse parallèle de l'expression d'OsETFβ et de la SUMOylation de ses régulateurs, afin de lier la modification post-traductionnelle à la régulation transcriptionnelle (Han et al., 2021). Ces investigations permettront de clarifier le rôle basal de la SUMOylation sur OsETFβ.

Il se pourrait également que le critère de sélection de ce gène s'avère effectivement limité, car la régulation transcriptionnelle en réponse au stress HT n'est pas exclusivement médiée par les FTs reconnaissant des HSE canoniques. De nombreux autres FTs impliqués dans la réponse au stress possèdent des motifs de liaison variés, y compris des HSE non canoniques ou d'autres éléments cis-régulateurs, ce qui complique la définition d'un véritable contrôle négatif (Wilkins et al., 2016). Une analyse approfondie des transcriptomes disponibles dans NCBI et autres bases de données, incluant des conditions de stress HT variées, aurait pu permettre d'identifier des gènes dont l'expression reste stable, indépendamment du stress, offrant ainsi des contrôles négatifs plus robustes et spécifiques. Cette démarche s'avère d'autant plus importante que certains gènes dits « contrôles négatifs » peuvent en réalité répondre de manière plus générale au stress, plutôt qu'à la chaleur spécifiquement. Il serait pertinent d'élargir l'étude en testant l'expression et la SUMOylation d'OsETFβ dans d'autres conditions de stress (par exemple oxydatif, hypoxie ou stress hydrique) pour déterminer si la réponse observée est spécifique à la haute température ou plus générale. Pour démontrer cette spécificité, plusieurs approches pourraient être envisagées : une analyse comparative des profils d'expression d'OsETFβ dans divers stress via qPCR ou transcriptomique, couplée à des analyses ChIP-qPCR ou ChIP-Seq pour évaluer la dynamique de SUMOylation sous ces différentes

conditions. Cette réflexion souligne la nécessité d'une sélection rigoureuse et justifiée des contrôles négatifs dans les études ChIP, en tenant compte non seulement des motifs cis-régulateurs mais aussi des données transcriptomiques globales et du contexte biologique. Cette démarche garantit la robustesse et la pertinence des conclusions sur les modifications post-traductionnelles spécifiques au stress étudié.

En revanche, eEF-1 α maintient systématiquement un % Input faible ($\approx 5-8\%$) et invariant entre les conditions ($p > 0,05$), ce qui atteste de sa spécificité vis-à-vis de la SUMOylation et confirme que c'est un témoin négatif fiable en ChIP-qPCR comme indiqué dans l'étude de Jain ([Jain et al., 2006](#)). À l'opposé des résultats de la même étude, UBQ5 présente une augmentation modérée mais significative sous stress thermique ($p = 0,048$) pour la ChIP-qPCR avec anti-SUMO (Figure 3.3) alors qu'elle ne présente pas de différence significative entre les deux conditions pour la ChIP-qPCR avec anti-OsSIZ1/2 (Figure 3.19). Ces résultats révèlent une variabilité non négligeable de son niveau basal et remettent en cause son statut de gène de référence interne. Cette instabilité peut par exemple découler d'une SUMOylation indirecte, qui affecte l'exactitude de la normalisation des données qPCR.

Toutefois, il faut rester prudent dans l'interprétation de ce résultat. Les observations rapportées ici proviennent exclusivement de données de ChIP-qPCR, une méthode ciblée mais plus limitée que les approches à haut débit. Bien que l'enrichissement détecté sur OsHSFA2d et OsHSFA6 soient robustes dans ce cadre, nous n'avons pas pu confirmer ce signal à l'échelle du génome par ChIP-Seq. Une première analyse exploratoire des données de séquençage n'a pas permis d'identifier de pic clair sur ces loci, probablement en raison de la faible abondance des fragments enrichis, du bruit de fond inhérent à la technique ou de paramètres d'appel de pics trop stricts. Il est tout à fait plausible que le signal ChIP atténué reflète une faible occupation réelle des ligases OsSIZ1/2 sur les sites chromatinien ciblés, particulièrement dans certaines conditions expérimentales. En effet, la détection de protéines SUMOylées via ChIP est complexe en raison de leur nature dynamique et de leur faible abondance intrinsèque ([Wu et Donohoe, 2016](#)). De plus, des études montrent que certains sites fonctionnels peuvent présenter une occupation faible mais biologiquement significative, même si le signal détecté par ChIP est modeste ([Jain et al., 2014](#)). Enfin, l'efficacité des analyses dépend fortement des réplicats et des paramètres utilisés pour l'appel de pics, et l'ajustement des outils comme MACS2 ou SICER peut changer radicalement les conclusions ([Steinhauser et al., 2016](#)).

Néanmoins, au vu de la dispersion technique observée entre les réplicats (Figure 3.4), de l'absence de pics significatifs sur des gènes pourtant SUMOylés (comme OsHSFA2d ou OsHSFA6 selon la ChIP-qPCR), et du faible recouvrement global entre les réplicats contrôles, des limitations expérimentales comme l'efficacité de la sonication, la variabilité de l'immunoprécipitation ou les paramètres d'appel de pics ne peuvent être totalement exclues. Il est donc nécessaire de compléter ces résultats par réanalyse ciblée, avec des réglages optimisés (par ex. MACS2 à seuils ajustés, filtrage amélioré des lectures) et un enrichissement supplémentaire du promoteur, est en cours pour confirmer ces enrichissements. Par ailleurs, des travaux antérieurs ([Craig et al., 2015](#) ; [Miura et al., 2009](#)) ont déjà suggéré que des sites génomiques impliqués dans la régulation du métabolisme, du trafic membranaire ou encore de la signalisation hormonale (comme l'ABA) pouvaient également être ciblés par la SUMOylation en condition de stress. La distribution des sites SUMOylés est donc plus large que celle repérée par notre qPCR ciblée. Une telle distribution renforcerait l'hypothèse selon laquelle la SUMOylation constitue une plateforme de modulation transcriptionnelle à large spectre, capable d'adapter la réponse environnementale en fonction des besoins physiologiques de la cellule.

Des recherches futures pourraient inclure l'utilisation de mutants ciblant des composants clés de la voie de SUMOylation afin de confirmer l'implication directe de cette modification dans la régulation des promoteurs identifiés ([Rytz et al., 2018](#)). Par exemple, des mutants supprimant l'activité des enzymes OsSIZ1 (connue pour son rôle dans les réponses au stress ([Park et al., 2011](#) ; [Rytz et al., 2018](#))) ou OsSIZ2 (peu d'études lui ont, jusqu'à présent, attribué un rôle transcriptionnel ou une implication directe dans la réponse au stress de HT) permettraient de déterminer si l'enrichissement observé sur les promoteurs de OsHSFA2d, OsHSFA6, ou OsETFβ dépend effectivement de l'activité ligase. Cette approche a déjà été illustrée par une étude ([Pei et al., 2017](#)) qui a utilisé des mutants à insertion T-DNA et des lignées RNAi pour caractériser la fonction de OsSIZ2. Les auteurs ont montré que la mutation de OsSIZ2 affecte négativement la croissance et le développement, en particulier des traits liés au rendement, tout en réduisant les concentrations de phosphate inorganique et de phosphore total dans différents tissus. De plus, l'expression de nombreux gènes impliqués dans la perception et la signalisation du phosphate était modulée de manière différentielle chez ces mutants. Ces résultats suggèrent que OsSIZ2 joue un rôle régulateur dans l'homéostasie du phosphate et dans les réponses développementales associées chez le riz, bien que des recherches supplémentaires soient nécessaires pour élucider pleinement ses mécanismes d'action ([Pei et al., 2017](#)). De même, l'étude de plantes déficientes en enzymes de désSUMOylation telles que les protéases OsOTS1 ou OsOTS2 (homologues des Ulp1/2 ([Miller et al., 2013](#) ; [Rytz et al., 2018](#)))

pourrait fournir des indications précieuses sur la dynamique et la réversibilité de la SUMOylation en situation de stress. Ces lignées mutantes pourraient être combinées à des approches de CHIP-qPCR, CHIP-Seq et RNA-Seq pour relier les modifications épigénétiques aux changements d'expression génique de manière causale (Rytz *et al.*, 2018). Par ailleurs, l'utilisation de mutants ou de plantes surexprimant certains facteurs de transcription candidats (comme des FTs NAC ou MYB) ou de versions non SUMOylables de ces FTs (mutants de lysines cibles (Lois *et al.*, 2003 ; Miura *et al.*, 2007)), offriront un moyen de tester directement l'impact de la SUMOylation sur l'activation de nos loci cibles. Ces stratégies contribueraient à affiner notre compréhension des mécanismes transcriptionnels SUMO-dépendants chez le riz et orienteront le développement de stratégies ciblées pour renforcer la tolérance à la chaleur chez les plantes cultivées.

L'analyse CHIP-Seq réalisée sur des feuilles de riz soumises à un stress de HT d'une heure a mis en évidence une redistribution apparente de la SUMOylation, mais révèle surtout des limites qui conditionnent l'interprétation des données. En suivant les recommandations usuelles pour les analyses de données CHIP-Seq (*An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome.*, 2012 ; Landt *et al.*, 2012), seuls les réplicats présentant ≥ 90 % de lectures conservées après FastP, ≥ 95 % d'alignement, plus de 10 M de lectures et au moins 10 000 pics (FDR < 0,05) ont été retenus, conduisant à l'exclusion d'un réplicat stress (Tableau 3.3) et d'un réplicat contrôle (Tableau 3.2) insuffisants. L'utilisation de DiffBind (Figure 3.4) a ensuite montré que seuls 30 % des pics sont partagés entre les réplicats contrôle, contre 59 % sous HT, tandis que la PCA illustre la dispersion des réplicats contrôles et le rapprochement des réplicats stress. Cette forte dispersion entre les réplicats d'une même condition ne semblent pas être d'ordre biologique, mais résulte davantage de variations d'ordre technique comme l'efficacité de la sonication, de la préparation des librairies, de la profondeur de séquençage ou de paramètres d'appel de pics trop stricts (Landt *et al.*, 2012 ; Li *et al.*, 2011). Pour corriger ces biais, nous pourrions compléter nos jeux de réplicats en répétant le CHIP-Seq avec au moins un réplicat contrôle et un réplicat stress de HT supplémentaires et/ou ajuster les seuils de MACS2. Il serait également pertinent de tester des algorithmes alternatifs (SICER) afin d'atténuer les biais d'appel de pics et de mieux capter les régions faiblement enrichies. SICER, par exemple, scanne le génome en petites régions successives (comme un balayage pas à pas) pour repérer des zones larges où le signal est constamment ne serait-ce qu'un peu supérieur au bruit, plutôt que de chercher uniquement des « pics » très marqués (Xu *et al.*, 2014). Ces optimisations techniques, sont indispensables avant d'attribuer de façon fiable des changements de SUMOylation à un phénomène de réponse au stress de HT chez *Oryza sativa*. Au-delà des ajustements méthodologiques indispensables, la

comparaison directe entre conditions contrôle et stress révèle malgré tout un signal cohérent de redistribution de la SUMOylation sous haute température (Figure 3.5). En effet, parmi les 9 301 pics « consensus » retenus, 157 régions présentent un enrichissement significatif sous stress ($\log_2FC \geq 1$, $p \leq 0,1$) contre 92 enrichies en contrôle ; ces sites HT affichent une médiane de signal $\log_2$ élevée ($\approx 6,2$) et une IQR plus large ($\approx 1,5$), témoignant d'un recrutement localisé et robuste de la machinerie SUMO sur des éléments régulateurs potentiellement impliqués dans la tolérance au stress de HT. Le diagramme de Venn et la PCA confirment la séparation nette des deux conditions ($PC1 \geq 80\%$ de variance pour les pics différentiels) comme pour (Han *et al.*, 2021), même si la variabilité technique affecte davantage les contrôles. Cette dualité souligne que, malgré le bruit expérimental et la dispersion entre les réplicats, le changement de profil de SUMOylation entre 28 °C et 40 °C demeure suffisamment marqué pour considérer une réponse transcriptionnelle spécifique au stress de HT. Pour renforcer cette conclusion, il sera crucial de coupler nos analyses ChIP-Seq optimisées à une quantification fonctionnelle des gènes portés par ces pics HT (RNA-Seq, ChIP-qPCR ciblée), afin de lier l'enrichissement SUMO à la modulation transcriptionnelle induite par la chaleur chez *Oryza sativa* (Wang *et al.*, 2023 ; Yu *et al.*, 2024).

4.2 Optimisation de l'expression et de la purification des protéines recombinantes OsSIZ1/2

Un autre objectif de cette étude consistait en la production d'un anticorps capable de reconnaître à la fois les protéines recombinantes OsSIZ1 et OsSIZ2, en vue de faire un ChIP-Seq. Le ChIP-Seq avec un anticorps anti-OsSIZ1/2 permettrait de définir des régions génomiques ciblées par la SUMOylation lors de la réponse au stress de HT, offrant ainsi des informations essentielles sur la localisation des sites de SUMOylation. Pour atteindre cet objectif, nous avons tout d'abord produit des protéines recombinantes de ces SIZs ainsi que de leur homologue d'*Arabidopsis* à des fins d'immunisation. Afin de guider le design des constructions, nous avons utilisé la modélisation tridimensionnelle via AlphaFold2 pour examiner la structure locale des domaines d'intérêt, leur accessibilité en surface et leur positionnement relatif dans l'architecture globale. L'alignement des séquences des domaines SP-RING (domaine le plus conservé au sein des SUMO E3 ligases) présentée dans la Figure 3.6 a révélé une forte conservation entre les homologues d'*Oryza sativa* et d'*Arabidopsis thaliana* ($\geq 77\%$ d'identité), soulignant la pertinence de cibler cette région dans une stratégie d'immunisation croisée. Les modèles AlphaFold générés ont permis d'examiner non seulement la structure locale des domaines d'intérêt, mais également leur positionnement dans l'architecture globale de la protéine. Ces analyses ont mis en évidence de potentielles interactions structurales entre le domaine SP-RING et le domaine PINIT, suggérant une configuration tridimensionnelle compacte pouvant être cruciale pour la stabilité et le repliement correct de la protéine (Yunus et Lima, 2009) . Ces observations

ont été renforcées par les profils de conservation des résidus (Figure 3.6), calculés à partir du score B-factor et visualisés via PyMOL, qui indiquent une forte conservation sur l'ensemble du domaine SP-RING, avec des scores dépassant les 70 % sur la majorité des résidus. Ces éléments ont guidé le choix rationnel de deux types de constructions pour l'expression des protéines recombinantes. Tout d'abord, nous avons élaboré une version courte contenant uniquement le domaine SP-RING, ciblant spécifiquement la région catalytique conservée tout en ajoutant une phénylalanine en N-terminal des constructions pour pouvoir mimer un résidu provenant du PINIT et empêcher l'exposition de résidus hydrophobes. Nous avons ensuite élaboré une version longue combinant les domaines PINIT et SP-RING afin d'assurer un meilleur repliement et une stabilité accrue en conditions bactériennes. Ce design multiple visait à maximiser les chances de produire un antigène recombinant soluble, fonctionnel et immunogène, compatible avec les exigences de pureté pour les applications de ChIP-Seq.

