



HAL
open science

Rôle de la protéine MtSNF4b dans la post maturation de graines de *Medicago truncatula*

William Bolingue

► **To cite this version:**

William Bolingue. Rôle de la protéine MtSNF4b dans la post maturation de graines de *Medicago truncatula*. Biologie végétale. Université d'Angers, 2009. Français. NNT: . tel-00459342v2

HAL Id: tel-00459342

<https://theses.hal.science/tel-00459342v2>

Submitted on 6 Apr 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

RÔLE DE LA PROTÉINE MtSNF4b
DANS LA POST MATURATION
DE GRAINES DE *MEDICAGO TRUNCATULA*

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de docteur de l'université d'Angers

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale

ECOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement le 10 Novembre 2009, à Angers

par : **William Bolingue**

Devant le jury ci-dessous :

Martin Crespi	Directeur de recherche, CNRS/ISV	Rapporteur
Philippe Grappin	Maître de conférence, AgroParisTech	Rapporteur
Dominique Job	Directeur de recherche, CNRS	Examineur
Philippe Simoneau	Professeur, Université d'Angers	Examineur

Directrice de thèse : **Julia Buitink**, Directeur de Recherche, INRA-Angers

Liste des publications

Hilhorst, H., Finch-Savage, WE, Leubner, G, Buitink, J, Bolingue W. (2009) Dormancy and resistance in harsh environments. In: Dormancy of Cells and Organisms, Topics in Current Genetics (series), Eds. E. Lubzens, J. Cerdà, M. Clark, in press

Bolingue, W., Rosnoblet, C., Ly Vu, B., Leprince, O., Aubry, C., Buitink, J. *MtSNF4b* connects after-ripening and constitutive biotic defense responses in seeds of *Medicago truncatula*, *The Plant Journal*, in press

Buitink, J., Bolingue, W., Ly Vu, B., Leprince, O. Physiological characterization of dormancy behaviour in seeds of the model legume *Medicago truncatula*. *Seed Science Research*, in press

Bolingue, W., Ly Vu, B., Lalanne, D., Buitink, J. Characterization of molecular and biochemical changes upon after-ripening in *M. truncatula* seeds. *En preparation pour Journal of Experimental Botany*

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier Olivier Leprince de m'avoir accueilli au sein de l'UMR de Physiologie Moléculaire des Semences, et Julia Buitink pour l'encadrement exigeant et engagé qu'elle m'a offert pendant ces trois années.

Merci à Messieurs Dominique Job, Martin Crespi, Philippe Grappin et Philippe Simoneau de m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de cette thèse.

Merci, à Marie-Agnès Jacques pour son accueil, son encadrement et ses relectures critiques du manuscrit et à Anne Darsonvale pour son aide technique précieuse.

Un grand merci également à ma famille : Martine, Jacky, Fanny, Pascaline, Ophélie, pour leur patience et leur amour durant cette thèse et les quelques années d'études qui l'ont précédée.

Merci Mathilde, pour tes relectures, ton soutien, et bien plus de choses encore, qui nécessiteraient sûrement une thèse entière pour être décrites clairement.

Comment ne pas remercier les équipes de l'UMR PMS :

MORE : merci Eric, merci Marie Laure pour votre expertise dans le domaine du double hybride bactérien. Merci à Anis, Laure, Elizabeth et Claudie pour les interactions sûrement trop rares que nous avons pu avoir.

EDGML : merci Caroline et Béatrice pour vos discussions, et merci aussi à toi Johann, bien que la course à pieds sur cailloux de nuit ne soit sûrement pas un sport homologué ;-). Reste comme tu es, c'est adorable!

TAS : merci David M., Marie Hélène, Françoise, Jérôme, Abdel, Nicole P., et Catherine pour les remarques, les aides, les situations (incrédibles), les cafés (désolé), les explications (en réunions), les appuis techniques et les enseignements respectifs. Merci à Pascale pour sa mauvaise fois et sa bonne humeur, à David L. pour son flegme et son humour. Merci à ma plus fidèle fan également, Virginie ! Mais à qui vais-je bien pouvoir raconter toutes mes bêtises maintenant ? Merci, à toi de m'avoir supporté dans l'humour, comme dans la détresse. Merci, Michaela, pour ton expérience, ton aide et surtout ton amitié dont je ne suis pas le seul à profiter avec un plaisir non dissimulé. Merci Emilie, de parfois réussir à te taire pendant plus de trente secondes... et je sais que c'est excessivement difficile pour toi ! Merci Céline, pour ton inertie au moment des repas et ces soirées fort sympathiques, voir mémorables, que tu nous as concoctés. Bien évidemment, merci Benoît pour tous ces moments passés à disséquer dans le vert le plus complet en racontant nos vies. Merci, également pour les boîtes de Petri que tu as nettoyé le 20 août dernier, et la misogynie dont tu fais preuve en permanence.

SECRETARIAT : Merci à Sylvie et Nicole C. qui m'ont fait dire de nouveau, après des années d'incompréhension, vive le secrétariat !

TECHNIQUE : Merci Edith pour ton sourire et Patrick pour ce truc bizarre indéfinissable qui te caractérise...peut-être un brin de folie.

Je tiens enfin à remercier les gens de passage qui ont compté et comptent encore pour certains, Paula, Sophie, Dimitri, pour l'image de grands frères que vous véhiculez. Cédric, dont je reste à toujours le fidèle Padawan.

Merci enfin à tous ceux que j'ai oubliés, « *Tout peut s'oublier, Qui s'enfuit déjà* ».

Table des matières

<i>Introduction : Données bibliographiques</i>	12
1. Biologie des semences.....	16
2. Perception et signalisation des sucres.....	56
3. Complexes kinases SNF1/AMPK/SnRK1	68
4. Objectifs de la thèse	100
<i>Chapitre 1 : Caractérisation physiologique et biochimique de la germination des semences RNAi MtSNF4b de M. truncatula.</i>	104
1.1 Caractérisation de la dormance chez <i>M. truncatula</i>	108
1.2 Dormance et balance acide abscissique /acide gibbérellique chez <i>M. truncatula</i>	112
1.3 Expression de la protéine MtSNF4b dans les graines.....	114
1.4 Rôle de MtSNF4b dans la dormance et la post maturation à sec	116
1.5 Sensibilité à l'ABA et au GA des mutants RNAi <i>MtSNF4b</i>	122
1.6 Teneur en sucres solubles en relation avec la dormance.	124
1.7 Rôle de MtSNF4b dans la signalisation des sucres.....	128
1.8 Discussion.....	130
<i>Chapitre 2 : Analyse transcriptomique des semences de M. truncatula RNAi MtSNF4b en relation avec la dormance et la germination</i>	144
2.1 Plan d'expérience et analyses statistiques.....	146
2.2 Gènes différentiellement exprimés entre les embryons de type sauvage et RNAi MtSNF4b après deux à trois semaines de PMS (analyse F).....	150
2.3 Gènes différentiellement exprimés entre les embryons RNAi et de type sauvage après six mois de PMS (analyse C)	160
2.4 Gènes différentiellement exprimés en relation avec la dormance dans les embryons de type sauvage (analyse D).....	162
2.5 Comparaison des différentes analyses.....	168
2.6 Caractérisation de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine en relation avec la dormance et MtSNF4b.....	172
2.7 Caractérisation de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine en relation avec la signalisation des sucres	176
2.8 Discussion.....	178
<i>Chapitre 3 : Impact de MtSNF4b sur la croissance de Xanthomonas dans les graines de M. truncatula</i>	194
3.1 Impact de l'extinction de MtSNF4b sur l'expression de MtPR10	198
3.1 Interaction entre <i>M. truncatula</i> cv. R108 et différentes souches de <i>Xanthomonas</i>	202
3.2 Impact de l'inoculation de souches de <i>Xanthomonas</i> sur la physiologie des semences de <i>M. truncatula</i>	204
3.3 Impact de l'extinction de MtSNF4b sur le développement de <i>Xanthomonas</i> dans les semences de <i>M. truncatula</i>	206

3.4 Discussion.....	212
<i>Chapitre 4 : Recherche des partenaires de MtSNF4b</i>	218
4.1 Etude de la fonctionnalité de MtSNF4b comme sous-unité activatrice du complexe SNF1	220
4.2 Caractérisation de l'interaction de MtSNF4b et MtSNF α 1 par double hybride bactérien	222
4.3 Identification des partenaires potentiels de MtSNF4b par double hybride.....	228
4.4 Discussion.....	232
<i>Discussion et perspectives</i>	242
1. Rôle de MtSNF4b dans la germination et la levée de la dormance	244
2. Rôle de MtSNF4b dans la perception et signalisation des sucres pendant la germination	248
3. Rôle de MtSNF4b dans la post maturation et le vieillissement.....	250
<i>Matériel et méthodes</i>	256
M1. Matériel végétal et conditions de cultures	258
M2. Extraction protéique et détection western blot.....	262
M3. Empreintes de tissus par western blot.....	264
M4. Isolement des ARN totaux et purification des ARN messagers	266
M5. Marquage Cys des cibles à hybrider, hybridation, et acquisition image.....	266
M6. Validation de la qualité de l'hybridation et analyse des données	270
M7. PCR et RT-qPCR en temps réel.....	270
M8. Clonage et Plasmides.....	272
M9. Complémentation des mutants Δ snf4 par MtSNF4b	274
M10. Double hybride bactérien	278
M11. Dosage des sucres	280
M12. Méthode d'inoculation et d'incubation des plantules et des semences	282
M13. Bioinformatique.....	284

Liste des figures

Figure 1 : Structure d'une graine de <i>M. truncatula</i> .	18
Figure 2 : Déroulement physiologique du développement chez <i>M. truncatula</i> .	18
Figure 3 : Modèle séquentiel de l'arrêt du développement dans les graines d' <i>A. thaliana</i> .	20
Figure 4 : Réseau de régulation des quatre régulateurs majeurs de la maturation et impact physiologique.	20
Figure 5 : Accumulation des réserves et principaux événements physiologiques des graines d' <i>A. thaliana</i> .	24
Figure 6 : Représentation triphasique de la germination	36
Figure 7 : Schéma de représentation des forces opposées contrôlant la germination.	38
Figure 8 : Régulation du potentiel de germination dans les graines matures d' <i>A. thaliana</i> imbibées.	40
Figure 9: Voies de signalisation des sucres chez <i>S. cerevisiae</i>	60
Figure 10 : Les trois voies de signalisation des sucres chez les plantes	64
Figure 11 : Alignement des séquences des différentes SNF1/AMPK/SnRK1 et de SnRK2/3.	72
Figure 12 : Structure des sous unités de SNF1	74
Figure 13 : Arbre phylogénique des sous classes de SNF4 chez les plantes	76
Figure 14: Régulation et rôle clef de SNF1 dans la signalisation des sucres chez <i>S. cerevisiae</i>	82
Figure 15 : Fonctions des SnRK1 chez les plantes, modèle de <i>A. thaliana</i>	92
Figure 1.1 : Effet de la PMS et du tégument sur la dormance des semences de <i>M. truncatula</i> .	108
Figure 1.2 : Effet de la lumière et de la stratification sur la dormance de <i>M. truncatula</i> .	108
Figure 1.3 : Effet de potentiel hydrique sur la germination des graines de <i>M. truncatula</i> .	110
Figure 1.4 : Sensibilité de la germination de <i>M. truncatula</i> à l'acide abscissique et à l'acide gibbérellique.	112
Figure 1.5 : Expression de la protéine MtSNF4b dans les différentes lignées de graines.	112
Figure 1.6 : Localisation <i>in situ</i> de la protéine MtSNF4b analysée par western blot d'une empreinte tissulaire.	114
Figure 1.7 : Expression de <i>MtSNF4b</i> en fonction de la post maturation et du potentiel hydrique.	114
Figure 1.8 : Effet de la post maturation sur la dormance des graines de RNAi <i>MtSNF4b</i> .	116
Figure 1.9 : Effet de la lumière sur la germination de semence de <i>M. truncatula</i> RNAi <i>MtSNF4b</i> .	118
Figure 1.10 : Effet combiné du stress hydrique et de la post maturation sur la dormance des graines RNAi <i>MtSNF4b</i> .	120
Figure 1.11: Effet de l'extinction de <i>MtSNF4b</i> sur la dormance embryonnaire à la lumière.	122
Figure 1.12 : Effet de l'ABA et du fluridone sur la dormance des semences RNAi <i>MtSNF4b</i> .	122
Figure 1.13 : Effet de l'acide gibbérellique et du paclobutrazol sur la T ₅₀ des graines de <i>M. truncatula</i> .	124
Figure 1.14 : Effet de la post maturation sur la teneur en sucres des graines RNAi <i>MtSNF4b</i> pendant l'imbibition.	126
Figure 1.15 : Nombre de molécules de sucres en lien avec l'état de dormance pendant l'imbibition.	128
Figure 1.16 : Signalisation des sucres dans la germination de <i>M. truncatula</i> .	128
Figure 1.17 : Germination de graines de type sauvage et RNAi <i>MtSNF4b</i> en présence de glucose, de mannose, de 3-O-méthylglucose et de glucosamine.	130
Figure 1.18 : Impact de MtSNF4b sur la T ₅₀ de graines dormantes imbibées dans le glucose et dans le mannose.	130
Figure 1.19 : Schéma du rôle de MtSNF4b dans la perception et la signalisation des sucres dans les graines dormantes de <i>M. truncatula</i> .	140
Figure 2.1 : Profils d'imbibition et de germination des graines utilisées dans les analyses par puces à ADNc.	146
Figure 2.2 : Schéma du plan d'expérience des analyses transcriptomiques par puces à ADNc.	148
Figure 2.3 : Comparaison de l'expression d'une <i>CCoAOMT</i> dans des embryons sauvages et mutants après deux semaines et six mois de post maturation à sec.	154
Figure 2.4 : Comparaison de l'expression d'une EDGP dans des embryons sauvages et mutants après deux semaines et six mois de post maturation à sec.	154
Figure 2.5 : Comparaison de l'expression d'un gène codant une <i>WRKY</i> dans des embryons de type sauvage et mutants au cours de la maturation et de l'imbibition.	156
Figure 2.6 : Comparaison de l'expression d'un gène codant une <i>sHSP18</i> dans des	

embryons de type sauvage et mutants au cours de la maturation et de l'imbibition.	156
Figure 2.7 : Diagramme de Venn représentant les gènes différentiellement exprimés dans les trois groupes de gènes.	168
Figure 2.8: Diagramme à plage de couleurs représentant les gènes codant des enzymes de la voie de biosynthèse de la médicarpine différentiellement exprimés entre les embryons de type sauvage et de lignées RNAi <i>MtSNF4b</i>	172
Figure 2.9 : Comparaison des expressions de quatre gènes codant des enzymes clés de la synthèse de la médicarpine dans des embryons de type sauvage et mutants après deux semaines de post maturation à sec.	174
Figure 2.10 : Comparaison des expressions de quatre gènes codant des enzymes clés de la synthèse de la médicarpine dans des embryons de type sauvage et mutants après six mois de post maturation à sec.	174
Figure 2.11 : Comparaison de quatre gènes codant des enzymes clés de la synthèse de la médicarpine dans des embryons imbibés après deux semaines et six mois de post maturation à sec.	176
Figure 2.12 : Cinétique d'expression de quatre gènes codant des enzymes clés de la synthèse de la médicarpine dans des embryons imbibés après deux semaines et six mois de post maturation à sec. ...	176
Figure 2.13 : Effet d'hexoses sur l'expression d'une PAL d'un CHR et d'une IFR.	178
Figure 2.14 : Comparaison de l'expression d'une PAL, d'une CHR et d'une IFR dans le type sauvage et deux lignées RNAi <i>MtSNF4b</i> dans du 3-OMG.	178
Figure 2.15 : Effet du glucosamine sur l'expression d'une PAL d'un CHR et d'une IFR dans une lignée de type sauvage et deux lignées RNAi <i>MtSNF4b</i>	180
Figure 3.1 : Schéma de classification des transcrits liés aux stress biotiques.	196
Figure 3.2 : Alignement protéique des protéines annotées PR10 dans l'analyse transcriptomique. ...	198
Figure 3.3 : Cinétique d'expression de <i>MtPR10-3</i> durant l'imbibition.	200
Figure 3.4 : Expression de la protéine MtPR10-1 pendant l'imbibition de graine de <i>M. truncatula</i>	200
Figure 3.5 : Symptômes sur feuilles de <i>M. truncatula</i> consécutifs à l'inoculation de deux souches de <i>Xanthomonas</i> en interaction compatible et en interaction incompatible.	204
Figure 3.6 : Effet de l'inoculation sur la germination et la mortalité des semences de <i>M. truncatula</i>	206
Figure 3.7 : Dynamique des tailles des populations de la flore totale (A) et de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (B) dans des semences de <i>M. truncatula</i>	206
Figure 3.8 : Dynamique des tailles des populations de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> CFBP 4834-R (Xap) inoculées dans des semences de <i>M. truncatula</i> à 20°C.	208
Figure 3.9 : Impact de la germination sur la dynamique des tailles des populations bactériennes à 20°C.	208
Figure 3.10 : Comparaison des dynamiques des tailles des populations bactériennes totales, de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> et de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> dans des semences de <i>M. truncatula</i>	210
Figure 3.11 : Comparaison des dynamiques des tailles des populations bactériennes totales de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> et de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> dans des semences de <i>M. truncatula</i>	210
Figure 4.1 : Alignement des protéines de la famille de PV42/MtSN4b/leSNF4.	220
Figure 4.2 : Complémentation de $\Delta snf4$ de levure par <i>MtSNF4b</i>	222
Figure 4.3 : Principe de la détection d'interaction protéines/protéines par double hybride bactérien. ...	222
Figure 4.4 : Expression de MtSNF4b fusionné à λ LC dans les bactéries reportrices.	224
Figure 4.5 : Test de self activation de MtSNF4b dans le système double hybride bactérien.	224
Figure 4.6 : Alignement de MtSNF α 1 avec SNF1 et AKIN10.	226
Figure 4.7 : Test de l'interaction entre MtSNF4b et MtSNF1 par double hybride.....	228
Figure D1 : Réseau de perception et de signalisation des sucres et de MtSNF4b dans les graines dormantes.	250
Figure D2 : Schéma de synthèse de l'impact de MtSNF4b sur la T ₅₀ au cours du temps pendant la maturation la post maturation et le vieillissement des graines de <i>M. truncatula</i>	252
Figure M1 : Analyse en composante principale des puces des analyses comparant le type sauvage aux lignées RNAi <i>MtSNF4b</i>	270
Figure M2 : procédure de sélection des gènes exprimés différentiellement.	207
Figure M3 : Vecteurs utilisés pour la complémentation et réaction LR.	272
Figure M4 : Cartes des plasmides utilisés lors des manipulations de double hybride.	274
Figure M5 : Isolement de la souche de <i>Xanthomonas</i> de type fuscans à partir de symptômes foliaires....	282

Liste des tableaux

Tableau 1 : Analogues de glucoses dans la signalisation des sucres.	64
Tableau 2.1 : Classification des gènes exprimés différemment dans l'analyse F.	152
Tableau 2.2 : Classification des gènes exprimés différemment dans l'analyse C.	160
Tableau 2.3 : Classification des gènes exprimés différemment dans l'analyse D.	162
Tableau 3.1 : Symptômes foliaires de plantules de <i>M. truncatula</i> cv. R108 inoculées avec différentes souches de <i>Xanthomonas</i> spp représentant différents pathovars.	202
Tableau 4.1 : Résultats de séquençage du criblage de la banque d'ADNc.	230
Tableau M1 : Listes des microorganismes utilisés dans les différentes manipulations.	258
Tableau M2 : Liste des amorces nucléotidiques utilisées dans les différentes manipulations.....	260
Tableau M3 : Composition du gel d'acrylamide.	262

Liste des annexes

Annexe 1 : Bolingue, W, Rosnoblet, C, Ly Vu, B., Leprince, O., Aubry, C., Buitink, J. (2009) MtSNF4b connects after-ripening and constitutive biotic defense responses in seeds of <i>Medicago truncatula</i>, soumis à The Plant Journal	
Annexe 2 : Données supplémentaires du chapitre 2 : Liste des gènes identifiés lors de l'analyse par puce à ADNc.	
Annexe 3 : Procédure de marquage et d'hybridation des puces à ADNc	

Liste des abréviations

3-OMG : 3-O-méthylglucose	HMGCoA : hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A
5'UTR : 5'-untranslated	HMGCoAR : hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase
AAC : acide-1-aminocyclopropane carboxylique	HR : réaction hypersensible
ABA : acide abscissique	HXK : hexokinase
ABR(17/18) : ABA responsive	HXT : hexose transporter
AC : anticorps	IFR : isoflavone réductase
ACC : acétyl-CoA carboxylase	IFS : isoflavone synthase
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire	IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
ADNg : acide désoxyribonucléique génomique	JAP : jours après pollinisation
ADP : adénosine diphosphate	KIS : kinase interacting sequence
AGPase : ADP glucose pyrophosphorylase	LEA : Late embryogenesis abundant protein
AIS : auto inhibitory sequence	LeMAN1, LeMAN2
AMPc : adénosine monophosphate cyclique	MAN : mannose
AMPK : Protéine kinase activée par l'AMP cyclique	MTGI : medicago truncatula gene index
ARN : acide ribonucléique	NR : nitrate réductase
ARNm : ARN messenger	PAL : phenylalanine ammonia lyase
ASC : Séquence d'association avec le complexe (association sequence complex)	PEG : polyethylene glycol
ATP : adénosine triphosphate	PFK-2 : Phosphofruktokinase 2
BSA : Albumine sérique bovine	PMS : post maturation à sec
CBS : Cystathionine- β -Synthétase	PR10 : Pathogenesis related protein 10
CFBP : collection française de bactéries phytopathogènes	PRL1 : Pléiotropique regulatory locus 1
CHS : Chalcone synthase	pv : pathovar
C-terminal : Carboxy-terminal	QTL : Quantitative trait loci
cv : cultivar	RBCS : Rubisco Small Subunit
Cy3/5 : cyanines	RFOs : sucres de la famille des raffinoses
Da : Dalton	RNAi : ARN interférence
DNase : Désoxyribonucléase	ROS : reactive oxygen species
dNTP : désoxynucléotides triphosphate	SCF : Skp1/Cullin/F-box complex
ECL : Chimiluminescence (electrogenerated chemiluminescence)	sHSP: small heat shock protein
EDGP : Extracellular dermal glycoprotein	SNF1: Sucrose non fermenting 1
ERF : ethylene response factor	SnRK1 : Sucrose non fermenting related kinase
EST : expressed sequence tag	SOD : superoxide dismutase
GA : acide gibbérellique	SUC : saccharose
GA3ox1 : acide gibbérellique oxydase 1	T ₅₀ : temps mis pour 50% de germination
GAL : galactose	T6P : tréhalose 6 phosphate
GAM : glucosamine	TC : tentative consensus
GDB : glycogen binding domain	Thr210 : thréonine 210
GLIP: graine legumes integrated project	TPP : thréalose-6-phosphate phosphatase
GLU : glucose	TPS : thréalose-6-phosphate synthase
GNIS: groupement national interprofessionnel des semences et plants	UDP : uridine diphosphate
GSH: glutathion	ufc : unité formant colonies
	Xap : <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv phaseoli
	Xcc : <i>Xanthomonas campestris</i> pv campestris
	XET : Xyloglucan endotransglucosylase

« Ce n'est pas le moindre charme d'une théorie que d'être réfutable. »

Friedrich Wilhelm Nietzsche (1886)

Introduction :
Données bibliographiques

L'espèce *Medicago truncatula* Gaertn. (*M. truncatula*) (luzerne) appartient à la famille des *Fabaceae*. Cette plante, originaire du croissant fertile est couramment utilisée comme plante fourragère permanente dans les zones subtropicales notamment, en Australie et aux Etats-Unis d'Amérique. La faible taille de son génome diploïde (450-520Mb), son autogamie et son temps de génération de graines à graines d'une dizaine de semaines, en fait une plante modèle pour l'étude des *Fabaceae* (Journet et al., 2001). De nombreuses espèces appartenant à ce genre représentent un intérêt agronomique (luzerne cultivée, pois, soja...). Bien qu'en Europe les *Fabaceae* cultivées n'occupent que trois pour cent des surfaces cultivées, elles représentent de 15 à 25 % d'entre elles dans le reste du monde (Source GNIS, 2005). L'intérêt agronomique de cette famille de plante est accru du fait de sa capacité à former des nodosités fixant l'azote de l'air. Cette caractéristique répond à la problématique croissante du coût et de l'impact environnemental de l'amendement azoté nécessaire à l'agriculture intensive (Source GLIP, 2006).

La plupart des espèces agronomiques est commercialisée sous forme de semences et la qualité germinative de ces dernières représente un enjeu important pour l'agriculture. Cette qualité germinative est liée à des caractéristiques intrinsèques des graines comme l'aptitude à la conservation ou la dormance. MtSNF4b est une protéine spécifiquement accumulée en fin de maturation dans les semences *Medicago truncatula* et son rôle dans la longévité et la vigueur germinative, précédemment mis en évidence, en fait un candidat intéressant en vue de l'amélioration de la qualité des semences. Pour autant de nombreuses interrogations subsistent au sujet de cette protéine et de son fonctionnement dans la graine. La caractérisation de son rôle peut donc donner des pistes pertinentes quant à son utilisation dans des programmes de sélection et d'amélioration des semences.

Dans cette introduction bibliographique nous nous attacherons dans un premier temps à rappeler les principales connaissances acquises sur la régulation de la maturation, de la dormance et de la germination des semences grâce aux données obtenues par l'étude de plantes modèles. Ensuite, nous nous attarderons sur la signalisation des sucres chez la levure et chez les plantes, à laquelle la protéine MtSNF4b est potentiellement liée. Enfin, nous terminerons cette partie introductive par une synthèse des connaissances acquises au sujet des protéines de la famille des Sucrose Non Fermenting (SNF1), un complexe kinase conservé, connu chez les plantes sous le nom de Sucrose nonfermenting-Related Kinase (SnRK1), dont MtSNF4b est une sous unité régulatrice putative.

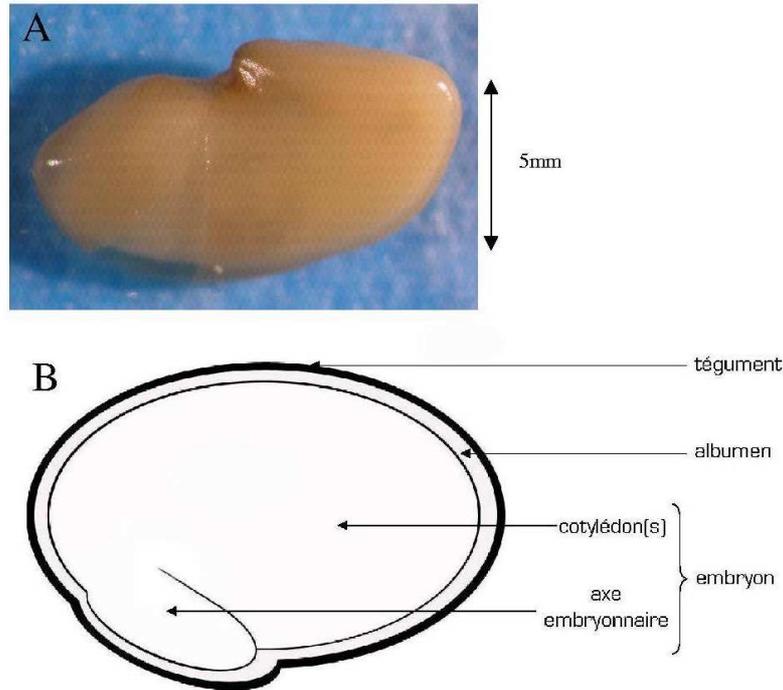


Figure 1 : Structure d'une graine de *M. truncatula* (A) Photographie d'une graine de *M. truncatula* imbibée 16 heures à 20°C. (B) Représentation schématique d'une graine de *M. truncatula*. Le schéma représente une coupe longitudinale dans le plan de symétrie d'une graine de *M. truncatula*.

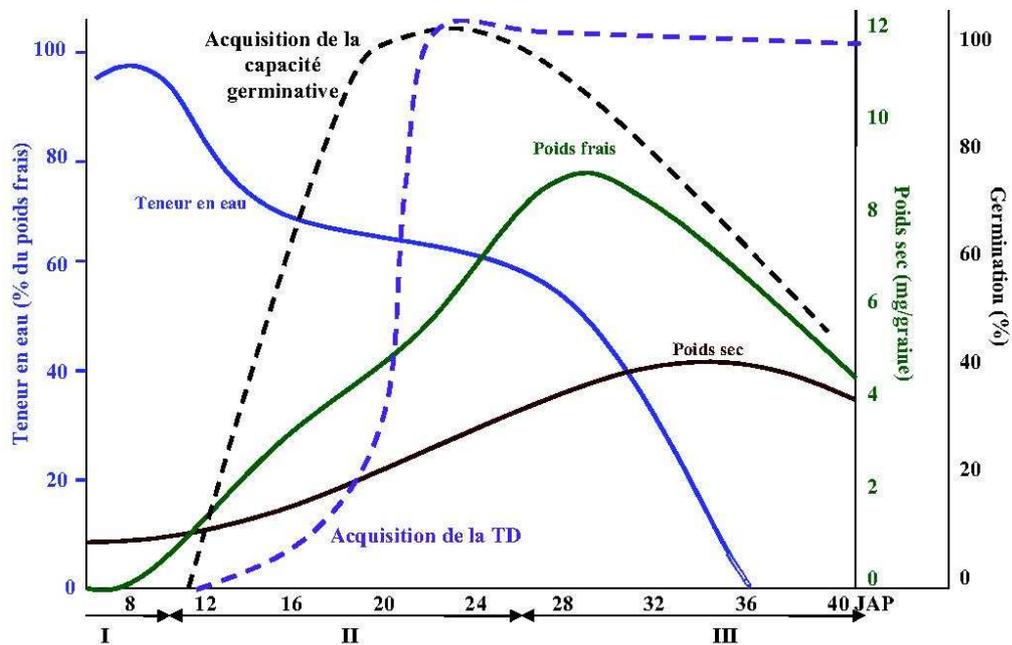


Figure 2 : Déroulement physiologique du développement chez *M. truncatula*. Le poids sec (marron), le poids frais (vert) et la teneur en eau (bleu) sont représentés au cours du développement. L'acquisition du pouvoir germinatif et de la tolérance à la dessiccation (TD) sont schématisés en pointillés (d'après Gallardo et al., 2003; Boudet et al., 2006). I : Histodifférenciation, organogenèse, morphogenèse. II : Acquisition de la capacité à germer et phase de remplissage. III : Dessiccation, acquisition de la dormance et de la vigueur, arrêt des activités cellulaires.

1. Biologie des semences

1.1 Développement de la graine

La graine, organe spécifique des spermaphytes est apparue il y a environ 380 millions d'années et constitue autant un avantage évolutif, qu'un passage obligatoire entre deux générations pour de nombreuses espèces. Une graine est constituée de plusieurs couches de cellules spécialisées se divisant et se différenciant en suivant un programme fortement régulé dans l'espace et dans le temps. Une graine mature d'angiosperme est schématiquement composée de trois couches de cellules principales (Fig. 1). La plus centrale est l'embryon diploïde issu de la fécondation de l'oosphère par une des deux cellules gamétophytiques mâles. La couche de cellules intermédiaire est l'albumen triploïde, issu de la fécondation du sac embryonnaire diploïde par la seconde cellule gamétophytique mâle. Enfin en périphérie, le tégument diploïde d'origine maternelle constitue généralement la barrière protégeant la graine du milieu extérieur.

La vie d'une graine de *Fabaceae* commence avec la double fécondation qui marque le début du développement et s'achève par la germination. Le développement est un processus biphasique, comprenant une étape de morphogénèse et une étape de maturation. La morphogénèse est l'étape suivant immédiatement la fécondation et ne concerne initialement que l'albumen et le tégument sous contrôle maternel (revue dans Weber et al., 2005). Elle se poursuit par une seconde phase de divisions cellulaires aboutissant au développement des différents organes de l'embryon zygote. A la fin de la morphogénèse, l'embryon est composé d'un axe embryonnaire et d'un ou deux cotylédons (Fig. 1). La maturation, à proprement parlé, commence une fois que l'embryon et l'albumen ont achevé leur morphogénèse (Wobus et al., 1999). Elle correspond au basculement du développement embryonnaire depuis un contrôle maternel vers un contrôle embryonnaire (Weber et al., 2005). Pendant cette étape, dans un premier temps le cycle cellulaire s'arrête et l'embryon subit une expansion cellulaire au détriment de l'albumen et accumule des réserves (Fig. 2). Il acquiert également la capacité à germer puis la tolérance à la dessiccation (Fig. 2). La seconde partie de la maturation d'une graine orthodoxe, *i.e.* supportant un séchage à l'air libre, s'achève lorsque les réserves ont été accumulées. Pendant cette phase, la teneur en eau diminue et la dormance primaire s'installe (revue dans Bewley et Black, 1994) (Fig. 2).

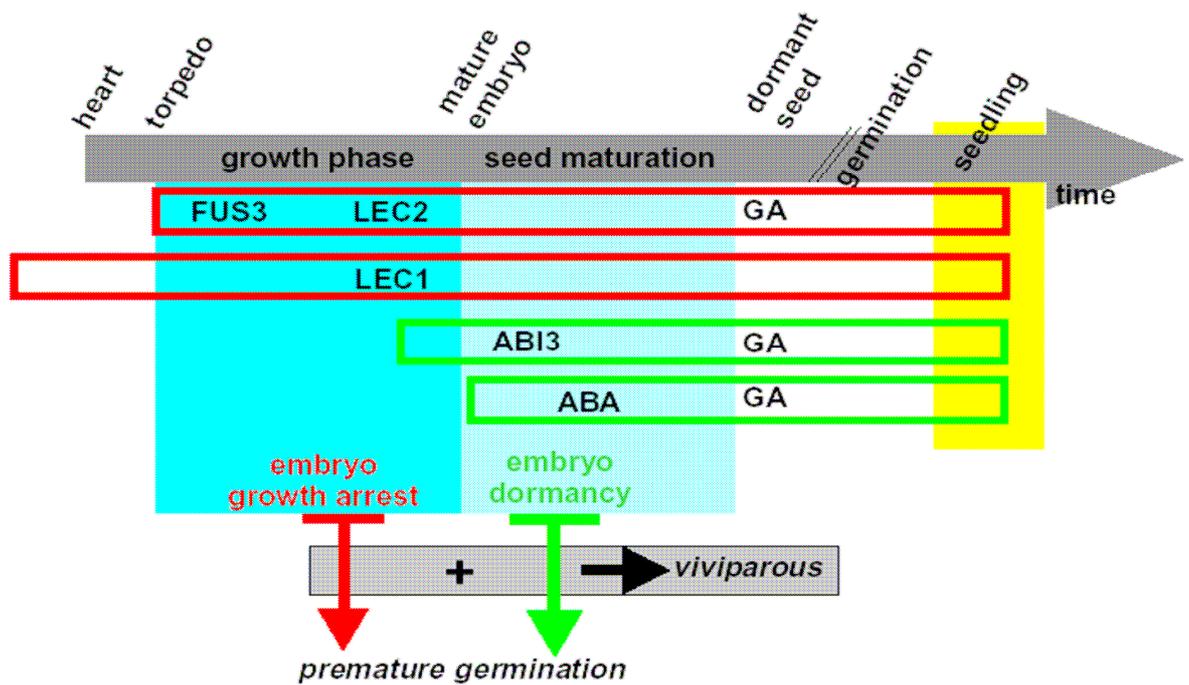


Figure 3 : Modèle séquentiel de l'arrêt du développement dans les graines d'*A. thaliana* (d'après Raz et al., 2001). Au cours de la phase de croissance de l'embryon, l'expression de FUS3, LEC1 et LEC2 provoque l'arrêt de la multiplication cellulaire. Au début de la phase de maturation, ABI3 inhibe la germination des semences sur la plante mère. Les encadrés et les flèches rouges et vertes indiquent l'expression et les fonctions des gènes.

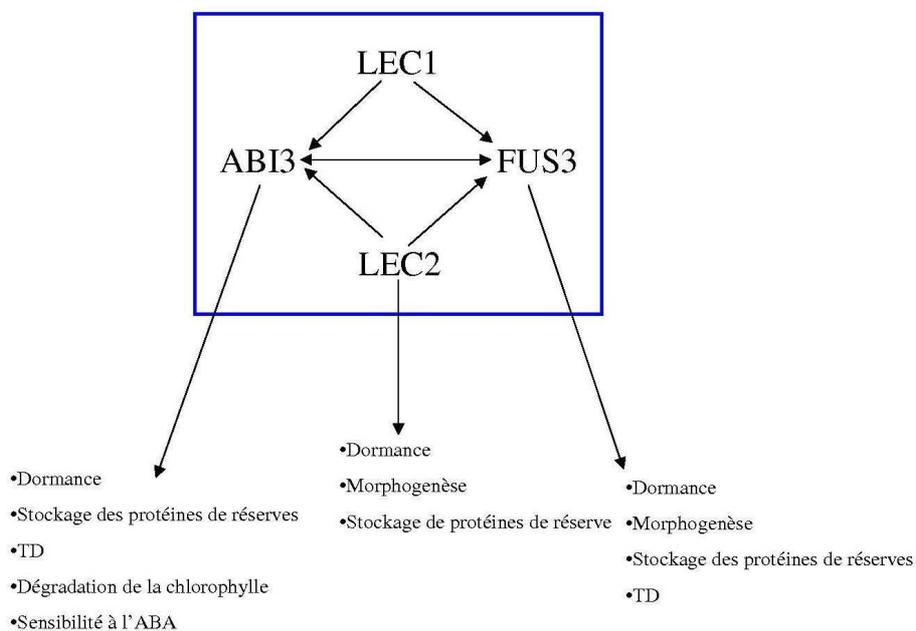


Figure 4 : Réseau de régulation des quatre régulateurs majeurs de la maturation et impact physiologique. TD, tolérance à la dessiccation (d'après Meinke et al., 1994; Wobus et Weber, 1999; Söderman et al., 2000; To et al., 2006).

1.1.1 Régulation du développement de la graine

Chez les plantes, certains gènes clefs de la morphogenèse et de la maturation ont pu être identifiés par l'analyse de mutants principalement de l'espèce modèle *A. thaliana*. On compte quatre régulateurs majeurs du développement des graines, agissant séquentiellement dans un réseau complexe de régulation ; Leafy Cotylédon (*LEC1*) et *LEC2*, ABA insensitive 3 (*ABI3*) , et *FUSCA3* (*FUS3*) (Keith et al., 1994, Koornneef et al., 1989; Meinke et al., 1992, 1994; Raz et al., 2001) (Fig. 3).

Les gènes *ABI3*, *FUS3* et *LEC2* codent des facteurs de transcription spécifiques des plantes contenant un domaine conservé VP1/ABI3 B3. *LEC1* code un facteur de transcription homologue à une sous-unité HAP3 liant le motif CCAAT (CBF) (Giraudat et al., 1992; Luerssen et al., 1998; Stone et al., 2001; Lotan et al., 1998). Dans des graines d'*A. thaliana*, les mutants pour ces gènes montrent des défauts pléiotropiques similaires, en plus de phénotypes plus spécifiques qui sont additifs dans les doubles mutants, suggérant que ces protéines appartiennent à des voies de signalisation parallèles se recouvrant partiellement (Santos-Mendoza et al., 2008). Les mutants *abi3*, et dans une moindre mesure *lec1*, montrent une sensibilité réduite à l'ABA (Parcy et al., 1997). Les quatre mutants montrent une dormance réduite et une réduction de l'accumulation de protéines de stockage au cours de la maturation des graines et (Raz et al., 2001) et une réduction des protéines de stockages spécifiques des graines (Guitierrez et al., 2007) (Fig. 4). *LEC1*, *LEC2* et *FUS3* jouent également un rôle pendant le développement. Les mutants *fus3*, *lec1* et dans une moindre mesure *lec2* ont des cotylédons qui présentent des caractéristiques foliaires (trichomes, systèmes vasculaires). *LEC1* est nécessaire aux phases précoces et tardives de l'embryogenèse et suffit à induire le développement embryonnaire d'une cellule végétative (Lotan et al., 1998). L'utilisation de mutants sur-exprimant *LEC2* a permis de montrer que ce gène confère des caractéristiques de maturation aux tissus végétatifs de plantules d'*A. thaliana* en induisant directement les gènes impliqués dans les processus de maturation (Braybrook et al., 2006). La plupart des gènes induits par *LEC2* sont liés aux réserves, comme des gènes codant des globulines 2S, 12S : des oléosines (Braybrook et al., 2006). Plus tard, durant le développement, les quatre gènes *LEC1*, *LEC2*, *FUS3* et *ABI3* jouent un rôle dans l'initiation et le déroulement de la maturation (Santos-Mendoza et al., 2008). Le mutant *abi3* montre une réduction de la dégradation de la chlorophylle dans les graines sèches et les mutants *abi3*, *fus3* et *lec1* sont intolérants à la dessiccation (Bäumlein et al., 1994; Keith et al., 1994; Meinke et al., 1994; Parcy et al., 1994;

Parcy et al., 1997; Luerssen *et al.*, 1998; Vicient *et al.*, 2000; Raz *et al.*, 2001; Stone *et al.*, 2001; Kroj *et al.*, 2003). Il a été démontré qu'ABI3, FUS3, LEC1 et LEC2 interagissent dans un réseau de contrôle de divers aspects du développement des graines dans des régions précises (Kagaya et al., 2005; To *et al.*, 2006; Kroj et al., 2003). L'analyse de l'expression d'ABI3 et de FUS3 dans divers mutants simples, doubles ou triples, a permis l'identification de liens entre les quatre gènes (To et al., 2006). Il a été montré que l'un des rôles majeurs de LEC2 est de sur-exprimer FUS3 et ABI3 dans des régions précises des cotylédons (Kroj et al., 2003). D'autre part, LEC1 régule positivement ABI3 et FUS3 dans les cotylédons (Kagaya et al., 2005; To *et al.*, 2006). Une mutation de LEC2 induit une importante diminution de l'expression d'ABI3 et de FUS3 pouvant être complétée par l'expression constitutive d'ABI3 ou de FUS3. De plus, ABI3 et FUS3 se régulent l'un l'autre positivement, permettant une expression soutenue et uniforme dans l'embryon (Fig. 4).

