**Résumé**

Dans un contexte de réchauffement climatique mondial, l’étude des mécanismes permettant aux plantes de survivre aux stress environnementaux est primordiale pour assurer le maintien de la production agricole dans les années à venir. Les experts du climat prévoient une hausse des températures de 1,5 à 5,8 °C d'ici 2100 ce qui pourrait entraîner une diminution de 15% à 50% des rendements agricoles. Les étés exceptionnellement chauds des dernières années ont fait subir aux plantes des températures extrêmes qui, combinées à d'autres stress comme la sécheresse, ont déjà eu un impact négatif sur la production agricole mondiale. Il est donc urgent de comprendre comment les variations climatiques impactent le cycle de vie des végétaux afin d’adapter rapidement l'agriculture aux futures hausses de température. Nous avons actuellement une connaissance limitée des mécanismes moléculaires par lesquels les plantes survivent aux stress. Par conséquent, l'étude de la régulation de l'expression des gènes en réponse à des signaux environnementaux est fondamentale pour mieux comprendre comment les plantes grandissent et se développent. Nous avons récemment découvert que les plantes reprogramment radicalement la dégradation de leurs ARNm lors d’un stress thermique. En effet, nous avons observé que la protéine de liaison à l'ARN LARP1 s’associe lors d'un stress thermique (15 min à 38 ° C) avec l’exonucléase (5’-3’) XRN4 pour mettre en place un processus massif de dégradation des ARNm qui cible plus de 4500 ARNm chez Arabidopsis. LARP1 est nécessaire pour adresser XRN4 aux polysomes pendant le stress thermique, suggérant qu'une partie de la dégradation est amorcée sur des ARNm encore engagés dans la traduction. Nous avons également montré que des plantes incapables de produire XRN4 sont clairement affectées dans leur capacité à survivre à au moins un régime de stress thermique. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent fortement que les plantes régulent la réponse au stress thermique en induisant un processus essentiel de dégradation ciblée des ARNm. Suite à ce travail pionnier, de nombreuses questions demeurent. En particulier, nous voulons identifier dans ce projet: 1) Quel est le répertoire complet des ARNm affectés lors d'un stress thermique, 2) Quels sont les autres acteurs moléculaires impliqués, 3) Comment les ARNm sont sélectionnés pour la dégradation et 4) quelle est l'importance physiologique pour la plante de ce processus de dégradation. Pour répondre à ces questions, ce programme combinera des approches de biochimie, de génétique et de phénotypage avec l'utilisation d'approches génomiques innovantes. En effet, nous utiliserons un approche originale de marquage non-radioactif couplée à un séquençage massif nous permettant de conduire une étude globale de la stabilité des ARNm à 20°C et 38°C. Nous évaluerons aussi l'importance des marques épigénétiques de méthylation sur la stabilité des ARNm en réalisant une analyse du méthylome ARN à 20°C et 38°C. La plupart des études à ce jour ont analysé le phénomène de la thermotolérance des plantes au niveau transcriptionnel. Une grande originalité de ce travail est de postuler que le processus post-transcriptionnel est également déterminant pour l’acquisition des propriétés de thermotolérance. Les quatre modules de travail interdépendants de ce projet permettront de déterminer pour la première fois l'importance physiologique de la dégradation des ARNm pour la survie des plantes au stress thermique.