Le clonage des domaines SP-RING d'OsSIZ1, OsSIZ2 et AtSIZ1 a ensuite été réalisé en utilisant la méthode de clonage de Gibson. Bien que la synthèse de gènes représente aujourd'hui une alternative rapide et fiable, notamment pour des domaines courts comme SP-RING, l'approche par RT-PCR à partir d'ADNc a été privilégiée dans ce projet en raison de son intégration dans les protocoles établis au sein du laboratoire d'accueil. Cette méthode, largement utilisée, offre également l'avantage d'amplifier directement les transcrits effectivement exprimés chez les espèces étudiées, ce qui peut être pertinent pour éviter les biais liés à des séquences synthétiques standardisées ([Bustin et Nolan, 2004](#)). Les premières PCR ont donné des amplicons faibles (Figure 3.7) nécessitant une réamplification. Une fois la quantité suffisante obtenue, les fragments ont été insérés dans le vecteur pRSF-Trx, qui permet une répllication à faible nombre de copies grâce à l'origine p15A, facilitant ainsi un meilleur contrôle de l'expression. Ce vecteur contenant des étiquettes histidine et thiorédoxine, optimise la purification et la solubilité des protéines recombinantes dans *E. coli* ([LaVallie et al., 1993](#)). L'optimisation des conditions d'expression et de purification est une étape essentielle pour l'obtention de protéines recombinantes solubles et fonctionnelles, en particulier lorsqu'il s'agit de protéines eucaryotes exprimées dans un hôte procaryote comme *E. coli*. L'induction à 18 °C par 100 µM d'IPTG a initialement permis l'expression des protéines attendues, comme observé dans les fractions induites (I) comparées aux non induites (NI), avec des tailles cohérentes pour les versions longues (~50 kDa) et courtes (~32 kDa) (Figure 3.9). Toutefois, une perte partielle de protéines a été notée lors de l'étape de centrifugation post-lyse, suggérant qu'une proportion de protéines existe sous forme insoluble, possiblement due à des phénomènes d'agrégation ou à une mauvaise conformation. Une purification par chromatographie d'affinité au nickel a permis l'obtention de protéines partiellement pures.

Cependant, l'optimisation des conditions de clivage des étiquettes s'est révélée plus complexe qu'anticipé. L'absence de clivage visible à température ambiante pendant les 6 premières heures (Figure 3.10.A) a mis en évidence un problème d'accessibilité du site ENLYFQG ou une interférence avec l'activité enzymatique de la protéase TEV. Plusieurs facteurs influencent en effet cette activité, notamment la composition du tampon et la température (Tropea *et al.*, 2009). L'inhibition partielle du clivage par la protéase TEV en présence de glycérol à 10 % pourrait s'expliquer par les propriétés vitrifiantes du glycérol, qui en créant une matrice protectrice à faible concentration, peuvent compromettre la dynamique enzymatique à concentration plus élevée car trop visqueuse et rigide (Crowe *et al.*, 1998). En réduisant la teneur en glycérol à 1 %, une amélioration nette du clivage est observée (Figure 3.10.C), suggérant que les conditions plus fluides du tampon favorisent l'accessibilité au site de clivage.

Afin d'améliorer la qualité du clivage, une dialyse a donc été introduite pour éliminer les inhibiteurs potentiels (glycérol, sels, imidazole), et les résultats post-dialyse ont permis un clivage plus net pour les versions courtes de nos protéines recombinantes (Figure 3.11). Les résultats expérimentaux montrent une tendance marquée à l'agrégation des formes longues des protéines recombinantes AtSIZ1, OsSIZ1 et OsSIZ2 après la dialyse, contrairement aux formes courtes contenant uniquement le domaine SP-RING. Cette observation suggère que l'ajout du domaine PINIT contribue significativement à la réduction de la solubilité des protéines. Ce comportement suggère un rôle direct du domaine PINIT dans la diminution de la solubilité globale des protéines recombinantes. Cette hypothèse est confortée par les modélisations AlphaFold, qui indiquent que ce domaine est structuralement bien replié, avec un score de confiance pLDDT (*Predicted Local Distance Difference Test*) >70, mais localisé à la surface de la protéine, ce qui peut favoriser des interactions non spécifiques et entraîner une agrégation lorsqu'il est exprimé en système hétérologue. Ce phénomène est renforcé lors de la dialyse, notamment lorsque la force ionique du tampon est abaissée, suggérant que le domaine PINIT pourrait déséquilibrer les propriétés hydrophiles/hydrophobes globales de la protéine. Cette observation s'aligne avec des travaux (Niwa *et al.*, 2009) qui ont démontré que la solubilité des protéines exprimées dans *E. coli* suit une distribution bimodale (avec une partie soluble et une partie insoluble), et que les protéines possédant des régions exposées ou désordonnées sont plus susceptibles de s'agréger, indépendamment du niveau d'expression ou de la transcription. Le domaine PINIT a été largement associé à la régulation subcellulaire et à la fonction enzymatique des ligases SIZ, en particulier chez *Arabidopsis thaliana*. Il joue un rôle central dans la rétention nucléaire de la protéine, influençant ainsi son accessibilité aux substrats nucléaires et sa capacité à catalyser la SUMOylation (Jmii *et Cappadocia*, 2021 ; Yunus *et Lima*, 2009) et suppose une

accessibilité fonctionnelle du domaine. Ce caractère exposé, tout en étant nécessaire pour l'activité *in vivo*, peut devenir problématique lors de l'expression hétérologue (dans un système hôte différent de l'organisme d'origine) en absence de partenaires cellulaires stabilisateurs (tels que les chaperonnes ou cofacteurs spécifiques). Cela peut provoquer une agrégation induite par une surface exposée trop réactive comme documenté précédemment pour certaines protéines recombinantes contenant des domaines de régulation périphériques (Tokuriki et Tawfik, 2009). Une solution à ce problème pourrait être l'utilisation, lors de l'expression, de chaperonnes moléculaires telles que GroEL ou DnaK pouvant améliorer le repliement adéquat de ces protéines recombinantes, limitant ainsi leur agrégation et augmentant leur solubilité. Cette stratégie permettrait d'optimiser l'expression de protéines comportant des domaines susceptibles d'induire une instabilité conformationnelle, facilitant ainsi leur production fonctionnelle en *E. coli* (Marco et al., 2007).

Par ailleurs, l'absence de clivage par la protéase TEV observée pour ces versions longues (Figure 3.10) suggère un masquage stérique du site ENLYFQG, potentiellement causé par un repliement spécifique de la protéine recombinante incluant PINIT. Cela soulève la possibilité que le domaine PINIT, en modifiant la conformation globale de la protéine fusionnée, entrave l'accès de la protéase TEV à son site de clivage. Il s'agit d'un phénomène connu pour les protéines adoptant des conformations compactes ou auto-associatives (Tropea et al., 2009). Ce type de conformation peut résulter d'un repliement interne "fermé", où la protéine masque certaines régions en se repliant sur elle-même, ou bien d'une auto-association entre plusieurs copies de la protéine, formant des oligomères ou des agrégats. Ces états structuraux peuvent limiter l'accessibilité à des sites fonctionnels, comme les épitopes ou les sites de clivage protéolytique, sans impliquer une interaction spécifique avec un partenaire moléculaire. En résumé, la combinaison d'un domaine potentiellement agrégant (PINIT), de la baisse de solubilité lors de la dialyse, et de l'inaccessibilité du site de clivage à la protéase TEV renforce l'idée que les formes longues des SIZs ne sont pas adaptées à une expression recombinante soluble. Les données de cette étude, combinées à celles de la littérature, justifient donc le choix des formes courtes (SP-RING seul) pour les applications ultérieures, notamment la production d'anticorps.

Dans un premier temps, l'expression recombinante des protéines SIZ, notamment de la version SP-RING seul d'AtSIZ1, a révélé des défis importants en termes de solubilité. En effet, AtSIZ1 présente une propension élevée à l'agrégation après clivage. L'analyse des fractions après dialyse montre que AtSIZ1 non clivée se retrouve dans le culot (Figure 3.12), confirmant que le problème de solubilité ne découle pas

essentiellement du retrait de l'étiquette de thiorédoxine. La majorité de la protéine AtSIZ1 clivée présente également une agrégation importante, ce qui suggère que la solubilité intrinsèque du domaine SP-RING est limitée, indépendamment de la présence de l'étiquette. Ce phénomène est cohérent avec ce qui est souvent observé pour des domaines fonctionnels isolés, qui, en l'absence de leurs partenaires structuraux ou de stabilisation contextuelle, peuvent présenter une instabilité et une tendance accrue à l'agrégation (Rosano et Ceccarelli, 2014). Nous nous sommes ensuite intéressés aux OsSIZs. Les résultats similaires obtenus pour OsSIZ2, nous ont mis sur la piste d'une exploration plus approfondie du rôle de la composition du tampon dans la solubilité des protéines recombinantes SIZs. Les résultats (Tableau 3.5) nous ont permis d'établir que la concentration en sel était le facteur déterminant quant à la solubilité des protéines recombinantes. La protéine OsSIZ2, bien que mieux exprimée, a montré une dépendance prononcée à la force ionique du tampon, précipitant systématiquement à des concentrations de NaCl inférieures à 100 mM. Ce phénomène, mis en évidence par les tests de solubilité (Tableau 3.5), indique une nécessité de maintenir une concentration élevée en sel pour prévenir l'agrégation. Une solubilisation efficace a été obtenue avec du PBS 1X enrichi à 350 mM NaCl mais nous avons choisis de procéder avec un tampon PBS 1X classique (137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ et 1.8 mM de KH₂PO₄, ajustée à un pH de 7.4) car plus proche des conditions physiologiques et contenant des ions potassium et phosphate contribuant à l'effet de solubilité, ce qui a également permis un clivage efficace par la protéase TEV (Figure 3.13). Ce comportement est typique des protéines présentant des surfaces hydrophobes partiellement exposées, nécessitant une force ionique élevée pour limiter les interactions non spécifiques (Arakawa *et al.*, 2007 ; Golovanov *et al.*, 2004). La découverte de cette dépendance marquée à la force ionique chez OsSIZ2 aurait pu être explorée également dans le cas d'AtSIZ1. Il est en effet plausible que la faible solubilité observée pour le domaine SP-RING d'AtSIZ1 soit en partie due à des conditions de dialyse sous-optimales en termes de force ionique. Toutefois, cette hypothèse n'a pas été testée expérimentalement dans cette étude. L'absence de cette exploration représente une limite méthodologique qui pourrait être adressée dans des travaux futurs, afin de vérifier si un ajustement de la concentration saline aurait permis une meilleure récupération de protéines solubles pour AtSIZ1 court. Enfin, le clivage efficace des étiquettes par protéase TEV après l'augmentation de la concentration en sel suggère que ces conditions n'affectent pas l'activité de la protéase et peuvent faciliter les étapes ultérieures de purification. Cette observation est soutenue par des travaux récents (Shahriari *et al.*, 2024), qui ont montré que la protéase TEV conserve son activité même dans des tampons à haute salinité, confirmant ainsi que des concentrations élevées en NaCl peuvent non seulement prévenir l'agrégation des protéines recombinantes mais aussi maintenir l'efficacité de notre enzyme de clivage.

Les derniers ajustements concernant l'optimisation des conditions d'expression ont constitué une étape cruciale pour surmonter les limitations initiales liées aux faibles rendements protéiques des versions courtes d'OsSIZ1 et OsSIZ2. En effet, l'augmentation de la concentration d'IPTG de 20 μ M à 100 μ M a conduit à une amélioration notable de la biomasse bactérienne et du rendement protéique après purification. Cette concentration, bien que plus faible que les doses classiques décrites dans la littérature (0,5 à 1 mM ; (Sivashanmugam *et al.*, 2009)), reste dans la plage typiquement utilisée dans notre laboratoire (100 à 300 μ M), et a été combinée à une réduction de la température d'induction à 30 °C. Cette approche s'appuie sur des principes selon lesquels une induction à plus basse température peut réduire la vitesse de traduction, favorisant ainsi le bon repliement des protéines et limitant leur agrégation dans les corps d'inclusion (Rosano et Ceccarelli, 2014 ; Sørensen et Mortensen, 2005). Les résultats obtenus ici, avec une multiplication par un facteur de trois des culots bactériens et des concentrations protéiques post-purification dépassant 16,5 mg (comparativement aux concentrations début avoisinant 5 mg ou moins), confirment l'efficacité de cette stratégie (Figure 3.14). La combinaison de cette optimisation avec un protocole de clivage ajusté (dialyse dans du PBS 1X à 5 mM β -mercaptoéthanol à 4 °C) a permis d'éviter l'agrégation des protéines recombinantes. L'absence d'agrégats observée au lendemain de la dialyse constitue une avancée significative par rapport aux essais précédents. L'utilisation d'un tampon physiologique tel que PBS 1X enrichi en agent réducteur s'est révélée compatible à la fois avec la stabilité des protéines et l'activité de la protéase TEV, comme précédemment démontré dans d'autres contextes de purification (Shahriari *et al.*, 2024). L'étape finale de purification par chromatographie d'exclusion stérique a permis une séparation efficace des protéines clivées du reste des composants, validant la stratégie de clivage durant la dialyse. Le choix d'une colonne Superdex S75, adaptée aux protéines de petite à moyenne taille, s'est avéré pertinent pour isoler les domaines SP-RING monomériques. Les fractions collectées (Figure 3.14 fractions 9 et 10) ont montré une bonne pureté, condition indispensable à leur utilisation dans des applications immunologiques. La concentration finale obtenue (1,402 mg/mL pour un total de ~4 mg de protéines) est satisfaisante pour des essais de production d'anticorps polyclonaux.

Ce optimisation illustre l'importance de la flexibilité expérimentale lors de la production de protéines recombinantes. Il faut coupler l'optimisation des conditions d'expression (induction, température) à des stratégies de purification raisonnées tenant compte des particularités biophysiques des protéines cibles. Le choix des domaines exprimés, les conditions de solubilité, le tampon de clivage, et même la nature du vecteur, ont tous un impact significatif sur le rendement et la qualité des protéines obtenues. Il convient

également de souligner que l'ensemble du processus a été conduit en conditions natives, ce qui augmente les chances que les anticorps générés reconnaissent la conformation native des domaines SP-RING, essentielle pour des applications fonctionnelles ultérieures. Cette approche complète peut servir de modèle pour l'expression et la purification de protéines recombinantes contenant des domaines sensibles ou instables.

4.3 Validation fonctionnelle des anticorps anti-OsSIZ1/2 et perspectives d'application

La mise au point d'anticorps spécifiques et fonctionnels dirigés contre les SUMO E3 ligases OsSIZ1 et OsSIZ2 constituait une étape clé pour permettre des analyses d'interactions protéines-ADN par immunoprécipitation de chromatine (ChIP). Dans cette optique, les premiers tests réalisés par ELISA, par la compagnie MédiMabs qui a produit les anticorps, ont permis d'établir un profil de réponse immunitaire robuste. Les titres d'anticorps observés dans les sérums post-immunisation, dépassant une dilution de 1 : 1 000 000 tout en maintenant un signal significatif, suggèrent une immunogénicité élevée des antigènes recombinants, en accord avec les observations classiques sur les antigènes protéiques bien structurés ([Hermanson, 2013](#) ; [Ridley, 1989](#)). Cependant, les résultats des immunobuvardages et de ChIP-qPCR ont révélé une certaine complexité découlant de l'utilisation de sérums bruts. En effet, bien que les anticorps reconnaissent clairement les protéines recombinantes OsSIZ1 et OsSIZ2, une réactivité croisée envers d'autres protéines, possiblement des contaminants bactériens co-purifiés a également été détectée (Figure 3.15). Cette réactivité non spécifique, typique des sérums polyclonaux ([Lipman et al., 2005](#)), peut limiter l'interprétation des signaux, notamment dans des tests d'immunobuvardage ou immunoprécipitation où la complexité de l'échantillon est élevée. Les tests fonctionnels de ChIP-qPCR ont d'ailleurs confirmé ces limites : aucune différence qualitative d'enrichissement n'a été observée entre les sérums immuns et préimmuns, tant en condition standard qu'après un stress de HT (Figure 3.16). Une telle absence de signal pourrait résulter d'un manque de spécificité, d'une reconnaissance insuffisante des protéines cibles dans leur conformation native, ou encore d'un effet d'interférence dû à la présence d'anticorps dirigés contre d'autres antigènes présents dans le sérum ([Egelhofer et al., 2011](#) ; [Teytelman et al., 2013](#)). Ce constat met en lumière une réalité souvent sous-estimée dans les approches immunologiques : la validation d'un anticorps par Western blot ne permet pas de juger de la fonctionnalité d'un anticorps en ChIP. Le Western blot, par conception, implique une dénaturation complète des protéines à l'aide de SDS (sodium dodecyl sulfate) parfois associée à l'effet de chaleur. Ce processus détruit la conformation tridimensionnelle native des protéines, exposant des séquences continues d'acides aminés accessibles après dénaturation. Ce sont donc des épitopes dit linéaires. En revanche, la ChIP repose

sur la reconnaissance d'épitopes conformationnels dans un environnement natif, où les protéines sont associées à l'ADN, parfois en interaction avec d'autres partenaires, au sein de la chromatine. Autrement dit, un anticorps peut très bien reconnaître une protéine dénaturée en Western blot sans pour autant être capable d'interagir avec cette même protéine dans son état natif dans la cellule. D'ailleurs, des articles fondateurs sur la ChIP, confirment que les performances d'un anticorps dans des applications telles que la ChIP ne peuvent être extrapolées à partir de données obtenues en Western blot. ([Orlando, 2000](#) ; [Teytelman et al., 2013](#)). Cette divergence entre épitopes linéaires et conformationnels est également détaillée dans d'autres travaux ([Hermanson, 2013](#)), qui soulignent que la reconnaissance d'un antigène dépend largement de la structure tridimensionnelle de la protéine et de la conservation de cette structure pendant l'immunoprécipitation.