Récemment, d'autres facteurs tels que PICKLE et ABI5, de même que la signalisation hormonale (ABA, GA) et des sucres ont montré une interaction avec les quatre régulateurs maîtres (Santos-Mendoza et al., 2008). PICKLE est un facteur de remodelage de la chromatine agissant de concert avec l'acide gibbérellique dans la répression des traits embryonnaires tels que l'expression de LEC1, LEC2 et FUS3 dans les radicules pendant la germination (Ogas et al., 1999; Rider et al., 2003). De même PICKLE est nécessaire à la répression de l'expression d'ABI3 et d'ABI5 en réponse à l'ABA pendant la germination (Santos Mendoza et al., 2008). ABI5 est un facteur de transcription de type bZIP dont l'absence induit une diminution de la sensibilité à l'ABA et de l'expression de gènes en fin de maturation (Finkelstein et al., 2000). L'accumulation des transcrits et des protéines ABI5, leur état de phosphorylation, leur stabilité et leur activité sont fortement régulés par l'ABA pendant la germination et les phases précoces de la croissance de la plantule (Lopez-Molina et al., 2001 et Finkelstein et al., 2000). ABI5 interagit physiquement avec ABI3 par double hybride et se lie au promoteur d'*AtEm6*, une protéine LEA (Late Embryogenesis Abundant) (Nakamura et al., 2001). Le rôle d'ABI5 est lié à l'induction de la quiescence via l'ABA après la germination en cas de stress environnementaux (Lopez-Molina et al., 2001 et Finkelstein et al., 2000).

1.1.2 Accumulation des réserves

Les phases précoces et intermédiaires de la maturation sont sous contrôle de l'ABA initialement synthétisé par le tissu maternel puis, dans une moindre mesure par l'embryon et

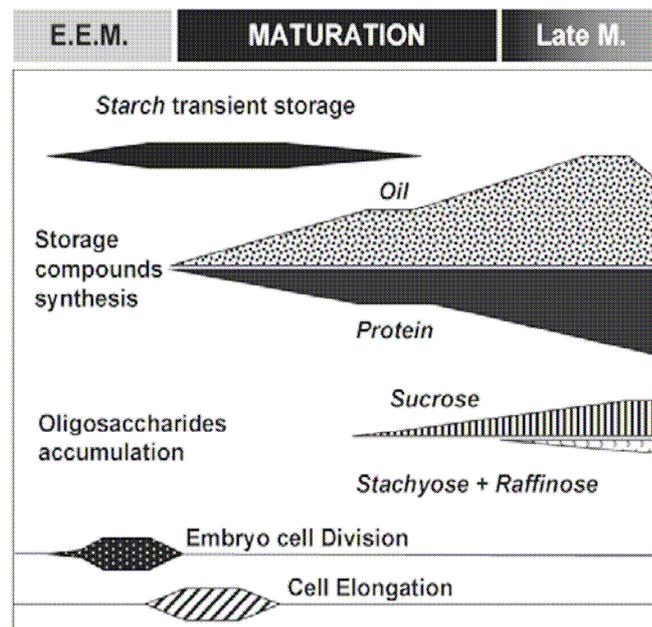


Figure 5 : Accumulation des réserves et principaux évènements physiologiques des graines d'*A. thaliana* (d'après Baud et al., 2002). L'abondance de différents composés de réserve est indiquée au cours de l'embryogenèse, la maturation et la fin de la maturation (E.E.M : early embryo morphogenesis).

l'albumen. C'est durant cette période que sont également synthétisées les principales protéines de réserves (Vicente-Carbajosa et al., 2005). Les graines accumulent des composés de réserve principalement sous forme de carbohydrates, de protéines et de lipides (souvent des triacylglycerols) (Baud et al., 2002). Ces réserves sont importantes à double titre. D'une part elles sont nécessaires à la germination et à la croissance de la plantule et d'autre part elles sont un élément majeur de l'alimentation humaine (Gallardo et al., 2003). Chez *A. thaliana*, la teneur en lipide et la masse de la graine sont faibles pendant la morphogenèse alors qu'une grande quantité d'amidon est accumulée transitoirement (Fig. 5). Pendant la maturation, la masse de la graine augmente, les lipides et protéines de stockage sont accumulés en grande quantité et représentent chacun 40% de la masse sèche (Baud et al., 2002) (Fig. 5). En fin de maturation la masse sèche de la graine reste constante alors que la teneur en eau diminue pendant que les quantités de saccharose, raffinose et stachyose augmentent (Baud et al., 2002) (Fig. 5).

Chez les légumineuses, la source de réserves majeures est protéique avec, selon les espèces et les génotypes, de 20 à plus de 40% de la masse sèche de la graine (Djemel et al., 2005). Le développement des graines de *M. truncatula* est relativement similaire à celui de la plupart des légumineuses. On note cependant la présence, dans la graine mature, d'un albumen qui disparaît au cours de la maturation dans la plupart des autres espèces de légumineuses cultivées (fèves, pois, haricots). Dans la graine mature, l'embryon représente entre 75 et 80% de la masse sèche, alors que l'albumen n'en représente que 10% et le tégument 10 à 15% (Djemel et al., 2005). Une graine de *M. truncatula* pèse en moyenne trois à quatre grammes selon les génotypes. Au cours des premières phases de l'embryogenèse et jusqu'au milieu de la maturation, une accumulation transitoire d'amidon a lieu dans le tégument et dans l'embryon, mais les graines matures de *M. truncatula* ne contiennent que très peu d'amidon (moins de 10 µg par mg de matière sèche dans l'embryon). Les réserves sont principalement protéiques avec environ 35% de la masse sèche. Viennent ensuite les acides gras (9%) et enfin les sucres solubles (7%) (Djemel et al., 2005; Rosnoblet et al., 2007). L'accumulation de protéines et d'acides gras s'effectue de façon constante au cours du développement et varie peu pendant la maturation. Les principales protéines trouvées dans les graines sèches de *M. truncatula* sont des légumines, des vicilines et des convicilines. De plus, leur accumulation est séquentielle, et ces protéines apparaissent respectivement 16, 14 et 18 jours après la pollinisation (Gallardo et al., 2003). En fin de maturation,

comme dans de nombreuses graines, des oligosaccharides de la famille du raffinose sont accumulés dans les semences de *M. truncatula* et plus particulièrement le stachyose, qui devient l'oligosaccharide le plus abondant dans les embryons matures (Djemel et al., 2005 ; Rosnoblet et al., 2007).

1.1.3 Tolérance à la dessiccation

Durant la maturation, les semences orthodoxes perdent progressivement leur eau (0,05 à 0,1g H₂O/g de matière sèche dans une graine mature) à la différence des graines récalcitrantes qui ne tolèrent pas une telle perte. Or l'eau est un élément fondamental à l'organisation cellulaire notamment celle des parois. Sans la mise en place de mécanismes complexes, la diminution de la teneur en eau est synonyme de mort cellulaire du fait de la dénaturation des protéines et de la fusion de membranes cellulaires (revue dans Walters et al., 2001). Cependant, certains organismes ont développé la capacité à survivre après un séchage à l'air libre : ils sont tolérants à la dessiccation et on les qualifie d'anhydrobiotes (Bewley, 1979 ; Leopold, 1986). Chez les végétaux, ce sont surtout les organes sexués, les spores, graines et pollens, qui possèdent cette aptitude (revue dans Leprince et al., 1993; Vertucci et Farrant, 1995). Certains tissus végétatifs sont également aptes à tolérer la dessiccation chez les plantes dites reviviscentes: *Craterostigma* ssp ou *Xerophyta* ssp (Gaff, 1971).

Les semences de *M. truncatula* acquièrent la tolérance à la dessiccation après 16 à 20 jours après pollinisation (Boudet et al., 2006) (Fig. 2). Elles perdent ensuite cette aptitude pendant l'imbibition, d'abord dans les radicules germées, puis dans les cotylédons (Buitink et al., 2003; Boudet et al., 2006). La tolérance peut cependant être ré-induite dans des radicules sensibles à la dessiccation au début de la post-germination par une exposition à un stress osmotique (Buitink et al., 2003, 2006). Une analyse microarray réalisée sur ces radicules montre qu'un grand nombre de gènes associés au métabolisme du carbone sont sur-exprimés pendant la ré-induction de la tolérance à la dessiccation. Les gènes sur-exprimés tardivement pendant la ré-induction de la tolérance à la dessiccation sont impliqués dans la fin de la maturation (Buitink et al., 2006). L'accumulation de sucres non réducteurs, de protéines LEA et une répression coordonnée du métabolisme semblent être les attributs essentiels et universels conférant la tolérance à la dessiccation (Buitink et al., 2002). Parmi les molécules jouant un rôle dans la tolérance à la dessiccation, les plus étudiées sont des LEA et des petites

protéines de stress thermiques (sHSP). On ne trouve ces dernières que dans les tissus végétatifs soumis à un stress. Dans les graines, elles s'accumulent en fin de maturation au cours de la déshydratation. Les protéines LEA forment une famille hétérogène de protéines thermosolubles et la plupart du temps fortement hydrophiles (Dure et al., 1989). Les protéines LEA sont également accumulées en réponse à divers stress abiotiques et à l'ABA (Kermode et al., 1990 ; Skriver et al., 1990 ; Ramanjulu et al., 2002). Elles joueraient un rôle dans la tolérance à la dessiccation et aux stress hydriques mais leurs fonctions dans ces phénomènes est mal connue (Ingram et Bartels, 1996; Kermode, 1997). Le rôle de ces protéines dans les mécanismes de protection et de tolérance à la dessiccation est mal connu. On leur attribue des rôles de chaperonnes, protégeant et limitant l'agrégation des protéines pendant le séchage, ou de pièges à ions (Dure et al., 1989; Dure, 1993, Close, 1996). Elles interviendraient également dans le maintien des liaisons hydrogènes avec les macromolécules et les membranes (Close et al., 1997 ; Hara et al., 2003). Elles pourraient également jouer un rôle dans la formation de l'état vitreux des graines sèches. Malgré ces résultats, les LEA ne sont pas suffisantes à la tolérance à la dessiccation puisqu'elles sont également retrouvées dans des graines récalcitrantes soumises à un stress hydrique (Kermode et al., 1997). Les sHSP sont des protéines inductibles par un stress thermique, spécifiques des plantes (Abernethy et al., 1989). Elles sont corrélées à l'augmentation de la teneur en ABA dans les graines au cours du développement (Wehmeyer et al., 2000). Leur expression coïncide également avec l'acquisition de la tolérance à la dessiccation (Almoguera et Jordano, 1992). Les sHSP sont de petites protéines de 15 à 42 kDa qui s'assemblent en oligomères d'une dizaine à une trentaine de sous-unités selon les protéines (Vierling, 1997). Les sHSP ont une activité de chaperonnes *in vitro* et *in vivo*. Il a été montré que l'HSP17.4 d'*A. thaliana* a un rôle similaire à la fin du développement des graines, prévenant l'agrégation irréversible de protéines pendant la dessiccation, ou assistant le repliement des protéines dénaturées pendant l'imbibition.

Les systèmes de protection contre le stress oxydatif du aux radicaux libres sont une importante composante des mécanismes de tolérance à la dessiccation (revue dans Buitink et al., 2002). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites par le métabolisme. Les mécanismes de protection contre les radicaux libres incluent la superoxyde dismutase (SOD qui catalyse la dismutation du superoxyde O_2^- en H_2O_2 et O_2) et les enzymes impliquées dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène (catalases, glutathion réductases et peroxydases). Plusieurs études ont montré un lien entre la tolérance aux stress oxydatifs induite par un déficit en eau et l'augmentation de la concentration en antioxydants chez les végétaux

photosynthétiques (Winston et al., 1990 ; Price et Hendry 1991). Chez la plante reviviscente *Craterostigma plantagineum*, un inhibiteur de la lipoxygénase (impliqué dans la production d'hydroperoxyde lipidique), s'accumule dans les feuilles en cours de séchage (Bianchi et al., 1992). De même, chez *C. wilmsii* et *C. viscosa*, l'activité de l'ascorbate peroxydase augmente pendant la déshydratation, alors que pendant la réhydratation l'activité de la SOD et de la glutathion réductase augmentent *in vitro* (Sherwin et Farrant et al., 1996). Malgré les différences d'activités observées *in vitro*, il est incertain que ces systèmes enzymatiques de protection soient actifs à des teneurs en eau réduites, lorsque le métabolisme est quasiment nul, dans les graines sèches par exemple (revue dans Vertucci et Farrant, 1995 ; Buitink et al., 2002). Dans des conditions de faibles teneurs en eau, les antioxydants peuvent jouer un rôle dans le contrôle du stress oxydant. La tolérance à la dessiccation du soja a été associée à l'accumulation de composés antioxydants lipidiques solubles (Senaratna et McKersie, 1986), bien que ce résultat ne soit pas retrouvé dans le maïs en cours de germination (Leprince et al., 1990). Les teneurs en ascorbate et en déhydroascorbate sont plus élevées dans les graines orthodoxes que dans les graines récalcitrantes (Tommasi et al., 1999). D'autres composés antioxydants ont potentiellement un rôle dans la tolérance à la dessiccation, comme les quinones, les polyols, les sucres et les métabolites secondaires (flavonoïdes).

1.1.4 Longévité

La longévité des semences est une des caractéristiques fondamentales des semences pour leur rôle dans la propagation d'une espèce et la préservation de la biodiversité. Dans certaines conditions extrêmes, des cas spectaculaires de longévité ont été observés par datation au carbone 14, jusqu'à 1700 ans pour les graines de *Phoenix dactylifera* (Sallon et al., 2008). La longévité est déterminée par des facteurs externes et internes aux semences. Les facteurs externes sont la température, l'humidité relative de l'environnement et l'oxygène. La cinétique de la détérioration dépend, entre autre, de la viscosité ou mobilité moléculaire du cytoplasme qui se transforme en état vitreux, formé par le cytoplasme dans les graines sèches quand la température et/ou la teneur en eau diminuent (Buitink et al., 2000a). Les études génétiques ont montré que la longévité est un caractère multigénique (Bentsink et al 2000, Clerckx et al 2004a). Une analyse QTL sur le riz a permis de mettre en évidence trois loci majeurs de contrôle de la longévité dont un, positionné sur le chromosome neuf, est en mesure d'expliquer 60 % de la variation observée (Miura et al., 2002). Des études

moléculaires indiquent que la détérioration des graines est provoquée par les radicaux libres, et que les mécanismes associés à la longévité sont liés à la protection et à la réparation des dommages causés par ces molécules destructrices. Effectivement, des mutants d'*Arabidopsis* déficients dans la production de tocophérol (vitamine E) ont une longévité réduite en raison d'une plus importante peroxydation des lipides pendant la germination (Sattler et al., 2004).

L'étude de mutants d'*A. thaliana* ayant des défauts tégumentaires de pigmentation ou de structure, montre une réduction de la germination après un stockage prolongé ou un vieillissement accéléré (Clerkx et al., 2004b). Parmi ces mutants, ceux à téguments transparents montrent des défauts d'accumulation des flavonoïdes (Lepiniec et al., 2006). Les flavonoïdes pourraient jouer un rôle dans la capture des ROS limitant le stress oxydatif mais également de barrière chimique contre les infections fongiques de part leur activité antimicrobienne (Hernandez et al., 2009). Des protéines liées aux défenses sont présentes dans le tégument telles que des polyphénols oxydases, des peroxydases et des chitinases (Pourcel et al., 2005 et 2007; Moïse et al., 2005). En plus du tégument, l'accumulation de composés aux propriétés antioxydantes dans l'embryon en fin de maturation peut contribuer à leur potentiel de stockage. Il a été suggéré que le ratio saccharose *versus* oligosaccharides de la famille des raffinoses est corrélé à la longévité (Brenac et al., 1997). Les oligosaccharides de la famille du raffinose (RFOs) comprennent le raffinose le stachyose et le verbascose. Ces sucres sont formés par l'ajout successif de molécules de galactinol à partir du saccharose. Mais la fonction des oligosaccharides dans la longévité n'a jamais été démontrée et de récentes études génétiques, physiologiques et biophysiques indiquent qu'il n'existe pas de lien direct entre l'effet protecteur des raffinoses et la survie des graines à l'état sec (Bentsink et al., 2000 ; Black et al., 1999, Buitink et al., 2000b).

L'accumulation de dommages macromoléculaires notamment de l'ADN et des protéines est considérée comme un mécanisme clef du vieillissement (Bertram et al., 2008). L'endommagement de l'ADN au cours du stockage des semences est connu depuis longtemps (Osborne et al., 1980) et des processus de réparation de l'ADN durant les premières phases de l'imbibition ont été observés, bien que les mécanismes sous jacents restent peu étudiés.

1.1.5 Dormance

La dormance est un état physiologique qui peut être observé dans la plupart des stades de développement de la vie d'une plante et être mis en place dans les graines, les bulbes, les tubercules, les bourgeons, ou la plante entière. La dormance s'installe dans les graines au cours de la maturation et décroît légèrement à la fin de celle-ci chez *M. truncatula* (Gallardo et al, 2003). Une graine dormante n'a pas la capacité de germer durant une période donnée sous n'importe quelle combinaison de facteurs environnementaux physiques suboptimaux (température, jour/nuit, etc.) qui sont autrement favorables à sa germination, *i.e.* lorsque la graine est devenue non dormante (revue dans Baskin et Baskin, 2004). La dormance a été acquise au cours de l'évolution de certains végétaux, permettant leur survie dans des environnements contraignants. Les dormances sont classées selon la morphologie de la graine d'une part et le moment où elle est acquise d'autre part. Lorsque la dormance est acquise avant la dissémination de la semence, on parle de dormance primaire. Lorsque la dormance est acquise pendant l'imbibition au contact de conditions peu ou pas propices à la germination, on parle de dormance secondaire (Baskin et Baskin, 2004). La dormance primaire peut être endogène ou exogène selon qu'elle trouve sa cause respectivement dans l'embryon lui-même ou dans les tissus qui l'entourent (en général albumen et tégument).

La dormance exogène est la conséquence d'une résistance physique, chimique ou mécanique des enveloppes entourant l'embryon. La dormance physique résulte en général de l'imperméabilité du tégument à l'eau et/ou à l'oxygène. Dans ce cas, le tégument nécessite une modification chimique ou mécanique (scarification) afin de permettre l'entrée de l'eau ou de l'oxygène dans l'embryon. La dormance exogène chimique fait intervenir des composés chimiques dérivant des graines, tels que les composés phénoliques ou l'ABA (Cohn et al., 1996). Ces composés chimiques n'ont pas uniquement un rôle dans l'inhibition de la germination mais également dans les stratégies de survie des semences. Il est envisageable que ces substances soient d'abord présentes pour éviter les infections pathogènes ou les prédatations.

La dormance endogène est elle-même subdivisée en deux groupes: la dormance morphologique résulte du fait que l'embryon n'a pas les organes nécessaires à sa germination

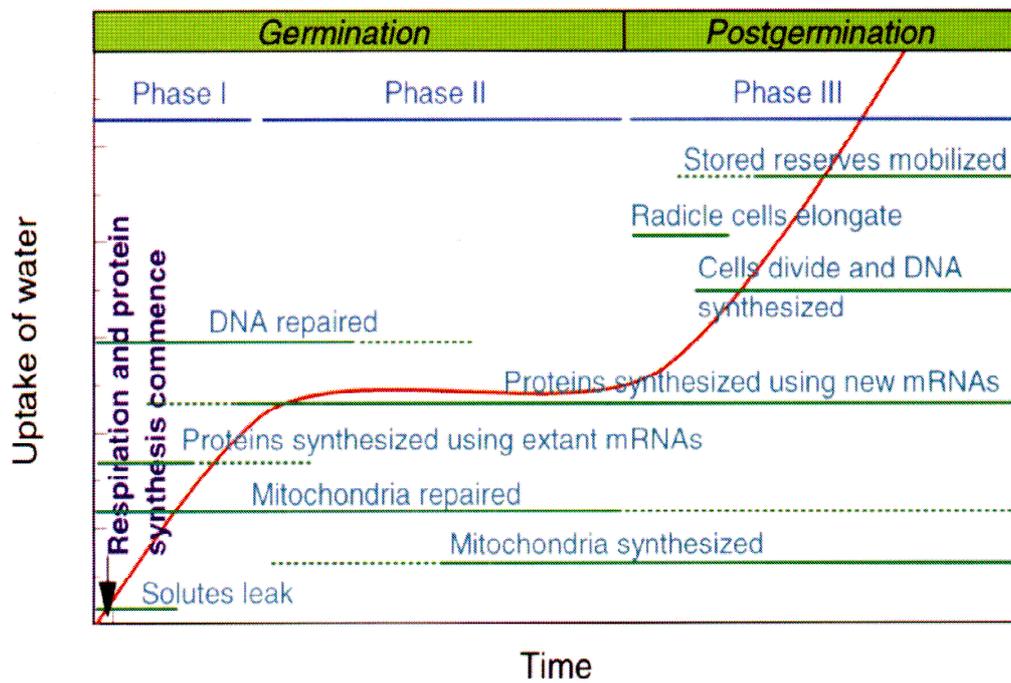


Figure 6 : Représentation triphasique de la germination (d'après Bewley, 1997). Les trois phases de la germination sont représentées en haut du graphique, les processus successifs sont représentés en vert et la teneur en eau est représentée en rouge.

et la dormance physiologique qui résulte d'un blocage réversible de la germination d'un embryon pourtant totalement développé. Le caractère réversible de la dormance endogène permet l'alternance de cycles de dormance des graines dans le sol suivant les changements de températures saisonniers (Hilhorst et al., 1996). La dormance secondaire découle directement de cette réversibilité et correspond au type de dormance observé après que les graines aient perdu leur dormance primaire une première fois (Kahn et al., 1980). La dormance secondaire peut être le résultat d'une inhibition prolongée de la germination. Cette inhibition peut être due à des facteurs actifs, comme la néosynthèse d'ABA endogène ou de métabolites secondaires, ou à des facteurs passifs tels que l'absence de conditions propices à la germination. Peu d'analyses sont disponibles concernant la dormance de *M. truncatula* et les observations antérieures laissent penser qu'elle peut être sous contrôle de plusieurs types de dormance. On parle alors de dormance combinatoire (Faria et al., 2005, Gallardo et al., 2006).

L'un des facteurs rendant la germination *sensus stricto* possible est la levée de la dormance. Les facteurs influençant ce phénomène font l'objet de la section suivante.

1.2 Levée de la dormance vers la germination

La germination inclut les événements ayant lieu depuis l'absorption d'eau par la graine sèche quiescente et jusqu'à la pénétration de la radicule au travers des enveloppes entourant l'embryon (Bewley et al., 1997). Les événements suivants, qui incluent la mobilisation des réserves majeures de la graine, sont associés à la croissance de la plantule ou post-germination.

L'absorption d'eau par les graines s'effectue en trois étapes. La première, d'absorption rapide d'eau (Phase I), est suivie par une étape de plateau (Phase II) (Fig 6). Une troisième étape, d'augmentation de la teneur en eau (Phase III), survient uniquement lorsque la germination est complétée par l'élongation de l'axe embryonnaire. Une graine dormante dont la germination n'est pas complète reste donc bloquée en phase II.

La première phase est accompagnée de perturbations temporaires structurelles des membranes et de la diffusion de molécules de petites tailles depuis la graines vers le milieu extérieur (sucres, ions...) (revue dans Vertucci and Farrant, 1995). Au cours de cette phase, la graine sèche quiescente retrouve rapidement son activité métabolique.

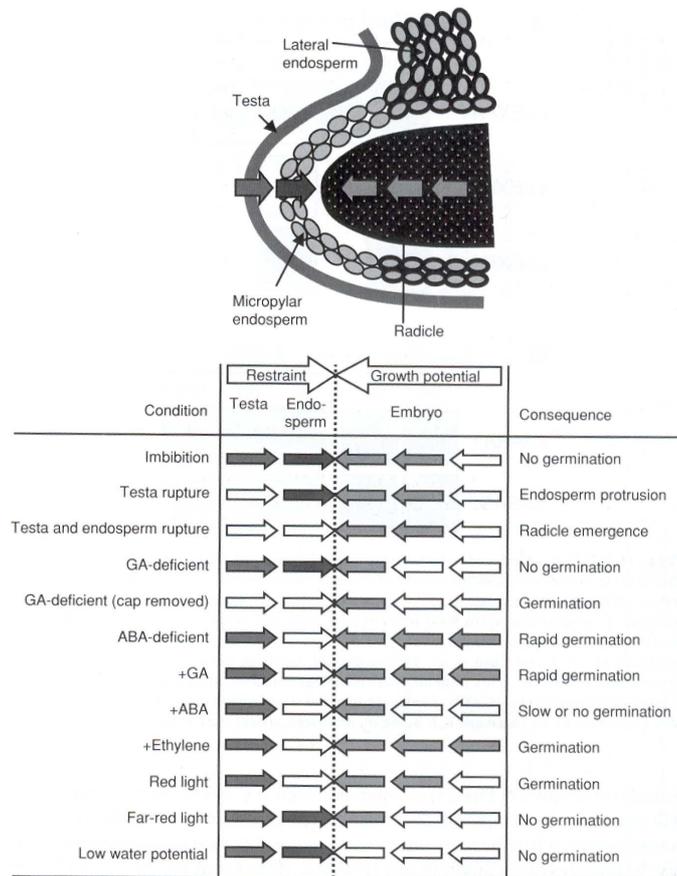


Figure 7 : Schéma de représentation des forces opposées contrôlant la germination (d'après Nonogaki et al., 2007). Pour compléter la germination, l'embryon doit rompre le tégument et l'albumen. Le tableau illustre comment différentes conditions environnementales et hormonales peuvent influencer le potentiel de croissance de l'embryon et la résistance des enveloppes.

Les structures et les enzymes nécessaires à l'initiation de la reprise du métabolisme seraient présentes dans la graine sèche et capables de survivre à la dessiccation survenant en fin de maturation.

Dans les premières minutes suivant le début de l'imbibition a lieu la reprise de l'activité respiratoire (Benamar et al., 2005). Les voies de la glycolyse et des pentoses phosphates sont initialisées pendant une deuxième phase et les enzymes du cycle de Krebs y sont actives (Nicolas et Aldasoro et al., 1979 ; Salon et al., 1988). Tous les composés nécessaires à la reprise de la synthèse de protéines au cours de l'imbibition sont présents dans les embryons secs (Bewley et al., 1997). La teneur en ribosomes libres diminue rapidement pendant la première phase de l'imbibition par rapport aux sous-unités recrutées dans des complexes polysomiaux de synthèse protéique (Bewley et al., 1997). Ces ribosomes préexistant ainsi que des ARNm préformés sont présents dans les embryons secs, sont utilisés par la graine pour une néo-synthèse précoce de protéines. Une nouvelle synthèse d'ARNm reprend rapidement pendant l'imbibition mais l'inhibition de la synthèse de ces ARNm n'empêche cependant pas l'achèvement de la germination (Nakabayashi et al., 2005 ; Rajjou et al., 2004) impliquant que les ARNm néo-synthétisés ne sont pas indispensables à la germination (Fig. 6). Une phase de synthèse d'ADN a lieu rapidement après le début de l'imbibition et correspond probablement à une réparation de l'ADN endommagé pendant la déshydratation et l'imbibition. Une seconde phase de synthèse d'ADN, associée à la division cellulaire post-germinative, a lieu à la fin de la phase II d'imbibition. La troisième phase précède immédiatement une reprise de l'absorption d'eau aboutissant à la percée de la radicule au travers des couches sus-jacentes (Schopfer et Plachy, 1984; Manz et al., 2005) (Fig. 6).

Les facteurs et voies de régulation impliqués dans le maintien et la levée de la dormance sont illustrés dans la Figure 8. Un facteur déterminant dans la germination est à la balance entre la pression de turgescence au niveau de la pointe de la radicule et la résistance mécanique opposée par l'albumen et/ou le tégument (Fig. 7) (Groot et Karssen, 1987, pour revue Nonogaki et al., 2007). La pression de turgescence de l'embryon sur les téguments dépend de l'entrée d'eau dans celui-ci. La disponibilité en eau du milieu extérieur est donc un facteur limitant la pression de turgescence de la radicule. Le potentiel hydrique du milieu (Ψ) est donc un des facteurs contrôlant la dormance et la germination pendant l'imbibition

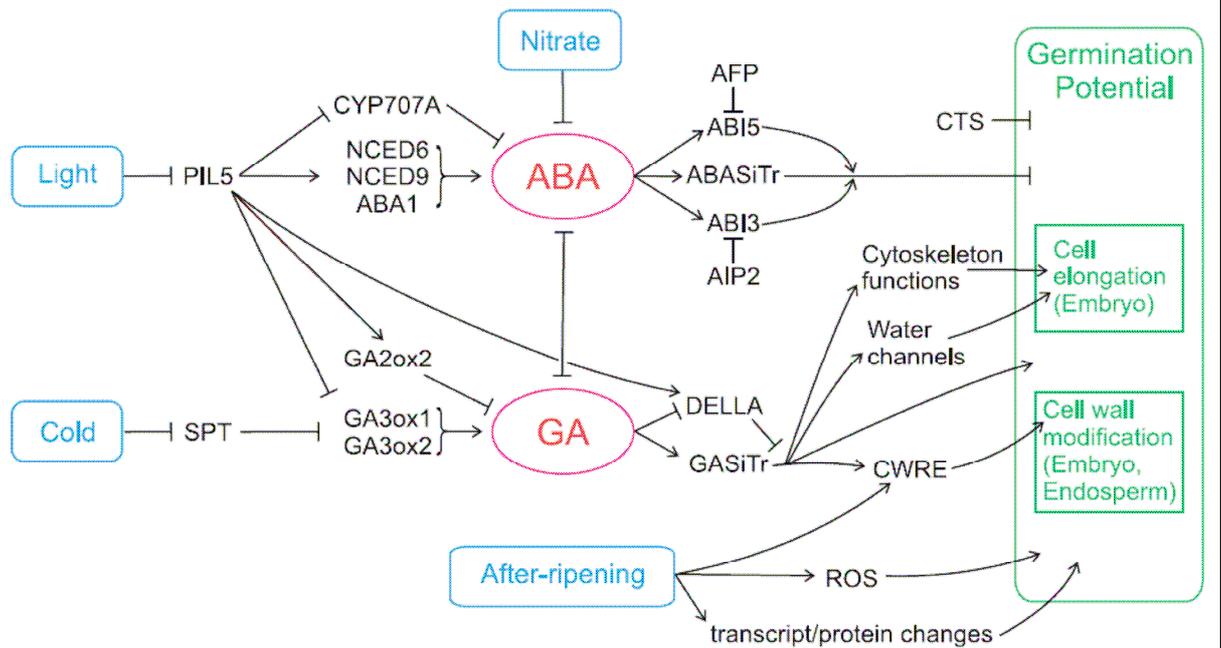


Figure 8 : Régulation du potentiel de germination dans les graines matures d'*A. thaliana* imbibées. (D'après Holdsworth et al., 2008). Les facteurs influençant la germination sont représentés en bleus, le potentiel de germination est représenté en vert, les hormones ABA et GA sont représentés en rouge. Les flèches signifient une induction et les barres une répression. (ABASiTr : transduction du signal ABA ; CWRE : enzyme de remodelage de la paroi ; GASiTr : transduction du signal GA ; ROS : espèces réactives de l'oxygène).

(Ni et al., 1992, revue dans Holdsworth et al., 2008). Comme l'application d'acide abscissique, l'augmentation du Ψ inhibe la germination des graines de nombreuses espèces (Schopfer et Plachy et al., 1985 (*Brassica napus* L.) ; Welbaum et al., 1990 (*Cucumis melo* L.)). On considère généralement trois mécanismes pouvant expliquer cette extension. La première serait liée à la diminution du potentiel osmotique dans la radicule (ψ_{π}) du fait d'une augmentation des solutés par une hydrolyse des réserves polymériques présentes dans la radicule elle-même. La diminution du ψ_{π} induirait une augmentation de la teneur en eau donc de la turgescence résultant en la croissance de la radicule. Cependant, les études réalisées n'indiquent pas de relation directe entre la diminution du ψ_{π} et la germination (Welbaum et Bradford, 1990). Dans cette manipulation, la différence entre le potentiel osmotique de la radicule et le potentiel du milieu est mesurée et comparée à la germination de graines de *C. melo*. Aucune différence n'est détectée entre les graines germant et celles ne germant pas, indiquant que la germination n'est pas directement contrôlée par la pression de la radicule. La seconde possibilité est de considérer que l'extensibilité des cellules de la radicule permet son élongation (Fig. 8).

Les mécanismes permettant l'élongation des cellules de la radicule, et plus généralement des parois primaires, sont inconnus (Hu et al., 2006). L'affaiblissement des parois cellulaires peut résulter du clivage entre les xyloglucanes et les fibres de celluloses permettant l'expansion de ces dernières (Bagatharia et Chanda, 1998). Chez les angiospermes les xyloglucanes endotransglucosylase (XET) / hydrolase (XTH) sont impliquées dans la réorganisation de la paroi pendant la croissance et le développement (Van Sandt et al., 2006) (Fig. 8). L'activité de la xyloglucane endotransglycosylase augmente dans la région apicale des racines de plantules de *Z. mays* pendant leur élongation (Wu et al., 1994). Les expansines font également office de candidats dans l'affaiblissement des parois cellulaires de par leur capacité à rompre les liaisons hydrogènes entre les polymères de la paroi. Les expansines ont montré un rôle important dans l'élongation de l'hypocotyle (McQueen-Mason and Cosgrove, 1995). La troisième possibilité implique les tissus d'enveloppe couvrant la coiffe de la radicule qui, en se rompant, permettant son l'élongation. Chez *N. plumbiginifolia*, *L. sativa* ou *L. esculentum*, c'est l'albumen qui impose une contrainte suffisante à l'inhibition de la croissance de la radicule. Dans de nombreuses espèces, une diminution de la résistance de

l'albumen est observée avant l'émergence de la radicule. C'est le cas pour le piment (Watkins et Cantliffe, 1983), le melon (Welbaum et al., 1995), ou le tabac (Leubner-Metzger et al., 2005). Des hydrolases pariétales telles que des β -mannanases et des β -glucosidases sont impliquées dans la diminution de la résistance de l'albumen sous contrôle du GA et de l'ABA (Müller et al., 2006). Les gènes surexprimés dans les graines non dormantes vis-à-vis des graines dormantes de *A. thaliana* sont associés à des processus de modification de la paroi. Ils codent des expansines, des β galactosidases, des endo-xyloglucanes ou des pectinestérases (Cadman et al., 2006). L'expression de gènes codant des endo- β -mannanases, des α -galactosidases et des β -mannosidases est également associée à la germination via l'hydrolyse de mannanes et d'hemicelluloses présents dans l'albumen (revue dans Nonogaki et al., 2007). Deux gènes codant des endo- β -mannanases ont été isolés à partir de graines de tomate en cours de germination, *LeMAN1* et *LeMAN2* (Bewley et al., 1997 ; Nonogaki et al., 2000). L'expression de *LeMAN2* est spécifique de l'albumen micropylaire et intervient avant la germination des graines de tomate alors que *LeMAN1* est plutôt exprimé dans l'albumen latéral après la germination (Nonogaki et al., 2000). Chez *A. thaliana*, des mutants à téguments transparents (tt), mutés sur des gènes du métabolisme secondaire, montrent un tégument moins épais et sont également moins dormants que les graines des lignées de type sauvage dont ils dérivent (Debeaujon et al., 2000).

1.2.1 Facteurs influençant la levée de la dormance

Post maturation à sec

Les graines de nombreuses espèces nécessitent une période de stockage afin de lever leur dormance. La post maturation à sec (PMS), qui consiste en la préservation de graines matures à température et humidité relative ambiantes, résulte dans la levée de la dormance (Bewley et al., 1997 ; Leubner-Metzger et al., 2002 ; Kucera et al., 2005 ; Finch-Savage et Leubner, 2006 ; Faria *et al.*, 2005). La vitesse de la PMS dépend de nombreux facteurs environnementaux tels que la température et l'humidité relative. Elle peut être interprétée à l'échelle écologique comme correspondant au passage d'un été sec, du type de celui des

climats méditerranéens, peu propice à la germination. La PMS conduit à une plus large gamme de températures de germination, une diminution de la sensibilité et de la teneur en ABA, une augmentation de la sensibilité aux GA₃, une altération des besoins en nitrate, une moins grande sensibilité aux conditions sub-optimales de germination et une augmentation de la vigueur germinative (revue dans Hilhorst, 2007). Les processus impliqués dans la PMS sont encore mal connus mais certains paramètres ont été identifiés comme agissant sur ce phénomène comme la teneur en eau et en lipides, la structure des enveloppes et la température (Manz et al., 2005). La PMS est retardée dans les graines très sèches et requiert une teneur en eau seuil. Elle est également empêchée lors d'une conservation à un trop fort taux d'humidité. Les taux d'humidités optimum de post maturation sont dépendants de l'espèce et on été caractérisés chez certaines d'entre elles (Probert, 2000; Hay et al., 2003; Steadman et al., 2003; Leubner-Metzger, 2005). L'hypothèse d'un lien causal entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au cours de la PMS et la diminution de dormance a été proposée (Oracz et al., 2007) (Fig. 8). L'analyse sur gel à deux dimensions de l'abondance des protéines et du statut oxydatif indique que les ROS causent la carbonylation d'un groupe spécifique de protéines (Oracz et al., 2007). L'oxydation spécifique de protéines impliquées dans la levée de la dormance peut modifier leur fonctionnement, agissant ainsi sur la dormance. La PMS réduit le potentiel hydrique de base des graines de *C. melo* (Welbaum et al., 1991). Cette induction favorise donc la germination du fait de la moins grande pression de turgescence que la radicule doit imposer au tégument pour le percer.

La régulation de la PMS a été dévoilée partiellement par une approche complémentaire destinée à définir les gènes régulés par la post maturation proprement dite (Carrera et al., 2008). Les changements d'expressions de gènes ont été analysés dans des graines de mutants *abil* et *abal*, non dormantes, et ont été comparés à ceux observés dans des graines de type sauvage avant et après PMS (Fig. 8). Les résultats obtenus indiquent que la PMS agit sur des voies distinctes de celles de la dormance. La PMS a été impliquée dans la diminution de l'expression de *ABAI* (associé à la synthèse d'ABA) et à l'augmentation de *LPP2* (Lipid Phosphate Phosphatase 2), une phosphatase associée à la diminution de sensibilité à l'ABA (Katagiri et al., 2005). L'application d'ABA exogène sur des graines après PMS bloque la germination mais ne ré-induit pas l'expression du génome observée dans les graines fraîches dormantes. De plus les mutants *abil* et *abal* qui montrent des changements d'expression du génome caractéristiques de la PMS indépendamment du phénotype de dormance. Ces deux observations amènent à penser que l'ABA n'est pas le régulateur majeur de la PMS.

Température

La température est, avec le potentiel osmotique du milieu, l'un des facteurs majeurs de contrôle de la germination chez *A. thaliana* (Fig. 7, 8). Sur le plan écologique, l'effet de la température sur la germination serait modulé par la teneur en eau du sol. Au champ, la germination se produit lorsque les conditions de températures sont favorables. Plus les graines sont dormantes, plus ces conditions sont restreintes (revue dans Finch-Savage et Leubner, 2006). En plus de cet impact de la température sur la germination, il est connu depuis des siècles que pour de nombreuses espèces, la stratification, qui consiste en l'imbibition des semences à basse température, a pour conséquence de lever la dormance (revue dans Baskin et Baskin, 1985). A la différence de la PMS, la stratification nécessite que les graines soient partiellement imbibées en présence d'oxygène (revue dans Bewley et Black, 1994). La température optimum nécessaire à la levée de la dormance par stratification est généralement comprise entre un et cinq degrés Celsius (Roberts et Smith, 1977). L'effet de cette exposition à de faibles températures sur les teneurs en ABA dans les graines imbibées a été analysé (Le Page-Degivry et al., 1997 ; Ali-Rachedi et al., 2004). Il ressort de ces études que la teneur en ABA reste la même dans les semences durant l'imbibition à basse température et que ce n'est qu'après transfert des semences à des températures optimales de germination que l'on observe une diminution de la teneur en ABA.

Lumière

L'exposition à la lumière de graines de nombreuses espèces stimule la germination, par l'intermédiaire de photorécepteurs, généralement de la famille des phytochromes. On parle de germination photoblastique positive (revue dans Allen et al., 2007). Les phytochromes montrent deux formes photoconvertibles en fonction de la qualité de la lumière. Pfr est la forme active qui absorbe la lumière à 730nm (rouge lointain (FR)) alors que P est la forme inactive qui absorbe la lumière à 660nm (rouge (R)). Exposer les graines à une lumière avec un fort ratio R/FR induit une augmentation du ratio Pfr/P, ce qui a pour conséquence de stimuler la germination. L'étude de mutants simples, doubles ou triples pour les phytochromes de A à E a permis de démontrer que seuls les phytochromes B, D et E sont requis à la régulation photoréversible de la dormance par la lumière (Casal et Sanchès, 1998 ;

Hennig et al., 2002). Chez certaines espèces telles que *Bromus sterilis* ou *Avena fatua* la lumière montre un impact négatif sur la germination qui est alors qualifiée de photoblastique négative (Hilton et al., 1984 ; Hou et al., 1992).

Nitrate

Le nitrate est un signal environnemental jouant un rôle dans le contrôle de la dormance des semences (Fig. 8). L'étude détaillée de la réponse germinative en fonction de la dose de nitrate de graines de *S. officinale* a permis d'émettre l'hypothèse de la médiation ambivalente du signal nitrate par des récepteurs à faible et à forte affinité au nitrate (Hilhorst et al., 1990). La double réponse observée, en fonction de la quantité de nitrate du milieu, permet de supposer l'existence d'un système à haute affinité dans des conditions de faibles teneurs en nitrate bloquant la germination, et d'un système à basse affinité dans des conditions de fortes teneur en nitrate stimulant la germination (Hilhorst et al., 1990). Récemment, le mutant *chl1-5* d'*A. thaliana*, dont un transporteur de nitrate à haute et basse affinité est muté (*NTR1-1*), germe dans des conditions de fortes teneurs en nitrate mais pas dans des conditions de faibles teneurs en nitrate (Alboresi et al., 2005). Ce phénotype semble indiquer que ce récepteur est impliqué dans la double réponse au nitrate pendant la germination. Une analyse transcriptomique a permis de suivre l'expression de gènes en lien avec l'état de dormance et les facteurs environnementaux l'influençant tels que la température, le nitrate et la lumière au cours de l'imbibition, chez *A. thaliana* (Finch-Savage et al., 2007). Cette analyse montre que l'expression des transcrits liés à l'ABA décroît en même temps que la levée de la dormance pendant que l'expression des gènes associés à l'accumulation et à la réduction des nitrates augmente.