**Objectifs globaux, verrous scientifiques/techniques**

La survie de tous les organismes vivants dépend largement de leur capacité à continuellement adapter leur programme d'expression génique aux variations de leur environnement immédiat. Cela est particulièrement vrai pour les plantes terrestres qui n’ont pas comme les animaux la capacité de se soustraire aux conditions difficiles. En outre, la capacité des plantes à survivre aux contraintes environnementales est d'une importance primordiale pour la production alimentaire, en particulier dans le contexte du réchauffement climatique. À l'heure actuelle, nous avons une connaissance limitée des mécanismes moléculaires par lesquels les plantes survivent au stress. Or l’introduction de nouveaux caractères de résistance dans les plantes cultivées nécessite une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de base qui permettent aux plantes de faire face aux brusques variations quotidiennes de température. Jusqu'à présent, la plupart des études moléculaires de la réponse des plantes aux stress thermiques se sont focalisées sur l’analyse fonctionnelle des protéines de stress thermiques (les « Heat shock proteins ») et sur la caractérisation du réseau transcriptionnel impliqué dans leur production. Nous avons récemment découvert pour la première fois que les plantes reprogramment brutalement la stabilité de milliers d’ARNm lors du stress thermique et que cette reprogrammation est essentielle pour la survie de la plante lors d’une hausse de la température. Cette découverte nous ouvre une voie de recherche extrêmement originale et prometteuse: l’étude des mécanismes post-transcriptionnels de la réponse au stress thermique. Nos objectifs principaux dans ce projet sont donc de répondre aux questions suivantes : 1) Quel est le répertoire complet des ARNm affectés lors d'un stress thermique, 2) Quels sont les autres acteurs moléculaires impliqués, 3) Comment les ARNm sont sélectionnés pour la dégradation et 4) quelle est l'importance physiologique pour la plante de ce processus de dégradation. Nous attendons de ce projet des informations nouvelles et originales sur un mécanisme essentiel mais complètement inconnu et qui permet aux plantes de survivre au stress thermique. Ce projet permettra également d’adapter deux nouvelles approches génomiques à l’étude des plantes levant ainsi deux verrous techniques: une approche de marquage non-radioactif des ARNm permettant une analyse de leur durée de vie sur une longue période (ce qui était impossible de faire jusqu’à présent en utilisant différentes drogues bloquant la transcription) ainsi qu’une étude globale des patrons de méthylation des ARNm. Ces deux techniques ont été utilisées très récemment sur des modèles levures et cellules de mammifères. Nous proposons dans ce projet de transférer ces technologies à l’étude des modèles végétaux. Ceci devrait nous permettre de faire sauter les verrous scientifiques que représentent la détermination de la demi-vie de tous les ARNm de plantes ainsi que la détermination du méthylome complet des ARN de plantes. En combinant ces deux approches, nous serons en mesure de comprendre pour la première fois (tous organismes confondus) la signification du code épigénétique ARN en reliant des patrons de méthylation précis à une réponse cellulaire permettant de réguler le niveau de stabilité des ARNm. Nous serons également en mesure d’identifier les protéines de  lecture du code épigénétique impliquées dans cette réponse. La stratégie utilisée dans ce projet permettra donc des avancées très significatives, non-seulement sur la connaissance d’un nouveau mécanisme de thermotolérance chez les plantes mais aussi sur les outils d’analyses des ARNm de plantes et sur le rôle régulateur des marques épigénétiques présents de façon générale sur l’ensemble des ARNm eucaryotes.

**Programme de travail**

Notre programme est composé de quatre activités (Workpackages) ayant chacun un objectif spécifique, mais chacun contribuant à l'objectif général du projet, qui est de comprendre le mécanisme, les conséquences physiologiques et la généralité de la reprogrammation radical de la stabilité des ARNm suite à une hausse de la température (le processus H-SMD)

WP1 : Détermination à l'échelle du génome de la demi-vie des ARNm à 20°C et 38°C.

L'objectif principal de cette activité est de générer pour la première fois un répertoire complet de la demi-vie des ARNm d’Arabidopsis à 20°C et 38°C. Cette étape est essentielle pour identifier tous les ARNm qui sont activement dégradés par le processus H-SMD. Pour ce faire, nous allons utiliser une méthode originale de marquage non radioactif (pulse-chase) qui permet l'incorporation d'un analogue de base non-toxique (le 4-thiouracil ou 4SU) dans les ARNm de plantes.

WP2 Caractérisation de nouveaux acteurs du H-SMD par une approche génétique.

L'objectif spécifique de cette activité est d'identifier, par une approche génétique, de nouveaux acteurs impliqués dans le H-SMD. Nos premières analyses ont révélé que XRN4 et LARP1 sont deux composants majeurs de ce processus de dégradation. Cependant, il est également probable que d’autres composants, catalysant directement le décapping et/ou le processus de déadénylation, participent au H-SMD. Dans une première approche ciblée, nous allons mesurer la demi-vie d’ARNm connus pour être la cible du H-SMD dans des plantes mutantes pour des facteurs généraux du décapping et de la déadénylation. Ensuite, dans une approche plus générale nous allons mettre en place deux cribles génétiques basée sur le phénotype de létalité des mutants xrn4 et ccr4a/ccr4b au stress thermique de type TMHT.

WP3 Importance du processus H-SMD dans les propriétés de thermotolérance des plantes

L'objectif spécifique de cette activité est d'abord de tester la capacité de tous les mutants déficients dans la production de facteurs impliqués dans le H-SMD à survivre à divers régimes de stress chaleur tels que la thermotolérance de base (BT), la thermotolérance acquise à court et à long terme (SAT et LAT) et la thermotolérance à une température modérément élevée (TMHT). Ces régimes de stress seront appliquées à différents stades de développement (plantules, graines et fleurs) et des phénotypes seront recherchés à différents niveaux (germination, croissance, et fertilité). En plus de cette approche phénotypique détaillée, nous allons suivre la cinétique et les niveaux d'accumulation des protéines de choc thermique (HSP) dans ces mutants de H-SMD. Ainsi, nous examinerons si les phénotypes observés sont systématiquement (ou pas) associés à un défaut dans la production des protéines HSP.