Un autre point important concerne la détection d'un signal, bien que plus faible, dans les immunobuvardages en conditions utilisant le sérum préimmun (Figure 3.15). Théoriquement, ce sérum, prélevé avant l'immunisation, ne devrait contenir aucun anticorps dirigé contre les SIZs du riz. Toutefois, un signal résiduel a été détecté, soulevant plusieurs hypothèses. D'une part, il pourrait s'agir d'un bruit de fond technique, inhérent aux protocoles d'immunoprécipitation (liaison non spécifique à la résine via des interactions hydrophobes ou électrostatiques). D'autre part, une reconnaissance croisée par des anticorps naturels pourrait être envisagée. Bien que le domaine SP-RING d'OsSIZ1 soit végétal, il partage une structure caractéristique hautement conservée avec les SUMO E3 ligases chez les mammifères, notamment PIAS1. Une comparaison avec la séquence du SP-RING de PIAS1 du lapin révèle une conservation partielle des résidus fonctionnels (notamment les cystéines et histidines coordonnant le zinc), malgré une divergence notable de la séquence primaire. Cette similitude structurale, bien que partielle, pourrait permettre une reconnaissance non spécifique par des anticorps dits "naturels", connus pour leur réactivité croisée vis-à-vis de structures conservées ([Avrameas, 1991](#) ; [Siloşi et al., 2016](#)).

Afin d'assurer cette spécificité, il est crucial de purifier les anticorps d'intérêt pour éliminer les interférences provenant de protéines non ciblées. Comme le souligne ([Hermanson, 2013](#)) dans son chapitre sur la modification et la conjugaison des anticorps, la purification par affinité permet de séparer efficacement les anticorps spécifiques des autres composants du sérum complexe. Cette méthode est particulièrement utile pour isoler les anticorps capables de lier spécifiquement leurs cibles, comme cela a été fait dans cette étude pour purifier les anticorps dirigés contre OsSIZ1 et OsSIZ2. Bien qu'aucune quantification directe de l'augmentation de spécificité n'ait été réalisée entre les anticorps bruts et purifiés,

plusieurs indices expérimentaux (diminution du signal avec le sérum préimmun, enrichissement spécifique en IP *in vitro* avec les formes SAP+) suggèrent une amélioration significative à la suite de la purification par affinité. Une analyse comparative plus systématique (test de compétition, immunobuvardages avec anticorps bruts vs purifiés) pourrait être envisagée dans des travaux futurs pour confirmer ce gain de spécificité (Bordeaux *et al.*, 2010). De plus, des expériences de ChIP-Seq ont été menées chez les mammifères avec des anticorps dirigés contre des protéines PIAS, mais les informations techniques concernant leur production, en particulier la région de la protéine utilisée pour l'immunisation, sont rarement détaillées. Cette absence de données limite les possibilités de comparaison directe avec notre propre approche expérimentale, notamment en ce qui concerne le choix de l'épitope et la validation des anticorps pour des applications de type ChIP.

Dans le but de valider la reconnaissance des SIZs dans leur forme native et leur interaction avec l'ADN, des approches complémentaires ont été explorées. Les essais d'immunoprécipitation *in vitro* (Figure 3.19), combinant les protéines recombinantes avec de l'ADN plasmidique, ont permis de montrer un enrichissement significatif en ADN pour les formes d'OsSIZ1 et OsSIZ2 contenant le domaine SAP (SAP + PINIT + SP-RING). Ce domaine, connu pour sa capacité à lier l'ADN, est essentiel pour la fonction des ligases SUMO de type SIZ (Gareau et Lima, 2010 ; Jmii et Cappadocia, 2021). Les anticorps utilisés dans ces expériences ont été générés contre le domaine SP-RING, une région hautement conservée des protéines de type SIZ (ou PIAS), impliquée dans l'activité E3 ligase du processus de SUMOylation (Gareau et Lima, 2010 ; Johnson, 2004). Bien que ce domaine joue un rôle central dans le transfert de SUMO à la cible, il n'est pas connu pour interagir directement avec l'ADN ou pour cibler spécifiquement des séquences promotrices (Jmii et Cappadocia, 2021 ; Schmidt et Müller, 2003). La récupération d'ADN co-précipité à partir des protéines OsSIZ1/2 dépourvues du domaine SAP s'avère donc particulièrement intéressante : bien qu'on observe un signal qPCR plus faible (mais relativement proche) pour ces formes (Cq $\approx$ 16 contre $\approx$ 14 pour les formes SAP+), cela indique néanmoins une capacité à co-précipiter l'ADN, peut-être via des interactions faibles, transitoires ou non spécifiques. La différence de concentration estimée (facteur $\sim$ 5) témoigne d'une affinité supérieure des formes contenant le domaine SAP, connu pour sa capacité à interagir directement avec l'ADN et à favoriser la localisation nucléaire des protéines SIZ/PIAS (Aravind et Koonin, 2000 ; Jmii et Cappadocia, 2021). Cependant, le fait que les formes dépourvues de SAP puissent tout de même être détectées en association à l'ADN *in vitro* suggère l'existence de mécanismes secondaires d'interaction. Ce résultat pourrait s'expliquer par des interactions électrostatiques transitoires avec l'ADN (Luscombe *et al.*, 2001) ou des effets de multimérisations des protéines sur la

chromatine ([Schmidt et Müller, 2003](#)). Ces observations suggèrent qu'un signal détecté n'est pas forcément synonyme d'interaction biologique spécifique ou fonctionnelle. Elles renforcent donc la nécessité de combiner des approches complémentaires (comme la microscopie à fluorescence, le ChIP-Seq ou les tests de mobilité électrophorétique EMSA) pour valider la spécificité réelle des interactions dans des conditions mimant le plus fidèlement possible le contexte cellulaire natif ([Furey, 2012](#) ; [Haring et al., 2007](#)). On pourrait par exemple procéder à un test de compétition antigénique. Il consiste à pré-incuber l'anticorps avec l'antigène libre (par exemple, le domaine SP-RING sous forme purifiée), afin de saturer les sites de liaison spécifiques avant l'immunoprécipitation. Une perte de signal dans ces conditions est un indicateur fort de spécificité ([Ridley, 1989](#)). Par ailleurs, il est également recommandé d'utiliser des sérums pré-absorbés, c'est-à-dire des anticorps qui ont été incubés au préalable avec des extraits protéiques ne contenant pas l'antigène cible (par exemple, des lysats de cellules végétales n'exprimant pas les SIZs ou des lysats provenant de cellules bactériennes exprimant le plasmide pRSF-Trx vide). Cette étape permet de retirer les anticorps qui reconnaissent des protéines communes ou abondantes sans lien avec la cible, réduisant ainsi le bruit de fond dû à des interactions fortuites ou de faible affinité. En combinant ces deux approches, on peut mieux distinguer les enrichissements réellement spécifiques de ceux résultant d'interactions non spécifiques ou de reconnaissances croisées ([Mishra et al., 2017](#) ; [Saper, 2009](#)). Toutefois, nos résultats d'IP-qPCR suggèrent que, bien que les anticorps aient montré des limitations en ChIP, ils peuvent encore reconnaître spécifiquement les SIZs dans un environnement contrôlé *in vitro*, ouvrant la voie à de nouvelles optimisations expérimentales pour les rendre plus efficaces dans des contextes cellulaires complexes.

CONCLUSION

Cette étude s'est inscrite dans la compréhension fondamentale de la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle par la SUMOylation qui constitue un mécanisme clé pour l'adaptation des plantes face aux stress environnementaux. Nous avons combiné des approches génomiques (ChIP-Seq, ChIP-qPCR) et biochimiques (modélisation, purification de protéines, production d'anticorps, immunoprécipitation) afin de caractériser la dynamique de la SUMOylation, de poser les bases pour l'identification des régulateurs transcriptionnels SUMOylés, et de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu lors du stress de haute température (HT). Un jeu de données ChIP-Seq pilote, obtenu en conditions optimales de croissance et de développement et en conditions de stress de HT, nous a permis d'amorcer la cartographie des sites SUMO. À l'échelle génomique, cette analyse ChIP-Seq préliminaire a mis en évidence une redistribution nette de la SUMOylation sous stress de HT (environ 157 pics enrichis en stress vs. 92 en contrôle). Toutefois, la variabilité entre les réplicats obtenus souligne la nécessité de renforcer leur nombre, d'ajuster les seuils de MACS2, d'optimiser la préparation des librairies, ou d'envisager des méthodes à plus haute sensibilité (CUT&Tag/CUT&RUN) avant de tirer des conclusions globales. CUT&Tag (Clivage au niveau des cibles suivi de la tagmentation) et CUT&RUN (Clivage au niveau des cibles et libération à l'aide d'une nucléase) sont des alternatives récentes à la ChIP-Seq, qui permettent une cartographie des interactions protéine-ADN à partir de quantités de matériel très faibles, tout en réduisant le bruit de fond associé aux étapes de sonication et d'immunoprécipitation traditionnelles. Contrairement à la ChIP-Seq, ces méthodes ne nécessitent pas de réticulation au formol, ce qui préserve davantage les interactions natives, et elles permettent une détection plus sensible et spécifique, notamment pour des cibles peu abondantes ou des anticorps à affinité modérée ([Kaya-Okur et al., 2019](#) ; [Skene et Henikoff, 2017](#)). Dans le contexte de notre étude, où le signal/bruit ratio est limité avec des anticorps polyclonaux en ChIP, ces approches pourraient améliorer la détection des régions SUMOylées ou des cibles des ligases OsSIZ1/2 à l'échelle du génome. Des ChIP-qPCR ciblées ont confirmé de façon robuste l'enrichissement des marques SUMO sur les promoteurs gènes régulateurs clefs comme OsHSFA2d et OsHSFA6. Le gène codant pour OsETF β , choisi initialement comme contrôle négatif, présentait une SUMOylation constitutive, suggérant un axe mitochondrie-noyau à explorer et qui permettrait de déterminer si ce contrôle basal module l'économie énergétique et la germination. Pour relier ces observations au mécanisme enzymatique de la SUMOylation, nous avons prédit la structure, exprimé puis purifié les SUMO E3 ligases OsSIZ1 et OsSIZ2, et généré des anticorps polyclonaux capables de précipiter leurs complexes protéine-ADN *in vitro*. En effet, grâce à des modélisations AlphaFold2 et une étude de l'alignement des domaines

SP-RING de ces protéines, nous avons pu concevoir deux types de protéines recombinantes (SP-RING seul vs PINIT+SP-RING). Les formes comprenant le PINIT se sont révélées sujettes à l'agrégation et au masquage du site de clivages des étiquettes par la protéase TEV. Pour les formes SP-RING seul, Le choix initial d'un tampon à faible force ionique a entravé la solubilité de nos protéines lors du clivage par la protéase TEV. Seule la dialyse en solution hautement ionique (PBS 1X) a permis un clivage satisfaisant et offert une meilleure solubilité, permettant d'atteindre des rendements supérieurs à 3 mg et une pureté optimale via tamis moléculaire. L'absence d'essais d'expression d'AtSIZ1 (SP-RING seul) à différentes forces ioniques constitue une lacune expérimentale qui pourrait expliquer sa faible solubilité. Le protocole d'expression/purification mis au point dans cette étude constitue un cadre répliquable pour d'autres protéines eucaryotes instables, et pourra être adapté pour l'étude fonctionnelle d'autres enzymes en conditions physiologiques. Enfin, pour les anticorps anti-OsSIZ1/2 obtenus à partir de ces protéines recombinantes, malgré des titres ELISA très élevés et une reconnaissance claire en Western blot, les sérums bruts sont restés limités en ChIP-qPCR. Cette limitation est possiblement due au fait d'une réactivité croisée créant un bruit de fond en immunobuvardage et ChIP. Dans le futur, il serait intéressant de produire un anticorps spécifique dirigé contre une région unique d'OsSIZ1 (par exemple, la région non conservée en dehors du domaine SP-RING) afin d'augmenter la spécificité en immunoprécipitation et en ChIP, en s'inspirant des stratégies employées dans les systèmes mammifères. Toutefois, après purification des anticorps anti-OsSIZ1/2, des essais d'IP-qPCR *in vitro* ont montré une coprécipitation d'ADN plus forte pour les formes SAP+ vs SP-RING seul, attestant de la spécificité de nos anticorps mais également de l'importance du domaine SAP dans le processus de liaison à l'ADN de nos protéines. Pour surmonter ces limites, il conviendra d'affiner la spécificité des anticorps anti-OsSIZ1/2 par pré-absorption et tests de compétition antigénique, puis de valider ces réactifs par EMSA, ChIP-qPCR et ChIP-Seq. Un ChIP-Seq ciblé sur OsSIZ1/2 en condition de stress de HT, permettrait de cartographier les sites de liaisons spécifiques aux E3 ligases dans le génome du riz. En combinant les acquis des deux ChIP-Seq (ciblant SUMO ou les OsSIZs) à des approches RNA-Seq, nous pourrions à la fois cartographier à l'échelle du génome les sites de SUMOylation sous stress de HT et inférer à partir de ces sites les facteurs de transcription ou complexes transcriptionnels ciblés par la SUMOylation. Ce qui nous permettra d'acquérir une meilleure compréhension des mécanismes SUMO-dépendant de réponse à la chaleur du riz mais aussi, de décrypter les boucles de rétrocontrôle entre HSFs SUMOylés et leurs promoteurs, ainsi que le dialogue mitochondrie-noyau suggéré par OsETFβ entre autres. Dans cette optique, la stratégie future pourrait s'articuler en trois étapes. Premièrement, une optimisation des outils expérimentaux, notamment la production d'anticorps plus spécifiques et la reprise de la ChIP-Seq avec réplicats supplémentaires et pipeline affiné pour

cartographier les sites SUMO avec une meilleure robustesse. Ensuite, faire une cartographie intégrative de la SUMOylation et des E3 ligases, via un ChIP-Seq ciblé sur OsSIZ1/2 en conditions de HT, puis croisement des données SUMO-ChIP-Seq et OsSIZs-ChIP-Seq pour identifier les FTs et complexes régulés par la SUMOylation. Enfin, réaliser une validation fonctionnelle par analyses RNA-Seq et phénotypage de mutants ciblant OsSIZ1/2, ainsi qu'exploration du rôle potentiel d'OsETF β dans la tolérance à la chaleur et le métabolisme énergétique. Ces approches permettront non seulement de consolider les bases posées dans ce mémoire, mais aussi d'ouvrir la voie à des applications agronomiques, telles que le développement de variétés de riz plus résistantes aux vagues de chaleur et l'adaptation d'autres cultures aux stress climatiques. En optimisant la manipulation de la voie SUMO (via génie génétique ou en modulant l'activité des ligases/protéases/FTs, on pourrait ouvrir la voie à la sélection ou à l'ingénierie de variétés de riz plus résistantes aux vagues de chaleur, un enjeu crucial face aux changements climatiques. Cela ouvrirait également de nouvelles perspectives pour étudier la plasticité transcriptionnelle par la SUMOylation sous d'autres stress et chez d'autres organismes.