1.2.2 Rôle des hormones dans la dormance et la germination

Acide abscissique

L'acide abscissique (ABA) joue un rôle prépondérant dans le contrôle de la maturation, régulant positivement la mise en place de la dormance et de l'accumulation des réserves ainsi que l'acquisition de la tolérance à la dessiccation (revue dans Braybrook et al., 2008). Mais l'ABA joue également un rôle pendant la germination dans le maintien de la dormance (Fig. 8). Une néo-synthèse d'ABA en corrélation avec la dormance a été démontrée chez *A. thaliana* (Ali-Rachedi et al., 2004) et chez *N. plumbaginifolia* (Grappin et al., 2000). Cette néo-synthèse n'est pas retrouvée chez les graines ayant été soumises à une PMS avant l'imbibition, ce qui a été interprété comme un mécanisme de maintien de la dormance (Grappin et al., 2000). On note une distinction entre l'ABA endogène de l'embryon et l'ABA maternel ou appliqué sur l'embryon au cours du développement. Le profil protéique d'une graine dormante diffère de celui d'une graine imbibée après PMS (Chibany et al., 2006). Pourtant, comme à l'échelle transcriptomique, l'application d'ABA sur des graines après PMS ne permet pas de retrouver un protéome équivalent à celui d'une graine dormante. L'application d'ABA inhibe donc la germination par une voie indépendante de celle de la dormance. En effet, d'autres études ont montré que l'ABA exogène n'induit pas la dormance des embryons mais peut avoir d'autres fonctions, comme l'inhibition de la croissance de l'embryon (Frey et al., 2004 ; Homrichhausen et al., 2003).

Une analyse transcriptomique récente comparant des graines dormantes et non dormantes d'*A. thaliana* apporte une preuve supplémentaire d'un lien entre la biosynthèse d'ABA et l'état de dormance (Cadman et al., 2006). Les mutations des gènes codant des enzymes impliquées dans la synthèse d'ABA mènent à une diminution de la dormance alors que la sur-expression de gènes impliqués dans la synthèse de l'ABA endogène (*ABA1*, *ABA2*, *ABA3* des zeaxantines epoxydases, *NCED*, une 9-cis-epoxycarotenoïde dioxygénase) mène à une augmentation de la quantité d'ABA et de la dormance ou du délai de germination (revue dans Kucera et al., 2005) (Fig. 8). Au contraire, les mutants déficients en ABA montrent une

dormance nulle ou réduite (Marin et al., 1996). Le catabolisme de l'ABA est associé dans de nombreuses espèces à la levée de la dormance. Chez *A. thaliana*, la mutation du gène codant une ABA 8' hydroxylase résulte ainsi en une teneur en ABA augmentée dans les graines sèches dont la dormance est également accrue (Kushiro et al., 2004).

La sensibilité à l'ABA est également un élément majeur de la levée de la dormance. Les graines non dormantes sont moins sensibles à l'ABA que les graines dormantes (Schmitz et al., 2000). De nombreux gènes ont été mis en évidence pour leur rôle dans la perception de l'ABA grâce à l'utilisation de mutants et de sur-expresseurs. C'est le cas des gènes codant des phosphatases 2C (*ABI1*) dont le mutant *abi1* montre une réduction de la sensibilité à l'ABA et une dormance réduite (Leung et al., 1994 ; Beaudoin et al., 2000) (Fig. 8). D'autres mutants montrent une dormance et une sensibilité à l'ABA plus marquées: c'est le cas du mutant *eral1*, dont le gène, *ERAI*, code une sous-unité β d'une farnesyl-transférase (Cutler et al., 1996).

En plus de son rôle dans le maintien de la dormance, l'ABA joue également un rôle dans la signalisation du stress et des sucres. D'autres mutations sur des gènes impliqués dans la sensibilité à l'ABA n'ont pas d'effet sur la dormance, c'est le cas d'*ABI4* et *ABI5* qui codent deux facteurs de transcription dont les mutants *abi4* et *abi5* montrent une dormance normale (Finkelstein et al., 1994). En effet, le mutant *abi4* est également insensible au glucose et joue un rôle dans la signalisation de la dégradation des lipides pendant la germination (Penfield et al., 2006, voir section 1.2)).

La transition depuis la dormance vers la germination peut être régulée à l'échelle du protéasome (Bove et al., 2005). Un mutant d'*A. thaliana*, dont l'expression de *RPN10*, une protéine du protéasome 26S est altérée, montre une inhibition hypersensible de l'établissement de la plantule en présence d'ABA (Smalle et al., 2003). Une protéine interagissant avec *ABI3* révélée par une analyse double hybride dans un système levure, *AIP2*, encode une ubiquitine ligase E3 qui cible les protéines destinées à être dégradées par le protéasome 26S (Kurup et al., 2000 ; Zang et al., 2005). *AIP2* peut polyubiquitiner *ABI3* *in vitro*, menant à une diminution de la teneur en protéine *ABI3* lorsqu'elle est sur-exprimée dans des plantes transgéniques (Zhang et al., 2005) (Fig. 8). Inversement, les mutants *aip2* sont hyper-sensibles à l'ABA et montrent un phénotype proche de celui des lignées sur-exprimant *ABI3* (Zhang et al., 2005). *AIP2* est donc un régulateur négatif de la réponse à l'ABA via sa modulation de la teneur en *ABI3*. De même une protéine liant *ABI5* (AFP),

régule la dégradation d'ABI5 (Zhang et al., 2005) (Fig. 8). La protéolyse a également été mise en évidence pour son rôle dans le contrôle de la germination via deux protéines de cette voie de dégradation : PRT6 (Proteolysis 6) et ATE (arginyl-tRNA :protéine arginyltransférase), connues pour réguler la sensibilité à l'ABA, aux sucres et à la post maturation à sec des graines d'*A. thaliana*. Elles interviendraient dans le turnover des protéines en lien avec ABI3 et ABI5 (Holman et al., 2009).

Acide gibbérellique

L'acide gibbérellique est impliqué dans la promotion de nombreux phénomènes de croissance et de développement tels que la germination, l'allongement cellulaire et le temps de floraison (Schwechheimer et al., 2009). La sensibilité des semences au GA augmente avec la levée de la dormance (Hilhorst et al., 1986). Le GA est associé à la promotion de la germination et comme pour l'ABA, c'est l'analyse de mutants qui a permis d'identifier des éléments clefs de cette voie de signalisation. L'acide gibbérellique est absolument requis à la germination comme le montre l'étude des mutants ne produisant pas de GA, *gib1* chez *L. esculentum* et *gal* chez *A. thaliana* qui nécessitent tous deux l'application de GA exogène pour compléter leur germination (Koorneef et Van der Veen, 1980 ; Groot et Karssen 1987).

Le GA est connu pour stimuler la germination des graines en induisant notamment des enzymes hydrolytiques conduisant à l'affaiblissement des enveloppes de la graine, en induisant la mobilisation des réserves et en stimulant l'expansion de l'embryon (Bewley et Black, 1994). Chez *L. esculentum*, le GA stimule l'expression de β -endo-mannases qui libèrent les réserves pariétales dans l'albumen de la coiffe (Still et Bradford, 1997 ; Nonogaki et al., 2000). Durant la germination d'*A. thaliana*, des gènes associés à la dégradation des parois cellulaires et à l'induction de la division cellulaire sont induits par le GA (Ogawa et al., 2003). Chez *H. vulgare*, et *T. aestivum*, le GA induit l'expression de gènes codant des α -amylases et des enzymes nécessaires à la mobilisation de l'amidon de l'albumen (Sun et Gubler, 2004).

La compréhension du rôle du GA dans la germination a été permise par la découverte des composantes clefs de sa signalisation, qui incluent les récepteurs GID GA, et leur interaction avec les protéines à domaines DELLA et l'ubiquitine ligase E3 SCF^{sly} (McGinnis et al., 2003) (Fig. 8). On compte cinq gènes codant des protéines à domaine conservé DELLA nommées *GAI*, *RGA*, *RGL1*, *RGL2* et *RGL3*. Ces protéines sont localisées dans le noyau et

répriment la réponse au GA pendant le développement (Sun et Gubler, 2004). *RGL2* semble jouer un rôle majeur dans la régulation de la germination. Les mutants *rgl2* sont insensibles au paclobutrazol, un inhibiteur de la synthèse de GA et produisent des graines non dormantes (Lee et al., 2002). L'influence des protéines contenant un domaine DELLA en lien avec le GA a été analysée en comparant le transcriptome de graines mutantes *gal-3* et de mutantes *gal-3/gai-t6/rga-t2.rgl1-1/rgl2-1* ne nécessitant pas de GA pour germer (Cao et al., 2006). Cette étude indique que seule la moitié des gènes régulés par le GA le sont en lien avec DELLA.

La voie de biosynthèse des GA est également impliquée dans le contrôle de la germination par l'intermédiaire des isoformes 1 et 2 de la GA 3-oxydase dont le rôle a été mis en évidence par l'étude de mutants (Yamauchi et al., 2004 ; Mitchum et al., 2006) (Fig. 8). L'expression du gène *GA3ox1* augmente lorsque la germination est complète en présence de lumière (Finch-Savage et al., 2007).

D'autres hormones comme l'éthylène, l'auxine, les cytokinines ou les brassinostéroïdes ont été étudiées pour leurs rôles dans la germination. Par exemple, l'éthylène est connu pour promouvoir la germination de graines de pois (Petruzzelli et al., 2000). L'éthylène serait responsable de l'activation de l'expression d'ACC oxydase pour synthétiser le 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), le précurseur d'éthylène. Les graines de mutant *etr1-2*, famille de récepteurs d'éthylène, ne sont plus sensibles à l'éthylène et ne sont plus dormantes (Chiwocha et al., 2005). Ces mutants sont également impliqués dans les voies métaboliques d'autres hormones, comme l'ABA, le GA, la cytokinine et l'auxine. L'éthylène interagit avec la signalisation de l'ABA via *CTR1*, une kinase kinase kinase régulatrice négative du signal éthylène, comme le montre la diminution de sensibilité à l'ABA d'un mutant *ctr1* (Ouaked et al., 2003). L'éthylène joue un rôle antagoniste à celui de l'ABA, pendant la maturation comme pendant la germination, agissant de concert avec le GA, dans la promotion de la germination chez de nombreuses espèces. Dans d'autres espèces, l'éthylène joue un rôle dans la levée de la dormance (Matilla et al., 2000). Les cytokinines peuvent lever la dormance de quelques espèces comme *O. sativa* (Cohn et Butera, 1982). L'effet de l'auxine sur la germination et la dormance n'est pas évident. Chez *A. thaliana* il n'y a pas de lien entre l'auxine et la germination ou la dormance. Par contre, chez le blé, l'auxine et son précurseur, le tryptophane, inhibent la germination des graines dormantes, alors que la PMS diminue

graduellement cet effet d'inhibition et que les graines non dormantes ne réagissent plus (Ramaih et al 2003). Les brassinostéroïdes, qui jouent plutôt un rôle dans la promotion de la germination, semblent être importants pour le bon déroulement de celle-ci (Stebert, 2001) et stimulent la 'rupture' de l'albumen (Leubner, 2001).

2. Perception et signalisation des sucres

En plus de leur rôle de nutriment, les sucres tels que le glucose, exercent également un rôle de molécule signal chez de nombreux eucaryotes. Les sucres impactent profondément les plantes à de nombreux stades de développement depuis la germination, en passant par les développements végétatif et reproductif, jusqu'à la formation des graines (revue dans Smeekens et al., 2000). Le métabolisme des sucres chez les plantes est un processus très dynamique. Les flux métaboliques, tout comme les concentrations en sucres, diffèrent fortement durant le développement en réponse à des signaux environnementaux tels que l'alternance jour/nuit et les stress biotiques et abiotiques (revue dans Rolland et al., 2006). La signalisation des sucres chez la levure est souvent utilisée comme modèle pour comprendre celle qui s'opère chez les plantes. Effectivement, la voie de perception et de signalisation des sucres, impliquant le complexe SNF1 (Sucrose Non Fermenting 1) chez la levure, a été en grande partie élucidée (revue dans Loreti et al., 2001). Après avoir décrits les différentes voies de signalisation chez la levure, les connaissances sur cette signalisation chez les plantes seront exposées. Les détails plus spécifiques de la structure, de la régulation et de la fonction sur le complexe SNF1/AMPK/SnRK1 seront décrits dans la section suivante.

2.1 Mécanismes de perception et de signalisation des sucres chez *S. cerevisiae*

S. cerevisiae est un organisme anaérobique facultatif. Mais en présence d'oxygène, elle préfère la fermentation de sucres tels que le glucose, le fructose ou le saccharose à la respiration. La levure possède au moins quatre voies distinctes de perception et de transduction du signal glucose permettant l'utilisation exclusive et optimale de cette source de carbone (Fig. 9 et 15).

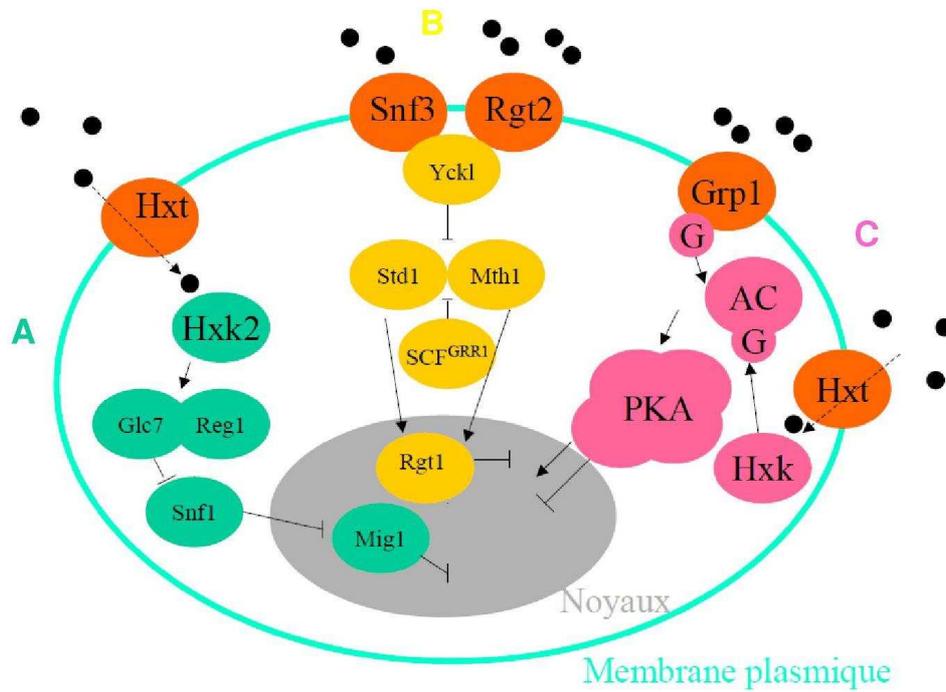


Figure 9: Voies de signalisation des sucres chez *S. cerevisiae* (d'après Rolland et al., 2006, modifié). Les sucres (points noirs) activent différentes voies de signalisation dépendant ou pas de l'hexokinase (Hxk2). A : voie principale de répression par le glucose. B : seconde voie de perception du glucose extracellulaire. C : troisième voie de signalisation via l'AMPc-PKA.

La « voie principale de répression par le glucose » est une importante voie de régulation responsable de la répression de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la respiration, la glucogénèse et le métabolisme des sources alternatives de carbone (Rolland et al., 2006). Cette voie de régulation par le glucose implique le transport du glucose par des transporteurs d'hexose (HXT) vers le cytosol (Kraakman et al., 1999). L'analyse de mutations aléatoires de l'hexokinase 2 indique que son rôle dans la signalisation des sucres est associé à son activité catalytique. Le glucose active l'hexokinase 2 cytosolique (HXK2) qui subirait, lors de sa phosphorylation, une modification de conformation lui permettant de jouer un rôle de régulateur (Kraakman et al., 1999). L'HXK2 activée interagit avec le complexe GLC7/REG1 (GLyCogen 7/REsistance to catabolite repression of Galactokinase 1) qui est un complexe phosphatase capable d'inhiber SNF1 (Randez-Gil et al., 1998) (Fig. 9). La protéine kinase SNF1 est responsable de la dé-répression de l'expression de gènes sous des conditions pauvres en glucose. Cette dé-répression s'effectue par la phosphorylation de Mig1 induisant sa dissociation du complexe de répression auquel il est associé, permettant ainsi l'expression de gènes (Lalonde et al., 1999).

La seconde voie de perception et de signalisation des sucres joue un rôle dans la perception du glucose extracellulaire (Fig. 9). Deux homologues de transporteurs d'hexoses, SNF3 (Sucrose Non Fermenting 3) et RGT2 (Restore Glucose Transport), dont l'activité catalytique est non fonctionnelle, sont des senseurs à forte et à faible affinité pour le glucose extracellulaire et activent la caséine kinase 1 (YCK1) en réponse au glucose (Ozcan et al., 1998). YCK1 phosphoryle alors à son tour deux protéines, STD1 (suppressor of TBP Deletion 1) et MTH1 (MSN three homologue 1), qui s'associent au répresseur de la transcription RGT1 et sont dirigées vers le complexe SCF^{GRR1} (Skp1-Cullin-F-box^{Glucose Repression Resistant 1}) afin d'être ubiquitinées et dégradées par le protéasome (Johnston et Kim, 2005). Plusieurs HXT, d'affinités et de capacités variables, sont activées en réponse à l'activation des récepteurs au glucose extracellulaire. La levée de la répression transcriptionnelle causée par le complexe RGT1-MTH1-STD1 sur les promoteurs d'*HXT* permet au final l'entrée du glucose nécessaire à la fermentation (Moriya et Johnson, 2004) (Fig. 9).

La troisième voie de signalisation des sucres implique la perception du glucose et du saccharose par la protéine kinase A dépendante de AMPc (AMPc-PKA) via l'activation de l'adénylate cyclase (Kubler et al., 1997 ; Colombo et al., 1998). Deux mécanismes sont impliqués dans l'activation de la synthèse d'AMPc par l'adénylate cyclase (AC). Le premier

mécanisme implique la perception du glucose ou du saccharose extracellulaire par le système GPCR (G-Protein couple receptor) couplé aux protéines G (Beullens et al., 1988). Ce système est constitué du récepteur GPR1, d'une sous unité $G\alpha$ GPA2 et de la protéine inhibitrice de la protéine G RGS2 (Versele et al., 1999 ; 2001). Le second mécanisme implique l'import de glucose et sa phosphorylation par de multiples hexokinases (HXK1 et HXK2) ou glucokinases 1 (GLK1) activant potentiellement de petites protéines G (RAS1 et RAS2) qui activent à leur tour l'adénylate cyclase (Toda et al., 1985; Colombo et al., 2004). L'AMPC-PKA intègre également les signaux provenant d'autres nutriments essentiels comme les sources de phosphate, de sulfate et d'azote (Rolland et al., 2006). L'AMPC-PKA régule de nombreux processus comme le vieillissement cellulaire, la thermotolérance, la résistance au stress et le métabolisme des tréhaloses (Santangelo et al., 2006). Elle est également potentiellement impliquée dans l'inhibition des facteurs de transcription MSN2 et MSN4 (Multicopy suppressor of SNF1 2/4) qui régulent des gènes en réponse à une carence en glucose (Boy-Marcotte et al., 1998 ; Gerner et al., 1998 ; Smith et al., 1998) (Fig. 9).

Enfin, la dernière voie de signalisation connue implique le tréhalose, qui est une molécule de stockage participant à la protection contre le stress chez de nombreux êtres vivants et issue de la déphosphorylation du tréhalose-6-phosphate par la tréhalose-6-phosphate phosphatase (TPP). Le tréhalose-6-phosphate est synthétisé par tréhalose-6-phosphate synthase à partir de glucose-6-phosphate et d'UDP glucose. Les mutants *tps1* de levure montrent une dérégulation de la glycolyse en présence de glucose, due à une inhibition de l'hexokinase par le tréhalose-6-phosphate (Gancedo et Flores, 2004) (Fig. 9).

2.2 Voies de la perception et signalisation des sucres chez les plantes

La perception et la régulation de la signalisation des sucres chez les végétaux est très complexe du fait de la nécessaire coordination entre les organes sources et les organes puits vis-à-vis de leur réponse aux changements de conditions environnementales (revue dans Loreti et al., 2001). Il existe plusieurs voies de signalisation des sucres chez les plantes, dont certaines sont directement comparables à celles connues chez la levure. L'étude de la signalisation des sucres chez les plantes est réalisée par différentes approches génétiques, moléculaires, biochimiques et physiologiques (Smeekens et al., 1999 ; Loreti et al., 2001, Rolland et al., 2006). Dans ce paragraphe nous commencerons par définir les

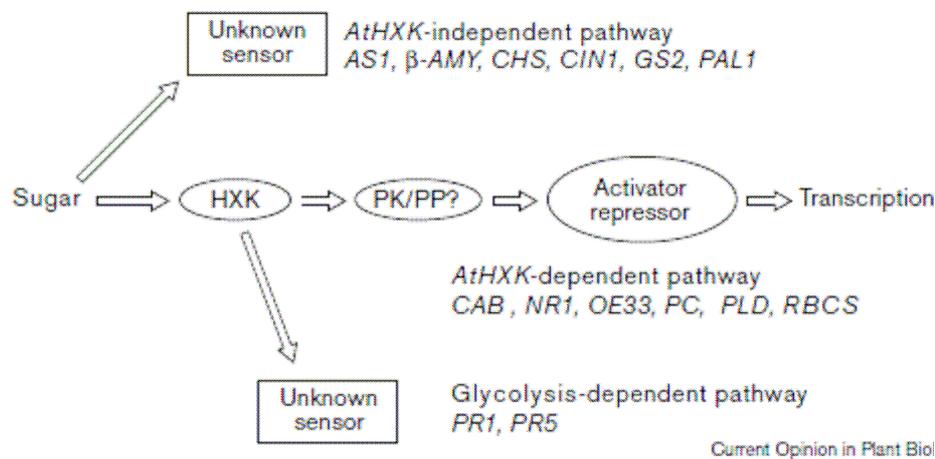


Figure 10 : Les trois voies de signalisation des sucres chez les plantes (d’après Sheen et al., 1999). Chez les plantes, on compte trois voies de signalisation des sucres. Une voie indépendante de l’hexokinase, qui mène à l’activation de gènes du métabolisme. Une voie dépendante de l’hexokinase mais indépendante de la glycolyse, qui inhibe des gènes associés à la photosynthèse. Enfin, une voie dépendante de la glycolyse, est connue pour activer l’expression de gènes de type « pathogenesis related » (PR).

Tableau 1 : Analogues de glucoses dans la signalisation des sucres. (d’après Loreti et al., 2001) HXK : hexokinase

Sugar	Uptake	Direct phosphorylation by HXK	Metabolization (glycolysis)	Putative sensor						
				Extracellular hexose sensor	Extracellular disaccharide sensor	Hexose transporter	Disaccharide transporter	Intracellular hexose sensor	Hexokinase	Post-HXK sensor
Glucose	✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓
2-Deoxyglucose	✓	✓		✓		✓		✓	✓	
6-Deoxyglucose	✓			✓		✓				
3-O-methylglucose	✓			✓		✓				
Mannose	✓	✓				✓		✓	✓	
Sucrose			✓		✓		✓			✓
Palatinose	✓									
Turanose					✓					

For each sugar, its ability to cross the plasma membrane (uptake), its phosphorylation by HXK, and the possibility of further metabolism through glycolysis is indicated. The deduced putative sensor able to perceive the sugar, based on its metabolic properties, is also indicated. The sugars reported are all able to trigger induction or repression of a variety of genes (see text for references).

différentes voies de régulation liées aux hexoses, puis celles liées aux disaccharides tels que le tréhalose et le saccharose. Enfin nous étudierons l'expression des gènes en réponse aux sucres et l'interaction entre les hormones et les sucres.

2.2.1 Signalisation des hexoses

Chez les plantes, il existe au moins trois voies de signalisation par le glucose. Les deux premières voies impliquent les hexokinases alors que la troisième ne l'implique pas (Fig. 10). Dans la première voie, l'expression des gènes est corrélée avec la fonction de signalisation d'H XK dont la fonction principale est la répression des gènes liés à la photosynthèse tels que chlorophyll a/b binding proteins (*CAB*), nitrate reductase (*NRI*), oxygen evolving protein (*OE33*), phospholipase D (*PLD*) et ribulose-1,5-biphosphate carboxylase (*RBCS*) (Fig. 10). La deuxième voie dépend de la glycolyse, en aval des hexokinases et régule l'expression de gènes *PR1*, *PR2* et *PR5* (Xiao et al., 2000).

Récemment, une étude sur les plantules d'*A. thaliana* des mutants *akin10*, obtenues par antisens, montre qu'il y a un lien entre SnRK1 et l'inductibilité de ces gènes par le glucose (Jossier et al., 2009). La séparation de ces deux voies est obtenue par le biais d'analyse de la réponse au glucose de mutants *hxx* d'*A. thaliana*, et par l'utilisation d'analogues de sucres (revue dans Smeeckens, 2000, Rolland et al. 2006). Par exemple, le 2-deoxyglucose et mannose sont des substrats de l'hexokinase n'entrant pas dans le métabolisme (Tab. 1). Ils peuvent mimer la signalisation activée par le glucose dans la régulation des gènes de photosynthèse et du cycle du glyoxylate (Jang et Sheen, 1997 ; Graham et al., 1994) (Fig. 10 et Tab. 1). L'utilisation des inhibiteurs d'hexokinase pour bloquer les réponses au glucose a également contribué à la mise en évidence d'un rôle de molécule de signalisation des hexokinases (Pego et al, 1999). Cependant, c'est grâce aux études génétiques, en utilisant des mutants sur-exprimant ou sous-exprimant une HXK homologue de l'HXK2 de levure, AtHXK, que le rôle des hexokinases dans ces deux voies a été confirmé (Jang et Sheen, 1997, Xiao et al., 2000). Des études de l'expression de gènes de mutants *hxl* d'*A. thaliana*, exposés à du glucose, et de sur-expression d'*AtHXK1* et *HXK2* de levure ont permis de distinguer des gènes dont l'expression est dépendante de l'hexokinase et d'autres dont l'expression dépend de la glycolyse (Xiao et al., 2000). En effet, la complémentation des mutants antisens *Athxx* avec une hexokinase de levure (YHXK)

conduit à une restauration de l'activité catalytique mais n'est pas capable de ré-induire la sensibilité aux sucres (Jang et Sheen, 1997).

La troisième voie est indépendante de l'hexokinase et a été mise en évidence par le biais de l'analyse de la réponse au glucose de mutants n'exprimant pas *AtHXK1* chez *A. thaliana* (Godt et al., 1995 ; Roitsch et al., 1999). Cette étude sur le mutant *hxx1* d'*A. thaliana*, exposé à du glucose, montre que la voie de signalisation indépendante de l'H XK induit des gènes codant une asparagine synthase, une β -amylase, une chalcone synthase, une invertase pariétale, une glutamine synthase et une phénylalanine ammonia lyase (Sheen et al., 1999). Xiao et al. (2000) ont montré que le glucose est capable d'induire l'expression des gènes *PAL*, *CHS* et *AGPase* non seulement dans les plantes de type sauvage, mais également dans les mutants sur-expressseurs sens ou antisens de *H XK* ou des mutants de sur-expression de levure *H XK2*. L'exposition de suspensions cellulaires de *Chenopodium rubrum* à des analogues du glucose non phosphorylés par les hexokinases, tels que le 3-O-méthylglucose ou le 6-déoxyglucose, induit l'expression de gènes codant des saccharoses synthases et invertases vacuolaires (Godt et al., 1995 ; Roitsch et al., 1999) (Fig. 10 et Tab. 1).

2.2.2 Perception et signalisation du saccharose

Le saccharose est difficile à étudier en tant que molécule de signalisation du fait de sa dégradation rapide en glucose et fructose (Loreti et al., 2001). Des gènes dont l'expression ou l'activité sont modulées par le saccharose mais ne sont pas affectées par le glucose, ont été identifiés. C'est le cas d'un promoteur patatine, du promoteur de *rolC* chez le tabac et de l'activité d'un symporteur saccharose-proton chez la betterave (Wenzler et al., 1989 ; Jefferson et al., 1990 ; Yokoyama et al., 1994 ; Chiou et Bush, 1998), qui ont permis de dévoiler une signalisation spécifique du saccharose. L'expression de l' α -amylase dans l'épithélium scutellaire chez *H. vulgare* est réprimée par le glucose, le saccharose et différents disaccharides non métabolisables contenant une moitié fructosyl (Loreti et al., 2001). Le transport du saccharose ne semble pas être lié à l'induction d'un signal par le saccharose (Loreti et al., 2001).

2.2.3 Signalisation du tréhalose

Les disaccharides ne contenant pas de fructose, comme le tréhalose, sont également perçus par l'organisme. Ils induisent une inhibition de l'élongation de la racine chez *A. thaliana*, du fait de l'accumulation de T6P qu'il engendre (Wingler et al., 2000, Pellny et al., 2004). Cette signalisation active notamment l'expression de l'AGPase provoquant une accumulation d'amidon dans les cotylédons. L'incubation des disques de pomme de terre dans le tréhalose conduit également à une activation directe de AGPase via un changement de l'état rédox qui dépend de SnRK1 (Kolbe et al., 2005 ; Tiessen et al., 2003).

La TPS5 est phosphorylée par des protéines SnRK1 chez *A. thaliana* en réponse à un analogue de glucose non métabolisable, le 2-déoxyglucose (Harthill et al., 2006). En plus de son rôle dans la signalisation du métabolisme carboné, le tréhalose joue un rôle dans la signalisation des mécanismes de tolérance aux stress, notamment via le facteur de transcription ABI4 (Ramon et al., 2007).

2.2.4 Interaction entre signalisation des sucres et hormones

Les criblages destinés à récupérer les mutants sucre-sensibles ont montré un lien avec la biosynthèse ou signalisation des hormones (Zhou et al., 1998 ; Laby et al., 2000 ; Huijser et al., 2000). Par exemple, *gin1*, *gin5* et *gin6* sont alléliques à *aba2*, *aba3* and *abi4*, impliqués dans la signalisation et la biosynthèse d'ABA (Rolland et al., 2002). En plus, le glucose induit à la fois une augmentation de l'expression de gènes liés à la synthèse et la signalisation de l'ABA ainsi qu'une augmentation de la teneur en ABA endogène (Rolland et al., 2006). L'implication de l'éthylène dans la signalisation des sucres a également été démontrée par l'utilisation de mutants liés à l'éthylène comme *eto1-1* et *ctr1-1* (constitutive ethylene response). Les mutants surproduisant de l'éthylène ou à réponse constitutive à l'éthylène sont insensibles au glucose alors que les mutants insensibles à l'éthylène sont hypersensibles au glucose (Zhou et al., 1998).

3. Complexes kinases SNF1/AMPK/SnRK1

La protéine kinase SNF1 fut identifiée pour la première fois lors d'une analyse génétique chez *S. cerevisiae* en 1981 (Carlson et al., 1981). La mutation *snf1* fut alors associée à des mutants incapables d'utiliser le saccharose comme source de carbone (*snf*, *sucrose-nonfermenting*). Le gène *SNF1* fut ensuite cloné et décrit comme codant une sous-unité catalytique d'une sérine-thréonine kinase (Celenza et al., 1986). Des analyses double-hybrides permirent l'identification de sous-unités non catalytiques β et γ , faisant de SNF1 un complexe hétérotrimérique (Celenza et al., 1989 ; Erikson et al., 1993 ; Yang et al., 1994). Le génome de *S. cerevisiae* code une sous-unité catalytique α , une sous-unité γ , SNF4, activatrice du complexe et trois sous-unités β liées à l'adressage et à la spécificité du complexe, SIP1, SIP2 et GAL83.

En 1994, un ADNc codant une sous-unité catalytique de l'AMPK (AMP activated kinase) fut cloné et identifié comme étant l'orthologue de SNF1 chez les mammifères (Carling et al., 1994 ; Mitchelhill et al., 1994). Comme chez la levure, l'AMPK fonctionne sous forme d'un hétérotrimère composé de sous-unités α , β et γ (Hardie et al., 2003). Chacune des sous-unités du complexe AMPK est représentée par deux à trois gènes qui sont sujets à l'épissage alternatif, impliquant une grande diversité de complexes $\alpha\beta\gamma$ différant par leurs cibles et leurs localisations (Salt et al., 1998 ; Chueng et al., 2000).

En 1991 la première séquence d'une protéine kinase similaire à SNF1 chez les plantes (SnRK1) fut clonée à partir d'ADNc provenant de l'albumen de seigle, RKIN1 (Alderson et al., 1991). Comme chez les levures et les animaux, les SnRK1 (sucrose nonfermenting related 1) sont associées en complexe, mais la nature des sous-unités tant catalytiques, que non catalytiques, est plus diversifiée chez les végétaux. En plus des complexes SnRK1, les plantes contiennent deux autres familles SnRK2 et SnRK3, qui possèdent un domaine catalytique les plaçant clairement parmi les SNF1 (Rolland et al., 2002). Les SnRK2 et SnRK3 semblent être des protéines kinases spécifiques des plantes relativement plus diversifiées que les SnRK1 (Halford et al., 2003). A la différence des SnRK1, elles ne complètent pas les mutants de levure *snf1* (Bouly et al., 1999 ; Lovas et al., 2003b ; Alderson et al., 1991). Les SnRK2 sont légèrement plus courtes que les SnRK1 mais montrent de 42% à 46% d'identité de séquence protéique avec RKIN1 de seigle (Halford et al., 1998) (Fig. 11).

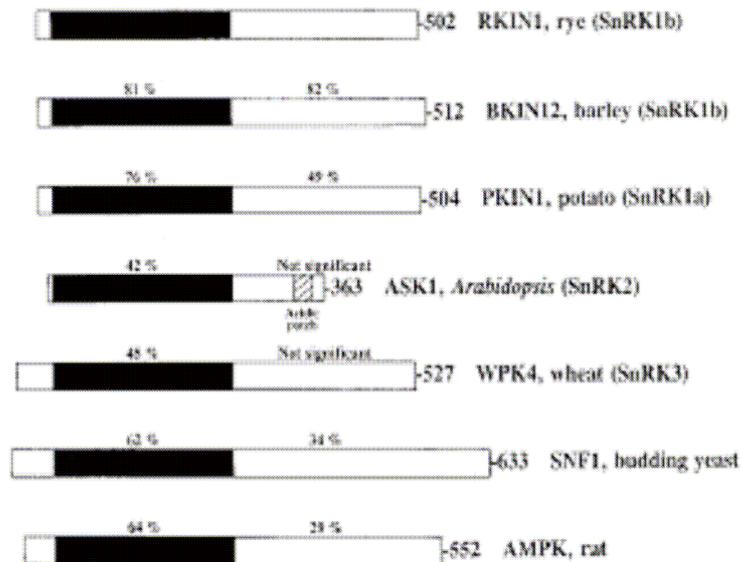


Figure 11 : Alignement des séquences des différentes SNF1/AMPK/SnRK1 et de SnRK2/3. (d'après Halford et al., 1998). Les homologies entre les différentes séquences de SnRK1, SNF1 et AMPK avec la première SnRK1 identifiée sont montrées pour le domaine kinase (en noir) et la partie régulatrice en blanc. Une SnRK2 et une SnRK3 sont également représentées. Le nombre d'acides aminés est indiqué à droite de la séquence.

Par contre, les SnRK2 et les SnRK1 divergent totalement au niveau de leur domaine régulateur en C-terminal et les SnRK2 n'interagissent pas avec les sous-unités activatrices de SnRK1 (Hrabak et al., 2003) (Fig. 11). Deux domaines conservés, un domaine spécifique SnRK2 et un domaine spécifique ABA, ont été identifiés dans la région C-terminale d'un membre des SnRK2 de *O. sativa* (Belin et al., 2006). Les SnRK3 représentent le groupe le plus diversifié des SnRKs et également celui qui diverge le plus de SNF1 (Ruifen et al., 2008). Les SnRK3, également connues sous les noms « calcineurin B-like protein interacting protein kinase » (CIPK) et « protein kinase related to SOS2 » (PKS), agiraient dans la signalisation Ca^{2+} (Harper et al., 2004). Elles possèdent un domaine conservé liant des protéines de type CBL immédiatement après la partie C-terminale du domaine kinase qui pourrait être associé à une séquence auto-inhibitrice (Albrecht et al., 2001). Comme ces deux kinases n'ont pas la capacité d'interagir avec les sous-unités régulatrices et que cette thèse porte sur la sous-unité régulatrice MtSNF4b, les kinases SnRK2 et SNRK3 ne font pas l'objet d'une revue de littérature. Dans cette section, en comparant avec les différentes connaissances acquises sur les modèles de la levure et des mammifères, une vision synthétique du rôle de SnRK1 et de ces sous-unités chez les plantes est présentée, avec une présentation plus détaillée des connaissances acquises sur la sous-unité γ étudiée pendant cette thèse : MtSNF4b.

3.1 Structure des composants des kinases de la famille SNF1/AMPK/SnRK

3.1.1 Sous-unité SNF1/ α

La SNF1 de levure est une protéine kinase de 633 acides aminés qui contient un domaine kinase en N-terminal et une région régulatrice en C-terminal (Celenza et Carlson, 1986) (Fig. 12). La région régulatrice en C-terminal interagit directement avec la région N-terminal catalytique et avec SNF4. L'analyse de délétions de la région C-terminal a permis l'identification de motifs suffisants à l'interaction avec SNF4 entre les acides aminés 392 et 495 de SNF1 et suffisants à l'interaction avec la partie kinase N-terminale entre les acides aminés 392 et 518 (Jiang et Carlson, 1996). Une séquence d'autoinhibition (AIS) fut

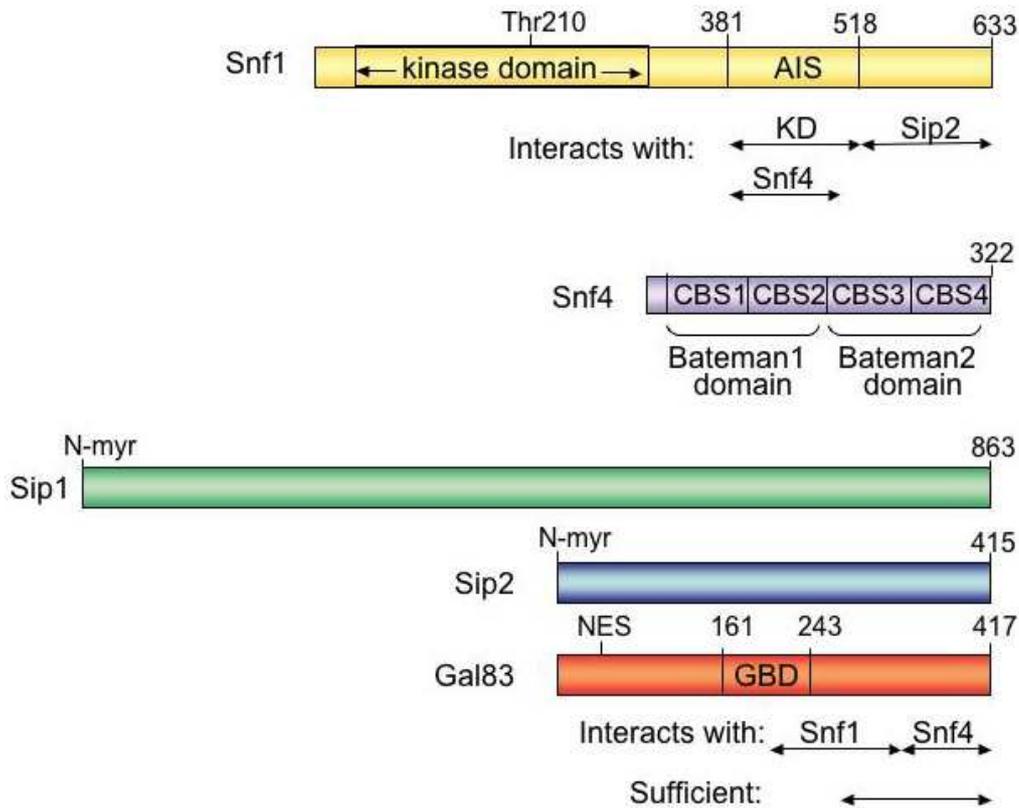


Figure 12 : Structure des sous unités de SNF1 (d'après Hedbacker et al., 2008). Une SNF1 (jaune), une SNF4 (violet), et les trois sous unités β (vert, rouge et bleu) de *S. cerevisiae* sont représentées ainsi que les régions spécifiques identifiées dans chacune d'elles. (AIS : séquence autoinhibitrice ; CBS : cystathionine-beta-synthase ; KD : domaine kinase, NES : nuclear export signal; GBD: glycogen binding domain).

finalement mise en évidence par la délétion des résidus 381 à 488 pour l'interaction avec SNF4 (Leech et al., 2003) (Fig. 12). Dans le domaine kinase, la délétion des résidus de la glycine 53 à l'arginine et de la leucine 183 à l'isoleucine lève partiellement la nécessité de la présence de SNF4 pour activer le complexe et constitue une boucle d'activation (T-loop) (Leech et al., 2003 ; Estruch et al., 1992). La région C-terminale interagit également avec les sous-unités β et des analyses de délétions indiquent que les résidus 515 à 633 sont suffisants à l'interaction avec Sip2 (Jiang et Carlson, 1997). Les SNF1 possèdent également une thréonine en position 210 située dans le segment de la boucle d'activation pouvant être phosphorylée (McCartney et Schmidt, 2001 ; Estruch et al., 1992) (Fig. 12).