WP4 Comment les ARNm sont sélectionnés par le H-SMD : impact des modifications épigénétique sur la stabilité des ARNm à 20°C et à 38°C.

Dans cette activité, nous allons tester l'implication des modifications épigénétiques des ARNm dans le processus H-SMD. Tout d'abord, nous allons tester si le niveau général de méthylation des ARNm augmente suite à un stress chaleur. Nous allons également tester si une augmentation de la température modifie la capacité des protéines de liaison aux ARNm méthylés à se lier à leurs cibles et ainsi purifier de nouvelles protéines de liaison. Ensuite en utilisant une lignée mutante, déficiente dans la déposition des marques de méthylation dans les ARNm, nous allons mesure la demi-vie de tous les ARNm et comparer ces résultats à ceux obtenus sur des plantes sauvages (WP1). Enfin, pour corréler les différents patrons de méthylation des ARNm à leur niveau de stabilité, nous allons réaliser le méthylome de tous les ARNm à 20°C et à 38°C. Cette activité va permettre pour la première fois d’accéder au code épigénétique des ARNm en reliant des patrons de méthylation ARN précis à des protéines fixant spécifiquement ces patrons et entrainant une réponse cellulaire modulant la stabilité des ARNm.

**Retombées scientifiques, techniques, économiques**

Au cours de ce projet, nous allons produire un matériel biologique et générer des données qui permettront de mieux comprendre le rôle biologique joué par la dégradation des ARNm induite par une hausse de la température sur le phénomène de thermotolérance des plantes. Un minimum 40 lignées simples ou doubles mutantes seront construites pendant ce projet. L’ensemble des lignées mutantes seront phénotypées dans au moins cinq régimes de stress thermique différents. Un phénotype de déficit de thermotolérance sera rechercher à au moins trois stades de développement différents (sur des plantules pour tester la survie et les défauts de croissance, sur la graine pour tester des défauts de germination et sur les fleurs pour tester des défauts de fertilité). Cette approche génétique combinée avec un crible phénotypique permettra d’établir un répertoire complet des acteurs de la dégradation des ARNm qui sont sollicités dans la mise en place de notre nouvelle voie de dégradation liée à la chaleur. Comme les protéines impliquées dans les processus de dégradation des ARNm sont très conservées chez l’ensemble des végétaux, chaque acteur identifié par cette approche représente une cible potentielle pour de futurs programmes d’amélioration variétale visant à augmenter les propriétés de thermotolérance de plantes d’intérêt agronomique. De plus, nous prévoyons caractériser en détail le mécanisme de dégradation induit par la chaleur et le rôle précis d’au moins deux nouveaux acteurs de ce mécanisme (en plus des deux acteurs déjà identifiés que sont XRN4 et LARP1). Ces dernières informations pourront être très utiles pour mettre en place une approche biotechnologique visant à modifier génétiquement des plantes d’intérêt agronomique pour leur permettre de mieux résister à des hausses de la température. Nous allons aussi préciser les populations d’ARNm qui sont ciblées par ce mécanisme de dégradation. Ces informations, couplées à notre approche épigénomique, nous permettra de mieux comprendre les principes du ciblage des ARNm vers la dégradation et ainsi ouvrir la voie à l’ingénierie d’ARNm hétérologues qui seraient où non dégradés lors d’une augmentation de la température. Cette capacité d’adresser un ARNm recombinant particulier vers la dégradation en jouant uniquement sur la température de croissance de la plante est inédite et présente un fort potentiel d’utilisation technologique qui pourrait faire l’objet d’un brevet dans le cadre de ce projet. Nous saisirons toutes les opportunités permettant de faire connaître nos résultats auprès des entreprises de biotechnologies et des sélectionneurs et ce avant même la publication de nos travaux dans des journaux internationaux à comité de lecture. La possibilité de déposer un brevet sera systématiquement évaluée et les entreprises potentiellement intéressées contactées bien en amont de l’étape de publication. Ainsi, les résultats pouvant avoir des retombés économiques seront identifiés et un schéma d’exploitation pourra être mis en place rapidement. Ce projet permettra donc non seulement des avancées très significatives, sur la connaissance d’un nouveau mécanisme de thermotolérance chez les plantes et la mise en place de nouveaux outils innovants d’études des ARNm, mais il offrira de réelles possibilités de valorisation biotechnologique se basant sur les connaissances acquises au cours du projet.