ANNEXE A

Similarité des séquences SUMO du riz et d'*Arabidopsis*

Tableau A.1 Pourcentage de similarité entre les protéines SUMO d'*Oryza sativa* et de leurs homologues d'*Arabidopsis thaliana*

Protéines	OsSUMO1	OsSUMO2	AtSUMO1	AtSUMO2
OsSUMO1	100.00%	97.44%	94.87%	93.60%
OsSUMO2	97.44%	100.00%	93.59%	91.80%
AtSUMO1	94.87%	93.59%	100.00%	96.50%
AtSUMO2	93.60%	91.80%	96.50%	100.00%

Légende : Le Tableau présente les pourcentages de similarité entre les protéines SUMO OsSUMO1 et OsSUMO2 du riz, et AtSUMO1 et AtSUMO2 d'*Arabidopsis thaliana*, calculés sur la base des propriétés physico-chimiques des résidus (taille, charge, polarité). Ces similarités ont été déterminées à partir d'un alignement sans gap, en considérant comme similaires les acides aminés appartenant à une même classe physico-chimique.

ANNEXE B

Séquences des protéines recombinantes SUMO

OsSUMO1 (A1)

GSMSAAGEEDKKPAGGEGGGAHINLKVKGQDGNEVFFRIKRSTQLKKLMNAYCDRQSVDMNAIAFLDGRRLRGEQT
PDELEMEDGDEIDAMLHQTGG

OsSUMO2 (B2)

GSMSSPAGEDEKKPAGGEGGGAHINLKVKGQDGNEVFFRIKRSTQLKKLMNAYCDRQSVDIKSIAFLDGRRLNAEQTP
DQLEMEDGDEIDAMLHQTGG

AtSUMO1

GSMSANQEEDKKPGDGGAHINLKVKGQDGNEVFFRIKRSTQLKKLMNAYCDRQSVDMNSIAFLDGRRLRAEQTPDE
LDMEDGDEIDAMLHQTGG

AtSUMO2

GSMSATPEEDKKPDQGAHINLKVKGQDGNEVFFRIKRSTQLKKLMNAYCDRQSVDFNSIAFLDGRRLRAEQTPDELE
MEDGDEIDAMLHQTGG

ANNEXE C

Exemple de %Input, p-value et amorces pour la ChIP-qPCR

Tableau A.2 Liste des % input et p-value calculés à la suite de la ChIP-qPCR avec l'anticorps anti-SUMO

Gène	Moyenne % Input (Contrôle)	Moyenne % Input (40 °C)	p-value
HSFA2d	71,85	115,22	0,0477 *
HSFA6	67,74	140,62	0,0167 *
ETFβ	135,50	127,37	0,5586 ns
eEF-1α	6,92	4,57	0,1280 ns
UBQ5	7,57	4,94	0,0484 *

ns : non significatif ($p > 0,05$) ; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Les % d'input ont été calculés avec la formule :

$$\%Input = 100 \times \frac{2^{(Ct(Input)-Ct(ChIP))}}{FD}$$

- Ct input et Ct ChIP sont les nombres de cycles mesurés en qPCR,
- FD est le facteur de dilution appliqué à l'échantillon Input.

Tableau A.3 Amorces utilisées pour les qPCR

Protéine	Amorce sens	Amorce antisens
HSFA2d	5'-CGAACCTCAGCCACACTC-3'	5'-GCCAGGAGAGGAATGGAAG-3'
HSFA6	5'-CCTCGCCTTCCTCTAGTACC-3'	5'-TCACCGTCGAGTAGTCCATC-3'
OsETFβ	5'-CAAGCTAATGGTCTCGATTCCG-3'	5'- GCTGTTTGATTCTGGCAGGT-3'
OseEF-1α	5'-TTAAGTAACCTGATCTGTGAGC-3'	5'-CCATGGTTGAATAAGGAGGTAG-3'
OsUBQ5	5'-CGGGAGAAACCACAGGTAAG-3'	5'-CTCCAGCGTGATCGTCTTC -3'
Plasmide pRSF-DUET	ACYC_DUET_UP1 5'-GGATCTCGACGCTCTCCCT-3'	DUET_DOWN1 5'-GATTATGCGGCCGTGTACAA-3'

ANNEXE D

Optimisation du protocole de sonication pour ChIP-Seq

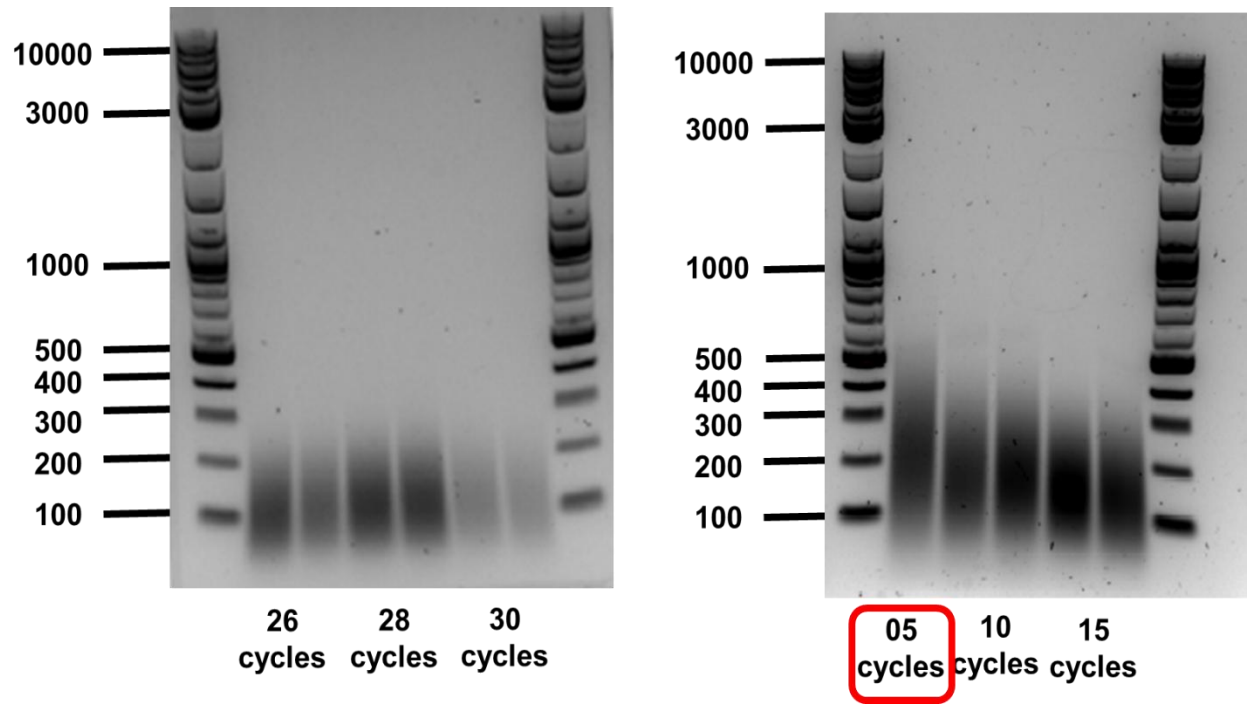


Figure A.1 Optimisation de la taille des fragments d'ADN obtenus après sonication à intensité maximale.

ANNEXE E

Préparation des librairies de séquençage

Tableau A.4 Liste des adaptateurs (codes-barres) utilisés pour la préparation des librairies de séquençage et concentrations des différents échantillons

Échantillon	i7 Index	i5 Index	Conc. Qubit (ng/μL)	Conc. TapeStation (ng/μL)
Input contrôle 1	ACTGGCGAAC	GATAAGTCGA	37,6	27,500
ChIP contrôle 1	GCGTTAGGCA	TCACGCCTTG	32,2	18,748
Input HT 1	TTATCGGCCT	AGGAACACAA	39,0	28,912
ChIP HT 1	GAGGTATAAG	CTCAGTAGGC	35,2	21,808
Input contrôle 2	GAGCCAAGTT	AGGCACCTTC	35,2	45,543
ChIP contrôle 2	AAGGCCGTAG	CTGTTGGTAA	37,0	44,550
Input HT 2	TCAAGGATTC	GAAGTGCCTG	39,0	22,776
ChIP HT 2	CGAACCGAGA	TCTCTCGCCT	32,0	22,076
Input contrôle 3	TTAGAGAAGC	GCTGGTACCT	31,6	31,954
ChIP contrôle 3	TCTAAGACCA	TAAGGAGCGG	15,4	12,976
Input HT 3	TGTAACCACT	AATCGCTCCA	32,8	19,971

ANNEXE F

Mesure de la taille des bibliothèques par Agilent TapeStation

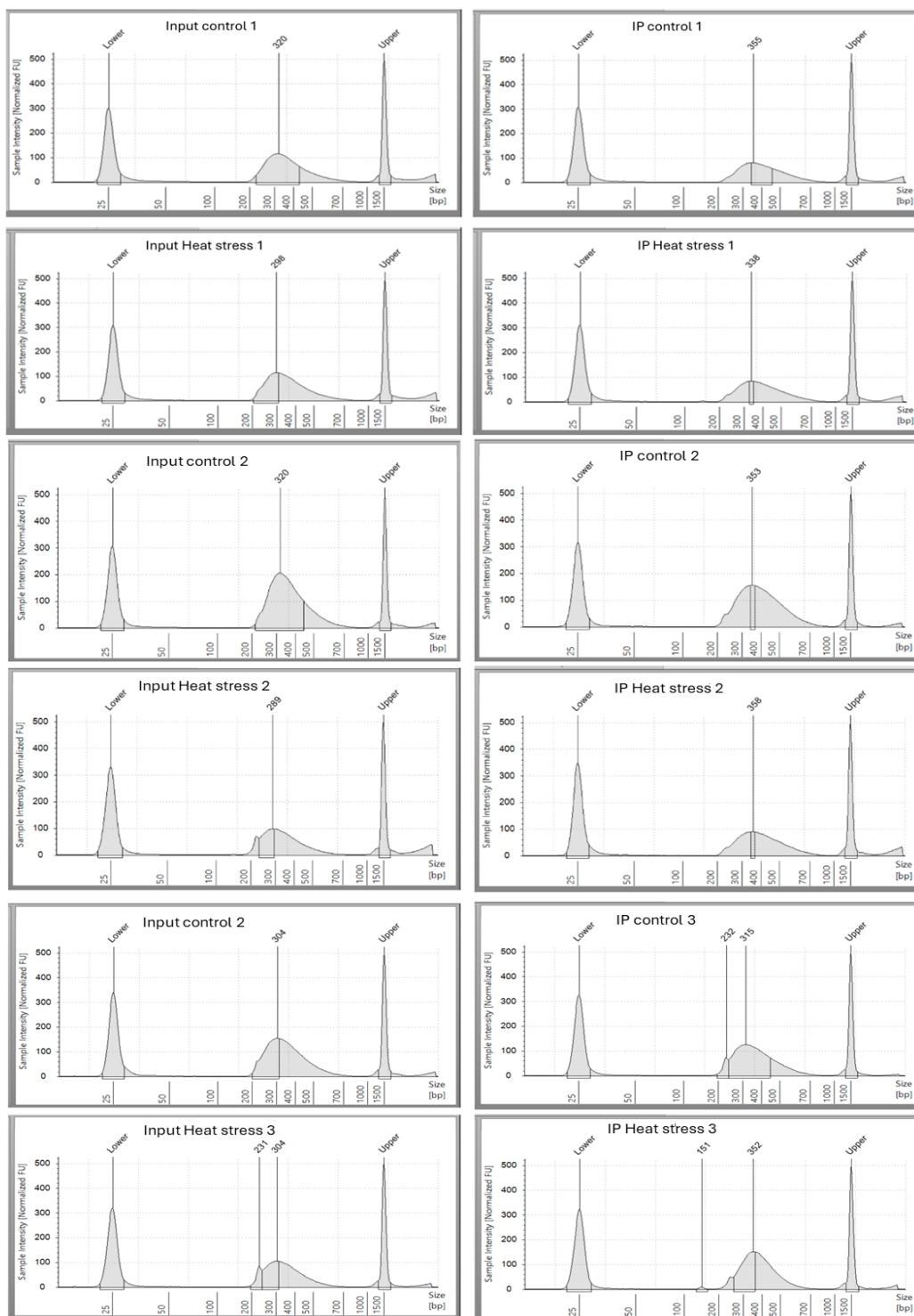


Figure A.2 Electrophorégrammes présentant la taille des librairies de ChIP-Seq ciblant SUMO. Les électrophorégrammes montrent la distribution des tailles des fragments d'ADN après immunoprécipitation (IP) avec un anticorps ciblant SUMO, en comparaison avec les contrôles et les échantillons soumis à un stress de HT. Les graphes montrent les intensités des signaux normalisés pour chaque taille de fragment d'ADN, indiquant les résultats pour les échantillons d'ADN "input" (avant immunoprécipitation) et IP.

ANNEXE G

Titrage ELISA des sérums immuns et préimmuns fournis par Médimabs

SPECIFIC ELISA ANTIBODY TITER

SCHEME:

pAb213													Coating: Anti-E3 SUMO-protein ligase SIZ1; 5ug/well of project peptide												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Rb-1 preimmune bleed													Rb-1 preimmune bleed											
B	Rb-1 test (4 doses) bleed													Rb-1 test (4 doses) bleed											
C	Rb-2 preimmune bleed													Rb-2 preimmune bleed											
D	Rb-2 test (4 doses) bleed													Rb-2 test (4 doses) bleed											
Dilution 1:	500	1 000	2 000	4 000	8 000	16 000	32 000	64 000	128 000	256 000	512 000	1 024 000		500	1 000	2 000	4 000	8 000	16 000	32 000	64 000	128 000	256 000	512 000	1 024 000

OPTICAL DENSITY AT 450NM

pAb213				2x background								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.302	0.255	0.265	0.256	0.162	0.143	0.099	0.096	0.083	0.081	0.082	0.105
B	OVFLW	OVFLW	OVFLW	OVFLW	OVFLW	OVFLW	OVFLW	OVFLW	OVFLW	OVFLW	2.921	2.559
C	0.513	0.395	0.337	0.285	0.136	0.14	0.098	0.101	0.098	0.059	0.095	0.09
D	OVFLW	OVFLW	OVFLW	OVFLW	OVFLW	OVFLW	OVFLW	OVFLW	OVFLW	2.697	1.512	0.801
Dilution 1:	500	1 000	2 000	4 000	8 000	16 000	32 000	64 000	128 000	256 000	512 000	1 024 000

TITER

Rabbit #	Titer
Rb-1	≥1:1 024 000
Rb-2	≥1:1 024 000

Titer was considered when the signal was twice the background. Overall titer is good for both animals. Please test the sera in your assay to decide if you need us to proceed to an immunogen affinity purification

We suggest that you test the serum in your assay with the highest concentration possible. The dilution should be done in "blocking buffer" and should generally range from 1:10 to 1:1,000. Pre-immune bleed will also be provided, and it should be used as control in the same concentration range to discriminate the non-specific binding.

Légende : Le tableau montre le titrage des anticorps anti-SIZ dans les sérums post-immunisation des lapins Rb-1 et Rb-2, à différentes dilutions (de 1 : 500 à 1 : 1 024 000). Les valeurs d'absorbance (OD à 450 nm) sont ajustées en fonction du bruit de fond (2x background). Les titres des anticorps spécifiques sont supérieurs à 1 : 1 024 000 pour les deux lapins, indiquant une réponse immunitaire robuste après immunisation avec le peptide cible. Les tests ont été réalisés à différents stades (pré-immunisation et après 4 doses) pour évaluer l'évolution du titre d'anticorps.