L'alignement protéique des domaines kinases d'une SNF1 de levure, d'une AMPK α 2 de rat et d'une SnRK1 de seigle, RKIN1, montre une similarité de plus de 60% entre les trois domaines kinases de ces protéines (Halford et al., 1998) (Fig. 11). La forte conservation des SnRK1 avec leurs homologues chez la levure ou les animaux laisse supposer que ces kinases occupent des rôles similaires dans les différents règnes (Halford et al., 1998). Certains de ces homologues de SNF1 chez les plantes sont capables de compléter les mutants $\Delta snf1$ de levure à l'exemple de la SnRK1 de *N. tabacum*, NPK5 (Muranaka et al., 1994), des SnRK1 de *A. thaliana*, AKIN10 (Leguen et al., 1992) et AKIN11 (Bhalerao et al., 1999) ou encore de *S. tuberosum*, StubSNF1 (Lakatos et al., 1999). Ces homologues sont également en mesure d'interagir avec des sous-unités non catalytiques d'*A. thaliana* chez *S. cerevisiae* (Bouly et al., 1999). Il a également été démontré que SIP2 interagit avec NPK5, l'homologue de SNF1 chez *N. tabacum*, lors d'essais double hydride (Jiang et Carlson 1997). Chez les céréales, la famille des SnRK1 est divisée en deux groupes, les SnRK1a et les SnRK1b, en fonction de leur séquence et de leur profil d'expression (Halford et al., 1998). La SnRK1a est exprimée dans toute la plante et est plus proche des SnRK1 des dicotylédones alors que la SnRK1b est fortement exprimée dans les graines et n'existe que chez les monocotylédones. La signification de cette divergence des SnRK1 chez les céréales n'est pas connue (Halford et al., 1998).

En plus des similarités de séquences, les protéines kinases de cette famille montrent des similarités de substrat. La séquence minimale reconnue et phosphorylée par SNF1/AMPK/SnRK est un motif du type Hyd-(Basic-X)-X-X-Ser-X-X-X-Hyd, où Hyd représente un résidu hydrophobe et où le résidu entre parenthèse n'est pas critique (Halford et al., 1998). Des peptides synthétiques, similaires à ce motif, tels que SAMS et AMARA sont

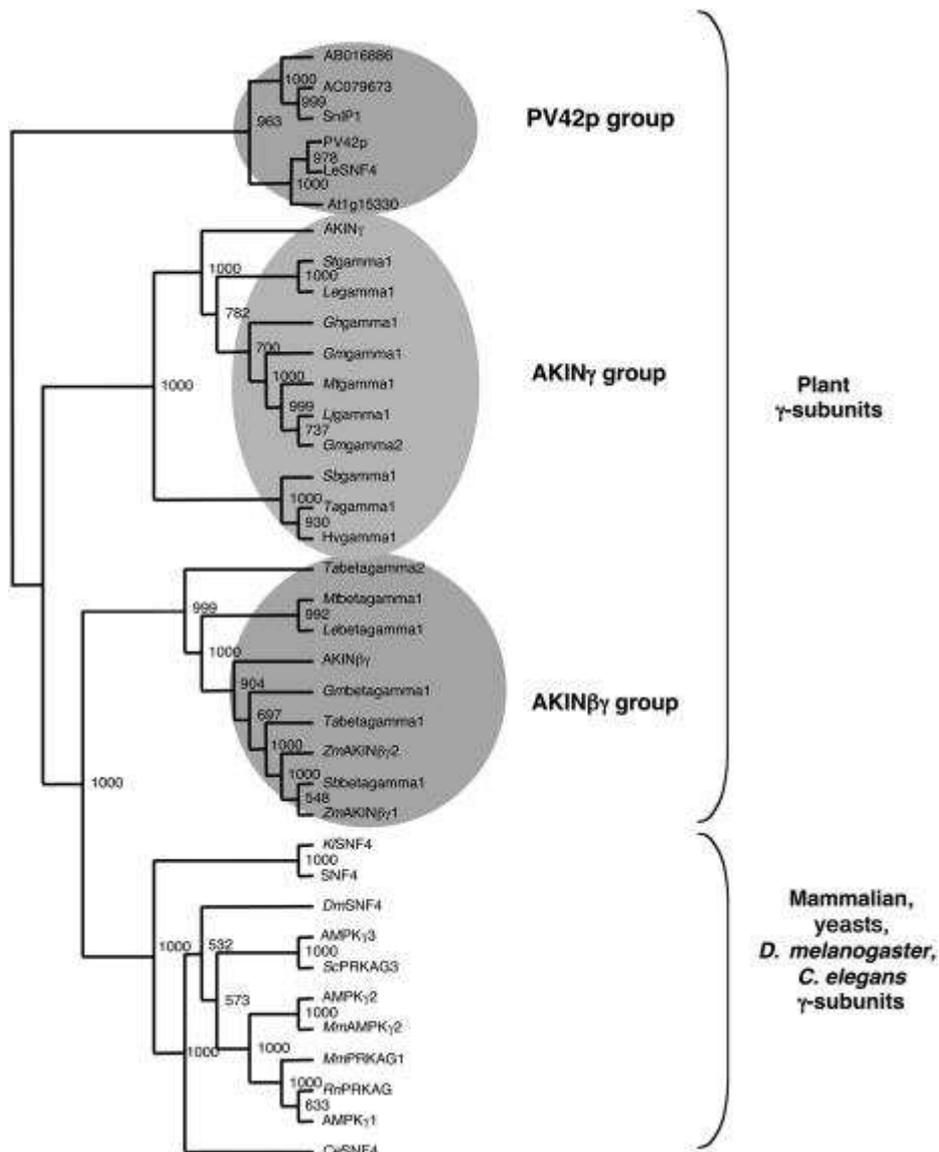


Figure 13 : Arbre phylogénique des sous classes de SNF4 chez les plantes (d'après Buitink et al., 2004). Trois sous classes de SNF4 sont connues chez les plantes, le groupe AKIN $\beta\gamma$, spécifique des plantes et issu de la fusion entre une protéine γ et β , le groupe AKIN γ aussi appelé SNF4 « vrai », et le groupe le plus divergent PV42, qui contient la protéine étudiée dans cette thèse MtSNF4b.

généralement utilisés dans des essais de mesure de l'activité des kinases (Davies et al., 1989 ; Halford et al., 2003).

3.1.2 Sous unité γ

Le gène codant la sous-unité γ de *S. cerevisiae*, *SNF4*, fut identifié lors de l'étude de mutants de type *sucrose nonfermenting* comme étant allélique de *CAT3* (Neigeborn et al., 1984). *SNF4* est une protéine de 322 acides aminés exprimée de manière constitutive se liant aux sous-unités α et β du complexe, indépendamment de la disponibilité en glucose (Celenza et al., 1989 ; Jiang et Carlson, 1997) (Fig. 12). L'association entre *SNF4* et *SNF1* fut d'ailleurs un modèle dans le développement de la technique de double hybride utilisé pour détecter l'interaction entre deux protéines (Fields et al., 1989). *SNF4* est constituée de deux paires de domaines conservés, connus sous le nom de cystathionine-beta-synthase (CBS), formant deux domaines appelés « domaines Bateman » qui ont été identifiés dans de nombreuses protéines comme liant les dérivés d'adénosine (Bateman et al., 1997 ; Adams et al., 2004 ; Scott et al., 2007) (Fig. 12). L'analyse cristallographique des domaines Bateman de l'homologue de *SNF4* chez *S. pombe* montre la présence d'une poche de liaison qui lie une molécule d'AMP ou d'ATP au niveau des domaines CBS3 et CBS4 (Townley et Shapiro, 2007). De plus, cette étude indique que la séquence pré-CBS1 en C-terminale est impliquée dans l'association avec la sous-unité β .

Chez les mammifères, les trois isoformes de la sous-unité γ possèdent des domaines Bateman (Kemp, 2004). L'AMPK γ 1 montre 35% d'homologie avec *SNF4* (Hardie et al., 1998). Les AMPK γ 2 et γ 3 possèdent une extension en N-terminale sujet à l'épissage alternatif dont la fonction reste inconnue (Hardie, 2007). Le second domaine CBS des trois sous-unités γ contient une séquence qui pourrait correspondre à un pseudosubstrat semblable au substrat reconnu par l'AMPK mais sur lequel le résidu phosphorylable est manquant (Scott et al., 2007). Cette séquence est conservée chez *SNF4* de levure indiquant qu'un mécanisme similaire peut exister chez *S. cerevisiae* (Hedbacker et Carlson, 2008). Des expériences de délétions de domaine de différentes sous-unités γ de mammifères ont permis de définir un domaine en C-terminal, pré-CBS1, impliqué dans l'interaction avec les sous-unités β (Viana

et al., 2007). Dans cette étude, la délétion d'un seul domaine CBS annule l'interaction entre la sous-unité γ et la sous-unité α catalytique.

Chez les plantes, trois familles de sous-unités γ sont distinguées $\beta\gamma$, γ et PV42 (Fig. 13). La sous-unité $\beta\gamma$ est spécifique des plantes et semble provenir de la fusion entre une protéine de type γ et une région GDB d'une protéine β (Lumbreras et al., 2001). Ces protéines forment des complexes dimériques avec les sous-unités α (Polge et al., 2004). Il est intéressant de noter que cette sous-unité complémente les mutants $\Delta snf4$ de levure ce qui n'est pas le cas de la sous-unité γ « classique », AKIN γ , qui appartient au second groupe de sous-unités γ (Kleinow et al., 2000 ; Lumbrera 2001). De nombreuses preuves de l'interaction entre sous-unités catalytiques et non catalytiques ont été mises en évidence. Chez *A. thaliana*, l'interaction entre les sous-unités $\alpha 1/\beta 1\beta 2$, $\alpha 1/\gamma$, $\gamma/\beta 1\beta 2$ a pu être démontrée par une technique de double hybride dans *S. cerevisiae* (Bouly et al., 1999). Chez *Z. mays*, AKIN $\beta\gamma$ s'associe chez la levure et *in vivo* avec SnRK1 par l'intermédiaire de son domaine KIS/GDB (Lumbreras et al., 2001; Lopez-Paz et al., 2009). Le dernier groupe de sous-unités γ identifié chez les plantes est le groupe PV42/LeSNF4/MtSNF4b, dont fait partie la protéine étudiée durant cette thèse : MtSNF4b. Son homologue, LeSNF4, complémente les mutants de levure *snf4* et interagit physiquement avec d'autres sous-unités du complexe SnRK1, ce qui indique que cette sous-unité est un régulateur fonctionnel de ce complexe (Bradford et al., 2003).

3.1.3 Sous unité β

Chez *S. cerevisiae*, trois isoformes de sous-unités β ont été identifiés : SIP1, SIP2, et GAL83 (Fig. 12). SIP1 et SIP2 ont été mis en évidence lors d'analyses double hybride comme étant des protéines interagissant avec SNF1 (SNF1 Interacting Proteins) (Yang et al., 1992 et 1994). GAL83 fut découvert par le biais de son implication dans la répression de GAL par le glucose et montre une forte homologie avec SIP2 (Erickson et Johnston, 1993 ; Matsumoto et al., 1981). Les membres de cette famille de protéines sont considérés comme le troisième composant alternatif du complexe, servant de sous-unités supports sur lesquelles SNF1 et SNF4 s'assemblent (Jiang et Carlson, 1997). Les différentes sous-unités β montrent des

fonctions relativement redondantes et la présence d'une seule d'entre elle permet la croissance de la levure dans une large gamme de stress requérant SNF1 (Schmidt et McCartney, 2000).

Les sous-unités β interagissent avec le complexe SNF1 par un domaine conservé en C-terminal (Erickson et Johnston, 1993) (Fig. 12). Des analyses de délétions ont permis d'identifier un domaine impliqué dans l'interaction avec la kinase KIS, qui inclut un domaine liant le glycogène (glycogen binding domain (GBD)) et un domaine d'association avec le complexe SNF1 (ASC) (Yang et al., 1994 et Jiang et Carlson, 1997). Les sous-unités β divergent au niveau de leur domaine N-terminal qui confère une spécificité de localisation subcellulaire à chaque complexe (Vincent et al., 2001 ; Hedbacker et al., 2004a). Ces trois sous-unités sont cytoplasmiques en cas de répression (abondance en glucose). En cas de dérépression SIP1 est dirigée vers la membrane vacuolaire tandis que GAL83 est dirigée vers le noyau, SIP2 reste cytoplasmique, dirigeant ainsi la localisation et l'activité de SNF1 (Vincent et al., 2001 ; Hedbacker et al., 2004a et 2004b). L'abondance en sous-unités β est régulée en lien avec la disponibilité en glucose et malgré leurs fonctions redondantes, elles montrent également des rôles plus spécifiques comme le vieillissement pour SIP2, ou l'interaction avec des facteurs de transcription pour GAL83 (Hedbacker et al., 2008).

Des gènes liés à la famille des SIP1/SIP2/GAL83 ont été clonés chez *A. thaliana* (*AKIN β 1* et *AKIN β 2*) et *S. tuberosum* (*StubGAL83*) (Bouly et al., 1999 ; Lakatos et al., 1999). Ces sous-unités sont relativement proches structurellement des sous-unités β de levure dans leur domaine C-terminal et interagissent avec des kinases SnRK1, comme StubSNF1 et StubGAL83 qui interagissent lors d'expériences de double hybride bactérien (Lakatos et al., 1999). Une sous-unité β 3 typique des plantes et qui diffère structurellement des deux premières a été identifiée. Cette sous-unité ne possède pas de domaine GDB, mais malgré cette délétion, AKIN β 3 interagit avec la kinase (Gissot et al., 2004). Les trois sous-unités β possèdent un domaine ASC qui interagit fortement avec les sous-unités γ (Bouly et al., 1999 ; Gissot et al., 2004). Chez *M. truncatula*, il existe au moins quatre sous-unités β qui répondent aux stress de façon différentielle (dessiccation, stress hydrique, carence...) (Buitink et al., 2004).

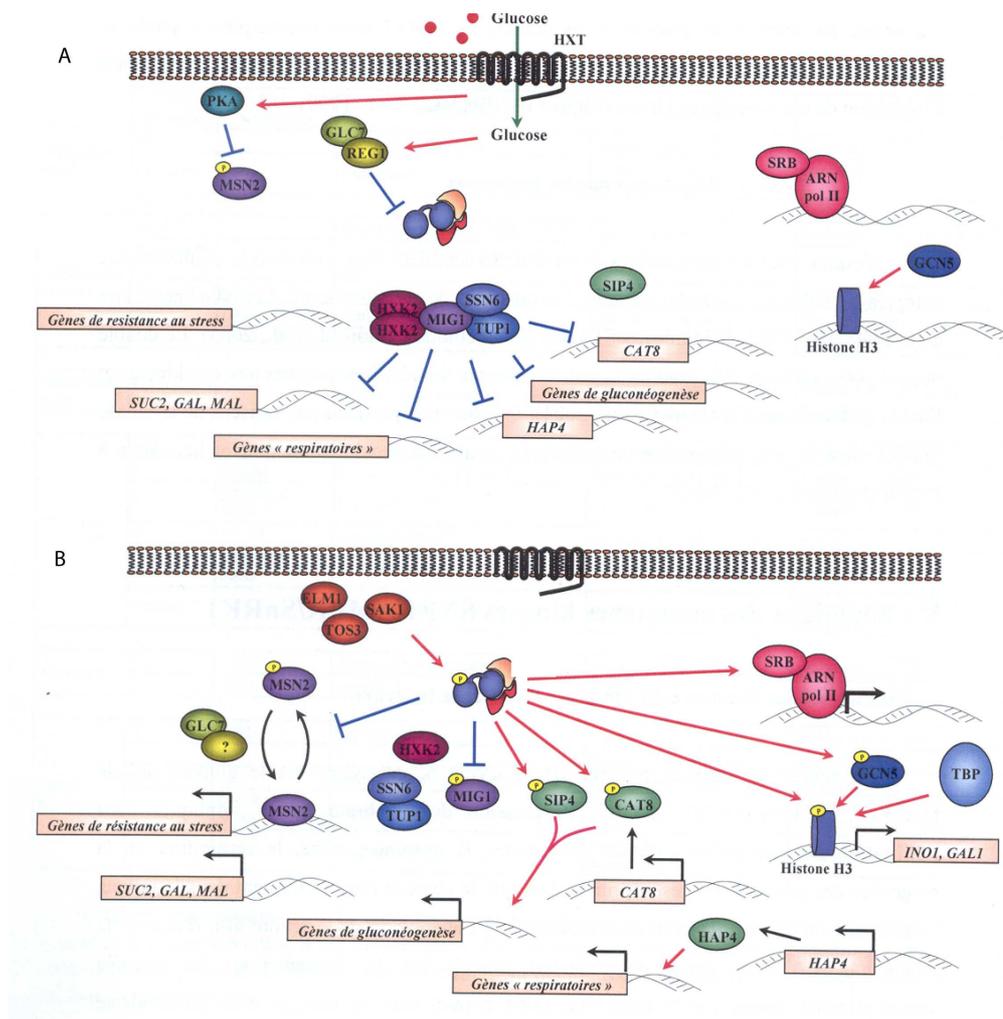


Figure 14: Régulation et rôle clef de SNF1 dans la signalisation des sucres chez *S. cerevisiae* (d'après thèse Jossier, 2007). (A) En présence de glucose, l'ATP est produit par la fermentation, alors que SNF1 est inhibée via l'hexokinase HXK2 et le complexe phosphatase REG1-GLC7. Dans cette situation, les gènes codant des enzymes impliquées dans l'utilisation de sources non fermentescibles de carbone sont réprimés par le complexe de répression SSN6-TUP1 et MIG1. (B) En cas d'absence de glucose, SNF1 est activée par des kinases en amont (ELM1, TOS3 et PAK1) et dé-réprime les gènes réprimés par l'association MIG1-SSN6-TUP1. La SNF1 activée phosphoryle MIG1, qui est exportée en dehors du noyau et inhibe l'interaction entre MIG et SSN6-TUP1. SNF1 active directement certains activateurs de la transcription tels que SIP4 ou CAT8.

3.2 Régulation des kinases SNF1/AMPK/SnRK

3.2.1 Régulation de l'AMPK et de SNF1 chez les mammifères et la levure

Un premier niveau de régulation de la sous-unité catalytique s'effectue au travers de SNF4 qui active le complexe SNF1 *in vitro* et *in vivo* (Celenza et al., 1989). SNF4 se lie au domaine régulateur de SNF1 dans des conditions de faible teneur en glucose alors qu'en cas de forte teneur en glucose, le domaine régulateur AIS de SNF1 se lie au domaine kinase de SNF1 (Jiang et Carlson, 1996) (Fig. 14). SNF4 est nécessaire à la levée de l'autoinhibition de la kinase par le domaine AIS en se liant à la région C-terminale de SNF1. Des études génétiques montrent que lorsque cette partie est tronquée, SNF4 n'est plus nécessaire à l'activation du complexe (Celenza et al., 1989 ; Jiang et Carlson, 1996).

Les kinases et phosphatases constituent le second mode de régulation connu de SNF1. Pour être active, SNF1 nécessite la phosphorylation de l'acide aminé thréonine en position 210 du domaine kinase et la substitution de cette thréonine par une alanine, une glutamine ou une asparagine inactive la kinase (Estruch et al., 1992 ; Ludin et al., 1998). Cette phosphorylation est sous contrôle de kinases et de phosphatases régulées par le glucose mais ne requière pas la présence du domaine C-terminal (Hedbacker et Carlson, 2008) (Fig. 14). Les kinases SAK1, ELM1, TOS3 activent SNF1 par phosphorylation du résidu Thr210 en réponse à différents stress environnementaux tels que les stress salin, un pH alcalin, oxydatifs mais pas face à un traitement avec du sorbitol ou un choc thermique (Hong et al., 2003 ; Sutherland et al., 2003). SNF1 est également régulée négativement par la protéine phosphatase complexe REG1-GLC7 (qui interagit avec HXK, section 2.1) par le biais d'une boucle de régulation négative (McCartney et Schmidt, 2001 ; Sanz et al., 2000).

Un dernier mode de régulation s'effectue par le biais de métabolites. Par exemple, une diminution de teneur en glucose ou en azote dans le milieu conduit à une activation du complexe (Wilson et al., 1996).

L'AMPK est activée lors de l'augmentation de la concentration en AMP cellulaire. La kinase fonctionne à la manière d'une « jauge à fioul » de l'organisme rendant compte du statut énergétique cellulaire en mesurant le ratio AMP/ATP. Chez l'animal, l'AMPK est activée par l'hypoxie, ischémie, mais également en cas de choc thermique et d'exercice qui ont pour conséquences d'augmenter le ratio AMP/ATP. L'AMP se lie à la sous-unité γ induisant un changement de conformation de cette dernière, ce qui a pour conséquence une activation allostérique de la sous-unité α . Cette association en complexe permet d'augmenter la phosphorylation de la thr172 par des AMPKK tel que LKB1 (Hawley et al., 2003) et CAMKK (Hurley et al., 2005).

3.2.2 Régulation de SnRK1 chez les plantes

SnRK1 peut être régulé au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel. Chez *S. tuberosum*, une forte expression de ce gène est observable dans les stolons lorsqu'ils commencent à se développer en tubercule (Man et al., 1997). Il est également montré que l'activité kinase d'extraits protéiques provenant de jeunes tubercules présente une expression du gène SnRK1 identique mais une différence d'activité kinase, qui est 40 fois plus élevée que dans les tubercules matures (Man et al., 1997). L'activité du complexe SnRK1 peut également être régulée par la présence ou l'expression différentielle de sa sous-unité activatrice, SNF4. Chez *Z. mays*, les transcrits codant ZmAKIN $\beta\gamma$ 1 et ZmAKIN $\beta\gamma$ 2 sont abondants dans les semences au début du développement et décroissent durant la maturation, alors qu'ils sont faiblement détectés dans les racines, les tiges et les feuilles (Lumbreras et al., 2001). Chez *A. thaliana*, le gène AKIN γ est, quant à lui, exprimé dans les organes végétatifs, mais les transcrits ne sont pas détectés dans les boutons floraux, les fleurs et les siliques (Bouly et al., 1999). Chez *M. truncatula*, les transcrits de son homologue sont présents dans les feuilles mais absents des graines et des racines, alors qu'ils sont induits en cas de carence en glucose (Buitink et al., 2004).

Comme chez les animaux et les champignons l'activité de SnRK1 peut être activée par phosphorylation du résidu Thr210 *in vivo* (Sugden et al., 1999a). Depuis peu, quelques protéines kinases phosphorylant la thr210 et activant SnRK1 ont été identifiées. Deux protéines nommées geminivirus Rep interacting kinases (GRIK) activent SnRK1 chez *A. thaliana*. Ces protéines sont exprimées en cas d'infection par un virus chez *A. thaliana* (Shen

et al., 2009). Deux gènes d'*A. thaliana*, *SnAK1* et *SnAK2*, contenant un motif conservé avec le groupe de protéines kinases régulatrices de SNF1 chez la levure (*ELM*, *TOS*, *SAK*), phosphoryle *in vitro* la thr210 de SnRK1, pourraient également constituer une régulation de l'activité de SnRK1 (Hey et al., 2007). Ces kinases complètent les triples mutants *elm*, *tos*, *sak* de levure (Hey et al., 2007). A la différence de ces homologues, SnRK1 n'est pas activé allostériquement par l'AMP.

En accord avec l'hypothèse d'un rôle dans la sensibilité aux conditions de carence en sucres, les oses phosphatés et plus particulièrement le glucose-6 phosphate, peuvent inhiber l'activité de SnRK1 (Toroser et al., 2000). De même, des disaccharides comme le tréhalose-6-phosphate inactivent également l'activité de SnRK1 dans des extraits protéiques de plantules de *A. thaliana* (Zhang et al., 2009). L'activité de SnRK1 peut être induite par le saccharose et le 2-deoxyglucose, un analogue du glucose non métabolisable (Bhalerao et al., 1999 ; Harthil et al., 2006) bien qu'aucune interaction directe n'ait été démontrée.

Un dernier mode de régulation a été mis en évidence par la protéine PRL1 (Pleiotropic Regulatory Locus 1). Cette protéine nucléaire possède un domaine WD qui interagit avec les sous-unités catalytiques de SnRK1 chez *A. thaliana* (Bhalerao et al., 1999). Les mutants *prl1* montrent une hypersensibilité au glucose et une dé-répression de gènes régulés par le glucose. *In vitro*, PRL1 inhibe l'activité d'AKIN10. Ces résultats indiquent que PRL1 est un régulateur négatif de SnRK1 (Bhalerao et al., 1999).

3.3 Fonctions des complexes SNF1/AMPK/SnRK1

3.3.1 Fonctions du complexe chez les mammifères et la levure

Chez la levure, le gène *SNF1* fut initialement décrit par le biais de mutants incapables de se développer sur du galactose ou du maltose (*cat1*), de l'éthanol (*ccr1*), du saccharose ou du raffinose (*snf1*) (Carlson et al., 1981). Tous ces mutants s'avèrent en fait être différents allèles du même gène, *SNF1*. La protéine kinase SNF1 régule la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme des sources alternatives de carbone, la glucogenèse, la respiration, le transport et la méiose. Lorsque le glucose devient limitant dans le milieu, la dé-répression de ces gènes devient essentielle à l'adaptation de la levure afin

d'assurer la production d'ATP à partir de l'éthanol produit par la fermentation. Une étude de l'expression des gènes sur les mutants *snf1* montre que 400 gènes sont régulés par SNF1 en conditions limitantes en glucose, incluant 29 des 40 gènes les plus fortement régulés par ce sucre (Young et al., 2003). La classe de gènes régulés par SNF1 la plus représentée est associée à la transcription et la transduction de signaux ce qui reflète le rôle central de SNF1 dans la régulation (Young et al., 2003). Ce contrôle transcriptionnel exercé par le complexe SNF1 permet ainsi le passage d'un métabolisme fermentatif à respiratoire, appelé transition diauxique (Fig. 14). SNF1 joue un rôle direct sur la transcription via des répresseurs et des activateurs de la transcription et plus généralement par l'intermédiaire de l'appareil transcriptionnel (Hedbacker et al., 2008). Par exemple, SNF1 stimule la transcription par l'holoenzyme ARN polymérase II sur un promoteur artificiel (Kuchin et al., 2000) et le remodelage de la structure de la chromatine. Ce remodelage est régulé par la modification des histones par SNF1. Par exemple, la phosphorylation de l'histone H3 par SNF1 est nécessaire à l'acétylation de la lysine 14 par l'histone acétyltransférase GCN5, permettant l'expression du gène *INO1* (inositol-1-phosphate synthase) (Lo et al., 2001) (Fig. 14).

Le métabolisme carboné est régulé via les activateurs transcriptionnels, tels que CAT8 et SIP4, nécessaires à l'utilisation de sources de carbone non-fermentescibles. Après phosphorylation par SNF1 en l'absence de glucose, ces activateurs se fixent sur des éléments de réponse aux sources de carbone trouvées dans les promoteurs de gènes de la gluconéogenèse (Hedges et al., 1995 ; Lesage et al., 1996 ; Vincent et al., 1998). En plus de ces activateurs, des répresseurs sont phosphorylés et inactivés par SNF1 en l'absence de glucose. C'est le cas de MIG1 (Multicopy inhibitor of GAL genes 1), dont la mutation supprime la répression par le glucose de nombreux gènes tels que *GAL*, *SUC* et *MAL* (Nehlin et al. 1991 ; De Vit et al., 1999) (Fig. 14).

SNF1 modifie aussi directement l'activité des enzymes du métabolisme des acides gras et du stockage de réserves carbonées. SNF1 phosphoryle et inactive l'acetyl-CoA carboxylase (ACC1), limitant ainsi la biosynthèse d'acides gras dans des conditions limitantes en glucose (Woods et al., 1994). Cette phosphorylation de l'ACC1 affecte également la transcription de *INO1*, un gène clef de la biosynthèse de phospholipides (Shirra et al., 2001). SNF1 est également requise pour l'accumulation de glycogène, qui est un carbohydrate de stockage important chez la levure et contrôle la phosphorylation de la glycogène synthase (Francois et

al., 2001). SNF1 assure le maintien du stockage de glycogène en favorisant l'autophagie (Wang et al., 2001).

En dehors de son rôle dans le métabolisme, SNF1 intervient dans la résistance aux stress. Lors de la transition diauxique, l'expression de nombreux gènes liés à la tolérance aux stress est régulée par les facteurs de transcription MSN2 et MSN3 (Multicopy suppressor of *Snf1* mutation). Dans les promoteurs de ces gènes se trouvent les éléments STRE (Stress Response Element) (Estruch, 2000). Les mutants *snf1* sont également sensibles aux chocs thermiques et montrent une thermotolérance réduite en phase stationnaire (Platara et al., 2006 ; Thompson-Jeager et al., 1991). Récemment, SNF1 a été impliqué dans la réponse aux stress UV par son interaction avec Rad23, une protéine associée au protéasome, qui lève la répression de promoteurs répondant aux UV (Wade et al., 2009).

Chez les mammifères, la protéine AMP-activated kinase (AMPK) fut détectée sous la forme de fractions de protéines totales causant l'inactivation d'une HMGCoA réductase, ou d'acétyl-CoA carboxylase dépendantes de l'ATP (Beg et al., 1973). L'action de l'AMPK conduit à l'activation coordonnée de voie de synthèse d'ATP et l'inhibition de voies anaboliques consommant de l'énergie (Young et al., 2005). L'AMPK a un rôle fondamental dans la réponse cellulaire aux stress environnementaux (Young et al., 2005). Lors d'un exercice, l'AMPK active le catabolisme des acides gras et du glucose pour répondre à la demande de l'organisme en énergie (Russell et al., 1999). L'AMPK pourrait également jouer un rôle dans l'inhibition de la production de ROS (Marsin et al., 2000). De par son rôle dans le contrôle de l'énergie, il n'est pas étonnant de retrouver un rôle de l'AMPK dans le contrôle de canaux à ions membranaires, notamment des canaux chlorure et sodium (Hallows et al., 2000 ; Light et al., 2003).

La kinase module l'expression de gènes du métabolisme par le biais de la phosphorylation de facteurs de transcription et de co-activateurs, de la stabilisation d'ARNm et de la traduction de protéines (Young et al., 2005). Le catabolisme des acides gras est régulé par l'inhibition par l'AMPK de l'acétyl CoA carboxylase et l'activation de la malonyl-CoA decarboxylase, ce qui a pour conséquence de diminuer la concentration de malonyl-CoA et de favoriser l'oxydation des acides gras par rapport à leur synthèse (Dyck et al., 1999 ; Saha et al., 2000). L'AMPK inhibe la synthèse de triglycérides par la phosphorylation de la glycerol-

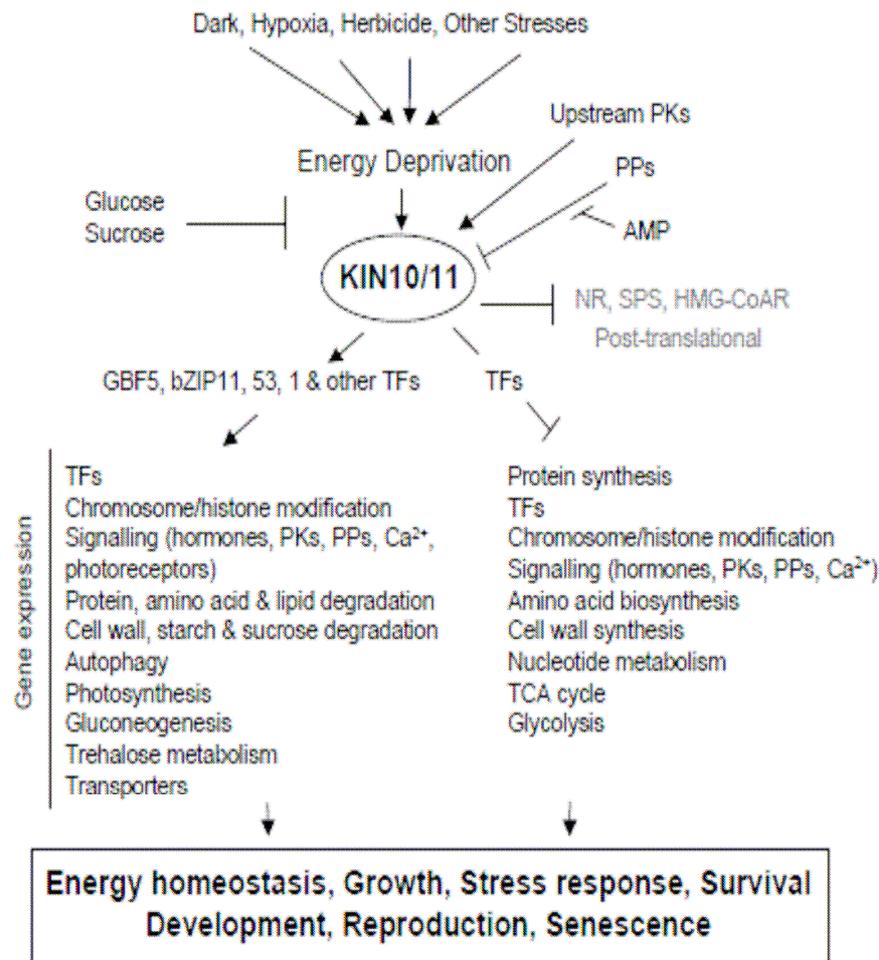


Figure 15 : Fonctions des SnRK1 chez les plantes, modèle de *A. thaliana* (d'après Baena-Gonzalez et al., 2007). Le complexe SnRK1 est activé par la diminution de la disponibilité en énergie provoquée par l'obscurité, l'hypoxie et est inhibé par le glucose. Les SnRK1 agissent directement sur des enzymes du métabolisme comme la nitrate réductase, la saccharose phosphate synthase, ou encore l'hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase, et indirectement sur l'expression de gènes via la phosphorylation de facteurs de transcription.

3-phosphatase acyltransférase (Muoio et al., 1999). L'AMPK stimule également le transport de glucose en régulant la translocation de GLUT4, un transporteur de glucose dans le sarcolemme (Li et al., 2004 ; Russell et al., 1999). En plus, en conditions anaérobiques, l'AMPK augmente la glycolyse par l'activation de la PFK-2 et phosphoryle la glycogène synthase inhibant le stockage de glucose (Marsin et al., 2000 ; Jorgensen et al., 2004).

3.3.2 Fonctions des SnRK1

Comme ses homologues, SnRK1 régule l'expression d'un grand nombre de gènes orchestrant des réseaux de transcription, induisant le catabolisme et inhibant l'anabolisme (Baena-Gonzalez et al., 2008) (Fig. 15). En modulant l'expression de KIN10 dans différents tissus, par expression transitoire dans des protoplastes sous différents stress, Baena-Gonzalez et al. (2007) ont mis en évidence 278 gènes, co-activés par KIN10 et une carence glucidique, qui sont également co-réprimés dans les plantules incubées dans des sucres ou des feuilles matures. Ces gènes sont impliqués dans un grand nombre de processus de synthèse incluant les acides aminés, la paroi cellulaire, les lipides, les nucléotides, les protéines, le saccharose et la synthèse d'amidon. Les gènes les plus sujets à cette répression sont liés à la synthèse de protéines et codent un grand nombre de protéines ribosomales. Des facteurs de transcription de type bZIP semblent également jouer un rôle de médiateur du signal induit par SnRK1 (Baena-Gonzalez et al., 2007). Cette étude a également mis en évidence que SnRK1 module l'expression d'un grand nombre de facteurs de transcription et joue ainsi un rôle central dans la régulation. En plus de ces facteurs de transcription, de nombreux gènes codant des protéines du métabolisme et de réponse aux hormones, ainsi que d'autres protéines codant des transducteurs de signal (kinases, phosphatases) sont affectés par SnRK1 chez *A. thaliana* (Baena-Gonzalez et al., 2009).

Rôle de SnRK1 dans la régulation du métabolisme des sucres

Le complexe SnRK1 est plus connu pour son rôle dans la régulation métabolisme carboné, activant ou inhibant certaines enzymes au niveau transcriptionnel ou post-traductionnel (Halford et al., 2003). Chez la pomme de terre, l'extinction du gène codant la sous-unité catalytique PKIN dans les tubercules provoque la diminution de l'expression des transcrits codant la saccharose synthétase, qui permet la conversion réversible du saccharose en hexoses (Purcell et al., 1998). Une construction antisens de SnRK1 dans des embryons de blé inhibe également l'activité du promoteur de l' α -amylase, enzyme responsable de l'hydrolyse de l'amidon et donc de la disponibilité en carbohydrates (Laurie et al., 2003). D'autre part, les ARNm codant l'invertase vacuolaire sont plus abondants dans des plantes d'*A. thaliana* sur-exprimant *AKIN α 1* (Lessard, 1997).

Le complexe SnRK1 régule également un certain nombre d'enzymes du métabolisme carboné de manière post-traductionnelle. Sugden et al. (1999b) ont mis en évidence que deux SnRK1 de feuilles d'épinard inactivent par phosphorylation la saccharose phosphate synthétase et la nitrate réductase *in vitro*. Le niveau d'activation de l'ADP glucose pyrophosphorylase (AGPase), enzyme clef impliquée dans la biosynthèse de l'amidon (Geigenberger, 2003), est diminué dans des plantes antisens où l'expression de SnRK1 est réduite d'au moins 50 % (Tiessen et al., 2003). Dans ces mêmes tubercules, lorsque la quantité de saccharose est réduite, l'AGPase est inhibée plus rapidement que dans des tubercules sauvages. Le complexe SnRK1 chez la pomme de terre est donc un activateur de l'AGPase en présence de saccharose (Tiessen et al., 2003). En effet, il a été montré que SnRK1 modifiait la régulation du métabolisme carboné et de l'azote par la phosphorylation d'une ADP glucose pyrophosphorylase et d'une nitrate réductase (Jossier et al., 2009). Dans cette étude, la sur-expression de SnRK1 induit un phénotype hypersensible au glucose. Des plantules transformées, cultivées en présence de glucose, accumulent plus de glucose et de fructose et moins d'amidon que le type sauvage (Jossier et al., 2009). Cette sensibilité serait dépendante de la signalisation dépendante de la glycolyse. Dans cette même étude, la sur-expression de SnRK1 induit également une hypersensibilité à l'ABA dans les plantules âgées de sept jours (Jossier et al., 2009). L'ABA accroît l'activité catalytique de SnRK1 mais la sur-expression de SnRK1 n'induit pas de changement de teneur en ABA (Jossier et al., 2009).

L'implication de SnRK1 dans la traduction du signal liée à l'utilisation des sucres est également assurée par la régulation de l'activité d'enzymes comme la nitrate réductase (NR), la saccharose-phosphate synthase (SPS) et la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (F2KP) (Sugden et al., 1999b ; Kulma et al., 2004). Après phosphorylation par SnRK1 de la NR et la F2KP, ces protéines interagissent avec les protéines type 14-3-3 et sont inactivées (Zuk et al., 2003 ; Harthill et al., 2006). Cette phosphorylation est activée par l'analogue de sucres 2-déoxyglucose (Harthill et al., 2006).

Une autre enzyme régulée directement par SnRK1 est également un des substrats du complexe AMPK : la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase (HMGR), qui catalyse la réduction de l'HMG-CoA en acide mévalonique, étape limitante d'une des voies de biosynthèse des isoprénoïdes (Carling et al., 1989; Dale et al., 1995b). Le domaine catalytique de la protéine HMG1 d'*A. thaliana* a été surexprimé dans un système bactérien et l'activité de la protéine recombinante est inactivée lors de sa phosphorylation par une SnRK1 de chou-fleur (Dale et al., 1995a). De plus, le site de phosphorylation de la protéine HMG1 d'*A. thaliana* (Serine 177) est équivalent à celui de l'HMGR de mammifère reconnu par l'AMPK (Dale et al., 1995b; Sugden et al., 1999a).

Régulation de la réponse au stress

Le rôle de SnRK1 dans la réponse aux stress a été mis en évidence, pour la première fois, par l'hypersensibilité aux stress salins dans des plantes mutantes pour la sous-unité β StubGal83 chez la pomme de terre (Lovas et al., 2003). Récemment, il a été montré que SnRK1 interagit avec le domaine WD40 du myoinositol polyphosphate 5-phosphatase chez *A. thaliana* (5PTase13; At1g05630) (Ananieva et al., 2008). La voie de signalisation du myoinositol est associée à une large gamme de processus tels que la réponse aux stress et le développement (Ananieva et al., 2008). Il est montré, par l'utilisation de mutants pour la 5PTase13 qu'en des conditions de stress nutritionnels, SnRK1 est activé par la 5PTase13. Il est suggéré que SnRK1 pourrait former un complexe avec la 5PTase13 induisant une régulation impliquant l'inositol, les sucres et la signalisation en cas de stress (Ananieva et al., 2008).

SnRK1 induit également l'expression de gènes codant une phosphoenolpyruvate carboxykinase, une pyruvate phosphate dikinase, une pyruvate kinase, une glutamate déshydrogénase et une asparagine synthétase. Ces gènes seraient impliqués dans un nouveau mécanisme économique de remobilisation d'azote sous des conditions de carence, d'obscurité et de stress (Banea-Gonzalez et al., 2008).

Un nombre croissant d'études a également montré un rôle de SnRK1 dans l'interaction hôte/pathogène. L'expression d'un homologue de *SNF1* chez *L. esculentum* est régulée positivement par l'inoculation d'un potyvirus dans les feuilles (Alfenas-Zerbini et al., 2009). Cette augmentation de l'expression de *SNF1* est accompagnée de celle de gènes associés à la réponse aux stress comme des facteurs de transcription *WRKY*, des sous-unités du protéasome et des « ubiquitin activating enzyme E2 ». L'expression antisens de *SnRK1* d'*A. thaliana* chez *N. plumbaginifolia* augmente la sensibilité à l'attaque par un gemivirus alors que la sur-expression induit un phénotype plus résistant, indiquant un rôle de SnRK1 dans la défense antivirale des plantes (Hao et al., 2003). *SnRK1* joue un rôle dans la tolérance aux herbivores en redirigeant les ressources carbonées vers les racines indépendamment des jasmonates (Schwachtje et al., 2006). Des sous-unités catalytiques ont également été associées aux stress biotiques. Une sous-unité $\beta\gamma$ interagit avec des protéines impliquées dans la résistance aux nématodes (Gissot et al., 2006). La sous-unité $\beta\gamma$ d'*A. thaliana* interagit au niveau de son domaine KIS/GDB avec deux protéines dont les gènes *AtHSPRO1* and *AtHSPRO2* sont deux orthologues de *HsI^{pro-1}* (Gissot et al., 2006). *HsI^{pro-1}* confère une résistance accrue au nématode *Heterodora schachtii* chez la betterave sur le modèle d'une réaction gène pour gène (Cai et al., 1997). L'expression d'*AtHSPRO2* est multipliée par 10 lors d'une inoculation d'*A. thaliana* par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Gissot et al., 2006).

Régulation de la maturation et de la germination

SnRK1 induit également des changements dans le développement des organes reproducteurs. Lors de l'extinction de l'expression de SnRK1 chez *H. vulgare*, les grains de pollen sont plus petits et contiennent moins d'amidon (Zhang et al., 2001). Une étude transcriptomique réalisée sur des embryons de pois a mis en évidence que la répression du SnRK1 décalait dans le temps l'expression de 183 gènes (Radchuk et al., 2006). La sous expression de SnRK1 conduit également à des défauts pléiotropiques durant la maturation tels qu'une accumulation réduite de globulines et une augmentation de la teneur en saccharose. Il a été suggéré que le complexe SnRK1 jouerait un rôle dans la régulation de la maturation des graines, notamment en liant les voies de signalisation de l'ABA et des sucres (Radchuck et al., 2003). Cependant, aucun lien direct n'a pu être démontré. En revanche, une étude récente (Jossier et al., 2009) a montré une interaction entre les voies de signalisation sucre/ABA sur de jeunes plantes. En effet, les graines de mutants sur-expressseurs d'AKIN10 (SnRK1) deviennent hypersensibles à l'ABA après la percée de la radicule au travers des téguments (Jossier et al., 2009). Une autre étude sur les graines d'*O. sativa* montre que la sous expression de SnRK1 dans les graines d'*O. sativa* retarde la germination et l'élongation de la plantule (Lu et al., 2007). SnRK1 est nécessaire à l'activation du facteur de transcription MYBS1 et à l'expression de l' α -amylase3 sous des conditions de carence en glucose (Lu et al., 2007).

La caractérisation des sous-unités régulatrices peut également donner des informations sur la fonction putative du complexe SnRK1. L'expression de sous-unités γ , PV42/LeSNF4/MtSNF4b, est maximale à la fin de la maturation et est spécifique des graines (Bradford et al., 2003 ; Buitink et al., 2004 ; Rosnoblet et al., 2007). L'expression de *LeSNF4* est inductible par l'ABA et est réprimée par le GA pendant l'imbibition (Bradford et al., 2003). L'accumulation de ces transcrits reste élevée quand les conditions d'imbibition bloquent la germination chez *L. esculentum* et chez *L. sativa* (ABA, stress osmotique, rouge lointain ou thermodormance) (Bradford et al., 2003, Argyris et al., 2008). *LeSNF4* est également surexprimé dans les mutants brownseed *bs4* de *L. esculentum* ayant un phénotype

plus dormant que le type sauvage (Downie et al., 2004). L'expression de *LeSNF4* diminue dans les graines au cours de l'imbibition dans des conditions menant rapidement à la germination, *i.e.* lorsque la dormance est levée, par stratification, par post maturation à sec ou par application de GA sur des graines mutantes *gib1* (Bradford et al., 2003). *MtSNF4b* est ré-induit dans les radicules de *M. truncatula* soumis à un stress osmotique en vue de ré-induire la tolérance à la dessiccation (Buitink et al., 2006). Rosnoblet et al. (2007) ont également mis en évidence que *MtSNF4b* est associé à un complexe de haut poids moléculaire dans les graines matures de *M. truncatula* (Rosnoblet et al., 2007). Ce complexe se forme au cours de la maturation dans les graines et disparaît dans les graines non dormantes au cours de l'imbibition.

L'extinction de *MtSNF4b* n'altère pas la tolérance à la dessiccation des semences de *M. truncatula* mais impacte leur longévité et leur vigueur germinative au cours d'expériences de vieillissement accéléré (Rosnoblet et al., 2007). L'analyse de la teneur en oligosaccharides des semences RNAi *MtSNF4b* de *M. truncatula* a également révélé que l'extinction de *MtSNF4b* réduit la quantité de stachyose et augmente la teneur en saccharose des semences matures (Rosnoblet et al., 2007). La régulation de l'expression des *PV42/LeSNF4/MtSNF4b* par l'ABA et le GA et l'implication de *MtSNF4b* dans la teneur en sucres des semences fournissent un lien potentiel entre les voies de signalisation des sucres et hormonales contrôlant la dormance, la longévité et la vigueur germinative des semences.

4. Objectifs de la thèse

La plupart des espèces agronomiques sont commercialisées sous forme de semences et la qualité germinative de ces dernières représente un enjeu majeur de l'agriculture. La qualité germinative est une définition opérationnelle qui permet de décrire la performance de la graine au champ. L'objectif des recherches menées au laboratoire est d'approfondir les connaissances sur les facteurs intrinsèques de la graine et leurs interactions avec les facteurs de stress abiotiques qui permettent la germination et la levée homogène dans des conditions

d'environnement variables. L'aptitude à la conservation, la tolérance aux stress ou la dormance sont des composantes de la qualité germinative. Ces propriétés sont progressivement acquises au cours du développement de la graine.

MtSNF4b est une protéine spécifiquement accumulée en fin de maturation dans les semences de *Medicago truncatula*. L'implication de cette protéine dans la longévité et la vigueur germinative en fait un candidat intéressant en vue de l'amélioration de la qualité des semences (Rosnoblet et al., 2007). Pour autant, de nombreuses interrogations subsistent quant à son fonctionnement dans la graine. Dans les travaux précédents, le rôle de MtSNF4b dans les graines de *M. truncatula* a été caractérisé pendant la maturation et le vieillissement accéléré. Certaines observations semblaient indiquer une différence de profil de germination entre des graines de type sauvage et des graines mutantes *MtSNF4b*.

Le but de cette thèse est de caractériser le rôle de MtSNF4b dans la germination des graines de *M. truncatula* et d'identifier les voies de signalisations liées à MtSNF4b. Pour ce faire, une analyse physiologique a été réalisée dans le but de déterminer l'impact de l'extinction de *MtSNF4b* sur la dormance et la germination des graines de *M. truncatula* dans différentes conditions d'imbibition (chapitre 1). Des tests de germination en présence d'hormones et de sucres visent à identifier la ou les voies de régulation affectées par l'extinction de MtSNF4b. L'étude du transcriptome de graines imbibées après différentes périodes de PMS a été réalisée dans le but d'identifier les voies régulées par MtSNF4b à l'échelle du transcrit (chapitre 2). Les résultats de ces analyses semblent indiquer un rôle de régulation de gènes liés au stress biotique. Afin d'évaluer l'impact de MtSNF4b sur le développement de pathogènes bactériens, une caractérisation du pathosystème *M. truncatula* vs *Xanthomonas* a été réalisée sur plantes entières avant d'étudier l'inoculation de deux souches contrastées de *Xanthomonas* dans des graines en cours d'imbibition (chapitre 3). Enfin, la recherche des partenaires de MtSNF4b a été réalisée par le biais d'une approche de complémentation fonctionnelle de mutant de levure $\Delta snf4$ et de double hybride bactérien dirigé et non dirigé (chapitre 4).

Chapitre 1 :
**Caractérisation physiologique et
biochimique de la germination des
semences RNAi *MtSNF4b* de *M.*
truncatula.**

Les mutants RNAi *MtSNF4b* de *M. truncatula* étudiés dans le laboratoire ont principalement été caractérisés pendant la maturation. Sur les quatre lignées RNAi *MtSNF4b* dans lesquelles l'expression de *MtSNF4b* est éteinte (Rosnoblet et al., 2007), les graines de la génération T3 sont utilisées. En plus de ces lignées, un criblage par PCR sur 30-40 plantules des plantes hétérozygotes de deux témoins différents a été réalisé pour sélectionner des homozygotes. Le témoin RNAi vide est une lignée de *M. truncatula* cv. R108, transformée avec le vecteur vide utilisé pour obtenir les mutants RNAi *MtSNF4b*, qui sert au contrôle de l'impact de la transformation. Le témoin RNAi est une lignée de *M. truncatula* cv. R108, transformée avec le vecteur contenant la région proximale du promoteur de *MtENOD40-1*, qui sert au contrôle de l'activation du système RNAi. En plus d'une modification de la teneur en oligosaccharides dans les graines matures, l'extinction de *MtSNF4b* réduit la longévité et la vigueur des semences imbibées après un vieillissement accéléré (Rosnoblet et al., 2007). Cependant les travaux préliminaires réalisés au sein de l'UMR ont également mis en évidence des différences de vitesse de germination entre des lignées de type sauvage et des lignées mutantes *MtSNF4b*. Ces différences de profils de germination peuvent être dues à des différences de dormance entre les lignées exprimant *MtSNF4b* et les lignées mutantes. Dans ce chapitre le lien entre *MtSNF4b* et la dormance des semences de *M. truncatula* a été étudié physiologiquement et biochimiquement.

Dans un premier temps la dormance des semences de *M. truncatula* cv. R108 nécessitait d'être caractérisée du fait d'une absence d'analyses détaillées. Dans un second temps, une caractérisation de l'abondance et de la localisation de *MtSNF4b* dans le type sauvage et les mutants RNAi *MtSNF4b* a été réalisée. Puis le rôle de *MtSNF4b* lors de la germination a été analysé en utilisant des mutants RNAi *MtSNF4b* disponibles dès le début de cette thèse. L'analyse de ces mutants a été réalisée au travers d'analyses physiologiques de la germination dans différentes conditions d'imbibition, de l'impact du potentiel osmotique et du tégument sur la dormance. Les interactions entre *MtSNF4b*, les hormones ABA et GA, la lumière et les sucres ont été évaluées par le biais de tests de germination. Enfin, les teneurs en sucres des graines dormantes et non dormantes au cours de l'imbibition ont été étudiées en lien avec *MtSNF4b*.

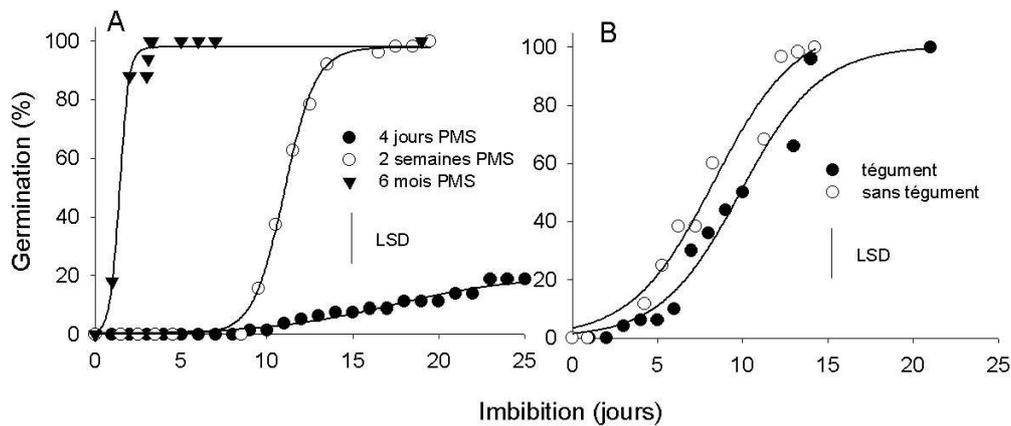


Figure 1.1 : Effet de la PMS et du tégument sur la dormance des semences de *M. truncatula*. (A) Les graines de type sauvage sont imbibées à l'obscurité à 20°C après quatre jours, deux à quatre semaines et six mois de post maturation à sec. (B) Les graines sont imbibées six heures à 20°C puis les téguments sont retirés et les embryons nus sont imbibés à 20°C à l'obscurité. Les données sont significatives lorsque l'écart est supérieur à 22% (LSD : Least square deviation ; PMS : post maturation à sec).

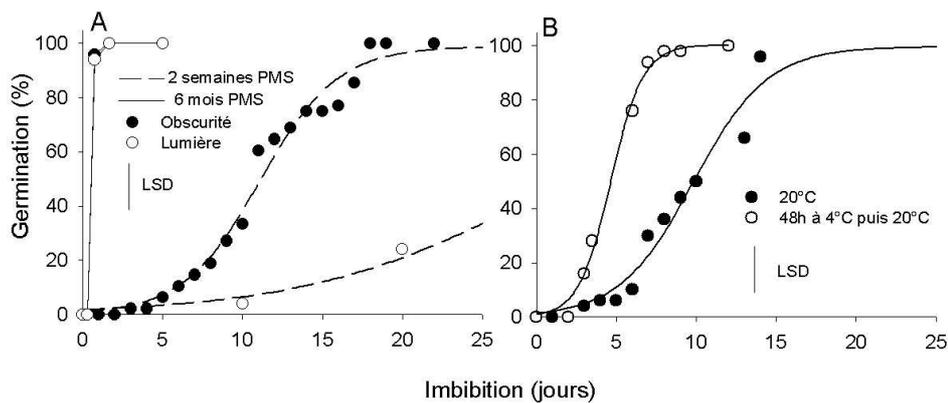


Figure 1.2 : Effet de la lumière et de la stratification sur la dormance de *M. truncatula*. (A) Les graines de type sauvage sont imbibées à la lumière (cercles vides) ou à l'obscurité (cercles pleins) à 20°C après deux semaines (lignes pointillées) et six mois (lignes continues) de post maturation à sec. (B) Les graines sont imbibées directement à 20°C ou bien 48 heures à 4°C avant d'être mises à 20°C. Les données sont significatives lorsque l'écart est supérieur à 22% (LSD : Least square deviation ; PMS : post maturation à sec).

1.1 Caractérisation de la dormance chez *M. truncatula*

La dormance des semences de *M. truncatula* n'ayant jamais été étudiée en détail, une caractérisation préalable est nécessaire à l'étude du rôle de MtSNF4b sur cette dormance. Les graines de *M. truncatula*, comme de nombreuses *Fabaceae*, sont caractérisées par une forte dormance physique liée à l'imperméabilité du tégument à l'eau (Quinlivan et al., 1961). Lors d'une imbibition de graines sèches (0,09g/g de matière sèche) dans l'eau à 20°C, seulement 50% des graines sont imbibées après un mois et 80% après deux mois d'imbibition.

Dans le but d'analyser la dormance physiologique, la dormance physique est levée par scarification des téguments au moyen de disques de papier de verre dans toutes les manipulations permettant ainsi une imbibition simultanée des graines. Chez de nombreuses espèces, la dormance physiologique est levée par la post maturation à sec (PMS). Afin de caractériser la dormance des graines de *M. truncatula*, les gousses sont récoltées au moment de l'abscission et, après dissection, les graines récoltées dans la même semaine sont utilisées pour les analyses comparatives diminuant ainsi la variation biologique. Après quatre jours, deux semaines et six mois de PMS (20°C ; 60% d'humidité relative) les graines sont imbibées à 20°C. Les graines ne germent qu'à 20% au bout de 25 jours lorsqu'elles sont imbibées quatre jours après l'abscission des gousses (Fig. 1.1A). Lorsque l'imbibition a lieu deux semaines après l'abscission des gousses, les graines germent avec une T_{50} d'une dizaine de jours. Enfin, après six mois de PMS, toutes les graines germent en moins de deux jours (Fig. 1.1A).

Le tégument et l'albumen sont généralement les deux enveloppes limitant l'expansion de la radicule en lui opposant une barrière mécanique et sont d'importants régulateurs de la germination dans les graines imbibées (Groot et Karssen, 1987). Afin de savoir si la différence de dormance chez *M. truncatula* est embryonnaire ou tégumentaire, comme observé dans les graines de *Lactuca sativa*, *Lycopersicon esculentum* et *Nicotiana tabacum* (Leubner-Metzger et al., 2005 ; Ni et al., 1993), une analyse de la germination d'embryons extraits de leurs albumens après six heures d'imbibition à 20°C et imbibés seuls à l'obscurité a été menée (Fig. 1.1B). La T_{50} des embryons imbibés dans l'albumen est de 10 jours environ contre six jours et demi pour les embryons imbibés sans téguments. Cette T_{50} de six

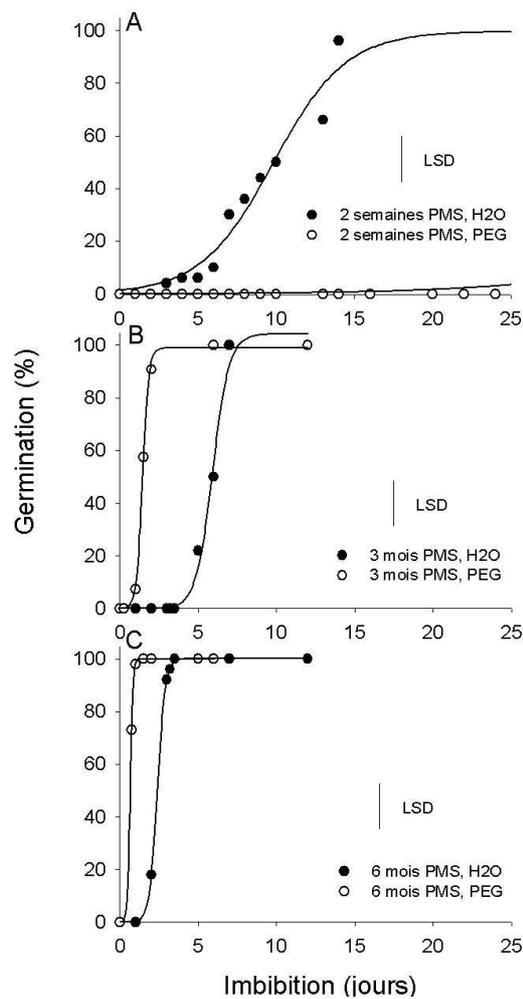


Figure 1.3 : Effet de potentiel hydrique sur la germination des graines de *M. truncatula*. Les graines sont imbibées à 20°C après deux semaines (A), trois mois (B) ou six mois (C) de PMS dans l'eau (symboles pleins) ou dans une solution de PEG à $-0,27\text{MPa}$ (symboles vides). Les données sont significatives lorsque l'écart est supérieur à 22% (LSD : Least square deviation ; PMS : post maturation à sec ; PEG : polyéthylèneglycol).

jours et demi reste quatre fois plus élevée que la T_{50} des graines non dormantes, indiquant que la dormance observée chez *M. truncatula* semble être due à la fois à la résistance de l'albumen et à une dormance physiologique embryonnaire.

Parmi les facteurs connus pour interagir avec la dormance, les effets de la lumière et de la stratification ont été évalués sur les semences de *M. truncatula* (Fig. 1.2). Les semences imbibées après deux semaines de PMS germent en une vingtaine de jours à l'obscurité alors que seulement 20% des graines germent à la lumière à 20°C (Fig. 1.2A). Cette différence n'est pas retrouvée pour les graines imbibées après six mois de PMS qui germent toutes immédiatement et à la même vitesse à la lumière qu'à l'obscurité (Fig. 1.2A). La lumière inhibe donc la germination des graines dormantes de *M. truncatula* ce qui s'oppose aux observations faites chez *A. thaliana* (Shinomura et al., 1996 ; 1998). L'effet de la stratification sur les graines de *M. truncatula* est analysé par une exposition de graines imbibées à quatre degrés Celsius pendant 48 heures après trois semaines de PMS (Fig. 1.2B). La T_{50} de graines imbibées directement à 20°C est de 10 jours environ, alors que celle des graines préalablement stratifiées n'est que de quatre jours. La stratification lève donc la dormance des graines de *M. truncatula*.

Le potentiel hydrique de base est une caractéristique intrinsèque des semences qui représente le plus fort potentiel hydrique du milieu dans lequel des graines peuvent germer (Ni et al., 1993). Afin d'évaluer l'impact de la dormance sur le potentiel de base des graines de *M. truncatula*, l'effet du potentiel hydrique du milieu sur germination en fonction de la durée de PMS est mesuré en imbibant les semences dans l'eau où dans une solution de polyéthylène glycol (PEG) à -0,27 MPa (Fig. 1.3). Les semences imbibées dans l'eau à 20°C après deux semaines de PMS germent à 100% en une vingtaine de jours. Les mêmes semences imbibées dans une solution de PEG à -0,27 MPa n'ont pas encore germé après 25 jours d'imbibition (Fig. 1.3A). Lorsque les graines sont imbibées après trois mois de PMS, la T_{50} passe de 35 heures à 141 heures (Fig. 1.3B). Après six mois de PMS, la T_{50} est de 17 heures pour les graines imbibées dans l'eau et de 57 heures pour celles imbibées dans la solution de PEG à -0,27 MPa (Fig. 1.3C). Comme attendu, l'effet du potentiel hydrique sur la germination décroît avec la levée de la dormance, signifiant que le potentiel de base des semences de *M. truncatula* diminue avec le temps de PMS.

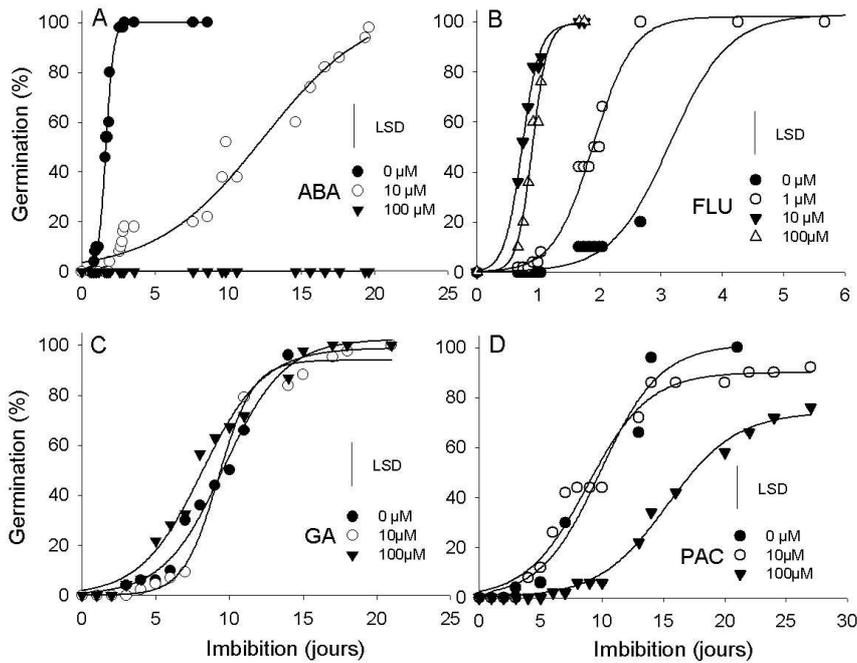


Figure 1.4 : Sensibilité de la germination de *M. truncatula* à l'acide abscissique et à l'acide gibbérellique. Les semences de type sauvage sont imbibées après deux à quatre semaines (B,C et D) ou après six mois de PMS (A) et imbibées dans un gradient de ABA (A), de GA (B), d'un inhibiteur de la synthèse d'ABA, le fluridone (C) et d'un inhibiteur de la synthèse de paclobutrazol (D). Les données sont significatives lorsqu'elles montrent plus de 22% d'écart (LSD : Least square deviation).

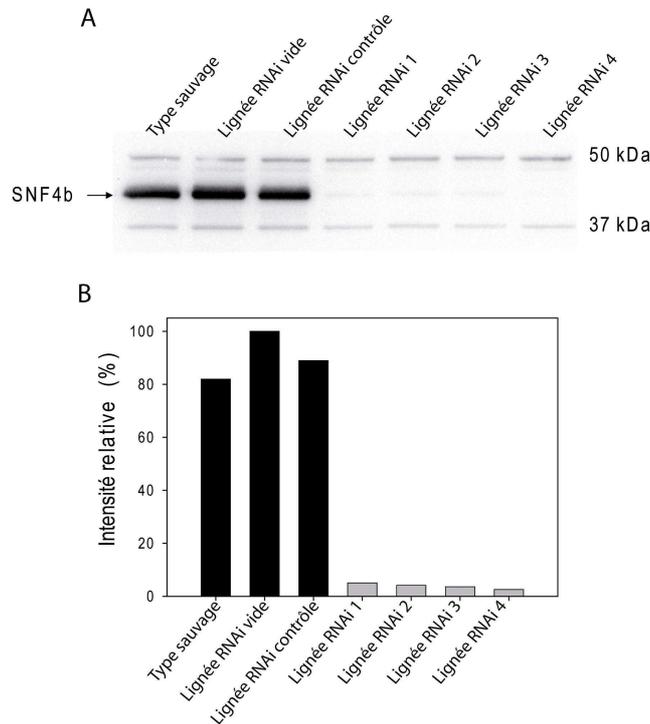


Figure 1.5 : Expression de la protéine MtSNF4b dans les différentes lignées de graines. (A) Analyse par western blot avec un anticorps anti-SNF4b sur quatre lignées de graines RNAi *MtSNF4b* indépendantes et trois lignées de graines témoins dont le type sauvage, les graines transformées avec le vecteur vide (lignée RNAi vide) ou transformées avec le même vecteur contenant une construction RNAi dirigée contre la région proximale du promoteur de *MtENOD40-1* (lignée RNAi contrôle). Les protéines totales sont extraites sur des graines après six heures d'imbibition à 20°C à la lumière. (B) La quantité relative de MtSNF4b a été mesurée avec le logiciel QuantityOne (Biorad) et exprimée en pourcentage de l'intensité maximum (lignée RNAi vide).

1.2 Dormance et balance acide abscissique /acide gibbérellique chez *M. truncatula*

Les deux hormones majeures impliquées dans la germination sont l'acide gibbérellique (GA) et l'acide abscissique (ABA) (Bewley et Black, 1994). L'ABA est la principale hormone induisant et maintenant la dormance dans les graines imbibées alors que le GA est l'hormone majeure de promotion de la germination (Finch-Savage et Leubner, 2006). Afin de comprendre le rôle de ces deux hormones dans la dormance et la germination des semences de *M. truncatula*, des graines sont imbibées dans différentes concentrations d'ABA, de GA et d'inhibiteurs de leur synthèse respective : le fluridone et le paclobutrazol.

L'ABA à 10 μ M inhibe la germination des graines de *M. truncatula* imbibées après six mois de PMS, induisant un délai de T₅₀ de neuf jours par rapport aux graines imbibées dans l'eau, pour lesquelles la population germe totalement en deux jours (Fig. 1.4A). L'ABA à 100 μ M inhibe totalement la germination des graines de *M. truncatula* (Fig. 1.4A). Le fluridone, un inhibiteur de la synthèse des caroténoïdes dont dérive l'ABA, montre l'effet opposé sur les graines dormantes (Fig. 1.4B). A partir de 1 μ M, le fluridone inhibe la germination des graines imbibées après deux à quatre semaines de PMS (Fig. 1.4B). La T₅₀, de trois jours dans l'eau, passe à deux jours dans 1 μ M de fluridone et diminue jusqu'à un minimum compris entre 18 et 22 heures pour les concentrations de 10 et 100 μ M (Fig. 1.4B).

Le GA n'induit pas de différences significatives des profils de germination pour les deux concentrations testées (10 et 100 μ M) par rapport à une imbibition dans l'eau après deux semaines de PMS (Fig. 1.4C). Ce résultat inattendu a été confirmé sur plusieurs lots de semences (données non-montrées). Le paclobutrazol, un inhibiteur de la synthèse de GA, n'a pas d'effet sur la germination à une concentration de 10 μ M (Fig. 1.4D). Une augmentation de la concentration à 100 μ M induit une augmentation de la T₅₀ qui passe de 10 à 17,4 jours (Fig. 1.4D). Ces résultats diffèrent de ceux obtenus chez *N. tabacum* et *A. thaliana*, pour lesquels des concentrations de 100 μ M de GA suffisent à induire un effet sur la germination (Grappin et al., 2000 ; Ali Rachedi et al., 2004). Il semble donc que la balance ABA/GA ne régule pas la dormance chez *M. truncatula* comme chez les autres espèces.

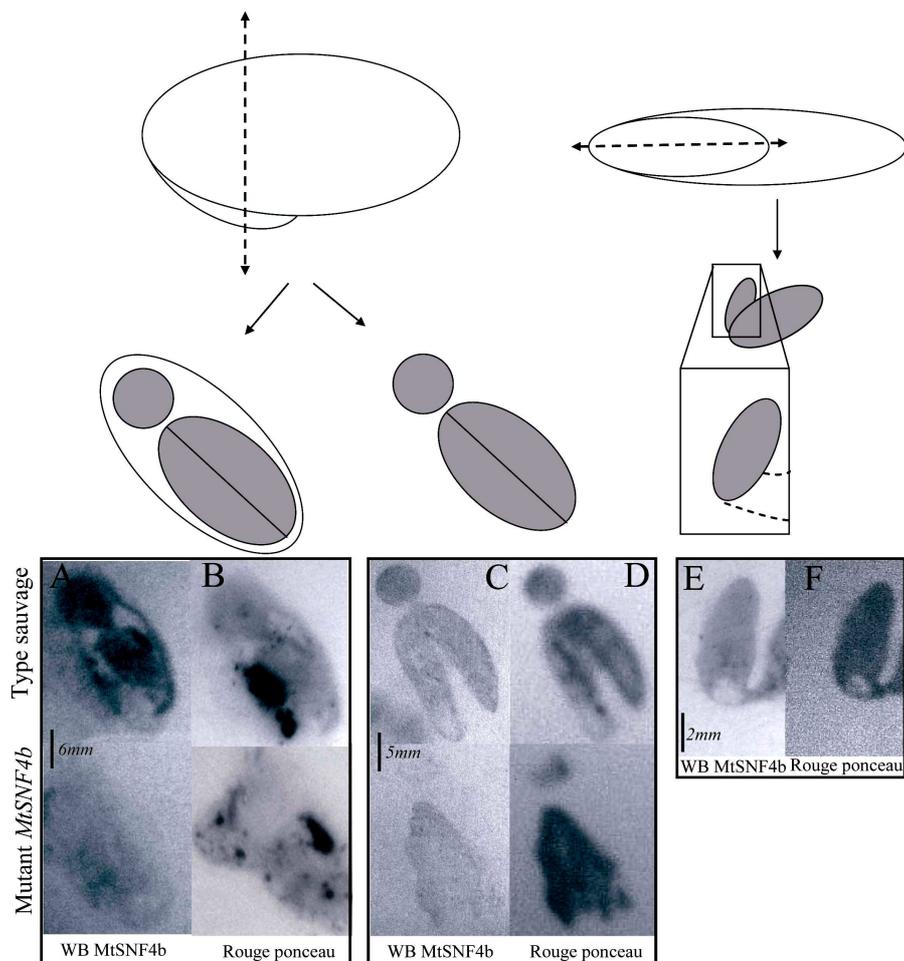


Figure 1.6 : Localisation *in situ* de la protéine MtSNF4b analysée par western blot d'une empreinte tissulaire. Les empreintes de coupes transversales de graines entières (A et B), d'embryons (C et D) et de coupes longitudinales axiales de radicules (E et F) sont révélées sur membranes de nitrocellulose par western blot anti-MtSNF4b (A, C et E) et par coloration au rouge ponceau (B, D, et F). Les empreintes supérieures sont réalisées à partir de coupes de type sauvage et les empreintes inférieures, servant de contrôle négatif du bruit de fond (aspécifique), sont réalisées à partir de coupe de graines RNAi *MtSNF4b*.

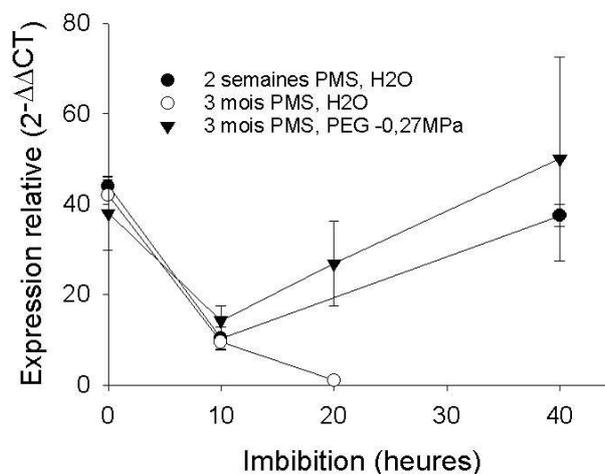


Figure 1.7 : Expression de *MtSNF4b* en fonction de la post maturation et du potentiel hydrique. Expression relative des transcrits (\pm écart type) de *MtSNF4b* dans les graines pendant l'imbibition à 20°C dans l'eau après 2-3 semaines de PMS ou après six mois de PMS. Chaque extraction d'ARN est réalisée sur 50 graines et l'écart type est donné pour trois réplicats techniques par point.

1.3 Expression de la protéine MtSNF4b dans les graines

Afin de comprendre le rôle de MtSNF4b dans les semences de *M. truncatula*, une extinction du gène *MtSNF4b* a précédemment été réalisée au moyen d'une technique d'ARN interférence (RNAi) permettant l'obtention de quatre lignées RNAi *MtSNF4b* indépendantes. Pour vérifier l'impact de la transformation et de l'activation du mécanisme RNAi dans les plantes transformées, deux lignées de contrôle ont également été sélectionnées au cours de cette thèse. Le témoin RNAi vide, qui sert au contrôle de l'impact de la transformation, est une lignée de *M. truncatula* cv. R108 transformée avec le vecteur vide utilisé pour obtenir les mutants RNAi *MtSNF4b*. Le témoin RNAi est une lignée de *M. truncatula* cv. R108, transformée au moyen du même vecteur contenant une construction RNAi ciblant la partie 5'UTR du gène *MtENOD40-1*. Un criblage par PCR sur 30-40 plantules provenant des graines des plantes hétérozygotes de ces deux témoins a été réalisé pour sélectionner des homozygotes. L'extinction de l'expression de *MtSNF4b* a été analysée par western blot, au moyen d'un anticorps anti-MtSNF4b sur des extraits de protéines solubles provenant de graines imbibées six heures. La protéine MtSNF4b est exprimée dans les lignées de contrôle et la lignée de type sauvage (Fig. 1.5). Par contre, les graines RNAi *MtSNF4b* montrent une forte diminution de l'expression, ce qui démontre l'efficacité de la construction RNAi *MtSNF4b* (Fig. 1.5).

Dans le but d'orienter notre recherche sur rôle de MtSNF4b, sa localisation *in situ* dans les graines et les différents organes de l'embryon a été effectuée par une technique d'empreintes de tissus révélées par western blot. L'analyse d'empreintes de tissus a été réalisée à l'aide d'un anticorps anti-MtSNF4b sur des coupes transversales de graines entières et d'embryons et des coupes longitudinales axiales de radicules provenant de graines imbibées pendant six heures. Les coupes ont été réalisées en parallèle sur des graines de type sauvage et des graines mutantes RNAi *MtSNF4b*. Les coupes de graines mutantes servent de contrôles négatifs lors de la détection par l'anticorps anti-*MtSNF4b* (Fig. 1.6A, 1.6C et 1.6E). Les empreintes réalisées sur des membranes de nitrocellulose sont également révélées au rouge ponceau afin de s'assurer de l'homogénéité de l'impression protéique (Fig. 1.6B, 1.6D et 1.6F). L'empreinte de graine entière détectée par un anticorps anti-MtSNF4b est nettement

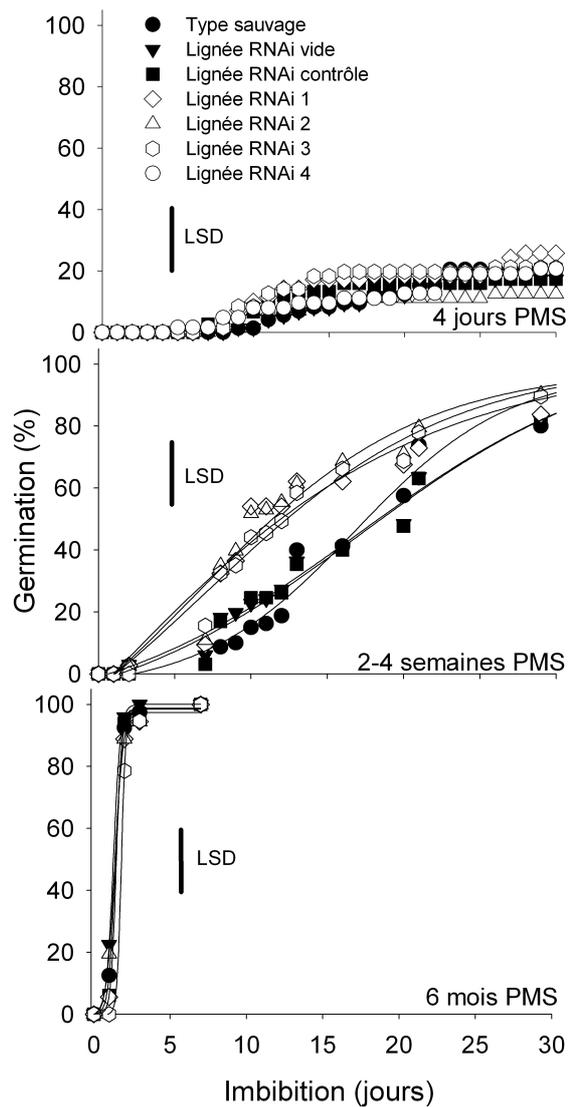


Figure 1.8 : Effet de la post maturation sur la dormance des graines de RNAi *MtSNF4b*. Les graines de type sauvage, les contrôles (symboles pleins) et les graines RNAi *MtSNF4b* (symboles vides) sont imbibées à l'obscurité à 20°C après 4 jours (A), 2-4 semaines (B) et 6 mois (C) de post maturation à sec (PMS). Les données sont significatives lorsque l'écart est supérieur à 22% (LSD : Least square deviation ; PMS : post maturation à sec).

plus intense pour la graine de type sauvage que pour la graine RNAi *MtSNF4b*, ce qui démontre la spécificité de la détection (Fig. 1.6A). L’empreinte du type sauvage indique une présence de MtSNF4b à la fois dans l’embryon et dans l’albumen/tégument (Fig. 1.6B). Les empreintes réalisées sur graines entières révélées au rouge ponceau sont d’intensité similaire dans le type sauvage et la lignée RNAi *MtSNF4b*, ce qui confirme l’équivalence des quantités de protéines déposées (Fig. 1.6B). Afin de mesurer de la répartition de MtSNF4b entre la radicule et les cotylédons, des empreintes de coupes transversales d’embryons seuls ont été réalisées (Fig. 1.6C et 1.6D). L’intensité de l’empreinte est la même pour les cotylédons et la radicule de la coupe transversale de l’embryon de type sauvage alors que la détection reste faible pour l’empreinte laissée par l’embryon RNAi *MtSNF4b* (Fig. 1.6C). De même, à l’intérieur de ces deux organes, l’empreinte semble homogène. Dans le but de confirmer la répartition homogène de MtSNF4b dans la radicule, une empreinte de coupe longitudinale suivant le plan de symétrie de la graine a été réalisée (Fig. 1.6E et 1.6F). L’empreinte révélée par l’anticorps anti-MtSNF4b est homogène dans toute la radicule (Fig. 1.6E). Ces résultats n’indiquent pas de répartition particulière de la protéine MtSNF4b dans l’embryon de *M. truncatula*.

1.4 Rôle de MtSNF4b dans la dormance et la post maturation à sec

L’expression de *LeSNF4b*, l’homologue de *MtSNF4b* chez *L. esculentum*, est maintenue dans les graines dont la germination est bloquée par la dormance ou l’ABA et décroît dans les graines achevant leur germination (Bradford et al., 2003). Afin de savoir si l’expression du gène *MtSNF4b* est régulée en lien avec la dormance chez *M. truncatula* (comme démontré pour son homologue *LeSNF4* de la tomate), cette expression a été analysée au cours de l’imbibition par une transcription inverse suivie d’une PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR). Dans les embryons dormants, imbibés après deux à trois semaines de PMS, la quantité de transcrits *MtSNF4b* est équivalente à celle observée dans les graines sèches après 40 heures d’imbibition (Fig. 1.7). Par contre, dans des graines non dormantes imbibées dans l’eau après six mois de PMS, la quantité de transcrits diminue après 20 heures d’imbibition, avant la germination. L’expression de *MtSNF4b* dans les mêmes graines non dormantes

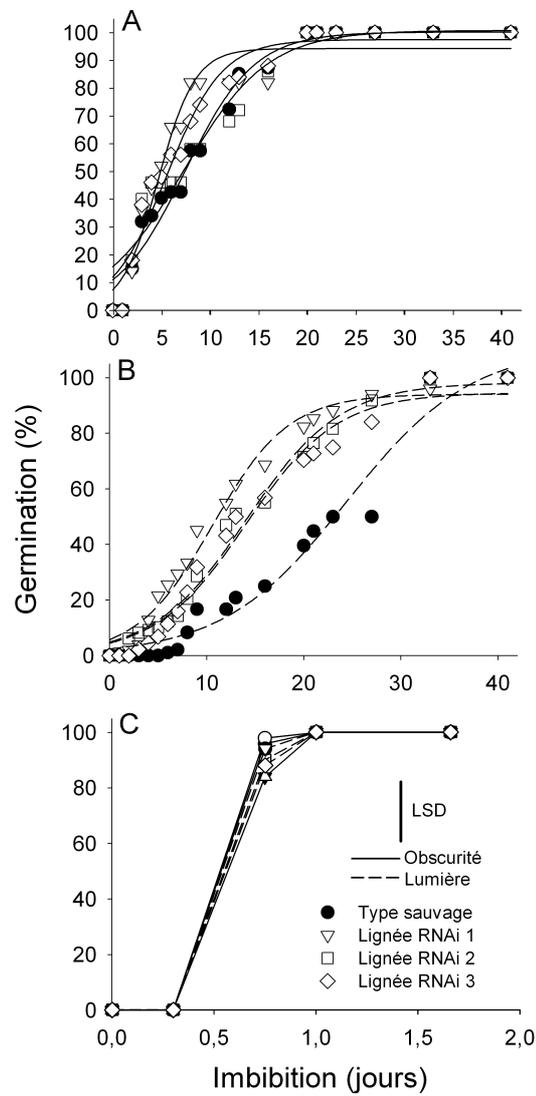


Figure 1.9 : Effet de la lumière sur la germination de semence de *M. truncatula* RNAi *MtSNF4b*. Les graines de type sauvage et de trois lignées RNAi *MtSNF4b* sont imbibées à l'obscurité (A et C) et à la lumière (B) à 20°C après deux mois (A et B) ou six mois (C) de post maturation à sec. Les données sont différentes de façon significative lorsqu'elles montrent plus de 22% d'écart (LSD : Least square deviation).

imbibées dans une solution de PEG à -0,27 MPa montre un profil d'expression identique à celui des graines dormantes.