ANNEXE H

Courbe d'étalonnage pour l'IP-qPCR

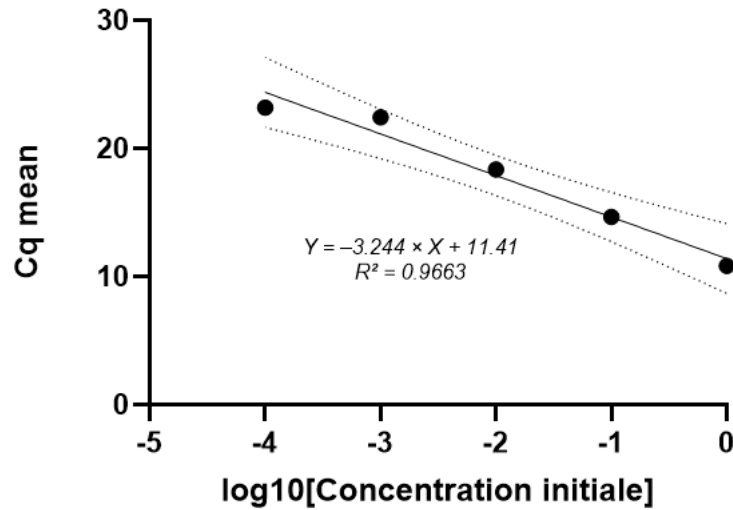


Figure A.3 . Courbe standard de l'IP-qPCR utilisée pour le calcul de la concentration en ADN dans les échantillons.

La courbe est obtenue à partir de dilutions logarithmiques d'un standard d'ADN (plasmide pRSF-Duet vide, de 1,5 ng/μL à 0,000015 ng/μL), mesuré en duplicata. La droite de régression linéaire obtenue est définie par l'équation :

$$Cq = -3,244 \times \log_{10}(Concentration) + 11,41$$

avec un coefficient de corrélation **R² = 0,9663**. L'efficacité de l'amplification est de **104 %**, ce qui valide la fiabilité des mesures de quantification dans cette plage de concentrations. À partir de la pente, l'efficacité d'amplification a été calculée selon la formule :

$$\text{Efficacité (\%)} = (10^{-1/(-pente)} - 1) \times 100$$

Cette efficacité se situe dans la plage recommandée (90 % – 110 %), ce qui atteste de la fiabilité des résultats obtenus par qPCR.

BIBLIOGRAPHIE

- Aguilar-Martinez, E., Chen, X., Webber, A., Mould, A. P., Seifert, A., Hay, R. T. and Sharrocks, A. D. (2015). Screen for multi-SUMO-binding proteins reveals a multi-SIM-binding mechanism for recruitment of the transcriptional regulator ZMYM2 to chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, E4854-63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509716112>
- An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. (2012). *Nature*, 489, 57–74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>
- Arakawa, T., Ejima, D., Tsumoto, K., Obeyama, N., Tanaka, Y., Kita, Y. and Timasheff, S. N. (2007). Suppression of protein interactions by arginine: a proposed mechanism of the arginine effects. *Biophysical chemistry*, 127, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2006.12.007>
- Araújo, W. L., Ishizaki, K., Nunes-Nesi, A., Larson, T. R., Tohge, T., Krahnert, I., Witt, S., Obata, T., Schauer, N., Graham, I. A., Leaver, C. J. and Fernie, A. R. (2010). Identification of the 2-Hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of Arabidopsis mitochondria. *The Plant Cell*, 22(5), 1549–1563. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075630>
- Araújo, W. L., Ishizaki, K., Nunes-Nesi, A., Tohge, T., Larson, T. R., Krahnert, I., Balbo, I., Witt, S., Dörmann, P., Graham, I. A., Leaver, C. J. and Fernie, A. R. (2011). Analysis of a range of catabolic mutants provides evidence that phytanoyl-coenzyme A does not act as a substrate of the electron-transfer flavoprotein/electron-transfer flavoprotein:Ubiquinone oxidoreductase complex in Arabidopsis during dark-induced senescence. *Plant Physiology*, 157(1), 55–69. <https://doi.org/10.1104/pp.111.182188>
- Aravind, L. and Koonin, E. V. (2000). SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends in biochemical sciences*, 25, 112–4. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(99\)01537-6](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(99)01537-6)
- Arouna, A., Fatognon, I. A., Saito, K. and Futakuchi, K. (2021). Moving toward rice self-sufficiency in sub-Saharan Africa by 2030: Lessons learned from 10 years of the Coalition for African Rice Development. *World Development Perspectives*, 21, 100291. <https://doi.org/10.1016/j.wdp.2021.100291>
- Augustine, R. C., York, S. L., Rytz, T. C. and Vierstra, R. D. (2016). Defining the SUMO system in maize: SUMOylation is up-regulated during endosperm development and rapidly induced by stress. *Plant physiology*, 171, 2191–210. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00353>
- Avrameas, S. (1991). Natural autoantibodies: from “horror autotoxicus” to “gnothi seauton”. *Immunology today*, 12, 154–9. [https://doi.org/10.1016/s0167-5699\(05\)80045-3](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(05)80045-3)

- Bailey, T. L., Williams, N., Misleh, C. and Li, W. W. (2006). MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl_2), W369–W373.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl198>
- Bakery, A., Vraggalas, S., Shalha, B., Chauhan, H., Benhamed, M. and Fragkostefanakis, S. (2024). Heat stress transcription factors as the central molecular rheostat to optimize plant survival and recovery from heat stress. *New Phytologist*, 244(1), 51–64. <https://doi.org/10.1111/nph.20017>
- Berz, J., Simm, S., Schuster, S., Scharf, K.-D., Schleiff, E. and Ebersberger, I. (2019). HEATSTER: a database and web server for identification and classification of heat stress transcription factors in plants. *Bioinformatics and Biology Insights*, 13, 1177932218821365.
<https://doi.org/10.1177/1177932218821365>
- Bordeaux, J., Welsh, A. W., Agarwal, S., Killiam, E., Baquero, M. T., Hanna, J. A., Anagnostou, V. K. and Rimm, D. L. (2010). Antibody validation. *BioTechniques*, 48(3), 197–209.
<https://doi.org/10.2144/000113382>
- Boulanger, M., Chakraborty, M., Tempé, D., Piechaczyk, M. and Bossis, G. (2021). SUMO and transcriptional regulation: the lessons of large-scale proteomic, modifomic and genomic studies. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26. <https://doi.org/10.3390/molecules26040828>
- Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y. and Greenleaf, W. J. (2013). Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nature Methods*, 10(12), 1213–1218. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2688>
- Burg, H. A. van den, Kini, R. K., Schuurink, R. C. and Takken, F. L. W. (2010). Arabidopsis Small Ubiquitin-Like Modifier paralogs have distinct functions in development and defense. *The Plant Cell*, 22(6), 1998–2016. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.070961>
- Bustin, S. A. and Nolan, T. (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of biomolecular techniques : JBT*, 15(3), 155–66.
- Castro, P. H., Tavares, R. M., Bejarano, E. R. and Azevedo, H. (2012). SUMO, a heavyweight player in plant abiotic stress responses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 69, 3269–83.
<https://doi.org/10.1007/s00018-012-1094-2>
- Chandran, A. K. N., Paul, P., Dhatt, B. K., Sandhu, J., Irvin, L., Oguro, S., Shi, Y., Zhang, C. and Walia, H. (2024). Phenotypic and transcriptomic responses of diverse rice accessions to transient heat stress during early grain development. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1429697.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1429697>
- Chang, K. N., Zhong, S., Weirauch, M. T., Hon, G., Pelizzola, M., Li, H., Huang, S. C., Schmitz, R. J., Urich, M. A., Kuo, D., Nery, J. R., Qiao, H., Yang, A., Jamali, A., Chen, H., Ideker, T., Ren, B., Bar-Joseph, Z., Hughes, T. R. and Ecker, J. R. (2013). Temporal transcriptional response to ethylene gas drives growth hormone cross-regulation in Arabidopsis. *eLife*, 2, e00675. <https://doi.org/10.7554/elife.00675>

- Chan-Schaminet, K. Y., Baniwal, S. K., Bublak, D., Nover, L. and Scharf, K.-D. (2009). Specific interaction between tomato HsfA1 and HsfA2 creates hetero-oligomeric superactivator complexes for synergistic activation of heat stress gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 284(31), 20848–20857. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.007336>
- Chauhan, J., Prathibha, M., Singh, P., Choyal, P., Mishra, U. N., Saha, D., Kumar, R., Anuragi, H., Pandey, S., Bose, B., Mehta, B., Dey, P., Dwivedi, K. K., Gupta, N. K. and Singhal, R. K. (2023). Plant photosynthesis under abiotic stresses: Damages, adaptive, and signaling mechanisms. *Plant Stress*, 10, 100296. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100296>
- Chen, C.-H., Lin, H.-W., Huang, M.-F., Chiang, C.-W., Lee, K.-H., Phuong, N. T., Cai, Z.-Y., Chang, W.-C. and Lin, D.-Y. (2024). Sumoylation of SAP130 regulates its interaction with FAF1 as well as its protein stability and transcriptional repressor function. *BMC Molecular and Cell Biology*, 25(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12860-023-00498-x>
- Chen, H., Wu, Y.-C. and Teng, C.-Y. (2023). Temporal variation of the relationships between rice yield and climate variables since 1925. *PeerJ*, 11, e16045. <https://doi.org/10.7717/peerj.16045>
- Chen, H.-C., Chien, T.-C., Chen, T.-Y., Chiang, M.-H., Lai, M.-H. and Chang, M.-C. (2021). Overexpression of a novel ERF-X-type transcription factor, OsERF106MZ, reduces shoot growth and tolerance to salinity stress in rice. *Rice*, 14(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s12284-021-00525-5>
- Cheng, Q., Zhou, Y., Liu, Z., Zhang, L., Song, G., Guo, Z., Wang, W., Qu, X., Zhu, Y. and Yang, D. (2015). An alternatively spliced heat shock transcription factor, OsHSFA2dI, functions in the heat stress-induced unfolded protein response in rice. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 17, 419–29. <https://doi.org/10.1111/plb.12267>
- Climate Change 2021 – The Physical Science Basis*. (2023). <https://doi.org/10.1017/9781009157896>
- Cohen-Peer, R., Schuster, S., Meiri, D., Breiman, A. and Avni, A. (2010). Sumoylation of Arabidopsis heat shock factor A2 (HsfA2) modifies its activity during acquired thermotolerance. *Plant Molecular Biology*, 74(1–2), 33–45. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9652-1>
- Cominelli, E., Galbiati, M., Vavasseur, A., Conti, L., Sala, T., Vuylsteke, M., Leonhardt, N., Dellaporta, S. L. and Tonelli, C. (2005). A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Current biology : CB*, 15, 1196–200. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.048>
- Cong, L., Pakala, S. B., Ohshiro, K., Li, D.-Q. and Kumar, R. (2011). SUMOylation and SUMO-interacting Motif (SIM) of Metastasis Tumor Antigen 1 (MTA1) synergistically regulate its transcriptional repressor function *. *Journal of Biological Chemistry*, 286(51), 43793–43808. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.267237>
- Consortium, T. U., Bateman, A., Martin, M.-J., Orchard, S., Magrane, M., Adesina, A., Ahmad, S., Bowler-Barnett, E. H., Bye-A-Jee, H., Carpentier, D., Denny, P., Fan, J., Garmiri, P., Gonzales, L. J. da C., Hussein, A., Ignatchenko, A., Insana, G., Ishtiaq, R., Joshi, V., ... Zhang, J. (2024). UniProt: the Universal

- Protein knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D609–D617.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkae1010>
- Craig, T. J., Anderson, D., Evans, A. J., Girach, F. and Henley, J. M. (2015). SUMOylation of Syntaxin1A regulates presynaptic endocytosis. *Scientific Reports*, 5(1), 17669. <https://doi.org/10.1038/srep17669>
- Crowe, J. H., Carpenter, J. F. and Crowe, L. M. (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual review of physiology*, 60, 73–103. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.73>
- Cubeñas-Potts, C. and Matunis, M. J. (2013). SUMO: A multifaceted modifier of chromatin structure and function. *Developmental Cell*, 24(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.11.020>
- Dawe, D. (2008). Agricultural research, poverty alleviation, and key trends in Asia's rice economy. *Charting New Pathways to C₄ Rice* (p. 37–53). WORLD SCIENTIFIC.
https://doi.org/10.1142/9789812709523_0003
- Debnath, T., Dhar, D. G. and Dhar, P. (2024). Molecular switches in plant stress adaptation. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 20. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-09051-7>
- Dergilev, A. I., Orlova, N. G., Dobrovolskaya, O. B. and Orlov, Y. L. (2021). Statistical estimates of multiple transcription factors binding in the model plant genomes based on ChIP-seq data. *Journal of Integrative Bioinformatics*, 19(1), 20200036. <https://doi.org/10.1515/jib-2020-0036>
- Desvoyes, Vergara, B. and, Sequeira-Mendes, Z. and, Madeira, J. and, Gutierrez, S. and and Crisanto. (2018). A rapid and efficient ChIP protocol to profile chromatin binding proteins and epigenetic modifications in *Arabidopsis*, 71–82. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7318-7_5
- Downs, C. A., Ryan, S. L. and Heckathorn, S. A. (1999). The chloroplast small heat-shock protein: evidence for a general role in protecting photosystem II against oxidative stress and photoinhibition. *Journal of Plant Physiology*, 155(4), 488–496. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(99\)80043-1](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(99)80043-1)
- Edwards, G. I., Nelson, K. M., Clec'h, S. L., Luu, T., Coast, O., Futakuchi, K. and Kok, K. (2024). Twenty-five rice research priorities for sustainable rice systems by 2050. *Global Sustainability*, 7, e23.
<https://doi.org/10.1017/sus.2024.17>
- Egelhofer, T. A., Minoda, A., Klugman, S., Lee, K., Kolasinska-Zwierz, P., Alekseyenko, A. A., Cheung, M.-S., Day, D. S., Gadel, S., Gorchakov, A. A., Gu, T., Kharchenko, P. V., Kuan, S., Latorre, I., Linder-Basso, D., Luu, Y., Ngo, Q., Perry, M., Rechtsteiner, A., ... Lieb, J. D. (2011). An assessment of histone-modification antibody quality. *Nature structural & molecular biology*, 18, 91–3.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.1972>
- Fang, Y., Liao, K., Du, H., Xu, Y., Song, H., Li, X. and Xiong, L. (2015). A stress-responsive NAC transcription factor SNAC3 confers heat and drought tolerance through modulation of reactive oxygen species in rice. *Journal of experimental botany*, 66, 6803–17. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv386>
- Farmer, A., Thibivilliers, S., Ryu, K. H., Schiefelbein, J. and Libault, M. (2021). Single-nucleus RNA and ATAC sequencing reveals the impact of chromatin accessibility on gene expression in *Arabidopsis*

- roots at the single-cell level. *Molecular Plant*, 14(3), 372–383.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.01.001>
- Feng, Z., Xu, Y., Xie, Z., Yang, Y., Lu, G., Jin, Y., Wang, M., Liu, M., Yang, H., Li, W. and Liang, Z. (2024). Overexpression of abscisic acid biosynthesis gene *OsNCED3* enhances survival rate and tolerance to alkaline stress in rice seedlings. *Plants (Basel, Switzerland)*, 13.
<https://doi.org/10.3390/plants13121713>
- Floden, E. W., Tommaso, P. D., Chatzou, M., Magis, C., Notredame, C. and Chang, J.-M. (2016). PSI/TM-Coffee: a web server for fast and accurate multiple sequence alignments of regular and transmembrane proteins using homology extension on reduced databases. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W339–W343. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw300>
- Flotho, A. and Melchior, F. (2013). Sumoylation: A regulatory protein modification in health and disease. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), 357–385. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061909-093311>
- Fonseca-Pereira, P. da, Pham, P. A., Cavalcanti, J. H. F., Omena-Garcia, R. P., Barros, J. A. S., Rosado-Souza, L., Vallarino, J. G., Mutwil, M., Avin-Wittenberg, T., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R. and Araújo, W. L. (2022). The Arabidopsis electron-transfer flavoprotein : ubiquinone oxidoreductase is required during normal seed development and germination. *The Plant Journal*, 109(1), 196–214.
<https://doi.org/10.1111/tpj.15566>
- Friedrich, T., Oberkofler, V., Trindade, I., Altmann, S., Brzezinka, K., Lämke, J., Gorka, M., Kappel, C., Sokolowska, E., Skirycz, A., Graf, A. and Bäurle, I. (2021). Heteromeric HSFA2/HSFA3 complexes drive transcriptional memory after heat stress in Arabidopsis. *Nature Communications*, 12(1), 3426.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-23786-6>
- Frietze, S. and Farnham, P. J. (2011). A handbook of transcription factors. *Sub-cellular biochemistry*, 52, 261–277. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9069-0_12
- Furey, T. S. (2012). ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nature reviews. Genetics*, 13, 840–52. <https://doi.org/10.1038/nrg3306>
- Gao, S., Zeng, X., Wang, J., Xu, Y., Yu, C., Huang, Y., Wang, F., Wu, K. and Yang, S. (2021). Arabidopsis SUMO E3 Ligase SIZ1 interacts with HDA6 and negatively regulates HDA6 function during flowering. *Cells*, 10(11), 3001. <https://doi.org/10.3390/cells10113001>
- Gareau, J. R. and Lima, C. D. (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11, 861–71.
<https://doi.org/10.1038/nrm3011>
- Garrido, E., Srivastava, A. K. and Sadanandom, A. (2018). Exploiting protein modification systems to boost crop productivity: SUMO proteases in focus. *Journal of Experimental Botany*, 69(19), 4625–4632. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery222>