Puisque l'expression de *MtSNF4b* est maintenue dans les graines dormantes pendant l'imbibition, nous avons voulu savoir si *MtSNF4b* joue un rôle dans la dormance de *M. truncatula*. Pour caractériser les graines, les plantes de type sauvage, les deux témoins ainsi que quatre lignées RNAi *MtSNF4b* sont cultivées simultanément dans une enceinte climatique. A maturité, déterminée par abscission des gousses de la plante-mère, les graines de gousses récoltées tous les 15 jours sont assemblées dans un lot et les analyses comparatives sont faites sur les graines de même date de récolte. Les graines de type sauvage et RNAi *MtSNF4b* sont imbibées à 20°C et à l'obscurité après différentes durées de PMS. Lorsque les graines sont imbibées immédiatement après l'abscission des gousses, elles montrent toutes une germination faible et lente de seulement 30% après 30 jours à 20°C (Fig. 1.8A). Pour une post maturation intermédiaire, de deux à quatre semaines, les graines RNAi *MtSNF4b* germent deux fois plus vite que les graines de type sauvage (Fig. 1.8B). Ce phénomène a pu être observé sur de nombreuses récoltes indépendantes et est retrouvé pour une durée allant de quelques semaines à un mois de PMS. Après six mois de PMS, toutes les graines germent dans les 24 heures, sans montrer de différence de profils de germination des mutants face au type sauvage (Fig. 1.8C). L'extinction de *MtSNF4b* semble donc induire une augmentation de la vitesse de la PMS des graines de *M. truncatula*, se traduisant par une levée plus rapide de la dormance.

Dans la section 1.1, il est montré que la dormance des semences de *M. truncatula* est renforcée quand les graines sont imbibées à la lumière (Fig. 1.2). Afin de savoir si le gène *MtSNF4b* est impliqué dans l'effet de la lumière sur la dormance, des graines sont imbibées à l'obscurité et en lumière continue. Les graines RNAi *MtSNF4b* et de type sauvage imbibées à l'obscurité après deux mois de PMS germent avec une T_{50} déjà réduite à six jours sans montrer de différence de profil de germination (Fig. 1.9A). Ces graines ne présentent plus de différence de vitesse de germination du fait d'une levée partielle de la dormance. Les mêmes graines imbibées à la lumière germent plus lentement que lorsqu'elles sont imbibées à l'obscurité (Fig. 1.9B). L'effet de la lumière semble plus important sur la dormance du type sauvage qui germe deux fois moins vite que les graines RNAi *MtSNF4b*, atteignant respectivement leurs T_{50} en 25 jours et en 10 à 13 jours (Fig. 1.9B). Par contre, la lumière n'a

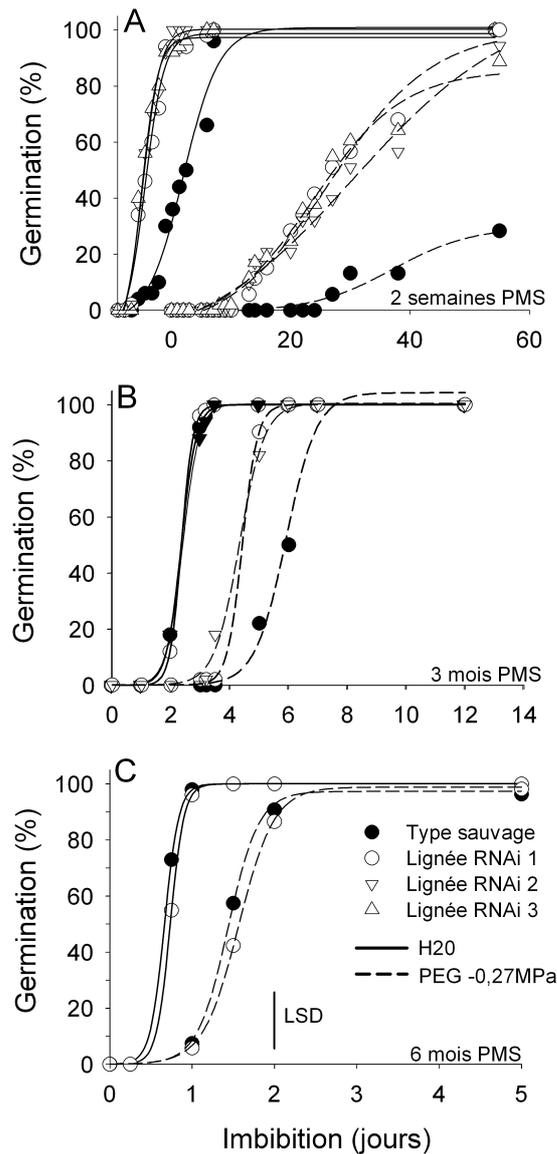


Figure 1.10 : Effet combiné du stress hydrique et de la post maturation sur la dormance des graines RNAi *MtSNF4b*. Les graines sont imbibées dans l'eau (ligne continue), ou dans une solution de PEG à 0,27MPa (ligne pointillée) après 2-3 semaines (A), 2 mois (B) et 6 mois de post maturation (C) de post maturation (AR). Les données sont significatives lorsque l'écart est supérieur à 22% (LSD: Least square deviation; PMS: post maturation à sec; PEG: polyéthylèneglycol).

aucun effet sur la germination dans les graines non dormantes imbibées après six mois de PMS (Fig. 1.9C). A l'obscurité comme à la lumière, toutes les graines germent entre 16 et 24 heures d'imbibition (Fig. 1.9C). L'extinction de *MtSNF4b* semble donc affecter la sensibilité de la dormance à la lumière pendant l'imbibition.

Le potentiel hydrique du milieu est un des facteurs majeurs contrôlant la dormance et la germination pendant l'imbibition. Il a également été démontré que la PMS conduit à une réduction du potentiel hydrique de base des graines de *C. melo* (Welbaum et al., 1991 ; Ni et al., 1992). Afin de savoir si l'extinction de *MtSNF4b* affecte la dormance en altérant le potentiel osmotique de base, les graines sont imbibées dans des solutions de PEG après les différentes durées de PMS (Fig. 1.10A-C). L'incubation de graines après deux semaines de PMS dans une concentration de PEG à -0,27 MPa inhibe la germination des graines de type sauvage : elles ne germent qu'à 30% après trois mois d'imbibition (Fig. 1.10A). Dans les mêmes conditions d'imbibition, les graines RNAi *MtSNF4b* présentent un délai de germination d'un mois et demi par rapport à une incubation dans l'eau mais germent totalement après une soixantaine de jours d'imbibition (Fig. 1.10A). Après trois mois de PMS, les graines de type sauvage et les lignées RNAi *MtSNF4b* germent à la même vitesse lorsqu'elles sont imbibées dans l'eau, soit une germination totale de la population en 72 heures (Fig. 1.10B). Une incubation dans une solution de PEG de -0,27 MPa après trois mois de PMS conduit à un retard de germination du type sauvage deux fois plus important que celui des lignées RNAi *MtSNF4b* (Fig. 1.10B). La différence de germination entre le type sauvage et les mutants RNAi *MtSNF4b* est donc ré-induite par une incubation dans une solution de potentiel hydrique plus bas que l'eau. Après six mois de PMS, les graines germent à 100% après seulement 24 heures d'imbibition sans différences entre le type sauvage et les lignées RNAi *MtSNF4b* (Fig. 1.10C). Lorsque ces graines sont imbibées dans une solution de PEG à -0,27 MPa, un retard de germination est observé dans toutes les lignées, mais aucune différence n'est observé entre les profils germinatif les lignées RNAi *MtSNF4b* et le type sauvage (Fig. 1.10C). L'extinction de *MtSNF4b* semble donc jouer un rôle dans la levée de la dormance des semences de *M. truncatula* en altérant, directement ou indirectement, leur potentiel osmotique de base.

La dormance endogène physiologique embryonnaire est une des composantes de la dormance. Comme *MtSNF4b* est localisée à la fois dans l'embryon et le tégument, nous avons voulu dissocier l'impact de l'extinction de *MtSNF4b* sur la dormance embryonnaire de celle liée à l'albumen. Pour ce faire, des embryons de type sauvage et RNAi *MtSNF4b* ont été

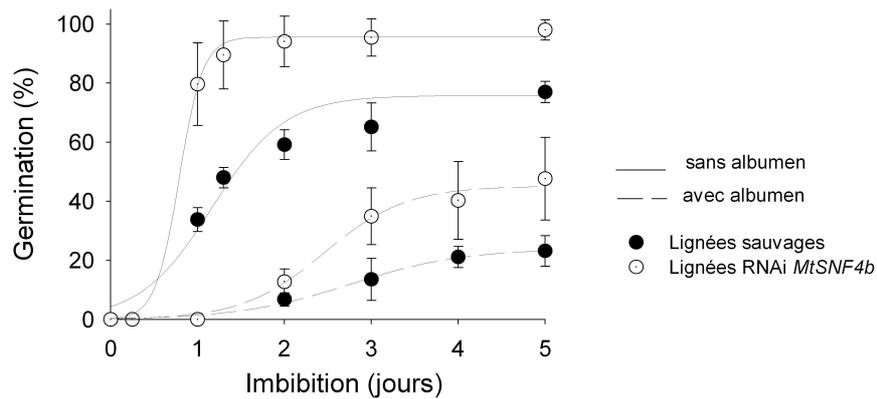


Figure 1.11: Effet de l'extinction de *MtSNF4b* sur la dormance embryonnaire à la lumière. Chaque courbe représente la moyenne de trois réplicats biologiques pour chaque point. Les lignées RNAi (symbole vide) sont les moyennes des trois lignées RNAi *MtSNF4b* et les lignées sauvages (symbole plein) sont les moyennes de la lignée de type sauvage, la lignée RNAi contrôle et la lignée RNAi vide. Les graines entières (lignes pointillées) et embryons nus (lignes pleines) ont été imbibés à la lumière à 20°C. Les embryons ont été isolés des graines après six heures d'imbibition. Les écart-types sont représentés pour chaque point.

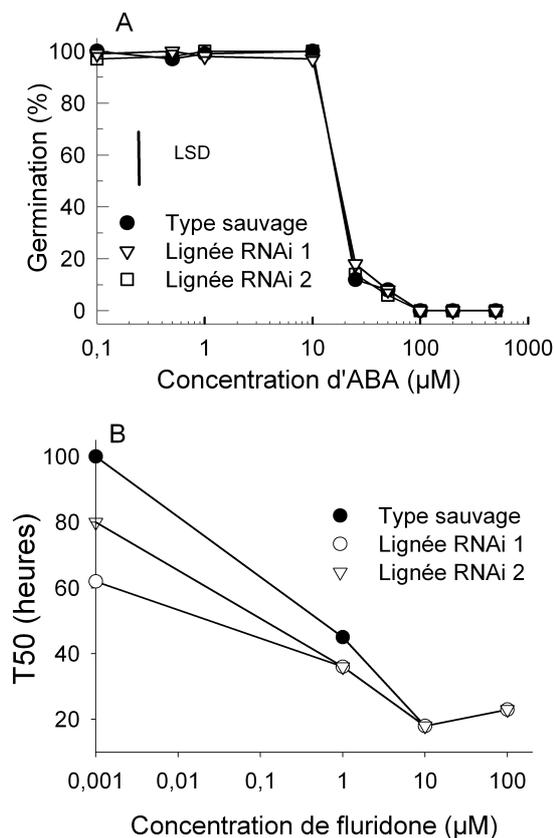


Figure 1.12 : Effet de l'ABA et du fluridone sur la dormance des semences RNAi *MtSNF4b*. Les graines de type sauvage et deux lignées RNAi indépendantes ont été imbibées dans différentes concentrations d'ABA (A) et de fluridone (B). Le pourcentage de germination après un mois d'imbibition est utilisé pour évaluer la sensibilité à l'ABA et la T_{50} pour la sensibilité au fluridone.

imbibés six heures avant d'être extraits des albumens, à la lumière et à 20°C. Des contrôles de germination ont été réalisés sur des graines entières imbibées à la lumière. Ces graines entières RNAi *MtSNF4b* germent significativement plus rapidement que les graines de type sauvage (Fig. 1.11). Les embryons nus de toutes les lignées germent plus rapidement que les embryons enveloppés par les albumens (Fig. 1.11). Bien que moins marquée, la différence de profil de germination entre embryons nus de type sauvage et RNAi *MtSNF4b* est toujours observée, bien que moins marquée. Ce résultat semble indiquer un rôle de *MtSNF4b* dans la dormance embryonnaire physiologique des embryons de *M. truncatula*.

1.5 Sensibilité à l'ABA et au GA des mutants RNAi *MtSNF4b*

L'ABA est un important régulateur positif de l'induction de la dormance pendant la maturation des graines et du maintien de cet état de dormance dans les graines imbibées (Grappin et al., 2000). Des données obtenues ultérieurement ont montré que la protéine *MtSNF4b* est induite dans des embryons immatures de *M. truncatula* incubés dans l'ABA et que les graines de type sauvage et les graines RNAi *MtSNF4b* ont des teneurs en ABA équivalentes pendant l'imbibition (Annexe 1). Au contraire, la sensibilité des semences au GA augmente avec le levée de la dormance (Hilhorst et al., 1986). Or l'expression de l'homologue de *MtSNF4b* chez la tomate, *LeSNF4*, est réprimée dans des graines au cours de l'imbibition par une application de GA (Bradford et al., 2003). L'implication de l'extinction de *MtSNF4b* dans la sensibilité à l'ABA et au GA a donc été évaluée. Des graines de type sauvage et de lignées RNAi *MtSNF4b* sont imbibées dans des concentrations d'ABA, de GA et de deux inhibiteurs de leur synthèse respective, le fluridone et le paclobutrazol. Le pourcentage final de germination est utilisé comme indicateur de la sensibilité à l'ABA (Fig. 1.12A) et la T_{50} comme indicateur de la sensibilité au GA et aux deux inhibiteurs (Fig. 1.12B et 1.13).

Les graines de *M. truncatula* imbibées dans différentes concentrations d'ABA germent toutes dans des concentrations de 0 à 10 μ M d'ABA alors qu'au delà de 100 μ M d'ABA plus aucune graine ne germe, indépendamment du génotype (Fig. 1.12A). L'extinction de *MtSNF4b* ne modifie donc pas la sensibilité des graines à l'application exogène d'ABA pendant l'imbibition. Des graines de type sauvage et RNAi *MtSNF4b* sont imbibées après

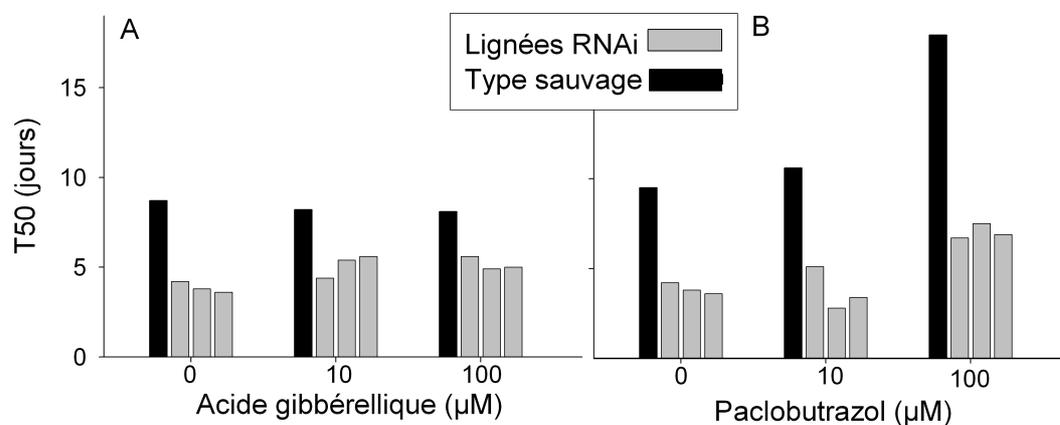


Figure 1.13 : Effet de l'acide gibbérellique et du paclobutrazol sur la T_{50} des graines de *M. truncatula*. Les graines de type sauvage (barres noires) et de trois lignées RNAi *MtSNF4b* indépendantes sont imbibées dans des solutions de GA (A) ou de paclobutrazol (B) (10 et 100 μM) à 20°C après deux semaines de PMS. La T_{50} est déterminée par la durée d'imbibition nécessaire à ce que 50% des graines germent.

trois semaines de PMS dans différentes concentrations de fluridone. Tous les géotypes montrent une accélération de la germination dont la T_{50} est atteinte en 20 heures au delà d'une concentration de 10 μ M (Fig. 11B).

Lors de leur imbibition dans des concentrations de 10 μ M et 100 μ M de GA, les graines de type sauvage montrent une T_{50} de huit jours et les graines RNAi *MtSNF4b* de quatre à cinq jours (Fig. 1.13A). Cependant les différentes lignées ne semblent pas sensibles aux deux concentrations de GA ce qui confirme le résultat trouvé sur le type sauvage (section 1.2). Les graines imbibées dans du paclobutrazol montrent une augmentation de la T_{50} équivalente à celle des graines de type sauvage et des graines RNAi *MtSNF4b* (Fig. 1.13B). L'extinction de *MtSNF4b* ne semble donc pas affecter la sensibilité des graines de *M. truncatula* à l'ABA et au GA pendant l'imbibition.

1.6 Teneur en sucres solubles en relation avec la dormance.

MtSNF4b joue un rôle dans l'accumulation du stachyose à la fin de la maturation dans les graines de *M. truncatula* (Rosnoblet et al., 2007). Les graines RNAi *MtSNF4b* contiennent deux fois moins de stachyose et deux fois plus de saccharose que les lignées de type sauvage. Cette différence disparaît rapidement au cours de l'imbibition de radicules de graines non dormantes (Rosnoblet et al., 2007). Afin de savoir si *MtSNF4b* joue un rôle dans la dégradation des sucres solubles dans les graines dormantes pendant l'imbibition, les teneurs en glucose, en saccharose et en sucres de la famille des raffinoses ont été analysées par chromatographie en phase liquide à haute performance sur des sucres extraits durant l'imbibition d'embryons sauvages et RNAi *MtSNF4b*, dormants (post maturation de quatre jours) et non dormants (post maturation de six mois). Les courbes de germination associées aux populations de graines utilisées sont représentées dans la Figure 1.8.

Les graines sèches de type sauvage et RNAi *MtSNF4b* contiennent de faibles quantités de glucose (approximativement 0,1 μ g/mg de matière sèche) (Fig. 1.14A). Au cours de l'imbibition, la teneur en glucose des graines imbibées après quatre jours de PMS ne change pas et reste très basse, à la fois dans les lignées de type sauvage et les lignées RNAi *MtSNF4b* (Fig. 1.14A). Par contre, dans les graines imbibées après six mois de PMS, la

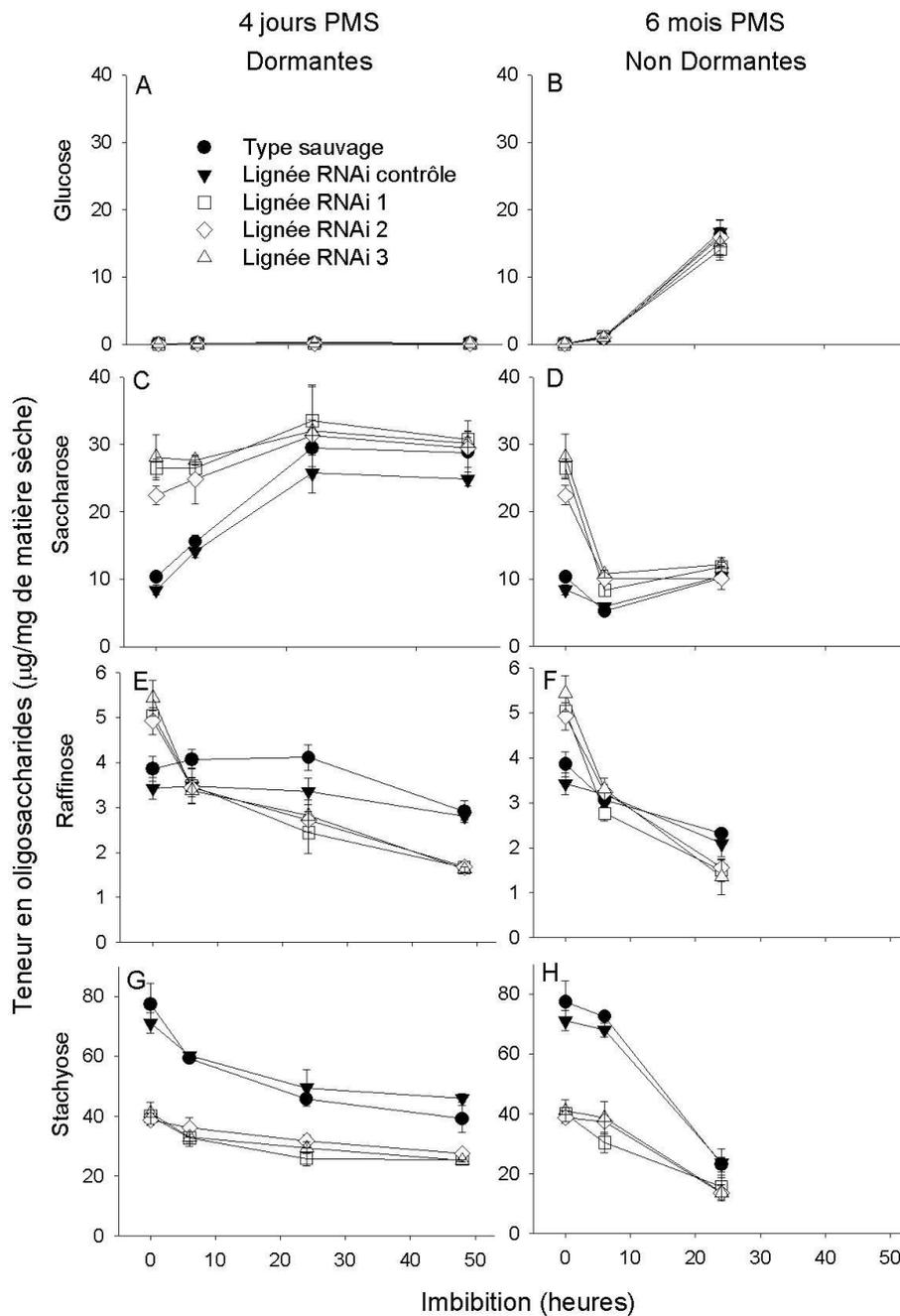


Figure 1.14 : Effet de la post maturation sur la teneur en sucres des graines RNAi *MtSNF4b* pendant l'imbibition. Les teneurs en glucose (A et B), en saccharose (C et D), en raffinose (E et F) et en stachyose (G et H) ont été analysées au cours de l'imbibition à 20°C de graines dormantes, imbibées quatre jours après récolte (A, C, E et G) ou six mois après récolte (B, D, F et H) par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Les écarts types sont représentés pour trois réplicats biologiques par point.

teneur en glucose augmente de la même manière dans le type sauvage que dans les lignées RNAi *MtSNF4b*, jusqu'à 15 µg/mg après 24 heures d'imbibition (Fig. 1.14B). Concernant les sucres non réducteurs, les graines sèches de type sauvage contiennent 10 µg/mg de saccharose alors que les graines sèches RNAi *MtSNF4b* en contiennent deux fois plus (Fig. 1.14C), ce qui confirme les données de Rosnoblet et al. (2007). Dans les embryons sauvages dormants, la quantité de saccharose est multipliée par 2,5 au cours des 48 premières heures d'imbibition et rejoint celle des graines RNAi *MtSNF4b* avec 30 µg/mg (Fig. 1.14C). Dans les embryons sauvages non dormants, la quantité de saccharose diminue transitoirement pendant l'imbibition, restant comprise entre 5 et 10 µg/mg. La teneur en saccharose dans les embryons RNAi *MtSNF4b* secs est de 25 à 30 µg/mg et diminue pour rejoindre celle des embryons sauvages à environ 10 µg/mg de matière sèche après 24 heures d'imbibition (Fig. 1.14D). La quantité de raffinose dans les graines de *M. truncatula* est faible en comparaison des quantités de saccharose et de stachyose. Elle est moins importante dans les graines sèches de lignées RNAi *MtSNF4b* que dans celle de type sauvage. Cette différence s'annule dès six heures d'imbibition dans les graines dormantes et non dormantes, et s'inverse même après 48 heures d'imbibition dans les graines dormantes (Fig. 1.14E et 1.14F). Avec 80 µg/mg de matière sèche, le stachyose est le sucre soluble le plus abondant dans les embryons secs (Fig. 1.14G). Dans les embryons RNAi *MtSNF4b* la teneur initiale en stachyose est deux fois moins importante que dans les embryons de type sauvage (Fig. 1.14G). Dans les embryons dormants de type sauvage, la quantité de stachyose diminue de 80 à 40 µg/mg pendant les 48 premières heures d'imbibition (Fig. 1.14G). Les embryons RNAi *MtSNF4b* montrent également une légère diminution de la teneur en stachyose. Après 48 heures d'imbibition, seule une différence résiduelle de teneur en stachyose de 10 µg/mg est observée entre le type sauvage et les lignées RNAi *MtSNF4b* (Fig. 1.14G). Dans les graines non dormantes, tous les embryons présentent une rapide diminution de la teneur en stachyose au bout de 24 heures d'imbibition (Fig. 1.14H). En conclusion, il semble que *MtSNF4b* ne joue pas de rôle dans le catabolisme des oligosaccharides de la famille des raffinoses pendant l'imbibition des graines. L'accumulation du saccharose, provenant de l'hydrolyse du stachyose dans les graines, et sa diminution dans les graines dormantes par rapport aux non-dormantes, indique que l'hydrolyse du saccharose est bloquée dans les graines dormantes. Effectivement, la conversion de la teneur en sucres montre que la quantité en saccharose, stachyose et raffinose est la même pour toutes les graines et n'évolue pas durant 24 heures d'imbibition

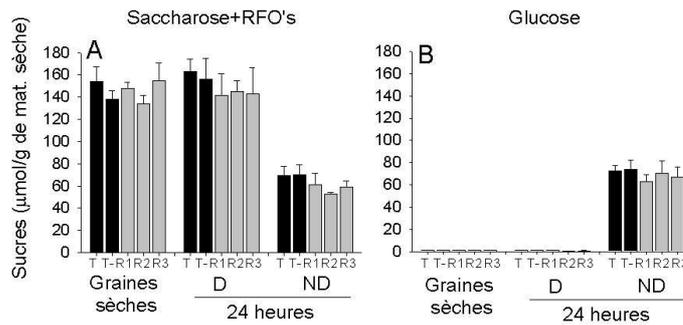


Figure 1.15 : Nombre de molécules de sucres en lien avec l'état de dormance pendant l'imbibition. A partir des masses de différents sucres, la masse molaire permet le calcul de différentes quantités de sucres en $\mu\text{mol/g}$ de matière sèche permettant d'additionner les quantités de sucres entre elles, saccharose+RFOs (A), Glucose (B). Les quantités sont calculées pour le type sauvage (T), la lignée RNAi contrôle (T-) et trois lignées RNAi indépendantes (R1, R2, R3) dans les graines sèches et après 24 heures d'imbibition dans les graines post-maturées 4 jours (D) et post-maturées six mois (ND) par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Les écarts types sont donnés pour chaque point.

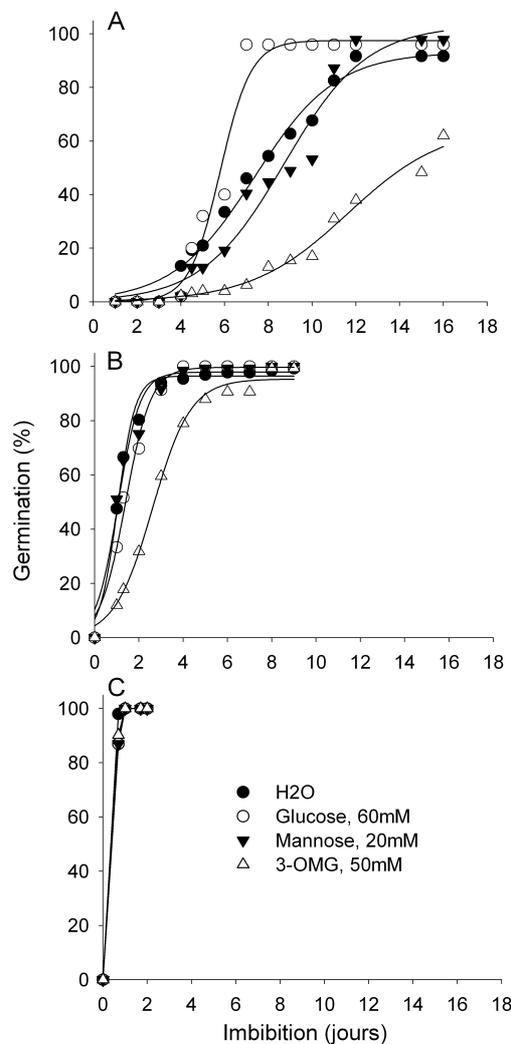


Figure 1.16 : Signalisation des sucres dans la germination de *M. truncatula*. Des graines sont imbibées après deux semaines (A), quatre semaines (B) et un an de PMS (C) dans l'eau (cercles noirs), une solution de glucose à 60 mM (cercles vides), de mannose à 20mM (triangles noirs) et de 3-O-méthylglucose à 50mM (triangles vides). Les courbes de germinations sont la moyenne de trois réplicats de 40 graines chacun.

pour les graines dormantes (Fig. 1.15A) ; ce qui renforce l'hypothèse d'une régulation moléculaire de blocage. Par contre, la quantité cumulée de saccharose, stachyose et raffinose qui disparaît dans les graines non dormantes est de 70 $\mu\text{mol}/\text{mg}$. Cette teneur est équivalente à la quantité de glucose synthétisée dans ces mêmes graines (Fig. 1.15B). L'accumulation de glucose, dérivant du saccharose, est donc liée à la levée de la dormance mais pas à la présence de MtSNF4b pendant l'imbibition de graines de *M. truncatula*.

1.7 Rôle de MtSNF4b dans la signalisation des sucres

Chez *A. thaliana*, une sur-expression de la SnRK1.1 induit une hypersensibilité au glucose (Jossier et al., 2009) et le glucose-6-phosphate serait capable d'inhiber SnRK1 (Toroser et al., 2000). De plus il a été montré que le glucose inhibe la germination des graines d'*A. thaliana* et que cette régulation est liée à la signalisation de l'ABA (Price et al., 2003).

Afin de savoir si *MtSNF4b* est lié à la signalisation des sucres, l'effet des analogues de sucres est d'abord testé sur les graines de type sauvage dormantes (Fig 1.16A). Les graines sont imbibées après deux semaines dans du glucose et deux de ses analogues : le 3-O-méthylglucose (3-OMG), qui est reconnu par les transporteurs d'hexoses mais qui n'est pas phosphorylé par les hexokinases et le mannose qui est phosphorylé par les hexokinases mais pas ou peu métabolisé (Loreti et al., 2001). Les graines dormantes imbibées dans l'eau germent avec une T_{50} de sept jours (Fig. 1.16A). Le glucose semble lever partiellement la dormance des graines en ramenant leur T_{50} à seulement cinq jours. Au contraire, le 3-OMG inhibe la germination en induisant une augmentation de la T_{50} qui double par rapport à l'incubation dans l'eau (Fig. 1.16A). Le mannose n'a pas d'effet sur la germination des graines dormantes.

L'influence de la PMS sur la sensibilité aux sucres est également étudié (Fig. 1.16B et C). Les graines imbibées dans l'eau après quatre semaines de PMS germent avec une T_{50} de 24 heures. Sur ce lot de graines, le glucose n'est plus capable d'augmenter la vitesse de la germination (Fig. 1.16B). Seul le 3-OMG induit une augmentation de la T_{50} qui passe de un à 2,5 jours (Fig. 1.16B). Enfin, lorsque la dormance est totalement levée par un an de PMS, les sucres n'ont plus d'impact sur la germination (Fig. 1.16C).

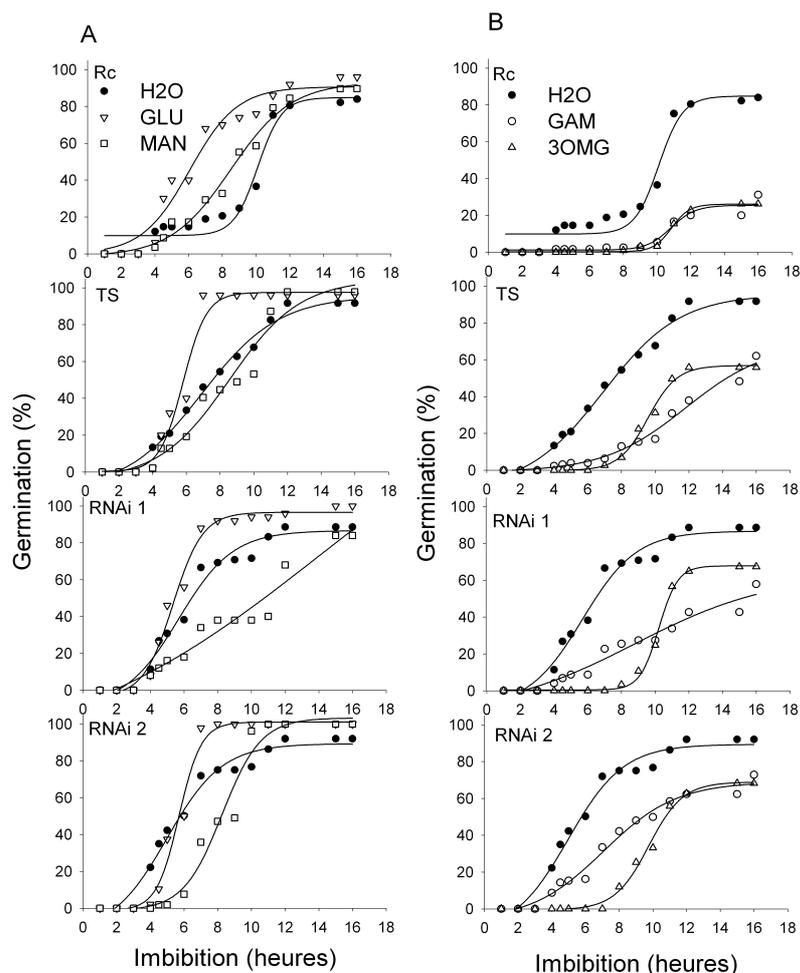


Figure 1.17 : Germination de graines de type sauvage et RNAi *MtSNF4b* en présence de glucose, de mannose, de 3-O-méthylglucose et de glucosamine. (A) Les graines de type sauvage (TS), de type RNAi témoin (Rc), de RNAi *MtSNF4b* (RNAi 1 et RNAi 2), sont imbibées dans du glucose à 60mM (triangles inversés) ou dans du mannose à 20mM (carrés). (B) Les graines sont imbibées dans du glucosamine à 40mM (triangles inversés) ou dans du 3-O-méthylglucose à 50mM (carrés). Des graines imbibées dans l'eau servent de témoins négatifs (ronds noirs). Les courbes sont obtenues à partir de la germination de 50 graines (A) (LSD 22%) ou en faisant la moyenne de trois répétitions de 40 graines (B).

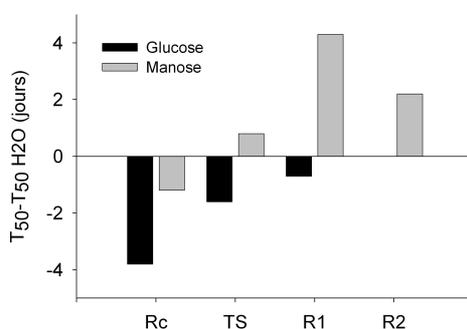


Figure 1.18 : Impact de *MtSNF4b* sur la T_{50} de graines dormantes imbibées dans le glucose et dans le mannose. Des graines de type sauvage et de deux lignées RNAi *MtSNF4b* sont imbibées après deux semaines de PMS dans des solutions de glucose à 60mM (barres noires) et de mannose à 20mM (barres grises). Les résultats sont donnés sous la forme de la différence entre la T_{50} dans l'eau et la T_{50} dans le sucre considéré (Rc=RNAi témoin ; TS=type sauvage ; R1=RNAi 1 ; R2=RNAi 2).

Dans le but d'évaluer l'impact de l'extinction *MtSNF4b* sur la signalisation des sucres, des graines de type sauvage, de la lignée RNAi témoin et de deux lignées RNAi *MtSNF4b* ont été imbibées, après deux semaines de PMS, d'une part dans du glucose et du 3-OMG, d'autre part dans du mannose et du glucosamine, un inhibiteur d'hexokinases (Da Silva et al., 2001) (Fig. 1.17). Le glucose inhibe la dormance des graines de type sauvage et RNAi témoin, respectivement de deux et quatre jours (Fig. 1.17A ; Fig. 1.18). Cette différence n'est donc pas retrouvée avec les graines RNAi *MtSNF4b* dont la vitesse de germination n'est pas affectée par le glucose (Fig. 1.17A; Fig. 1.18). Au contraire, le mannose renforce la dormance dans les lignées RNAi *MtSNF4b* de deux et quatre jours, alors qu'il n'affecte pas la dormance des lignées de type sauvage et RNAi témoin (Fig. 1.17A; Fig. 1.18). Ces deux sucres semblent donc avoir un effet antagoniste sur la dormance sous contrôle de *MtSNF4b*. Le glucosamine et le 3-OMG inhibent tous les deux la germination des graines de tous les génotypes sans différence de sensibilité (Fig. 1.17B).

1.8 Discussion

L'analyse physiologique de la dormance des graines de *M. truncatula* a permis de rendre compte de particularités de ces graines du point de vue de la dormance et de son contrôle dont nous parlerons dans un premier temps. Nous avons également mis en évidence le rôle de *MtSNF4b* dans la levée de la dormance lors de la PMS, indépendamment de la sensibilité à l'ABA, ce qui fera l'objet d'une seconde partie. Le lien entre la dormance de *M. truncatula* et la signalisation des sucres, ainsi que la place de *MtSNF4b* dans la perception, la signalisation et la teneur en sucres seront finalement discutés.

1.8.1 Insensibilité des graines dormantes de *M. truncatula* à l'acide gibbérellique et effet de la lumière en lien avec MtSNF4b

Notre étude montre que, chez *M. truncatula*, la dormance est levée par six mois de post maturation à sec à 20°C et 60% d'humidité relative. De même, chez *N. plumbaginifolia* la dormance est levée en 10 mois à 24°C et 50% d'humidité relative (Grappin et al., 2000 ; Bove et al., 2005). Chez *A. thaliana* Cvi, la dormance est levée par sept mois de PMS à température ambiante (~20°C) (Ali-Rachedi et al., 2004). Les graines de *M. truncatula* présentent une dormance non profonde du type de celle rencontrée chez *N. tabacum* ou chez *A. thaliana* Ler (Grappin et al., 2000 ; Ali-Rachedi et al., 2004). La germination d'un lot de graines dormantes de génotype de *M. truncatula* R108 n'est que partiellement bloquée et les graines finissent par toutes germer. Certains cultivars de *M. truncatula*, comme le DZA 315.16, montrent une dormance plus profonde que R108, et les lots de semences ne germent pas pendant plusieurs semaines d'imbibition à 20°C à l'obscurité (données du laboratoire). Notre étude vise à analyser l'impact de MtSNF4b sur la dormance de *M. truncatula*. Mais du fait de cette dormance faible, les conclusions relatives à la levée de la dormance sont à considérer avec précaution. La dormance des graines de *M. truncatula* semble être contrôlée par l'ABA mais le rôle du GA n'a pas pu être mis en évidence. Des concentrations de fluridone de 10 µM ou 100 µM lèvent la dormance des graines de *M. truncatula* alors que dans 100 µM de GA, la germination des graines de *M. truncatula* n'est pas affectée. Chez *A. thaliana* Cvi, l'addition de 100 µM de GA ne lève que partiellement la dormance, alors que l'addition de 10 µM fluridone lève presque totalement la dormance (Ali-Rachedi et al., 2004). Chez *N. plumbaginifolia*, l'addition de 100 µM de GA lève presque totalement la dormance et celle de 100µM de fluridone lève la dormance de façon légèrement moins efficace (Grappin et al., 2000). Nous avons montré que, bien que la dormance et la sensibilité à l'ABA des graines de *M. truncatula* soient équivalentes à d'autres espèces, elles semblent montrer une insensibilité au GA lors de la germination. Par le passé, de nombreux auteurs ont associé l'action des GA à la germination *sensu stricto* plus qu'à la levée de la dormance, mais la faible dormance primaire des mutants DELLA d'*A. thaliana* indique que chez cette plante, le GA joue un rôle dans le contrôle de la dormance (Penfield et al., 2006). Le GA agit par la déstabilisation des protéines de répression de la croissance DELLA (Peng *et al.* 1997; McGinnis *et al.* 2003), et

plusieurs d'entre elles sont requises pour la dormance des graines chez *A. thaliana* (Penfield *et al.* 2006). Il serait intéressant d'évaluer les taux de transcrits de protéines DELLA et d'autres récepteurs ou protéines régulés par le GA dans les graines de *M. truncatula* dormantes et non dormantes afin de comprendre si elles sont régulées par la dormance à l'échelle transcriptomique.