- Golovanov, A. P., Hautbergue, G. M., Wilson, S. A. and Lian, L.-Y. (2004). A simple method for improving protein solubility and long-term stability. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(29), 8933–8939. <https://doi.org/10.1021/ja049297h>
- Gong, M., Li, Y.-J. and Chen, S.-Z. (1998). Absciscic acid-induced thermotolerance in maize seedlings is mediated by calcium and associated with antioxidant systems. *Journal of Plant Physiology*, 153(3), 488–496. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(98\)80179-x](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(98)80179-x)
- Grant, C. E., Bailey, T. L. and Noble, W. S. (2011). FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics*, 27(7), 1017–1018. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr064>
- Guo, H., Tao, W., Gao, H., Chen, L., Zhong, X., Tang, M., Gao, G., Liang, T. and Zhang, X. (2024). Physiological traits, gene expression responses, and proteomics of rice varieties varying in heat stress tolerance at the flowering stage. *Frontiers in plant science*, 15, 1489331. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1489331>
- Han, D., Chen, C., Xia, S., Liu, J., Shu, J., Nguyen, V., Lai, J., Cui, Y. and Yang, C. (2021). Chromatin-associated SUMOylation controls the transcriptional switch between plant development and heat stress responses. *Plant Communications*, 2(1), 100091. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100091>
- Han, D., Yu, Z., Lai, J. and Yang, C. (2022). Post-translational modification: a strategic response to high temperature in plants. *aBIOTECH*, 3(1), 49–64. <https://doi.org/10.1007/s42994-021-00067-w>
- Haring, M., Offermann, S., Danker, T., Horst, I., Peterhansel, C. and Stam, M. (2007). Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant methods*, 3, 11. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-11>
- Hartwig, T., Banf, M., Prietsch, G. P., Zhu, J.-Y., Mora-Ramírez, I., Schippers, J. H. M., Snodgrass, S. J., Seetharam, A. S., Huettel, B., Kolkman, J. M., Yang, J., Engelhorn, J. and Wang, Z.-Y. (2023). Hybrid allele-specific ChIP-seq analysis identifies variation in brassinosteroid-responsive transcription factor binding linked to traits in maize. *Genome Biology*, 24(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s13059-023-02909-w>
- He, J., Cheng, J. and Wang, T. (2020). SUMOylation-mediated response to mitochondrial stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5657. <https://doi.org/10.3390/ijms21165657>
- He, Z., Huang, T., Ao, K., Yan, X. and Huang, Y. (2017). Sumoylation, phosphorylation, and acetylation fine-tune the turnover of plant immunity components mediated by Ubiquitination. *Frontiers in plant science*, 8, 1682. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01682>
- Hermanson, G. T. (2013). *Bioconjugate Techniques* (3rd ed.). <https://www.sciencedirect.com/book/9780123822390/bioconjugate-techniques#book-info>
- Hickey, C. M., Wilson, N. R. and Hochstrasser, M. (2012). Function and regulation of SUMO proteases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13, 755–66. <https://doi.org/10.1038/nrm3478>

- Hu, Z., Song, N., Zheng, M., Liu, X., Liu, Z., Xing, J., Ma, J., Guo, W., Yao, Y., Peng, H., Xin, M., Zhou, D.-X., Ni, Z. and Sun, Q. (2015). Histone acetyltransferase GCN5 is essential for heat stress-responsive gene activation and thermotolerance in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 84, 1178–91. <https://doi.org/10.1111/tpj.13076>
- Huang, D., Wu, W., Abrams, S. R. and Cutler, A. J. (2008). The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *Journal of experimental botany*, 59, 2991–3007. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern155>
- Huang, J., Huang, J., Feng, Q., Shi, Y., Wang, F., Zheng, K., Huang, Q., Jiang, J., Luo, S., Xie, Y., Han, D., Lai, J. and Yang, C. (2023). SUMOylation facilitates the assembly of a Nuclear Factor-Y complex to enhance thermotolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 65(3), 692–702. <https://doi.org/10.1111/jipb.13396>
- Huang, Y., An, J., Sircar, S., Bergis, C., Lopes, C. D., He, X., Costa, B. D., Tan, F.-Q., Bazin, J., Antunez-Sanchez, J., Mammarella, M. F., Devani, R., Brik-Chaouche, R., Bendahmane, A., Frugier, F., Xia, C., Rothan, C., Probst, A. V., Mohamed, Z., ... Benhamed, M. (2023). HSFA1a modulates plant heat stress responses and alters the 3D chromatin organization of enhancer-promoter interactions. *Nature Communications*, 14(1), 469. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36227-3>
- Ibrahim, E. I., Attia, K. A., Ghazy, A. I., Itoh, K., Almajhdi, F. N. and Al-Doss, A. A. (2021). Molecular characterization and functional localization of a novel SUMOylation gene in *Oryza sativa*. *Biology*, 11(1), 53. <https://doi.org/10.3390/biology11010053>
- Ishida, T., Fujiwara, S., Miura, K., Stacey, N., Yoshimura, M., Schneider, K., Adachi, S., Minamisawa, K., Umeda, M. and Sugimoto, K. (2009). SUMO E3 Ligase HIGH PLOIDY2 regulates endocycle onset and meristem maintenance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(8), 2284–2297. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.068072>
- Jackson, S. A. (2016). Rice: The first crop genome. *Rice (New York, N.Y.)*, 9, 14. <https://doi.org/10.1186/s12284-016-0087-4>
- Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A. K. and Khurana, J. P. (2006). Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(2), 646–651. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.140>
- Jaini, S., Lyubetskaya, A., Gomes, A., Peterson, M., Park, S. T., Raman, S., Schoolnik, G. and Galagan, J. (2014). Transcription factor binding site mapping using ChIP-Seq. *Microbiology Spectrum*, 2(2), 10.1128/microbiolspec.mgm2-0035–2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mgm2-0035-2013>
- Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M. and Marcatili, P. (2017). BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W24–W29. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx346>
- Jmii, S. and Cappadocia, L. (2021). Plant SUMO E3 Ligases: function, structural organization, and connection with DNA. *Frontiers in Plant Science*, 12, 652170. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.652170>

- Johnson, D. S., Mortazavi, A., Myers, R. M. and Wold, B. (2007). Genome-wide mapping of *in vivo* protein-DNA interactions. *Science*, 316(5830), 1497–1502. <https://doi.org/10.1126/science.1141319>
- Johnson, E. S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annual review of biochemistry*, 73, 355–82. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074118>
- Joly-Lopez, Z., Forczek, E., Vello, E., Hoen, D. R., Tomita, A. and Bureau, T. E. (2017). Abiotic stress phenotypes are associated with conserved genes derived from transposable elements. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2027. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02027>
- Joo, J., Choi, D. H., Lee, Y. H., Seo, H. S. and Song, S. I. (2019). The rice SUMO conjugating enzymes OsSCE1 and OsSCE3 have opposing effects on drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 240, 152993. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.152993>
- Jr, F. C. S. and Lima, C. D. (2016). Capturing a substrate in an activated RING E3/E2–SUMO complex. *Nature*, 536(7616), 304–308. <https://doi.org/10.1038/nature19071>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kappel, C., Friedrich, T., Oberkofler, V., Jiang, L., Crawford, T., Lenhard, M. and Bäurle, I. (2023). Genomic and epigenomic determinants of heat stress-induced transcriptional memory in Arabidopsis. *Genome Biology*, 24(1), 129. <https://doi.org/10.1186/s13059-023-02970-5>
- Kaya-Okur, H. S., Wu, S. J., Codomo, C. A., Pledger, E. S., Bryson, T. D., Henikoff, J. G., Ahmad, K. and Henikoff, S. (2019). CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells. *Nature Communications*, 10(1), 1930. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09982-5>
- Khush, G. S. (2005). What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant molecular biology*, 59, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-2159-5>
- Kim, M., Kim, H., Lee, W., Lee, Y., Kwon, S.-W. and Lee, J. (2015). Quantitative shotgun proteomics analysis of rice anther proteins after exposure to high temperature. *International Journal of Genomics*, 2015(1), 238704. <https://doi.org/10.1155/2015/238704>
- Knight, H., Trewavas, A. J. and Knight, M. R. (1997). Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 12, 1067–78. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.12051067.x>
- Kurepa, J., Walker, J. M., Smalle, J., Gosink, M. M., Davis, S. J., Durham, T. L., Sung, D.-Y. and Vierstra, R. D. (2003). The Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 6862–6872. <https://doi.org/10.1074/jbc.m209694200>

- Lamaoui, M., Jemo, M., Datla, R. and Bekkaoui, F. (2018). Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Frontiers in Chemistry*, 6, 26. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00026>
- Landt, S. G., Marinov, G. K., Kundaje, A., Kheradpour, P., Pauli, F., Batzoglou, S., Bernstein, B. E., Bickel, P., Brown, J. B., Cayting, P., Chen, Y., DeSalvo, G., Epstein, C., Fisher-Aylor, K. I., Euskirchen, G., Gerstein, M., Gertz, J., Hartemink, A. J., Hoffman, M. M., ... Snyder, M. (2012). ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. *Genome research*, 22, 1813–31. <https://doi.org/10.1101/gr.136184.111>
- Larkindale, J., Hall, J. D., Knight, M. R. and Vierling, E. (2005). Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant physiology*, 138, 882–97. <https://doi.org/10.1104/pp.105.062257>
- Lata, C. and Prasad, M. (2011). Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of experimental botany*, 62, 4731–48. <https://doi.org/10.1093/jxb/err210>
- LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F. and McCoy, J. M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 11, 187–93. <https://doi.org/10.1038/nbt0293-187>
- Lee, H. and Seo, P. J. (2023). Accessible gene borders establish a core structural unit for chromatin architecture in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 51(19), 10261–10277. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad710>
- Lee, T. A. and Bailey-Serres, J. (2019). Integrative Analysis from the epigenome to translome uncovers patterns of dominant nuclear regulation during transient stress. *The Plant Cell*, 31(11), 2573–2595. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00463>
- Li, Q., Brown, J. B., Huang, H. and Bickel, P. J. (2011). Measuring reproducibility of high-throughput experiments. *The Annals of Applied Statistics*, 5(3), 1752–1779. <https://doi.org/10.1214/11-aos466>
- Li, Y., Williams, B. and Dickman, M. (2017). Arabidopsis B-cell lymphoma2 (Bcl-2)-associated athanogene 7 (BAG7)-mediated heat tolerance requires translocation, SUMOylation and binding to WRKY29. *New Phytologist*, 214(2), 695–705. <https://doi.org/10.1111/nph.14388>
- Liang, Z., Zhang, Q., Ji, C., Hu, G., Zhang, P., Wang, Y., Yang, L. and Gu, X. (2021). Reorganization of the 3D chromatin architecture of rice genomes during heat stress. *BMC Biology*, 19(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-00996-4>
- Liao, Y., Liu, Z., Gichira, A. W., Yang, M., Mbichi, R. W., Meng, L. and Wan, T. (2022). Deep evaluation of the evolutionary history of the Heat Shock Factor (HSF) gene family and its expansion pattern in seed plants. *PeerJ*, 10, e13603. <https://doi.org/10.7717/peerj.13603>

- Lin, B. L., Wang, J. S., Liu, H. C., Chen, R. W., Meyer, Y., Barakat, A. and Delseny, M. (2001). Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell stress & chaperones*, 6, 201–8. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2001\)006<0201:gaoths>2.0.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2001)006<0201:gaoths>2.0.co;2)
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J. and Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal*, 46, 258–68. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>
- Liu, B., Jiang, Y., Tang, H., Tong, S., Lou, S., Shao, C., Zhang, J., Song, Y., Chen, N., Bi, H., Zhang, H., Li, J., Liu, J. and Liu, H. (2021). The ubiquitin E3 ligase SR1 modulates the submergence response by degrading phosphorylated WRKY33 in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 33(5), 1771–1789. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab062>
- Liu, C. and Weigel, D. (2015). Chromatin in 3D: progress and prospects for plants. *Genome Biology*, 16(1), 170. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0738-6>
- Liu, J., Feng, L., Li, J. and He, Z. (2015). Genetic and epigenetic control of plant heat responses. *Frontiers in plant science*, 6, 267. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00267>
- Liu, X., Ciais, P., Makowski, D. and Liang, J. (2024). Warming leads to lower rice quality in east Asia. *Geophysical Research Letters*, 51(21). <https://doi.org/10.1029/2024gl110557>
- Liu, Y., Lai, J., Yu, M., Wang, F., Zhang, J., Jiang, J., Hu, H., Wu, Q., Lu, G., Xu, P. and Yang, C. (2016). The Arabidopsis SUMO E3 Ligase AtMMS21 dissociates the E2Fa/DPa complex in cell cycle regulation. *The Plant cell*, 28, 2225–2237. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00439>
- Lois, L. M., Lima, C. D. and Chua, N.-H. (2003). Small ubiquitin-like modifier modulates abscisic acid signaling in Arabidopsis. *The Plant cell*, 15, 1347–59. <https://doi.org/10.1105/tpc.009902>
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. and Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Luscombe, N. M., Laskowski, R. A. and Thornton, J. M. (2001). Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic acids research*, 29, 2860–74. <https://doi.org/10.1093/nar/29.13.2860>
- Mangani, R., Gunn, K. M. and Creux, N. M. (2023). Projecting the effect of climate change on planting date and cultivar choice for South African dryland maize production. *Agricultural and Forest Meteorology*, 341, 109695. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2023.109695>
- Marco, A. de, Deuerling, E., Mogk, A., Tomoyasu, T. and Bukau, B. (2007). Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. *BMC biotechnology*, 7, 32. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-32>
- Matsukura, S., Mizoi, J., Yoshida, T., Todaka, D., Ito, Y., Maruyama, K., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription

- factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Molecular Genetics and Genomics*, 283(2), 185–196. <https://doi.org/10.1007/s00438-009-0506-y>
- McCarthy, R. L., Kaeding, K. E., Keller, S. H., Zhong, Y., Xu, L., Hsieh, A., Hou, Y., Donahue, G., Becker, J. S., Alberto, O., Lim, B. and Zaret, K. S. (2021). Diverse heterochromatin-associated proteins repress distinct classes of genes and repetitive elements. *Nature Cell Biology*, 23(8), 905–914. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00725-7>
- Meers, M. P., Bryson, T. D., Henikoff, J. G. and Henikoff, S. (2019). Improved CUT&RUN chromatin profiling tools. *eLife*, 8, e46314. <https://doi.org/10.7554/elife.46314>
- Miller, M. J., Barrett-Wilt, G. A., Hua, Z. and Vierstra, R. D. (2010). Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(38), 16512–16517. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004181107>
- Miller, M. J., Scalf, M., Rytz, T. C., Hubler, S. L., Smith, L. M. and Vierstra, R. D. (2013). Quantitative proteomics reveals factors regulating RNA biology as dynamic targets of stress-induced SUMOylation in Arabidopsis. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 12, 449–63. <https://doi.org/10.1074/mcp.m112.025056>
- Miller, M. J. and Vierstra, R. D. (2011). Mass spectrometric identification of SUMO substrates provides insights into heat stress-induced SUMOylation in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(1), 130–133. <https://doi.org/10.4161/psb.6.1.14256>
- Mindel, V., Brodsky, S., Yung, H., Manadre, W. and Barkai, N. (2024). Revisiting the model for coactivator recruitment: Med15 can select its target sites independent of promoter-bound transcription factors. *Nucleic Acids Research*, 52(20), 12093–12111. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae718>
- Mishra, M., Tiwari, S. and Gomes, A. V. (2017). Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert review of proteomics*, 14, 1037–1053. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1388167>
- Miura, K., Jin, J. B. and Hasegawa, P. M. (2007). SUMOylation, a post-translational regulatory process in plants. *Current opinion in plant biology*, 10, 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.07.002>
- Miura, K., Jin, J. B., Lee, J., Yoo, C. Y., Stirn, V., Miura, T., Ashworth, E. N., Bressan, R. A., Yun, D.-J. and Hasegawa, P. M. (2007). SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in Arabidopsis. *The Plant cell*, 19, 1403–14. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048397>
- Miura, K., Lee, J., Jin, J. B., Yoo, C. Y., Miura, T. and Hasegawa, P. M. (2009). SUMOylation of ABI5 by the Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 negatively regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 5418–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811088106>

- Miura, K., Rus, A., Sharkhuu, A., Yokoi, S., Karthikeyan, A. S., Raghothama, K. G., Baek, D., Koo, Y. D., Jin, J. B., Bressan, R. A., Yun, D.-J. and Hasegawa, P. M. (2005). The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21), 7760–7765. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500778102>
- Moon, S.-J., Min, M. K., Kim, J.-A., Kim, D. Y., Yoon, I. S., Kwon, T. R., Byun, M. O. and Kim, B.-G. (2019). Ectopic expression of OsDREB1G, a member of the OsDREB1 subfamily, confers cold stress tolerance in rice. *Frontiers in Plant Science*, 10, 297. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00297>
- Mosleh, M. K., Hassan, Q. K. and Chowdhury, E. H. (2015). Application of remote sensors in mapping rice area and forecasting its production: a review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 15, 769–91. <https://doi.org/10.3390/s150100769>
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M. and Snyder, M. (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*, 320(5881), 1344–1349. <https://doi.org/10.1126/science.1158441>
- Niskanen, E. A., Malinen, M., Sutinen, P., Toropainen, S., Paakinaho, V., Vihervaara, A., Joutsen, J., Kaikkonen, M. U., Sistonen, L. and Palvimo, J. J. (2015). Global SUMOylation on active chromatin is an acute heat stress response restricting transcription. *Genome Biology*, 16(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0717-y>
- Niskanen, E. A. and Palvimo, J. J. (2017). Chromatin SUMOylation in heat stress: To protect, pause and organise? *BioEssays*, 39(6). <https://doi.org/10.1002/bies.201600263>
- Niu, L. and Liao, W. (2016). Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium. *Frontiers in plant science*, 7, 230. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00230>
- Niwa, T., Ying, B.-W., Saito, K., Jin, W., Takada, S., Ueda, T. and Taguchi, H. (2009). Bimodal protein solubility distribution revealed by an aggregation analysis of the entire ensemble of *Escherichia coli* proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 4201–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811922106>
- Novatchkova, M., Tomanov, K., Hofmann, K., Stuible, H. and Bachmair, A. (2012). Update on SUMOylation: defining core components of the plant SUMO conjugation system by phylogenetic comparison. *New Phytologist*, 195(1), 23–31. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04135.x>
- Orlando, V. (2000). Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends in biochemical sciences*, 25, 99–104. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(99\)01535-2](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(99)01535-2)
- Ouyang, W., Luan, S., Xiang, X., Guo, M., Zhang, Y., Li, G. and Li, X. (2022). Profiling plant histone modification at single-cell resolution using snCUT&Tag. *Plant Biotechnology Journal*, 20(3), 420–422. <https://doi.org/10.1111/pbi.13768>

- Ouyang, Z., Zhou, Q. and Wong, W. H. (2009). ChIP-Seq of transcription factors predicts absolute and differential gene expression in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(51), 21521–21526. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904863106>
- Park, H. C., Kim, H., Koo, S. C., Park, H. J., Cheong, M. S., Hong, H., Baek, D., Chung, W. S., Kim, D. H., Bressan, R. A., Lee, S. Y., Bohnert, H. J. and Yun, D. (2010). Functional characterization of the SIZ/PIAS-type SUMO E3 ligases, OsSIZ1 and OsSIZ2 in rice. *Plant, Cell & Environment*, 33(11), 1923–1934. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02195.x>
- Park, H. J., Kim, W.-Y., Park, H. C., Lee, S. Y., Bohnert, H. J. and Yun, D.-J. (2011). SUMO and SUMOylation in plants. *Molecules and cells*, 32, 305–16. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-0122-7>
- Park, H.-J., Jung, H.-M., Lee, A., Jo, S.-H., Lee, H.-J., Kim, H.-S., Jung, C.-K., Min, S.-R. and Cho, H.-S. (2021). SUMO modification of OsFKBP20-1b is integral to proper pre-mRNA splicing upon heat stress in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 9049. <https://doi.org/10.3390/ijms22169049>
- Park, P. J. (2009). ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nature Reviews Genetics*, 10(10), 669–680. <https://doi.org/10.1038/nrg2641>
- Park, S.-M., Kim, S.-A. and Ahn, S.-G. (2015). HSF2 autoregulates its own transcription. *International Journal of Molecular Medicine*, 36(4), 1173–1179. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2309>
- Pei, W., Jain, A., Sun, Y., Zhang, Z., Ai, H., Liu, X., Wang, H., Feng, B., Sun, R., Zhou, H., Xu, G. and Sun, S. (2017). OsSIZ2 exerts regulatory influences on the developmental responses and phosphate homeostasis in rice. *Scientific Reports*, 7(1), 12280. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10274-5>
- Piveta, L. B., Roma-Burgos, N., Noldin, J. A., Viana, V. E., Oliveira, C. de, Lamego, F. P. and Avila, L. A. de. (2020). Molecular and physiological responses of rice and weedy rice to heat and drought stress †. *Agriculture*, 11(1), 9. <https://doi.org/10.3390/agriculture11010009>
- Puri, D., Koschorz, B., Engist, B., Onishi-Seebacher, M., Ryan, D., Soujanya, M. and Montavon, T. (2021). Foxd3 controls heterochromatin-mediated repression of repeat elements and 2-cell state transcription. *EMBO reports*, 22(12), EMBR202153180. <https://doi.org/10.15252/embr.202153180>
- Qiu, F., Zheng, Y., Lin, Y., Woldegiorgis, S. T., Xu, S., Feng, C., Huang, G., Shen, H., Xu, Y., Kabore, M. A. F., Ai, Y., Liu, W. and He, H. (2023). Integrated ATAC-Seq and RNA-Seq data analysis to reveal OsbZIP14 function in rice in response to heat stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5619. <https://doi.org/10.3390/ijms24065619>
- Ramakrishnan, M., Zhang, Z., Mullasser, S., Kalendar, R., Ahmad, Z., Sharma, A., Liu, G., Zhou, M. and Wei, Q. (2022). Epigenetic stress memory: A new approach to study cold and heat stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1075279. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1075279>
- Raorane, M. L., Mutte, S. K., Varadarajan, A. R., Pabuayan, I. M. and Kohli, A. (2013). Protein SUMOylation and plant abiotic stress signaling: *in silico* case study of rice RLKs, heat-shock and Ca²⁺-binding proteins. *Plant Cell Reports*, 32(7), 1053–1065. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1452-z>

- Ren, Y., Huang, Z., Jiang, H., Wang, Z., Wu, F., Xiong, Y. and Yao, J. (2021). A heat stress responsive NAC transcription factor heterodimer plays key roles in rice grain filling. *Journal of experimental botany*, 72, 2947–2964. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab027>
- Ribet, D. and Cossart, P. (2010). Post-translational modifications in host cells during bacterial infection. *FEBS Letters*, 584(13), 2748–2758. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.012>
- Riboni, M., Galbiati, M., Tonelli, C. and Conti, L. (2013). GIGANTEA enables drought escape response via abscisic acid-dependent activation of the florigens and suppressor of overexpression of CONSTANS1. *Plant physiology*, 162, 1706–19. <https://doi.org/10.1104/pp.113.217729>
- Ridley, R. G. (1989). *Antibodies: A laboratory manual*. Edited by Ed Harlow and David Lane. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 1988. 726 pages. Paper \$50.00. ISBN 0 87969 314 2. *Genetical Research*, 54(2), 161–161. <https://doi.org/10.1017/s0016672300028548>
- Robert, X. and Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W320–W324. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>
- Rosa, M. T. and Abreu, I. A. (2019). Exploring the regulatory levels of SUMOylation to increase crop productivity. *Current opinion in plant biology*, 49, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.04.009>
- Rosa, M. T. G., Almeida, D. M., Pires, I. S., Farias, D. da R., Martins, A. G., Maia, L. C. da, Oliveira, A. C. de, Saibo, N. J. M., Oliveira, M. M. and Abreu, I. A. (2018). Insights into the transcriptional and post-transcriptional regulation of the rice SUMOylation machinery and into the role of two rice SUMO proteases. *BMC Plant Biology*, 18(1), 349. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1547-3>
- Rosano, G. L. and Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, Volume 5-2014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rosonina, E., Akhter, A., Dou, Y., Babu, J. and Theivakadacham, V. S. S. (2017). Regulation of transcription factors by SUMOylation. *Transcription*, 8, 220–231. <https://doi.org/10.1080/21541264.2017.1311829>
- Ross-Innes, C. S., Stark, R., Teschendorff, A. E., Holmes, K. A., Ali, H. R., Dunning, M. J., Brown, G. D., Gojis, O., Ellis, I. O., Green, A. R., Ali, S., Chin, S.-F., Palmieri, C., Caldas, C. and Carroll, J. S. (2012). Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. *Nature*, 481(7381), 389–393. <https://doi.org/10.1038/nature10730>
- Roy, D. and Sadanandom, A. (2021). SUMO mediated regulation of transcription factors as a mechanism for transducing environmental cues into cellular signaling in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(6), 2641–2664. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03723-4>
- Rytz, T. C., Miller, M. J., McLoughlin, F., Augustine, R. C., Marshall, R. S., Juan, Y., Charng, Y., Scalf, M., Smith, L. M. and Vierstra, R. D. (2018). SUMOylome profiling reveals a diverse array of nuclear targets modified by the SUMO ligase SIZ1 during heat stress. *The Plant Cell*, 30(5), 1077–1099. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00993>

- Sah, S. K., Reddy, K. R. and Li, J. (2016). Absciscic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. *Frontiers in plant science*, 7, 571. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00571>
- Sahid, S., Roy, C., Shee, D., Datta, R. and Paul, S. (2021). Jacalin domain-containing protein OsSalT interacts with OsDREB2A and OsNAC1 to impart drought stress tolerance in planta. *Environmental and Experimental Botany*, 183, 104362. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104362>
- Saleh, A., Withers, J., Mohan, R., Marqués, J., Gu, Y., Yan, S., Zavaliev, R., Nomoto, M., Tada, Y. and Dong, X. (2015). Posttranslational modifications of the master transcriptional regulator NPR1 enable dynamic but tight control of plant immune responses. *Cell Host & Microbe*, 18(2), 169–182. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.07.005>
- Samtani, H., Sharma, A. and Khurana, P. (2022). Overexpression of HVA1 enhances drought and heat stress tolerance in *Triticum aestivum* doubled haploid plants. *Cells*, 11(5), 912. <https://doi.org/10.3390/cells11050912>
- Saper, C. B. (2009). A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 57, 1–5. <https://doi.org/10.1369/jhc.2008.952770>
- Saracco, S. A., Miller, M. J., Kurepa, J. and Vierstra, R. D. (2007). Genetic analysis of SUMOylation in Arabidopsis: conjugation of SUMO1 and SUMO2 to nuclear proteins is essential. *Plant Physiology*, 145(1), 119–134. <https://doi.org/10.1104/pp.107.102285>
- Sato, H., Mizoi, J., Tanaka, H., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Morimoto, K., Ohori, T., Kusakabe, K., Nagata, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014). Arabidopsis DPB3-1, a DREB2A interactor, specifically enhances heat stress-induced gene expression by forming a heat stress-specific transcriptional complex with NF-Y Subunits. *The Plant Cell*, 26(12), 4954–4973. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.132928>
- Sato, Y., Antonio, B. A., Namiki, N., Takehisa, H., Minami, H., Kamatsuki, K., Sugimoto, K., Shimizu, Y., Hirochika, H. and Nagamura, Y. (2011). RiceXPro: a platform for monitoring gene expression in japonica rice grown under natural field conditions. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl_1), D1141–D1148. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1085>
- Saud, S., Wang, D., Fahad, S., Alharby, H. F., Bamagoos, A. A., Mjrashi, A., Alabdallah, N. M., AlZahrani, S. S., AbdElgawad, H., Adnan, M., Sayyed, R. Z., Ali, S. and Hassan, S. (2022). Comprehensive impacts of climate change on rice production and adaptive strategies in China. *Frontiers in Microbiology*, 13, 926059. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.926059>
- Scharf, K.-D., Berberich, T., Ebersberger, I. and Nover, L. (2012). The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. *Biochimica et biophysica acta*, 1819, 104–19. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.10.002>
- Schmidt, D. and Müller, S. (2003). PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 60, 2561–74. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3129-1>

Schrödinger, L. (s. d.). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version~1.8*.

Seager, R., Ramesh, N. S., Cross, S., Guo, C., Wilkinson, K. A. and Henley, J. M. (2024). SUMOylation of MFF coordinates fission complexes to promote stress-induced mitochondrial fragmentation. *Science Advances*, 10(40), eadq6223. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adq6223>

Shahriari, M., Shafiee, F., Moazen, F. and Sadeghi, H. M. M. (2024). Optimization of the production of soluble recombinant TEV protease in two *E. coli* strains. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 16, 279–283. <https://doi.org/10.18502/ajmb.v16i4.16744>

Shi, L., Cui, X. and Shen, Y. (2024). The roles of histone methylation in the regulation of abiotic stress responses in plants. *Plant Stress*, 11, 100303. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100303>

Shiio, Y. and Eisenman, R. N. (2003). Histone SUMOylation is associated with transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), 13225–13230. <https://doi.org/10.1073/pnas.1735528100>

Shimada, H. and Tanaka, K. (2023). Rice SUMOs and unification of their names. *Genes & Genetic Systems*, 98(1), 1–7. <https://doi.org/10.1266/ggs.22-00097>

Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany*, 58, 221–7. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl164>

Sijacic, P., Bajic, M., McKinney, E. C., Meagher, R. B. and Deal, R. B. (2018). Changes in chromatin accessibility between Arabidopsis stem cells and mesophyll cells illuminate cell type-specific transcription factor networks. *The Plant Journal*, 94(2), 215–231. <https://doi.org/10.1111/tpj.13882>

Siloși, I., Siloși, C. A., Boldeanu, M. V., Cojocaru, M., Biciușcă, V., Avrănescu, C. S., Cojocaru, I. M., Bogdan, M. and FolcuȚi, R. M. (2016). The role of autoantibodies in health and disease. *Romanian journal of morphology and embryology*, 57, 633–638.

Singh, G., Sarkar, N. K. and Grover, A. (2018). Mapping of domains of heat stress transcription factor OsHsfA6a responsible for its transactivation activity. *Plant Science*, 274, 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.05.010>

Singh, M., Singh, A., Yadav, N. and Yadav, D. K. (2022). Current perspectives of ubiquitination and SUMOylation in abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*, 13, 993194. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.993194>

Sivashanmugam, A., Murray, V., Cui, C., Zhang, Y., Wang, J. and Li, Q. (2009). Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Science*, 18(5), 936–948. <https://doi.org/10.1002/pro.102>

Skene, P. J. and Henikoff, S. (2017). An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites. *eLife*, 6, e21856. <https://doi.org/10.7554/elife.21856>

- Song, L., Huang, S.-S. C., Wise, A., Castanon, R., Nery, J. R., Chen, H., Watanabe, M., Thomas, J., Bar-Joseph, Z. and Ecker, J. R. (2016). A transcription factor hierarchy defines an environmental stress response network. *Science (New York, N.Y.)*, 354. <https://doi.org/10.1126/science.aag1550>
- Song, L., Koga, Y. and Ecker, J. R. (2016). Profiling of transcription factor binding events by Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-seq). *Current Protocols in Plant Biology*, 1(2), 293–306. <https://doi.org/10.1002/cppb.20014>
- Song, S., Tian, D., Zhang, Z., Hu, S. and Yu, J. (2018). Rice genomics: over the past two decades and into the future. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 16, 397–404. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2019.01.001>
- Sørensen, H. P. and Mortensen, K. K. (2005). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-1>
- Srivastava, A. K., Zhang, C., Caine, R. S., Gray, J. and Sadanandom, A. (2017). Rice SUMO protease overly tolerant to salt targets the transcription factor, OsbZIP23 to promote drought tolerance in rice. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 92, 1031–1043. <https://doi.org/10.1111/tpj.13739>
- Stark, R. and Brown, G. (2016). *DiffBind: Differential binding analysis of ChIP-Seq peak data*.
- Steinhauser, S., Kurzawa, N., Eils, R. and Herrmann, C. (2016). A comprehensive comparison of tools for differential ChIP-seq analysis. *Briefings in Bioinformatics*, 17(6), bbv110. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv110>
- Su, Q., Sun, Z., Liu, Y., Lei, J., Zhu, W. and Nanyan, L. (2022). Physiological and comparative transcriptome analysis of the response and adaptation mechanism of the photosynthetic function of mulberry (*Morus alba* L.) leaves to flooding stress. *Plant signaling & behavior*, 17, 2094619. <https://doi.org/10.1080/15592324.2022.2094619>
- Su, X., Yao, L., Wang, X., Zhang, Y., Zhang, G. and Li, X. (2025). Mechanisms for cell survival during abiotic stress: focusing on plasma membrane. *Stress Biology*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s44154-024-00195-5>
- Sun, Q., Zhao, Y., Zhang, Y., Chen, S., Ying, Q., Lv, Z., Che, X. and Wang, D. (2022). Heat stress may cause a significant reduction of rice yield in China under future climate scenarios. *The Science of the total environment*, 818, 151746. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151746>
- Suzuki, R., Shindo, H., Tase, A., Kikuchi, Y., Shimizu, M. and Yamazaki, T. (2009). Solution structures and DNA binding properties of the N-terminal SAP domains of SUMO E3 ligases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Oryza sativa*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 75(2), 336–347. <https://doi.org/10.1002/prot.22243>
- Talukdar, P. D. and Chatterji, U. (2023). Transcriptional co-activators: emerging roles in signaling pathways and potential therapeutic targets for diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 427. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01651-w>

- Tannenbaum, M., Sarusi-Portuguez, A., Krispil, R., Schwartz, M., Loza, O., Benichou, J. I. C., Mosquna, A. and Hakim, O. (2018). Regulatory chromatin landscape in *Arabidopsis thaliana* roots uncovered by coupling INTACT and ATAC-seq. *Plant Methods*, 14(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0381-9>
- Tao, Z., Shen, L., Gu, X., Wang, Y., Yu, H. and He, Y. (2017). Embryonic epigenetic reprogramming by a pioneer transcription factor in plants. *Nature*, 551, 124–128. <https://doi.org/10.1038/nature24300>
- Teramura, H., Yamada, K., Ito, K., Kasahara, K., Kikuchi, T., Kioka, N., Fukuda, M., Kusano, H., Tanaka, K. and Shimada, H. (2021). Characterization of novel SUMO family genes in the rice genome. *Genes & Genetic Systems*, 96(1), 25–32. <https://doi.org/10.1266/ggs.20-00034>
- Teytelman, L., Thurtle, D. M., Rine, J. and Oudenaarden, A. van. (2013). Highly expressed loci are vulnerable to misleading ChIP localization of multiple unrelated proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46), 18602–18607. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316064110>
- The map-based sequence of the rice genome. (2005). *Nature*, 436, 793–800. <https://doi.org/10.1038/nature03895>
- Tokuriki, N. and Tawfik, D. S. (2009). Protein dynamism and evolvability. *Science (New York, N.Y.)*, 324, 203–7. <https://doi.org/10.1126/science.1169375>
- Tomanov, K., Zeschmann, A., Hermkes, R., Eifler, K., Ziba, I., Grieco, M., Novatchkova, M., Hofmann, K., Hesse, H. and Bachmair, A. (2014). Arabidopsis PIAL1 and 2 promote SUMO chain formation as E4-type SUMO ligases and are involved in stress responses and sulfur metabolism. *The Plant Cell*, 26(11), 4547–4560. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.131300>
- Tomašíková, E. D., Prochazkova, K., Yang, F., Jemelkova, J., Finke, A., Dorn, A., Said, M., Puchta, H. and Pecinka, A. (2023). SMC5/6 complex-mediated SUMOylation stimulates DNA-protein cross-link repair in Arabidopsis. *The Plant cell*, 35, 1532–1547. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad020>
- Tropea, J. E., Cherry, S. and Waugh, D. S. (2009). Expression and purification of soluble His(6)-tagged TEV protease. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 498, 297–307. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-196-3_19
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., ... Velankar, S. (2021). AlphaFold protein structure database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Varadi, M., Bertoni, D., Magana, P., Paramval, U., Pidruchna, I., Radhakrishnan, M., Tsenkov, M., Nair, S., Mirdita, M., Yeo, J., Kovalevskiy, O., Tunyasuvunakool, K., Laydon, A., Židek, A., Tomlinson, H., Hariharan, D., Abrahamson, J., Green, T., Jumper, J., ... Velankar, S. (2023). AlphaFold protein structure database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D368–D375. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1011>

- Wang, C., Zhang, Q. and Shou, H. (2009). Identification and expression analysis of OsHsfs in rice. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 10(4), 291–300. <https://doi.org/10.1631/jzus.b0820190>
- Wang, F., Liu, Y., Shi, Y., Han, D., Wu, Y., Ye, W., Yang, H., Li, G., Cui, F., Wan, S., Lai, J. and Yang, C. (2020). SUMOylation stabilizes the transcription factor DREB2A to improve plant thermotolerance. *Plant physiology*, 183, 41–50. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00080>
- Wang, H., Makeen, K., Yan, Y., Cao, Y., Sun, S. and Xu, G. (2011). OsSIZ1 Regulates the vegetative growth and reproductive development in rice. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(2), 411–417. <https://doi.org/10.1007/s11105-010-0232-y>
- Wang, Y., Wang, Y., Chen, W., Dong, Y., Zhang, G., Deng, H., Liu, X., Lu, X., Wang, F., Chen, G., Xiao, Y. and Tang, W. (2023). Comparative transcriptome analysis of the mechanism difference in heat stress response between *indica* rice cultivar “IR64” and *japonica* cultivar “Koshihikari” at the seedling stage. *Frontiers in genetics*, 14, 1135577. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1135577>
- Wenjing, W., Chen, Q., Singh, P. K., Huang, Y. and Pei, D. (2020). CRISPR/Cas9 edited HSFA6a and HSFA6b of *Arabidopsis thaliana* offers ABA and osmotic stress insensitivity by modulation of ROS homeostasis. *Plant Signaling & Behavior*, 15(12), 1816321. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1816321>
- Wilkins, O., Hafemeister, C., Plessis, A., Holloway-Phillips, M.-M., Pham, G. M., Nicotra, A. B., Gregorio, G. B., Jagadish, S. V. K., Septiningsih, E. M., Bonneau, R. and Purugganan, M. (2016). EGRINs (Environmental Gene Regulatory Influence Networks) in rice that function in the response to water deficit, high temperature, and agricultural environments. *The Plant Cell*, 28(10), 2365–2384. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00158>
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V. and Provart, N. J. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analysing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*, 2(8), e718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000718>
- Wu, K., Dhillon, N., Bajor, A., Abrahamsson, S. and Kamakaka, R. T. (2024). Yeast heterochromatin stably silences only weak regulatory elements by altering burst duration. *Cell Reports*, 43(4), 113983. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.113983>
- Wu, T. and Donohoe, M. E. (2016). Sequential chromatin immunoprecipitation to detect SUMOylated MeCP2 in neurons. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 5, 374–378. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.01.014>
- Wu, T.-Y., Hoh, K. L., Boonyaves, K., Krishnamoorthi, S. and Urano, D. (2022). Diversification of heat shock transcription factors expanded thermal stress responses during early plant evolution. *The Plant Cell*, 34(10), 3557–3576. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac204>
- Wu, Z., Li, T., Ding, L., Wang, C., Teng, R., Xu, S., Cao, X. and Teng, N. (2024). Lily LHsFC2 coordinates with HSFA6s to balance heat stress response and improve thermotolerance. *New Phytologist*, 241(5), 2124–2142. <https://doi.org/10.1111/nph.19507>

- Xiang, Z., Zhang, L., Long, Y., Zhang, M., Yao, Y., Deng, H., Quan, C., Lu, M., Cui, B. and Wang, D. (2024). An ABA biosynthesis enzyme gene OsNCED4 regulates NaCl and cold stress tolerance in rice. *Scientific reports*, 14, 26711. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-78121-y>
- Xiao, G., Jiang, Z., Xing, T., Chen, Y., Zhang, H., Qian, J., Wang, X., Wang, Y., Xia, G. and Wang, M. (2025). Small Ubiquitin-like modifier protease gene TaDSU enhances salt tolerance of wheat. *The New phytologist*, 245, 2540–2552. <https://doi.org/10.1111/nph.20171>
- Xu, S., Grullon, S., Ge, K. and Peng, W. (2014). Spatial clustering for identification of ChIP-enriched regions (SICER) to map regions of histone methylation patterns in embryonic stem cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1150, 97–111. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0512-6_5
- Xu, Y., Chu, C. and Yao, S. (2021). The impact of high-temperature stress on rice: Challenges and solutions. *The Crop Journal*, 9(5), 963–976. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.02.011>
- Xu, Y., Ramanathan, V. and Victor, D. G. (2018). Global warming will happen faster than we think. *Nature*, 564(7734), 30–32. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-07586-5>
- Yau, T.-Y., Sander, W., Eidson, C. and Courey, A. J. (2021). SUMO interacting motifs: structure and function. *Cells*, 10. <https://doi.org/10.3390/cells10112825>
- Yen, M.-J., Lin, K.-H., Thalimaraw, L., Yang, H.-R., Boonyaves, K., Cheng, C.-Y. and Wu, T.-Y. (2025). Evolutionarily conserved heat-induced chromatin dynamics drive heat stress responses in plants. *bioRxiv*, 2025.03.05.641738. <https://doi.org/10.1101/2025.03.05.641738>
- Yu, H.-X., Cao, Y.-J., Yang, Y.-B., Shan, J.-X., Ye, W.-W., Dong, N.-Q., Kan, Y., Zhao, H.-Y., Lu, Z.-Q., Guo, S.-Q., Lei, J.-J., Liao, B. and Lin, H.-X. (2024). A TT1-SCE1 module integrates ubiquitination and SUMOylation to regulate heat tolerance in rice. *Molecular plant*, 17, 1899–1918. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2024.11.007>
- Yu, Y., Chen, Y., Liu, K., Cheng, J. and Tu, J. (2020). SUMOylation enhances the activity of IDH2 under oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 532(4), 591–597. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.08.089>
- Yu, Y., Meng, Y., Chen, P. and Cao, K. (2024). Submergence stress reduces the ability of rice to regulate recovery after disaster. *Agronomy*, 14(6), 1319. <https://doi.org/10.3390/agronomy14061319>
- Yu, Y., Zhang, H., Long, Y., Shu, Y. and Zhai, J. (2022). Plant public RNA-seq database: a comprehensive online database for expression analysis of ~45 000 plant public RNA-Seq libraries. *Plant Biotechnology Journal*, 20(5), 806–808. <https://doi.org/10.1111/pbi.13798>
- Yunus, A. A. and Lima, C. D. (2009). Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA. *Molecular cell*, 35, 669–82. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.07.013>
- Zander, M., Lewsey, M. G., Clark, N. M., Yin, L., Bartlett, A., Guzmán, J. P. S., Hann, E., Langford, A. E., Jow, B., Wise, A., Nery, J. R., Chen, H., Bar-Joseph, Z., Walley, J. W., Solano, R. and Ecker, J. R. (2020).

Integrated multi-omics framework of the plant response to jasmonic acid. *Nature Plants*, 6(3), 290–302. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0605-7>

Zeigler, R. S. and Barclay, A. (2008). The relevance of rice. *Rice*, 1(1), 3–10. <https://doi.org/10.1007/s12284-008-9001-z>

Zhang, J., Augustine, R. C., Suzuki, M., Feng, J., Char, S. N., Yang, B., McCarty, D. R. and Vierstra, R. D. (2021). The SUMO ligase MMS21 profoundly influences maize development through its impact on genome activity and stability. *PLoS Genetics*, 17(10), e1009830. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009830>

Zhang, J., Zhang, S., Cheng, M., Jiang, H., Zhang, X., Peng, C., Lu, X., Zhang, M. and Jin, J. (2018). Effect of drought on agronomic traits of rice and wheat: A meta-analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5), 839. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050839>

Zhang, P., Qian, D., Luo, C., Niu, Y., Li, T., Li, C., Xiang, Y., Wang, X. and Niu, Y. (2021). Arabidopsis ADF5 acts as a downstream target gene of CBFs in response to low-temperature stress. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 635533. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.635533>

Zhang, S., Wang, S., Lv, J., Liu, Z., Wang, Y., Ma, N. and Meng, Q. (2018). SUMO E3 ligase SISIZ1 facilitates heat tolerance in tomato. *Plant and Cell Physiology*, 59(1), 58–71. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx160>

Zhang, X., Tang, Y., Ma, Q., Yang, C., Mu, Y., Suo, H., Luo, L. and Nian, H. (2013). OsDREB2A, a Rice transcription factor, significantly affects salt tolerance in transgenic soybean. *PLoS ONE*, 8(12), e83011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083011>

Zhang, Y., Wang, C., Wang, C., Yun, L., Song, L., Idrees, M., Liu, H., Zhang, Q., Yang, J., Zheng, X., Zhang, Z. and Gao, J. (2022). OsHsfB4b confers enhanced drought tolerance in transgenic Arabidopsis and rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10830. <https://doi.org/10.3390/ijms231810830>

Zhao, X. and Blobel, G. (2005). A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(13), 4777–4782. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500537102>

Zheng, C., Liu, C., Liu, L., Tan, Y., Sheng, X., Yu, D., Sun, Z., Sun, X., Chen, J., Yuan, D. and Duan, M. (2023). Effect of salinity stress on rice yield and grain quality: A meta-analysis. *European Journal of Agronomy*, 144, 126765. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2023.126765>

Zheng, S., Zhao, W., Liu, Z., Geng, Z., Li, Q., Liu, B., Li, B. and Bai, J. (2024). Establishment and maintenance of heat-stress memory in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(16), 8976. <https://doi.org/10.3390/ijms25168976>

Zheng, Z. and Liu, D. (2021). SIZ1 regulates phosphate deficiency-induced inhibition of primary root growth of Arabidopsis by modulating Fe accumulation and ROS production in its roots. *Plant Signaling & Behavior*, 16(10), 1946921. <https://doi.org/10.1080/15592324.2021.1946921>

- Zhou, W., Chen, F., Meng, Y., Chandrasekaran, U., Luo, X., Yang, W. and Shu, K. (2020). Plant waterlogging/flooding stress responses: From seed germination to maturation. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 148, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.020>
- Zhu, J.-K. (2016). Abiotic Stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167, 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>
- Zhu, L. and Huq, E. (2011). Plant transcription factors, methods and protocols. *Methods in Molecular Biology*, 754, 167–184. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-154-3_9