La synthèse de GA est activée par la lumière et la dégradation de l'ABA est activée par le GA et la lumière dans les graines de *L. sativa* au cours de l'imbibition (Toyomasu *et al.*, 1998). Chez de nombreuses espèces, dont *A. thaliana*, l'exposition de graines à la lumière stimule la germination par l'intermédiaire de photorécepteurs généralement de la famille des phytochromes (Allen *et al.*, 2007). Les graines de *L. sativa* et d'*A. thaliana* montrent donc une germination photoblastique, *i.e.* activée par la lumière. Ici, *M. truncatula* montre une germination photoblastique négative, c'est à dire que la lumière accroît la dormance de ses graines. *M. truncatula* a donc un comportement à la lumière proche de celui de *Bromus sterilis* ou de *Avena fatua* qui sont deux espèces dont les graines montrent également une germination photoblastique négative (Hilton *et al.*, 1984 ; Hou *et al.*, 1992). *Avena fatua* montre une sensibilité réduite au GA (Hou *et al.*, 1992). L'absence de sensibilité au GA et la germination photoblastique négative sont peut-être liés mais des manipulations supplémentaires de germinations en conditions d'éclairages de type rouge lointain ou rouge proche pourraient permettre de mieux comprendre les mécanismes d'inhibition de la germination des graines de *M. truncatula* par la lumière.

1.8.2 MtSNF4b impacte la levée de la dormance de *M. truncatula* au cours de la PMS

La dormance initiale des graines RNAi *MtSNF4b* est la même que celle des graines de type sauvage. Par contre, après trois semaines de PMS, les graines RNAi *MtSNF4b* sont moins dormantes que celles de type sauvage. Elles ne présentent cependant pas de différence de sensibilité à l'ABA qui inhibe la germination à partir de 100 μ M, ni au fluridone. Il a été montré chez *N. plumbaginifolia* que les graines non dormantes sont moins sensibles à l'ABA que les graines dormantes qui nécessitent respectivement 100 et 10 μ M d'ABA pour inhiber totalement la germination d'une population (Grappin *et al.*, 2000). De plus les teneurs

en ABA des embryons de *M. truncatula* imbibés après deux semaines de PMS ne montrent pas de différences reproductibles entre type sauvage et lignées RNAi *MtSNF4b* (Données acquises au laboratoire, annexe 1). Or des études menées sur *A. thaliana* et *N. plumbaginifolia* indiquent que la teneur en ABA des graines dormantes est, ou devient, plus élevée que celle des graines non dormantes (Grappin et al., 2000 ; Ali-Rachedi et al., 2004). La levée de la dormance des graines de *M. truncatula* en lien avec *MtSNF4b* n'est donc pas liée à une différence initiale de dormance, ou à une différence de l'évolution de la teneur ou de la sensibilité à l'ABA.

La quantité de transcrits de *MtSNF4b* diminue dans les graines non dormantes de *M. truncatula* alors qu'elle reste élevée dans les graines non dormantes. Cette analyse corrobore le fait que le complexe de haut poids moléculaire contenant *MtSNF4b* se dissocie dans les graines non dormantes et reste formé dans les dormantes (Données du laboratoire, Annexe 1).

Notre analyse confirme également les résultats obtenus par Bradford et al. (2003) qui ont montré que la teneur en l'homologue de *MtSNF4b*, *LeSNF4*, restait élevée dans les graines dormantes et disparaissait dans les graines non dormantes. L'analyse de mutants d'*A. thaliana* ne montrant pas de dormance primaire, a permis de distinguer des gènes différentiellement exprimés en réponse à la PMS, indépendamment de la dormance (Carrera et al., 2008). Dans cette étude, les mutants *abi3* et *aba3* ont été imbibés avant et après une PMS. Comme ces mutants ne présentent pas de dormance parce qu'ils sont respectivement insensibles et à teneur réduite en ABA, les 101 gènes exprimés différentiellement dans ces lignées, après une PMS, ne sont donc ni liés à l'ABA, ni liés à la dormance. Cette étude montre que la teneur en transcrits *AtSNF4b* (At1g15330), l'homologue de *MtSNF4b* chez *M. truncatula*, diminue dans les graines après une PMS, indépendamment de l'ABA et de la dormance (Carrera et al., 2008). *MtSNF4b* pourrait donc réguler la dormance des graines de *M. truncatula* par sa levée au cours de la PMS plus que par son induction au cours de l'imbibition.

1.8.3 MtSNF4b intervient dans la signalisation des sucres pendant l'imbibition en lien avec la PMS

L'imbibition de graines non dormantes de *M. truncatula* en présence de sucres montrent qu'aucun d'entre eux n'affecte leur germination. Dans les graines non dormantes d'*A. thaliana* le glucose et le mannose (10mM) inhibent la germination et le 3-OMG n'a pas d'effet (Pego et al., 1999, Price et al., 2003). Le glucose en plus forte concentration (360 mM) est connu pour inhiber la germination des graines d'*A. thaliana* en induisant une accumulation d'ABA (Arenas-Huertero et al., 2000). Il semble donc que la perception des sucres chez *M. truncatula* soit différente de celle d'*A. thaliana*.

Dans les graines dormantes après deux semaines de PMS, le glucose active la germination alors que le 3-OMG l'inhibe. Certains des analogues n'ont pas d'effet sur la germination des graines non dormantes de *M. truncatula* indiquant une absence de toxicité des sucres aux concentrations testées (Loreti et al., 2001). L'analyse de l'influence des sucres sur les graines dormantes n'a jamais été réalisée sur *A. thaliana*. Les seules données accessibles, corroborant nos résultats, montrent que lorsque la germination de graines non dormantes de *A. thaliana* est bloquée avec du mannose, cette inhibition de la germination peut être levée par l'addition de glucose dans le milieu (Pego et al., 1999). Par la suite on remarque que cette sensibilité de la germination au glucose et au 3-OMG disparaît progressivement au cours de la PMS. Donc, dans les graines dormantes de *M. truncatula*, il semblerait que le glucose joue un rôle dans la perception et la signalisation des sucres activant la germination via une voie dépendante de l'hexokinase, puisque le mannose n'a aucun effet sur la germination. Par contre, dans les graines RNAi *MtSNF4b* imbibées après deux semaines de PMS, le glucose n'influence plus la vitesse de germination alors que c'est le mannose qui inhibe la germination. Les tendances de l'effet de la perception des sucres dans les graines dormantes sont inversées entre le type sauvage et la lignée RNAi. Dans les graines dormantes, le GAM et le 3-OMG ont un effet négatif sur la germination et cet effet est le même dans le type sauvage que dans les lignées RNAi *MtSNF4b*. Les voies de perception et de signalisation liées au 3-OMG, indépendantes des hexokinases, ne semblent donc pas impliquer MtSNF4b. La synthèse des résultats obtenus sur les graines dormantes est présentée en Figure 1.19. Pour confirmer cette hypothèse, des manipulations supplémentaires sont nécessaires, notamment sur l'impact des sucres sur la germination de graines RNAi *MtSNF4b* non dormantes.

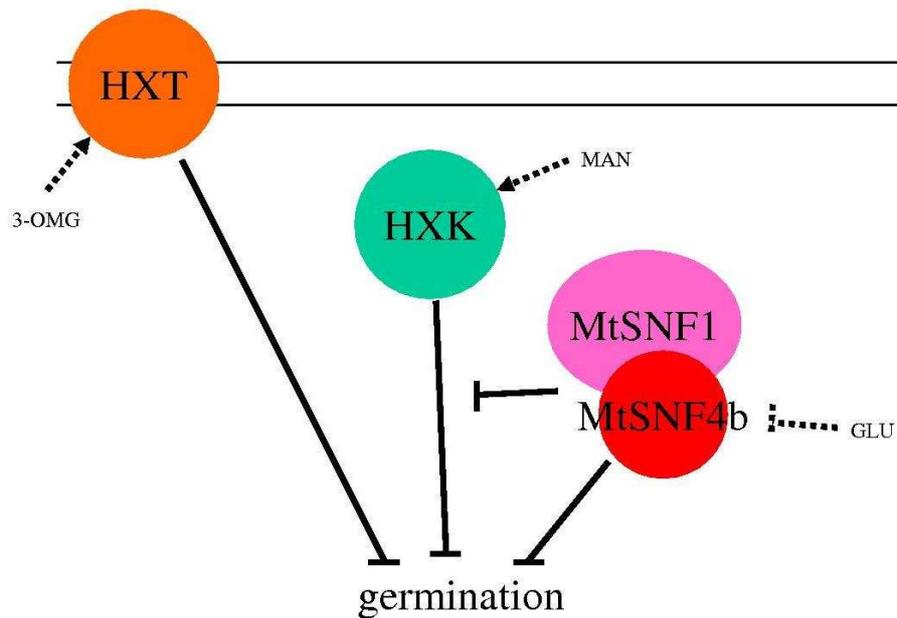


Figure 1.19 : Schéma du rôle de MtSNF4b dans la perception et la signalisation des sucres dans les graines dormantes de *M. truncatula*. Les flèches indiquent une induction et les traits une répression. Les flèches pleines représentent les liens déduits entre les divers éléments clés de la signalisation à partir des données de germination et de l'effet connu des hexoses et inhibiteur d'hexokinase testés (traits pointillés). (HXT : transporteur d'hexose ; HXK : hexokinase ; 3-OMG : 3-O-méthylglucose ; GAM : Glucosamine ; MAN : Mannose ; GLU : Glucose).

1.8.4 MtSNF4b impacte la teneur en oligosaccharides, la dormance et la balance glucose/saccharose.

Lors de l'analyse de la teneur en sucres des graines dormantes et non dormantes, nous avons montré que, chez *M. truncatula*, la levée de la dormance par une PMS induit une rapide hydrolyse du saccharose et l'accumulation de glucose dans les embryons. Ce résultat corrobore ceux obtenus chez les graines dormantes et non dormantes d'*Avena fatua* (Foley et al., 1993). Par contre, MtSNF4b ne joue pas de rôle dans cette activation de l'hydrolyse. Il semble qu'elle soit impliquée dans la régulation du métabolisme des sucres pendant la maturation, indiquée par une diminution de la quantité de stachyose et une augmentation du saccharose dans les graines matures (Fig. 1.14, Rosnoblet et al., 2007), mais pas pendant l'imbibition des graines. Pourtant des mutants de *S. tuberosum* sur-exprimant une *SnRK1* montrent une diminution de leurs teneurs en glucose et une augmentation de leurs teneurs en amidon (McKibbin et al., 2006). Les teneurs en saccharose et en fructose des mutants ne sont pas affectées (McKibbin et al., 2006). Une expérience d'expression antisens chez *T. aestivum* a montré que SnRK1 est nécessaire à l'expression de l' α -amylase, une enzyme clef de la mobilisation de l'amidon (Laurie et al., 2003). Par contre, la réduction de l'activité SnRK1 chez *S. tuberosum* affecte principalement le clivage et l'utilisation du saccharose par la diminution de l'expression d'une saccharose synthase dans les tubercules (Purcell et al., 1998). Des mutants de *P. sativum*, à l'activité SnRK1 réduite, présentent une augmentation de la teneur en saccharose mais aucune différence de teneur en amidon des cotylédons pendant la maturation par rapport au type sauvage (Radchuck et al., 2006). L'augmentation de la teneur en saccharose dans les mutants en fin de maturation est en accord avec ces données, tout comme l'absence de différences de teneur en glucose entre mutants RNAi *MtSNF4b* et type sauvage. Pourtant durant l'imbibition, l'absence de différences dans les teneur en glucose et en saccharose entre type sauvage et lignées RNAi *MtSNF4b* laisse à penser que MtSNF4b confère un rôle spécifique au complexe SnRK1, exclusivement lié à la dégradation des oligosaccharides. Or l'inhibition du catabolisme des sucres de la famille des raffinoses par un inhibiteur de la synthèse de raffinoses, le 1-deoxygalactonojirimycin, induit un retard de la germination chez le *P. sativum* et *Glycine max* (Blöchl et al., 2007, Dierking et al., 2009). Par contre, la comparaison de lignées recombinantes de *Glycine max* sélectionnées, soit pour leur

teneur normale, soit pour leur faible concentration en raffinoses ne montre pas de différences significatives de germination. MtSNF4b, par son rôle dans le ralentissement de la dégradation des raffinoses pourrait, de façon analogue au 1-désoxygalactonojirimycin, accroître la dormance des graines de *M. truncatula*.

Chapitre 2 :
Analyse transcriptomique des semences
de *M. truncatula* RNAi *MtSNF4b* en
relation avec la dormance et la
germination

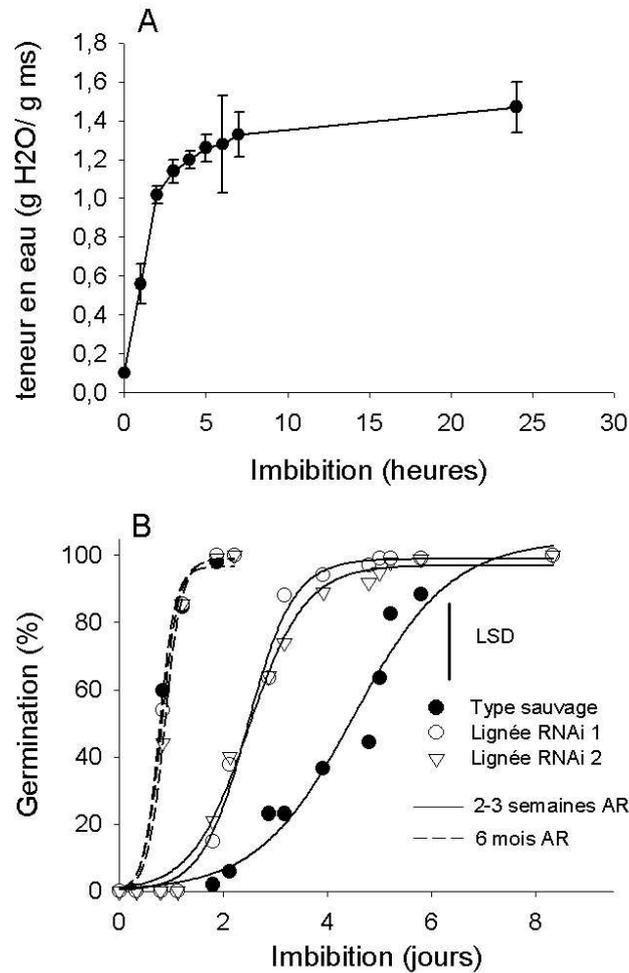


Figure 2.1 : Profils d'imbibition et de germination des graines utilisées dans les analyses par puces à ADNc. (A) La teneur en eau dans les graines sèches scarifiées de *M. truncatula* est mesurée pendant l'imbibition exprimée en fonction de la masse fraîche des graines. Des graines de type sauvage (cercles pleins) et de deux lignées RNAi indépendantes (cercles et triangles vides) sont imbibées dans l'eau à 20°C à l'obscurité après deux à trois semaines (lignes pleines) et 6 mois de post maturation à sec (lignes pointillées). Les données sont significatives lorsqu'elles diffèrent de 22% ou plus (test de χ^2 , $P < 0,05$, $N = 50$).

L'analyse physiologique des mutants RNAi *MtSNF4b* montre des particularités de phénotypes liées à la post maturation à sec et à la levée de la dormance. Les SnRK1 sont connues pour jouer un rôle dans le contrôle de l'expression de nombreux gènes à l'échelle du transcriptome (Baena-Gonzalez et al., 2007). Afin d'obtenir une vision panoramique des processus régulés directement ou indirectement par *MtSNF4b* lors de l'imbibition, une analyse comparative des transcrits exprimés dans des graines de type sauvage et des graines RNAi *MtSNF4b* et leur lien avec le transcriptome lié à la levée de la dormance, a été menée grâce à une technique de puces à ADNc. Dans un premier temps, une description du plan d'expérience et des principales étapes de l'analyse statistique sera présentée. Dans un second temps, les résultats obtenus, seront décrits analyse par analyse, avant une étude comparative des trois analyses. Une caractérisation plus détaillée de l'expression de certains gènes par RT-qPCR sera présentée dans un troisième temps en lien, notamment, avec la signalisation des sucres.

2.1 Plan d'expérience et analyses statistiques

L'analyse transcriptomique porte sur deux récoltes de graines imbibées six heures: 1) après deux à trois semaines de PMS ou 2) de graines imbibées après six mois de PMS. L'analyse a été réalisée sur une lignée de type sauvage et deux lignées RNAi *MtSNF4b* indépendantes pour les graines imbibées après deux à trois semaines de PMS et sur une lignée de type sauvage et une lignée RNAi *MtSNF4b* pour les graines imbibées après six mois de PMS. Les échantillons sont prélevés à six heures d'imbibition pour deux raisons : 1) à six heures d'imbibition le complexe de haut poids moléculaire auquel appartient *MtSNF4b* est encore présent dans les radicules de *M. truncatula* (Rosnoblet et al., 2007) ; 2) ce point correspond à la fin de la phase I d'imbibition rapide chez *M. truncatula* (Fig. 2.1A). Un échantillon des graines utilisées pour l'analyse transcriptomique a été imbibé afin de produire les courbes de germination du lot étudié (Fig. 2.1B). Comme attendu, les graines post-maturées six mois ne sont plus dormantes et germent immédiatement sans différences de profil entre les lignées sauvages et mutantes alors que les graines imbibées après deux à trois semaines de PMS montrent une vitesse de germination deux fois plus faible pour le lot de graines de type sauvage que pour les lots de graines RNAi *MtSNF4b* (Fig. 2.1B).

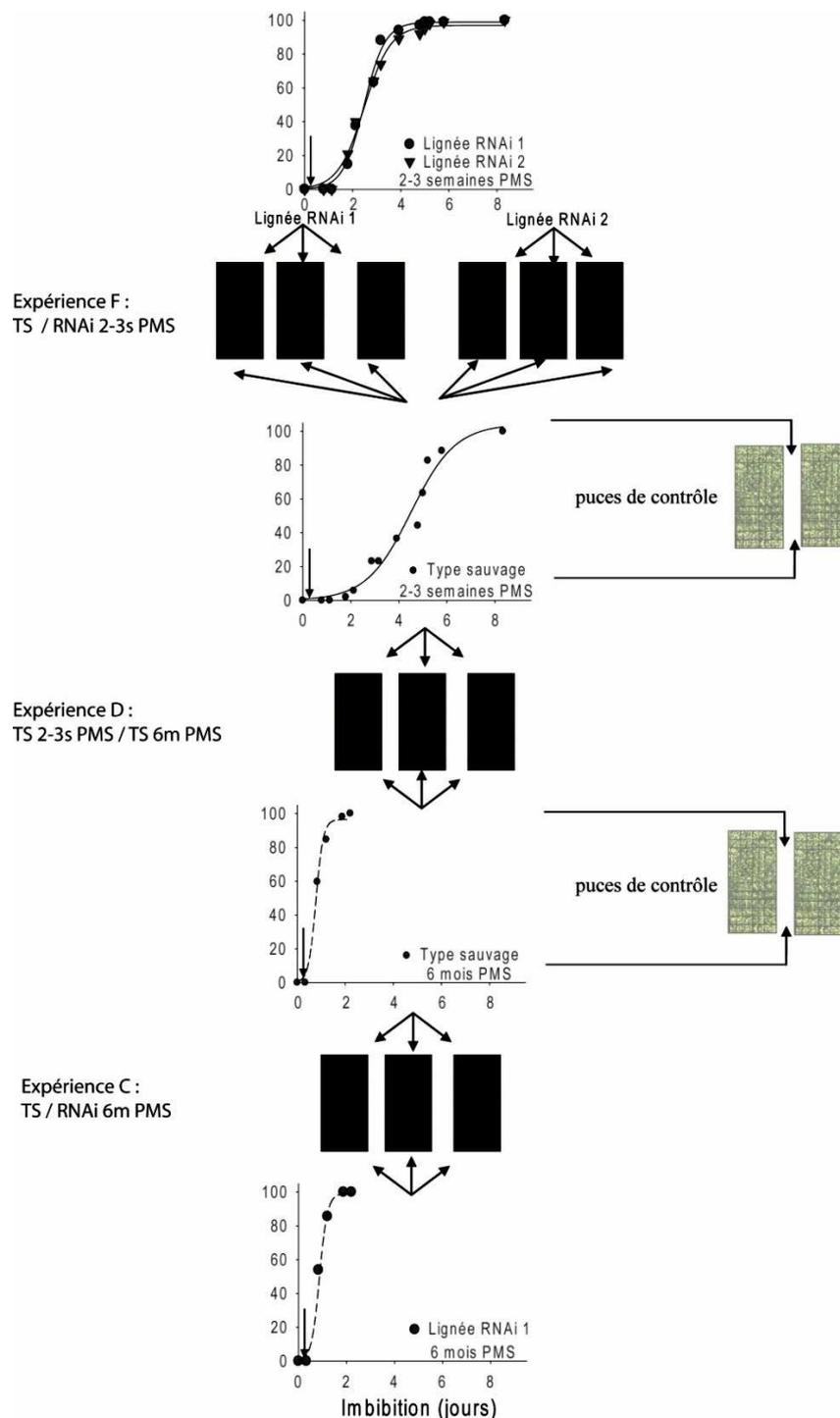


Figure 2.2 : Schéma du plan d'expérience des analyses transcriptomiques par puces à ADNc. Les trois expériences sont réalisées sur des puces à ADNc Mt16kOLI1Plus (Qiagen, Hilden, Germany). Chaque puce représente deux réplicats techniques et chaque expérience compte trois puces par lignée analysée. Les ADNc des lignées sauvages sont un pool de trois extractions indépendantes et les ADNc des lignées RNAi *MtSNF4b* sont trois extractions indépendantes, hybridées chacune sur une puce, provenant de 50 embryons imbibés six heures à 20°C (point de prélèvement représenté par une flèche noire sur les graphiques). L'expérience Fraîche (expérience F) représente les gènes exprimés différemment entre le type sauvage et deux lignées RNAi *MtSNF4b* imbibés après 2 à 3 semaines de post maturation à sec (PMS). L'expérience conservée (expérience C) représente les gènes différemment exprimés entre le type sauvage et une lignée RNAi *MtSNF4b* imbibés après six mois de PMS. L'expérience Dormante (expérience D) représente les gènes différemment exprimés entre les types sauvages imbibés après deux à trois semaines et six mois de PMS. Les quatre puces de contrôle sont issues de l'hybridation des ADNc provenant des mêmes échantillons de types sauvages marqués après deux à trois semaines et six mois de PMS.

L'analyse relative des transcrits dans les embryons après six heures d'imbibition est réalisée au moyen de la puce à ADNc Mt16kOLI1Plus (Qiagen, Hilden, Germany), qui représente environ 16000 gènes de *M. truncatula* en duplica, soit environ 40% du génome prédit de cette espèce. Pour chaque lignée, l'ARNm de trois échantillons biologiques de 50 embryons a servi pour la synthèse des ADNc. Les ADNc marqués par Cy3 et Cy5 sont ensuite hybridés sur les puces en fonction du plan d'expérience défini (Fig. 2.2) à raison de trois puces par génotype RNAi *MtSNF4b* afin de s'assurer de la reproductibilité technique et biologique. Trois hybridations ont été réalisées afin de caractériser les transcrits différentiellement exprimés (Fig. 2.2). Une première hybridation vise à comparer les transcrits des embryons de type sauvage et de deux lignées RNAi *MtSNF4b*, imbibés après deux à trois semaines de PMS. Cette expérience sur des graines fraîches est notée « expérience Fraîche » (Fig. 2.2 ; Expérience F). La seconde hybridation vise à comparer les transcrits d'embryons de type sauvage et d'une lignée RNAi *MtSNF4b* après six mois de PMS. Cette seconde expérience sur des graines conservées est notée « expérience Conservée » (Fig. 2.2 ; Expérience C). La troisième hybridation vise à comparer les embryons de type sauvage, imbibés après deux à trois semaines et six mois de PMS. Cette expérience sur des graines dormantes et non dormantes est notée « expérience Dormante » (Fig. 2.2 ; Expérience D). En plus de celles dédiées aux comparaisons entre lignées, quatre puces ont été utilisées comme contrôles négatifs des hybridations rendant compte des différences d'affinités des ADNc marqués, dues au marquage et pas à une différence d'expression (puces de contrôle) (Fig. 2.2). Pour cela, les ADNc des types sauvages comportant l'un et l'autre des marqueurs ont été hybridés sur la même puce pour les deux temps de la PMS testés.

Après l'acquisition et l'analyse de l'image des puces, une analyse statistique, réalisée grâce au logiciel Genespring 7.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, United States), permet de définir des sous-groupes de gènes différentiellement exprimés. Après avoir normalisé les données brutes par puces et avoir fixé un seuil négligeant les données dont l'expression est trop proche du bruit de fond, seuls les points définis comme 'present' (dans au moins deux répétitions sur trois lors de l'acquisition de l'image) sont pris en compte dans l'analyse. L'intensité des points n'est retenue que si elle diffère significativement de la valeur des puces de contrôle (t-test $p < 0,01$). Enfin, une dernière étape consiste en un filtre ne prenant en compte que les gènes dont l'expression différentielle moyenne entre les deux conditions testées est supérieure ou égale à 1,5 avec une p-value de 0,01 (pour détails voir chapitre M&M M4-6).

L'analyse F (F pour fraîche) présente une expression différentielle de 217 gènes dont 162 sont sur-exprimés et 55 sont sous-exprimés dans le type sauvage par rapport aux lignées RNAi *MtSNF4b* imbibées après deux à trois semaines de PMS (Tab. 2.1, Annexe 2 : données supplémentaires S1 et S2). L'analyse C (C pour Conservée) montre une expression différentielle d'un nombre plus réduit de gènes avec 36 gènes différentiellement exprimés. Ce faible nombre de gènes est prévisible puisque le type sauvage et la lignée RNAi *MtSNF4b* ne montrent pas de différence de profils de germination lorsque les graines sont imbibées après six mois de PMS (Fig. 2.1). Parmi ces gènes, 23 sont sur-exprimés et 14 sont sous-exprimés dans le type sauvage par rapport à la lignée RNAi *MtSNF4b* imbibés après six mois de PMS (Tab. 2.2, Annexe 2 : données supplémentaires S3 et S4). L'analyse D (D pour Dormante) montre une expression différentielle de 185 gènes dont 57 sont sur-exprimés et 128 sont sous-exprimés dans le type sauvage dormant par rapport au type sauvage non dormant (Tab. 2.3, Annexe 2 : données supplémentaires S6 et S7). Les proportions de gènes sur et sous-exprimés sont inversées entre les analyses F et D, avec respectivement 75% de gènes sur-exprimés dans le type sauvage par rapport aux lignées RNAi *MtSNF4b* imbibés après deux à trois semaines de PMS contre 30% de gènes sur-exprimés dans le type sauvage dormant par rapport au type sauvage non dormant.

Dans la suite de ce chapitre nous étudierons dans un premier temps ces trois analyses indépendamment avant de réaliser une analyse commune.

2.2 Gènes différentiellement exprimés entre les embryons de type sauvage et RNAi *MtSNF4b* après deux à trois semaines de PMS (analyse F)

2.2.1 Sur-exprimés

Parmi les gènes de l'analyse F, 162 sont sur-exprimés dans le type sauvage par rapport aux lignées RNAi *MtSNF4b*. La classification des transcrits est réalisée manuellement en se référant au système de classification de « The Munich Information Center for Protein Sequences » (MIPS) (Mewes et al., 1999). Les quatre classes de gènes les plus représentées sont celles du métabolisme qui regroupe 47 gènes, celle du stress qui regroupe 22 gènes

Tableau 2.1 : Classification des gènes exprimés différemment dans l'analyse F. Les gènes du groupe F présentent une expression différentielle dans des embryons de type sauvage par rapport à des embryons RNAi *MtSNF4b* imbibés six heures après deux à trois semaines de post maturation à sec. Les gènes ont été sélectionnés au moyen du logiciel Genespring 7.0 (Agilent) avec une différence d'expression relative d'au moins 1,5 et avec une p-value inférieure à 0,01. Les gènes supérieurs à 1,5 sont plus exprimés dans le type sauvage et les gènes inférieurs à -1,5 sont moins exprimés dans le type sauvage. La classification manuelle des gènes est effectuée à l'aide des annotations Medicago truncatula Gene Expression Atlas (<http://bioinfo.noble.org/gene-atlas/v2>) et suit la classification fonctionnelle de gènes FunCat version 2.0 (MIPS).

Classification	>1.5 (P<0.01)	<-1.5 (P<0.01)
Métabolisme	47	4
Métabolisme secondaire	36	2
Métabolisme primaire	11	2
acides aminés	3	1
lipides, acides gras	4	0
hormones	3	0
sucres	1	1
Sauvetage cellulaire	22	18
Maladie, virulence et défense	19	0
Détoxification	2	5
Réponse aux stress abiotiques	1	13
Paroi cellulaire	12	2
Régulation de la transcription	9	1
Transport cellulaire	12	0
Energie	1	0
Synthèse de protéines	1	0
Post-translation	5	0
Développement	2	0
Transduction d'un signal	1	1
Non classés	50	28
Total	162	54

et celle de la paroi cellulaire et du transport qui regroupe 12 gènes chacune (Tab. 2.1). Neuf gènes sur-exprimés sont associés à la régulation de la transcription (Tab. 2.1). Les gènes des différentes classes sont détaillés ci-dessous en commençant par ceux liés au métabolisme. Les gènes liés aux stress biotiques et à la paroi sont ensuite détaillés. Enfin les gènes liés à la signalisation hormonale et à la transcription seront énumérés.

Parmi les gènes associés au métabolisme, 36 sont plus particulièrement liés au métabolisme secondaire (Tab. 2.1). Dans ce groupe se trouve des gènes codant des enzymes du métabolisme des phénylpropanoïdes, des flavonoïdes et des isoflavonoïdes (Tab. 2.1, Annexe 2 : données supplémentaires S1) et conduisent à la formation de la médicarpine. Dans ce groupe, 26 gènes codant neuf des dix enzymes de la voie de biosynthèse de la médicarpine sont présents. La caractérisation de leur expression est plus précisément analysée dans la section 2.6. En plus de ces gènes du métabolisme de la médicarpine, des gènes clefs de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes sont sur-exprimés dans le type sauvage. C'est le cas de trois gènes codant des phénylalanines ammonia lyase (*PAL*) (TC106667, TC106669 et TC106671), deux gènes codant des cinnamoyl-CoA réductase (*CCR*) (TC100838 et TC100839) et deux gènes codant des Caffeoyle CoA O-méthyltransférase (*CCoAOMT*) (TC107427 et TC94321), impliqués dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Tab. 2.1, Annexe 2 : données supplémentaires S1). L'expression de la *CCoAOMT* (TC94321) a été validée par RT-qPCR dans des embryons provenant de lignées de type sauvage, RNAi témoin et RNAi *MtSNF4b* imbibés six heures après deux semaines et six mois de PMS (Fig. 2.3). Lorsque les graines sont imbibées pendant six heures après deux semaines de PMS, l'expression des transcrits est 7 à 14 fois plus élevée dans les graines de type sauvage que dans les graines RNAi *MtSNF4b* (Fig. 2.3A). Cette différence d'expression disparaît dans les graines imbibées après six mois de post maturation (Fig. 3B). *MtSNF4b* affecte donc l'expression de gènes liés au métabolisme des phénylpropanoïdes dans les graines dormantes de *M. truncatula* au début de l'imbibition. D'autres gènes de la classe du métabolisme sont associés au métabolisme primaire. Deux gènes codant des Acetyl CoA carboxylases associées au métabolisme des lipides (TC110264 et TC94319) et un gène codant une terpène synthase (TC102995) (Tab. 2.1, Annexe 2 : données supplémentaires S1) sont également sur-exprimés dans les graines du type sauvage par rapport aux lignées RNAi *MtSNF4b*. Des gènes associés au métabolisme des acides aminés sont également sur-exprimés dans le type sauvage par rapport aux lignées RNAi *MtSNF4b*. Ces gènes codent des protéines associées à la biosynthèse de phénylalanine et de tyrosine telles que la préphénate déshydratase (TC101233)

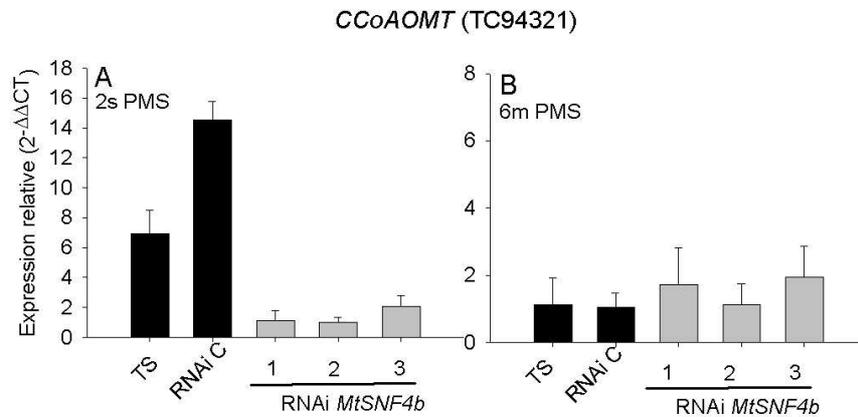


Figure 2.3 : Comparaison de l'expression d'une *CCoAOMT* dans des embryons sauvages et mutants après deux semaines et six mois de post maturation à sec. Les graines de type sauvage (T), de la lignée RNAi témoin (RNAi C) et de trois lignées RNAi indépendantes provenant de deux récoltes différentes sont imbibées pendant six heures après deux semaines (A) ou six mois de post maturation à sec (B). Les ARN sont analysés par RT-qPCR à l'aide d'amorces spécifiques d'une caféoyl-CoA 3-O-méthyltransférase (*CCoAOMT*) (TC94321). Les ARN sont extraits à partir de 50 embryons imbibés six heures à l'obscurité dans l'eau à 20°C et les écarts types sont donnés pour trois réplicats techniques.

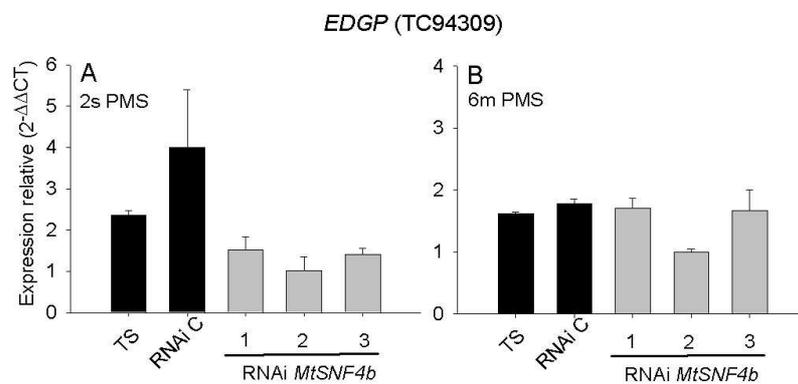


Figure 2.4 : Comparaison de l'expression d'une *EDGP* dans des embryons sauvages et mutants après deux semaines et six mois de post maturation à sec. Les graines de type sauvage (T), de la lignée RNAi témoin (RNAi C) et de trois lignées RNAi indépendantes provenant de deux récoltes différentes sont imbibées pendant six heures après deux semaines (A) ou six mois de post maturation à sec (B). Les ARN sont analysés par RT-qPCR à l'aide d'amorces spécifiques d'un inhibiteur d'endoglucanase (*EDGP*) (TC94309). Les ARN sont extraits à partir de 50 embryons imbibés six heures dans l'eau à l'obscurité à 20°C et les écarts types sont donnés pour trois réplicats techniques.

et au catabolisme de la tyrosine vers le cycle TCA tel que la fumaroylacetoacetate hydrolase (TC101117 et TC101116) (Tab. 2.1, Annexe 2 : données supplémentaires S1).

Une deuxième classe montrant un grand nombre de gènes sur-exprimés dans le type sauvage par rapport aux lignées RNAi *MtSNF4b* est liée aux stress biotiques. Les gènes les plus représentés dans cette classe codent des protéines « pathogenesis related » de la famille des *PR10* (TC106614, TC106355, TC106352, TC109466, TC94217, TC95383) (Tab. 2.1 ; Annexe 2 : données supplémentaires S1). Parmi ces *PR10*, deux sont similaires à des protéines « ABA responsive » de type ABR17/ABR18 (TC106355 et TC106352) dont certaines sont induites dans les racines de *M. truncatula* infectées par *Aphanomyces euteiches* et dans celles de *Pisum sativum* soumises à un stress salin (Colditz et al., 2005 ; Kav et al., 2004). L'expression constitutive de gènes codant des protéines de la famille ABR17/ABR18 améliore la germination des semences sous des conditions de stress thermique et salin chez *B. napus* et *A. thaliana* (Srivastava et al., 2004; 2006 ; Dunfield et al., 2007). Des gènes associés aux stress biotiques sont également retrouvés dans les autres classes, comme par exemple des gènes liés aux processus de détoxication (glutathion peroxydase et une glutathion-S-transférase (TC94581 et TC105598)). Quatre gènes liés à la dégradation des protéines codent des « RING-H2 finger » qui appartient à la sous famille des ATL. Ces protéines sont impliquées dans les étapes précoces des voies de signalisation de défenses chez les plantes (Serrano et al., 2004). Enfin, deux gènes codant des nodulines MtN5 (TC100608, TC103145) sont également sur-exprimés dans l'analyse F (Tab. 2.1 ; Annexe 2 : données supplémentaires S1). Ces gènes montrent des similitudes avec des protéines de transfert de lipides impliquées dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Jung et al., 2003).

En plus de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, connue pour son implication dans la formation des monolignoles et des acides ferruliques (constituants des parois cellulaires), d'autres gènes associés à la paroi cellulaire sont surexprimés dans le type sauvage par rapport aux lignées RNAi *MtSNF4b* (Tab. 2.1). Par exemple, deux gènes codent des inhibiteurs de polygalacturonases (TC95395 et TC108860) et quatre gènes codent des globulines basiques 7S, destinées à la paroi et impliquées dans l'inhibition de xyloglucan endoglucanase (TC100618, TC107655, TC94309 et TC94310). Le TC94309 code une Extracellular Dermal GlycoProtein (EDGP) qui a été analysée après six heures d'imbibition dans des lignées après deux semaines et six mois de PMS (Fig. 2.4A et 2.4B).

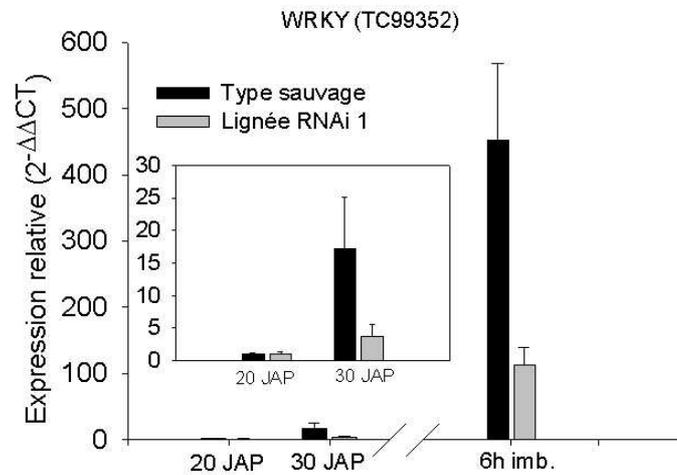


Figure 2.5 : Comparaison de l'expression d'un gène codant une WRKY dans des embryons de type sauvage et mutants au cours de la maturation et de l'imbibition. L'expression d'un gène codant une WRKY (TC99352) a été analysé par RT-qPCR à 20 JAP, 30 JAP et à six heures d'imbibition après deux semaines de PMS dans des embryons de type sauvage (en noir) et des embryons RNAi *MtSNF4b* (en gris). Les ARN sont extraits à partir de 50 embryons et les écarts types sont donnés pour trois réplicats techniques.

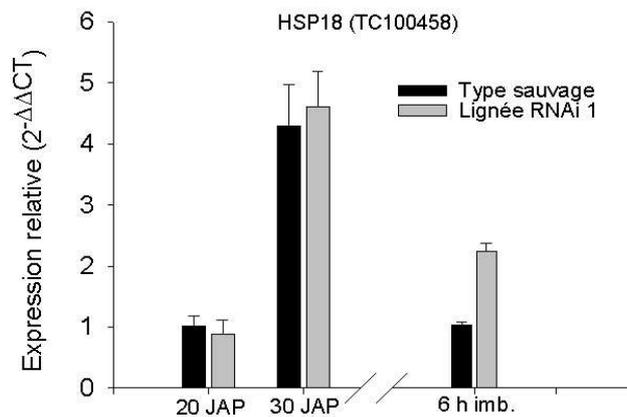


Figure 2.6 : Comparaison de l'expression d'un gène codant une sHSP18 dans des embryons de type sauvage et mutants au cours de la maturation et de l'imbibition. L'expression d'un gène codant une sHSP18 (TC100458) a été analysée par RT-qPCR à 20 JAP, 30 JAP et à six heures d'imbibition après deux semaines de post maturation à sec dans des embryons de type sauvage (en noir) et des embryons RNAi *MtSNF4b* (en gris). Les ARN sont extraits à partir de 50 embryons et les écarts types sont donnés pour trois réplicats techniques.

L'*EDGP* est 1,5 à 4 fois plus exprimée dans le type sauvage que dans les lignées RNAi *MtSNF4b* après deux semaines de PMS (Fig. 2.4A). Cette différence n'est plus visible lors d'une imbibition après six mois de PMS (Fig. 2.4B). L'extinction de *MtSNF4b* affecte donc également l'expression de gènes impliqués dans la structure et la résistance de la paroi cellulaire.

La famille de facteurs de transcription la plus représentée est celle des *WRKY*, avec cinq gènes sur-exprimés sur neuf (TC99352, TC108715, TC108324, TC102282, TC100630) (Tab. 2.1 ; Annexe 2 : données supplémentaires S1). Les *WRKY* sont une famille de protéines codant des facteurs de transcription dont une centaine de représentants sont connus chez *A. thaliana* (Eulgem et al., 2000). Les ARNm de certains de ces facteurs de transcription sont induits chez *A. thaliana* lors d'une infection par *Pseudomonas syringae* ou d'un traitement par de l'acide salicylique (Dong et al., 2003). Dans le but de valider la diminution d'expression d'un transcrite codant une *WRKY* dans les graines de RNAi *MtSNF4b* et de préciser si cette différence d'expression est le fait d'une néo-synthèse ou d'une dégradation d'ARNm pendant l'imbibition, l'expression du TC99352 a été analysée par RT-qPCR à 20 jours après pollinisation (JAP), après 30 JAP et dans des embryons dormants provenant de lignées RNAi *MtSNF4b* et de type sauvage imbibés six heures après deux semaines de PMS (Fig. 2.5). L'expression de ce gène est la plus faible à 20 JAP et ne montre pas de différence entre les deux lignées d'embryons testées à ce stade où *MtSNF4b* n'est pas encore exprimé dans les graines de type sauvage (Fig. 2.5). A 30 JAP, alors que *MtSNF4b* apparaît sous forme d'un complexe de haut poids moléculaire (Rosnoblet et al., 2007), l'expression augmente de 15 fois dans le type sauvage et n'augmente que de trois fois dans les embryons RNAi *MtSNF4b* (Fig. 2.5). Pendant l'imbibition des graines dormantes, l'expression de ce gène est cinq fois plus importante dans le type sauvage que dans les embryons RNAi *MtSNF4b*. Cette expression est également 450 fois plus grande dans les embryons sauvages après six heures d'imbibition que dans les embryons sauvages à 20 JAP (Fig. 2.5). La différence observée quant à l'expression du *WRKY*, bien que présente pendant la maturation, est exacerbée pendant l'imbibition. D'autres facteurs de transcription sont représentés dans cette analyse et les expressions de gènes associés à la signalisation de l'éthylène codant des éléments « ethylene responsive » ayant les fonctions putatives de facteur de transcription sont affectées (TC100991 et TC101396) (Annexe 2 : données supplémentaires S1).

Les gènes liés à la réponse à des hormones végétales et à leur biosynthèse sont également sur-exprimés dans le type sauvage par rapport aux lignées RNAi *MtSNF4b* (Annexe 2 : données supplémentaires S1). La seule hormone dont la voie de biosynthèse est potentiellement affectée par l'extinction de *MtSNF4b* est le jasmonate. En effet, deux gènes codant des 12-oxophytodionéates réductases, une enzyme clef de la synthèse du jasmonate sont sur-exprimés dans ce groupe (TC94407 et TC94408) (Annexe 2 : données supplémentaires S1). Le produit de ce gène catalyse la dernière étape de la formation du jasmonate à partir du méthyl-jasmonate. Des gènes associés à la réponse aux brassinostéroïdes sont également détectés. Deux gènes codant des glycosyles hydrolases sont des homologues de *BRUI* inductibles par les brassinostéroïdes (TC100489 et TC100486). Un gène codant un homologue d'un récepteur majeur des brassinostéroïdes chez *A. thaliana*, *BRI1*, est également sur-exprimé dans ce groupe. Enfin, un gène codant une protéine induite par l'auxine (TC101953) est également mis en évidence.

2.2.2 Sous-exprimés

L'analyse des gènes sous-exprimés dans le type sauvage, donc sur-exprimés dans les lignées RNAi *MtSNF4b*, met en évidence une sur-représentation des gènes liés aux stress abiotiques (Tab. 2.1). Sur 18 de ces gènes, 13 correspondent plus particulièrement à la protection et cinq sont liés à la détoxification (Tab. 2.1). Parmi les gènes identifiés en lien avec la protection, sept codent des petites protéines de choc thermique (*sHSP*) (TC108198, TC109542, TC95948, TC108710, TC100455, TC100454, TC100458) (Annexe 2 : données supplémentaires S2). Dans le but de préciser les différences observées pendant l'imbibition, le TC100458 codant une *sHSP20* a été analysé par RT-qPCR pendant la maturation et l'imbibition dans une lignée d'embryons de type sauvage et de type RNAi *MtSNF4b* (Fig. 2.6). L'expression de cette *sHSP* augmente de cinq fois entre 20 et 30 JAP, sans différence entre la lignée RNAi *MtSNF4b* et celle de type sauvage (Fig. 2.6). Après six heures d'imbibition, l'expression est de nouveau identique à celle observée à 20 JAP dans le type sauvage et reste deux fois plus élevée dans la lignée RNAi *MtSNF4b* (Fig. 6). Bien que ce résultat confirme l'analyse microarray, il semble que l'expression différentielle de ces gènes à six heures d'imbibition ne soit pas le résultat de l'accumulation différentielle des transcrits pendant la maturation, mais d'une dégradation différentielle puisque le niveau d'expression à six heures d'imbibition est plus faible que celui observé en fin de maturation.

Tableau 2.2 : Classification des gènes exprimés différemment dans l'analyse C. Les gènes du groupe C présentent une expression différentielle dans des embryons de type sauvage par rapport à des embryons RNAi *MtSNF4b* imbibés six heures après six mois de post maturation à sec. Les gènes ont été sélectionnés au moyen du logiciel Genespring 7.0 (Agilent) avec une différence d'expression relative d'au moins 1,5 et avec une p-value inférieure à 0,01. Les gènes supérieurs à 1,5 sont plus exprimés dans le type sauvage et les gènes inférieurs à -1,5 sont moins exprimés dans le type sauvage. La classification manuelle des gènes est effectuée à l'aide des annotations « Medicago truncatula Gene Expression Atlas » (<http://bioinfo.noble.org/gene-atlas/v2>) et suit la classification fonctionnelle de gènes FunCat version 2.0 (MIPS).

Classification	>1.5 (P<0.01)	<-1.5 (P<0.01)
Métabolisme	6	1
Métabolisme secondaire	3	0
Métabolisme primaire	3	1
lipides, acides gras	2	0
hormones	1	0
sucres	0	1
Sauvetage cellulaire	4	2
Maladie, virulence et défense	2	1
Réponse aux stress abiotiques	2	1
Paroi cellulaire	1	1
Régulation de la transcription	2	0
Transport cellulaire	0	1
Post-translation	1	1
Développement	1	1
Signalisation	1	1
Non classés	6	5
Total	22	14

La mise en évidence des transcrits codant des sHSP, plus exprimés dans les lignées mutantes, peut indiquer que les graines subissent un stress particulier en début d'imbibition en cas d'absence de MtSNF4b. En plus des sHSP, trois gènes codant des LEA de la famille *D-34* (TC96521, TC102412, TC102411) et une LEA de groupe 1, *Em6* (TC96799) sont sur-exprimés dans les graines des lignées RNAi *MtSNF4b* par rapport au type sauvage (Annexe 2 : données supplémentaires S2). Les gènes appartenant à la classe détoxification codent des protéines liées à la régulation redox par les glutathions (Annexe 2 : données supplémentaires S2). Deux de ces gènes codent des lactoglutathions lyases (TC101361 et TC101362) et un gène code une glutathions S-transferase (TC100571).

2.3 Gènes différentiellement exprimés entre les embryons RNAi et de type sauvage après six mois de PMS (analyse C)

L'analyse C montre une expression différentielle d'un nombre plus réduit de gènes, 36 étant différentiellement exprimés. Parmi eux, 23 sont sur-exprimés dans le type sauvage par rapport à la lignée RNAi *MtSNF4b* imbibées six heures après six mois de PMS. Les gènes observés appartiennent principalement à la classe liée au métabolisme (six gènes), aux stress abiotiques (quatre gènes) et deux gènes sont liés à la régulation de la transcription (Tab. 2.2 ; Annexe 2 : données supplémentaires S3). Parmi les gènes classés dans le métabolisme, certains codent une CHS et une 12-oxophytodionéate réductase (TC94407) (Tab. 2.2). Ces deux gènes sont retrouvés à la fois dans l'analyse F et C. De même, parmi les gènes associés aux stress abiotiques, certains codant des nodulines *MtN5* (TC103145 et TC100608) sont trouvés. Un gène code une *SnRK3*, dont l'homologue chez *A. thaliana* est une CBL interacting protein kinase 7 (TC107107). La séquence de la protéine codée par ce gène est proche de SOS2 (Salt Over Sensitivity), dont la sur-expression chez *A. thaliana* induit un phénotype de résistance au stress salin (Yang et al., 2009).

Au contraire, 13 gènes sont sous-exprimés dans le type sauvage par rapport aux graines RNAi *MtSNF4b* (Tab. 2.2 ; Annexe 2 : données supplémentaires S4). Parmi eux, deux gènes codant des protéines de transfert des lipides sont classés dans le groupe des

Tableau 2.3 : Classification des gènes exprimés différemment dans l'analyse D. Les gènes du groupe D représentent des gènes dont l'expression est différentielle dans des embryons de type sauvage imbibé après deux à trois semaines de PMS par rapport à des embryons de type sauvage imbibés après six mois de post maturation à sec. Les gènes ont été sélectionnés au moyen du logiciel Genespring 7.0 (Agilent) avec une différence d'expression relative d'au moins 1,5 et avec une p-value inférieure à 0,01. Les gènes supérieurs à 1,5 sont plus exprimés dans le type sauvage imbibé après deux à trois semaines de PMS et les gènes inférieurs à -1,5 sont moins exprimés dans le type sauvage imbibé après deux à trois semaines de PMS. La classification manuelle des gènes est effectuée à l'aide des annotations Medicago truncatula Gene Expression Atlas (<http://bioinfo.noble.org/gene-atlas/v2>) et suit la classification fonctionnelle de gènes FunCat version 2.0 (MIPS).

Classification	>1.5 (P<0.01)	<-1.5 (P<0.01)
Métabolisme	14	18
Métabolisme secondaire	9	4
Métabolisme primaire	5	8
lipides, acides gras	1	2
hormones	1	1
sucres	3	5
Sauvetage cellulaire	10	12
Maladie, virulence et défense	4	8
Détoxification	2	2
Réponse aux stress abiotiques	4	2
Paroi cellulaire	4	4
Régulation de la transcription	1	6
Transport cellulaire	0	5
Energie	4	4
Synthèse de protéines	0	9
Post-translation	0	3
Développement	0	4
Signalisation	1	7
Non classés	23	55
Total	57	127

stress biotiques (TC93922 , TC94143) : un gène codant une glycosyle hydrolase appartient au groupe des parois cellulaires (TC106656) et un gène codant une ferritine appartient au groupe de détoxification (TC94500) (Tab. 2.2 ; Annexe 2 : données supplémentaires S4).

2.4 Gènes différentiellement exprimés en relation avec la dormance dans les embryons de type sauvage (analyse D)

2.4.1 Sur-exprimés

L'analyse des gènes différentiellement exprimés après six heures d'imbibition entre le type sauvage imbibé après deux à trois semaines de PMS (dormant) et le type sauvage imbibé après six mois de PMS (non-dormant) permet d'identifier un groupe de 185 gènes, liés à la dormance (Tab. 2.3 ; Annexe 2 : données supplémentaires S5 et S6). Parmi ces gènes, 57 sont sur-exprimés dans le type sauvage dormant. En utilisant le même système de classification que pour les deux premières analyses, la classe de gènes liés au métabolisme est la plus représentée avec 14 gènes sur-exprimés, dont 9 sont associés au métabolisme secondaire. Parmi les gènes classés dans le métabolisme primaire, certains codent une phospholipide acyltransférase (TC110884) et trois gènes sont liés au métabolisme des sucres dont une invertase vacuolaire (TC96236), une glycerol-3-phosphate acyltransferase (TC110884) et une 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (TC103279) (Tab 2.3 ; Annexe 2 : données supplémentaires S3). La seconde classe fortement représentée est celle liée au stress (sauvetage cellulaire). Quatre gènes sont liés aux stress biotiques et codent des ABR17/18 (ABA responsive protein) sur lesquelles nous reviendrons au niveau de l'analyse commune des différentes expériences. Les gènes associés aux stress abiotiques, sur-exprimés dans le type sauvage dormant par rapport au type sauvage non-dormant, sont également associés à la fin de maturation et à la tolérance à la dessiccation comme des protéines Late Embryogenesis Abundant (LEA) et des Seed Maturation Protein. Parmi elles, la PM32 (TC108056), dont l'homologue chez *P. sativum* a été identifié comme étant inductible par un stress hydrique et par l'ABA, montre une expression spécifique des mitochondries de semences en fin de maturation et en début d'imbibition (Grelet et al., et 2005). La PM3 (TC101811), dont l'homologue chez le blé, *WPM-1*, code un polypeptide possédant quatre domaines

hydrophobes, est induite par l'ABA en lien avec la tolérance au froid dans des suspensions cellulaires (Koike et al., 1997). D'autres gènes surexprimés dans les graines dormantes sont associés à la détoxification, notamment un gène codant une glutamate-cystéine ligase (GCL) (TC95880) qui est une des enzymes limitantes de la synthèse du glutathion (GSH), impliquée dans le maintien du statut redox de la cellule (Botta et al., 2004). En lien avec la GSH, un gène codant une lactoylglutathion lyase est également sur-exprimé (TC107226) (Annexe 2 : données supplémentaires S5). Cette enzyme est associée à la détoxification des méthylglyoxales via le système glyoxalase I qui associe un alpha-oxoaldéhyde avec une GSH donnant du S-D-lactoylglutathion (Yadav et al., 2008).

Des gènes codant des protéines de réserves sont également mis en évidence dans cette analyse (Tab. 2.3). Ils codent différentes légumine A et J, qui compte parmi les principales protéines de réserve chez *M. truncatula* (Gallardo et al., 2003) et sont surexprimés dans les graines dormantes pendant l'imbibition (TC100250, TC100252, TC100253, TC100259) (Annexe 2 : données supplémentaires S3). La classe des réserves lipidiques est représentée par un gène codant une caléosine (TC104435). Ces protéines s'accumulent en fin de maturation dans les semences et sont inductibles par l'ABA (Naested et al., 2000 ; Purkrtova et al., 2008). L'homologue de cette caléosine chez *A. thaliana* est une protéine spécifique de l'embryon, nommée ATS1, qui s'accumule en fin de maturation et pourrait jouer un rôle dans l'accumulation des réserves et le maintien des structures subcellulaires de l'embryon lors de la dessiccation (Nuccio et al., 1999, Leprince et al., 1998).

Un seul gène codant un facteur de transcription est également induit dans les graines dormantes (TC107542) (Annexe 2 : données supplémentaires S5). Son homologue chez *A. thaliana* est connu sous le nom de *ATHB-12* (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 12) et code un régulateur de croissance en condition de stress hydrique (Olsson et al., 2004). Enfin, *MtSNF4b* est sur-exprimé dans le type sauvage imbibé après deux à trois semaines de PMS par rapport au type sauvage imbibé après six mois de PMS, et confirme la figure 1.7 du chapitre 1 qui comparait l'expression de *MtSNF4b* au cours de l'imbibition entre des semences dormantes et non dormantes.

2.4.2 Sous-exprimés

Le groupe de gènes sous-exprimés dans les graines dormantes est associé à la levée de la dormance et à la promotion de la germination. Un grand nombre de gènes est associé à la reprise de l'activité métabolique de la semence. La germination nécessite l'utilisation des réserves accumulées en fin de maturation. Or, de nombreux gènes identifiés sont liés à l'utilisation des réserves carbonées (Tab. 2.3 ; Annexe 2 : données supplémentaires S6). Des gènes codant une phosphoenolpyruvate carboxylase (TC106827), une panthoneate kinase (TC95315), des UDP et ADP- glucose pyrophosphorylases (TC94328 et TC107880), une UDP glucose 6 déshydrogenase (TC100484) et une polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase (TC111851) ont été identifiés en lien avec le métabolisme, l'énergie et les réserves (Tab. 2.3 ; Annexe 2 : données supplémentaires S6). De même, quelques gènes associés à l'utilisation des réserves lipidiques sont retrouvés, comme une GDSL-lipase (TC112323), une lysophospholipase (TC101903) et une phosphoethanolamine N-methyltransférase (TC112072). Enfin, le seul gène clairement identifiable comme lié à la dégradation de réserves protéiques appartient à la voie de biosynthèse des glutamates et code une gamma aminobutyrate transaminase (TC110117). En plus des gènes liés à la consommation des réserves, certains gènes codent des protéines liées à la production d'énergie comme une ATP synthase gamma chain (TC101703). Les systèmes de la synthèse protéique sont également activés par l'expression des gènes qui codent des sous-unités ribosomales (TC106680, TC93933, TC106321, TC96508, TC106285, TC110075, TC103094, TC94000, TC106467). La germination est décrite comme un processus lié à l'allongement cellulaire. Or un gène codant une xyloglucan endo-transglycosylase (TC107883), considérée comme un agent clef régulant l'expansion de la paroi, est également identifié dans cette analyse.

Divers gènes mis en évidence sont liés à la signalisation hormonale (Tab. 2.3 ; Annexe 2 : données supplémentaires S6). Les phosphatases 2C qui fonctionnent comme des régulateurs négatifs de la signalisation par l'ABA (TC97909 et TC107841) (Pernas et al., 2007). Un gène codant une protéine régulée par le GA (TC93984) est sous-exprimé dans le type sauvage dormant. L'étude de mutants pour l'homologue de cette protéine chez *A. thaliana*, *GASA4*, a montré qu'elle jouait un rôle d'activateur dans la croissance des semences (Roxrud et al., 2007). La voie de biosynthèse de

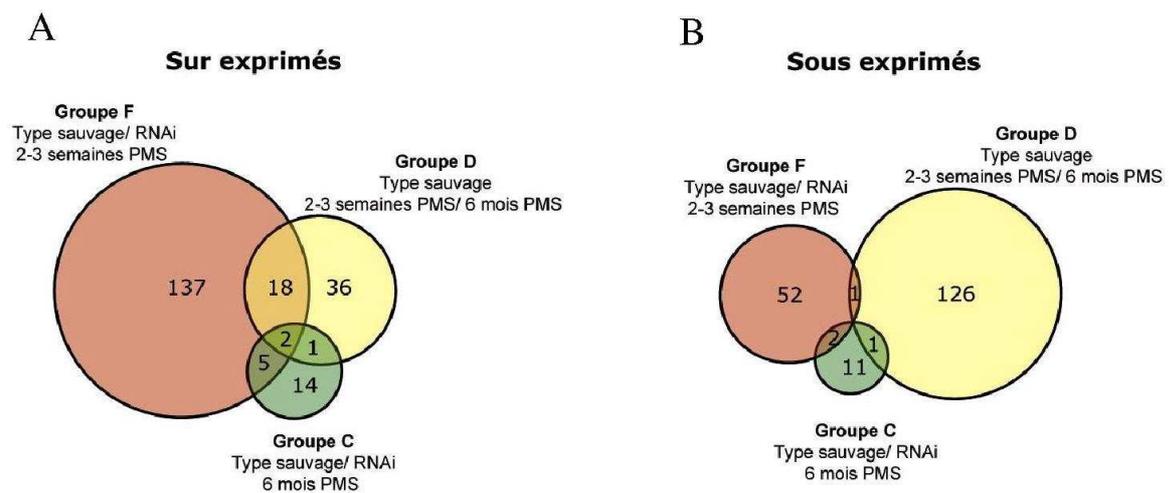


Figure 2.7 : Diagramme de Venn représentant les gènes différentiellement exprimés dans les trois groupes de gènes. Les gènes qui montrent une différence d'expression minimale de 1,5 (A) et de -1,5 (B) avec une p-value de 0,01 sont représentés. Les gènes ont été sélectionnés avec le logiciel Genespring 7.0 (Agilent) en prenant comme différence minimale 1,5 et une p-value de 0,01. Les diagrammes de Venn ont été obtenus grâce au logiciel Gene List Venn Diagram (<http://mcbc.usm.edu/genevenn/genevenn.htm>).

l'éthylène est également activée au travers d'un gène clef de sa biosynthèse codant une 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (TC110792).

Deux gènes qui codent des facteurs de transcription sont également sur-exprimés dans les graines non-dormantes. L'un d'eux code une protéine homologue d'un facteur de transcription AP2/ERF (At1g21910) (TC97510) et l'autre (TC104057) est un homologue de l'auxine responsive factor 5, ARF5 (At1g19850) d'*A.thaliana*. Ce dernier gène, aussi connu sous le nom MONOPTEROS, est un activateur de la transcription impliqué dans la formation de l'axe embryonnaire et la différenciation des tissus vasculaires (Hardtke et al., 1998).

2.5 Comparaison des différentes analyses

2.5.1 Sur-exprimés

Dans le but de comparer les différents groupes de gènes définis par les trois expériences, une analyse en diagramme de Venn a été réalisée (Fig. 2.7).

La majeure partie des gènes exprimés différemment entre le type sauvage dormant et les lignées RNAi *MtSNF4b* n'est pas retrouvée entre le type sauvage dormant et le type sauvage non dormant, ce qui indique que *MtSNF4b* induit l'expression de gènes indépendamment de l'état de dormance des semences. Les 18 gènes sur-exprimés communs aux deux analyses D et F sont principalement des ABR17/18 (ABA responsive protein) montrant des similitudes avec les protéines « pathogenesis related » (TC06449, TC106314, TC100422 et BQ138448) (Fig. 2.7A, Annexe 2 : données supplémentaires S1 et S5). Des gènes associés au métabolisme secondaire et à la paroi sont également communs aux deux analyses. C'est le cas de trois chalcones synthases (TC1065539, TC106555, TC106554), de trois chalcones reductases (TC100398, TC100400, TC100402) et d'une cafféoyl-CoA 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) (Fig. 2.7A, Annexe 2 : données supplémentaires S1 et S5). On trouve également des gènes codant des protéines liées à la paroi cellulaire, une « xyloglucan-specific fungal endoglucanase inhibitor protein » (TC107655), une

« cell wall associated receptor protein » (TC109407) et deux gènes codant des peroxidases (TC106556 et TC106558) (Fig. 2.7A, Annexe 2 : données supplémentaires S1 et S5).

Cinq gènes sont sur-exprimés à la fois dans les analyses F et C, donc en lien avec l'extinction de *MtSNF4b*, indépendamment de la durée de PMS (Fig. 2.7A ; données supplémentaires S1 et S3). Il s'agit de gènes codant un facteur de transcription de type MYB (TC107549), une protéine contenant un domaine SH3 (TC97653), une enzyme clef de la synthèse des jasmonates, la 12-oxophytodionéate réductase (TC94407) et deux protéines de transfert de lipides de type MtN5 (TC103145 et TC100608) (Fig. 2.7A ; Annexe 2 : données supplémentaires S1 et S3). Ces gènes différenciellement exprimés dans ces deux analyses peuvent correspondre, soit à un reliquat d'expression différentielle, soit à un effet de *MtSNF4b* dans les graines non dormantes. Mais, comme l'expression de MtN5 est la même dans les graines imbibées après deux à trois semaines et six mois de PMS, la seconde hypothèse nous semble à privilégier.

Le seul gène commun aux deux groupes C et D est une flavonol glucosyde 7-O-glucosyltransferase (TC107945), impliquée dans le métabolisme des flavonoles (Fig. 2.7A, Annexe 2 : données supplémentaires S3 et S5). De plus, seuls deux gènes sur-exprimés dans le type sauvage sont communs entre les trois groupes (F, C et D). Ils codent une chalcone synthase (TC106550) et une protéine inconnue possédant un domaine conservé de type 'heavy-metal-associated' (TC95122) (Fig. 2.7A, Annexe 2 : données supplémentaires S1, S3 et S5).

2.5.2 Sous-exprimés

Très peu de gènes sous-exprimés dans le type sauvage par rapport aux graines RNAi *MtSNF4b* sont communs avec les gènes sous-exprimés en relation avec la dormance (analyse D) (Fig. 2.7B, Annexe 2 : données supplémentaires S2, S4, et S6). Ceci confirme que la régulation des gènes différenciellement exprimés par l'extinction de *MtSNF4b* n'est pas seulement liée à la différence de l'état de dormance de ces deux lignées.

Le seul gène sous-exprimé, commun aux analyses F et D, est une petite HSP (TC97409) (Fig. 2.7B ; Annexe 2 : données supplémentaires S2 et S6). Seuls deux gènes sont sous-exprimés

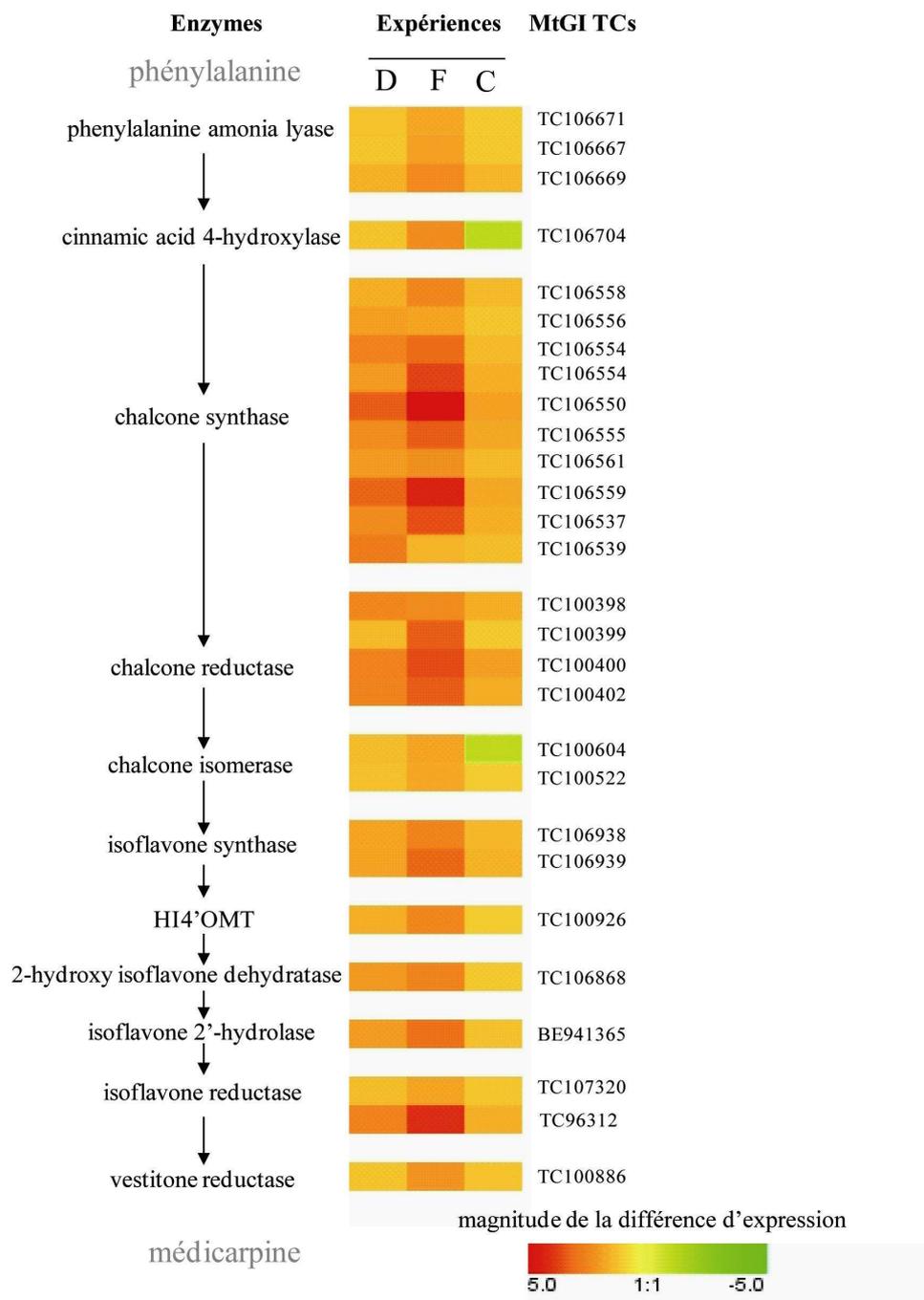


Figure 2.8: Diagramme à plage de couleurs représentant les gènes codant des enzymes de la voie de biosynthèse de la médicarpine différentiellement exprimés entre les embryons de type sauvage et de lignées RNAi *MtSNF4b*. L'expérience D représente les gènes différentiellement exprimés entre les embryons de type sauvage dormant et non dormant. L'expérience F représente les gènes différentiellement exprimés entre les embryons de type sauvage et RNAi *MtSNF4b* imbibés après deux à trois semaines de post maturation à sec. L'expérience C représente les gènes différentiellement exprimés entre les embryons de type sauvage et RNAi *MtSNF4b* imbibés après six mois de post maturation à sec. La différence d'expression positive indique une sur-expression du transcrite consensus (TC) dans le type sauvage (pour les expériences F et C) ou dans le type sauvage dormant (pour l'expérience D). A gauche, la voie de biosynthèse de la médicarpine chez *M. truncatula* où seules les enzymes dont les transcrits sont différentiellement exprimés dans l'expérience F sont présentées. Le diagramme a été obtenu au moyen du logiciel Genesis 1.5.0 (Graz University of Technology).

dans le type sauvage par rapport aux lignées RNAi *MtSNF4b* indépendamment de la durée de PMS (entre analyse F et C). Un gène code une ferritine (TC94500) et un autre une protéine associée à la dormance et à l'auxine (TC107811) (Fig. 2.7B ; Annexe 2 : données supplémentaires S2, et S4).

2.6 Caractérisation de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine en relation avec la dormance et MtSNF4b

La classe de gènes la plus représentée dans l'analyse F est liée au métabolisme secondaire. Parmi ces gènes, l'extinction de *MtSNF4b* semble affecter plus particulièrement la voie de biosynthèse des isoflavonoïdes, dont l'un des produits chez *M. truncatula* est la médicarpine (Deavours et al., 2006). En effet, 26 gènes codant différentes isoformes des transcrits de cette voie sont sur-exprimés dans le type sauvage par rapport aux lignées RNAi *MtSNF4b* imbibées après deux à trois semaines de PMS. Ces gènes représentent 10 des 13 enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de la médicarpine (Fig. 2.8). On retrouve trois gènes qui codent des phénylalanine ammonia lyases (*PAL*), un gène codant une cinnamic acid 4-hydroxylase (*C4H*), 10 codant des chalcones synthases (*CHS*), quatre qui codent des chalcones réductases (*CHR*). Certains gènes identifiés sont plus spécifiques à la voie des isoflavonoïdes, deux codant des chalcones isomérases (*CHI*), deux autres codant des isoflavones synthétases (*IFS*), un gène qui code une 2-hydroxyisoflavone déshydratase (*2HID*), un qui code une isoflavone-2'-hydratase (*I2'H*), un qui code une isoflavone réductase (*IFR*), et enfin un gène qui code une vestitone réductase (*VR*) qui est la dernière enzyme de cette voie de biosynthèse (Fig. 2.8). Seul le gène qui code une *CHS* (TC106550) est retrouvé différemment exprimé entre le type sauvage et les mutants RNAi *MtSNF4b* après six mois de PMS (analyse C). Ceci montre que l'expression différentielle de ces gènes, liée à l'extinction de *MtSNF4b*, est couplée à l'état de dormance des graines. Effectivement, en relation avec la dormance (analyse D), les gènes codant des enzymes du début de cette voie de biosynthèse (*CHS* et *CHR*) sont trouvés sur-exprimés dans les types sauvages dormants par rapport aux non dormants, ce qui n'est pas le cas pour la *PAL*. Les gènes plus en aval de cette

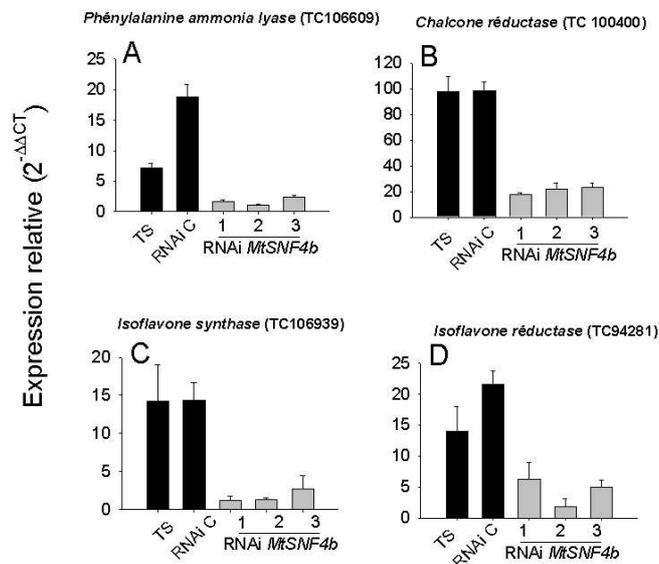


Figure 2.9 : Comparaison des expressions de quatre gènes codant des enzymes clés de la synthèse de la médicarpine dans des embryons de type sauvage et mutants après deux semaines de post maturation à sec. Les graines de type sauvage (TS), de la lignée RNAi témoin (RNAi C) et de trois lignées RNAi *MtSNF4b* indépendantes, sont imbibées six heures à 20°C. (A) Une phénylalanine ammonia lyase (TC106609), (B) une chalcone réductase (TC100400), (C) une isoflavone synthase (TC106939) (B), et (D) une isoflavone réductase (TC94281) sont analysées par RT-qPCR. Les ARN sont extraits à partir de 50 embryons et les écarts types sont donnés pour trois réplicats techniques.

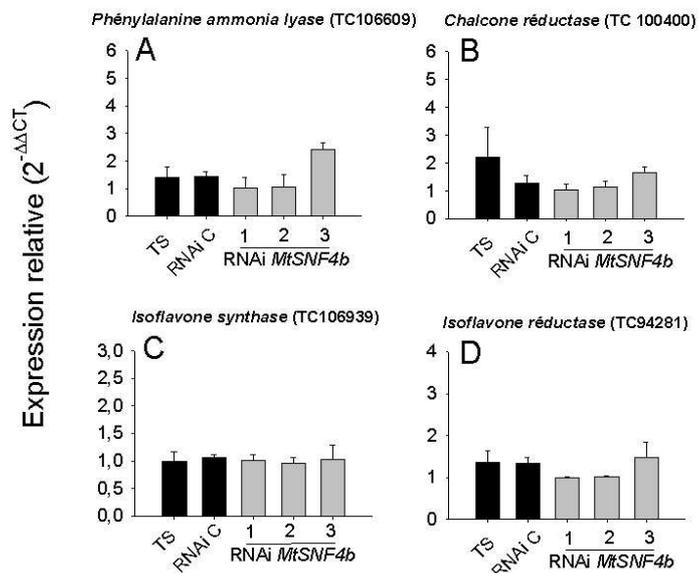


Figure 2.10 : Comparaison des expressions de quatre gènes codant des enzymes clés de la synthèse de la médicarpine dans des embryons de type sauvage et mutants après six mois de post maturation à sec. Les graines de type sauvage (TS), de la lignée RNAi témoin (RNAi C) et de trois lignées RNAi *MtSNF4b* indépendantes, sont imbibées six heures à 20°C. (A) une phénylalanine ammonia lyase (TC106609), (B) une chalcone réductase (TC100400), (C) une isoflavone synthase (TC106939) (B), et (D) une isoflavone réductase (TC94281) sont analysées par RT-qPCR. Les ARN sont extraits à partir de 50 embryons et les écarts types sont donnés pour trois réplicats techniques

voie de biosynthèse semblent être régulés directement ou indirectement par *MtSNF4b* dans les graines dormantes mais non liés à la différence de dormance.

Dans le but de confirmer ces résultats, une analyse des transcrits par RT-qPCR a été menée pendant l'imbibition après deux semaines et six mois de PMS sur quatre gènes représentatifs de cette voie de biosynthèse (*PAL* (TC106609), *CHR* (TC100400), *IFS* (TC106939), et *IFR* (TC94281)) sur trois récoltes indépendantes (Fig. 2.9, 2.10 et 2.11). Les graines d'une des récoltes imbibées après deux semaines PMS montrent une sur-expression des quatre gènes analysés dans le type sauvage et dans la lignée de contrôle par rapport aux lignées RNAi *MtSNF4b* (Fig. 2.9). La *PAL*, la *CHR*, l'*IFS* et l'*IFR* sont plus exprimées dans les embryons sauvages et RNAi contrôle que dans les embryons RNAi *MtSNF4b* (Fig. 2.9). Les graines d'une autre récolte, imbibées après six mois de PMS, montrent une absence de différence d'expression entre les différentes lignées analysées pour les quatre gènes étudiés (Fig. 2.10). Ces deux premiers résultats confirment donc l'analyse transcriptomique. Dans le but de comparer l'expression dans les graines dormantes et non dormantes sur la même récolte, les graines d'une troisième récolte ont été utilisées après deux durées de PMS. Ces graines sont imbibées soit après deux semaines, soit après six mois de PMS (Fig. 2.11). L'analyse conjointe de l'expression de ces gènes dans les graines imbibées après les deux durées de PMS confirme également que l'expression pour ces gènes est moins importante dans les graines RNAi *MtSNF4b* par rapport aux graines de type sauvage après deux semaines de PMS (Fig. 2.11). Enfin, dans les graines après six mois de PMS, l'expression a diminué par rapport au même lot de graines après deux semaines de PMS, même si une différence d'expression persiste entre les graines de type sauvage et RNAi pour la *CHR* et l'*IFR* (Fig. 2.11).

Afin de déterminer si les différences d'expression observées pendant l'imbibition préexistent dans l'embryon mature ou bien si elles sont induites durant les premières phases de l'imbibition, une cinétique d'expression pendant l'imbibition a été réalisée sur des embryons de type sauvage, après deux à trois semaines et six mois de PMS. Pour les quatre gènes analysés, le taux de transcrits augmente dans les embryons dormants pendant l'imbibition (Fig. 2.12). Dans les graines dormantes, les expressions des quatre gènes codant une *PAL*, une *CHR*, une *IFS*, et une *IFR* augmente après 24 heures d'imbibition. Ces expressions restent faibles et similaires à celles observées dans les graines sèches dans des graines non dormantes imbibées 24 heures (Fig. 2.12).

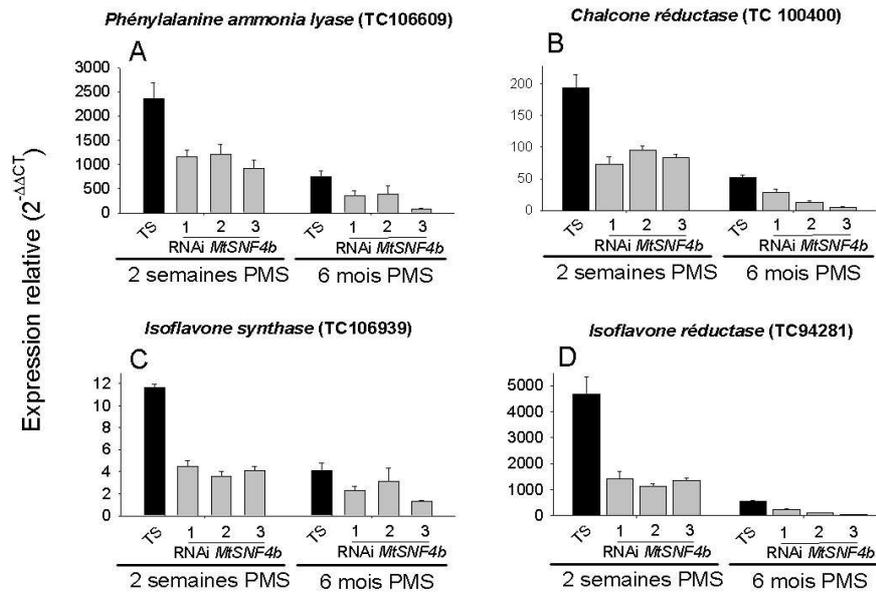


Figure 2.11 : Comparaison de quatre gènes codant des enzymes clés de la synthèse de médicarpine dans des embryons imbibés après deux semaines et six mois de post maturation à sec. Les graines de type sauvage (TS), de la lignée RNAi témoin (RNAi C) et de trois lignées RNAi *MtSNF4b* indépendantes proviennent d'une même récolte et sont imbibées six heures à 20°C après deux temps de post maturation. (A) une phénylalanine ammonia lyase (TC106609), (B) une chalcone réductase (TC100400), (C) une isoflavone synthase (TC106939) (B), et (D) une isoflavone réductase (TC94281) sont analysées par RT-qPCR. Les ARN sont extraits à partir de 50 embryons et les écarts types sont donnés pour trois réplicats techniques.

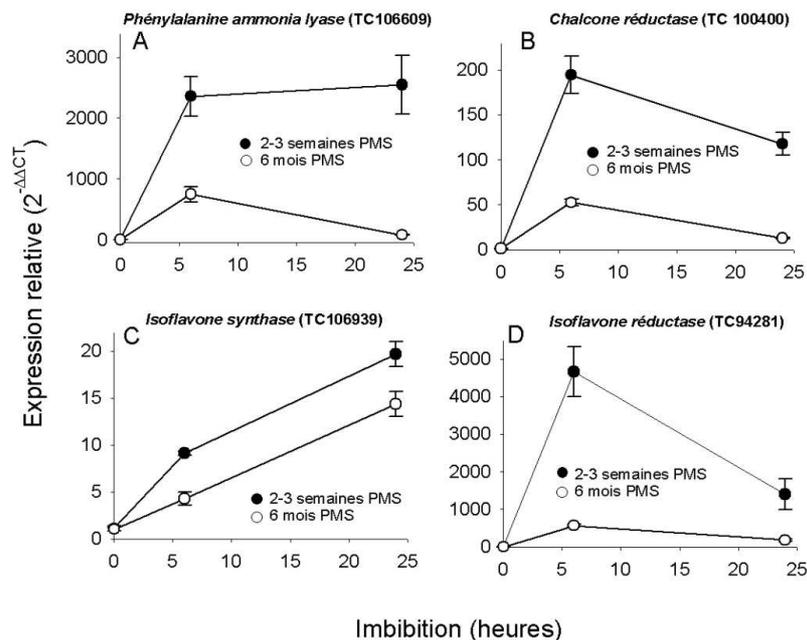


Figure 2.12 : Cinétique d'expression de quatre gènes codant des enzymes clés de la synthèse de la médicarpine dans des embryons imbibés après deux semaines et six mois de post maturation à sec. Les graines de type sauvage sont imbibées après deux temps de post maturation. (A) une phénylalanine ammonia lyase (TC106609), (B) une chalcone réductase (TC100400), (C) une isoflavone synthase (TC106939) (B), et (D) une isoflavone réductase (TC94281) sont analysées par RT-qPCR. Les ARN sont extraits à partir de 50 embryons et les écarts types sont donnés pour trois réplicats techniques.

2.7 Caractérisation de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine en relation avec la signalisation des sucres

Il a été observé au chapitre précédent que le glucose et ses analogues sont capables de réduire (3-O-méthylglucose, glucosamine) ou d'augmenter (glucose) la vitesse de germination des graines dormantes de type sauvage. Le seul sucre qui semble provoquer un effet différentiel entre le type sauvage et les mutants RNAi *MtSNF4b* est le glucose. Il n'est donc pas possible d'identifier la voie de signalisation qui se situe en amont de SNF4b. C'est pourquoi dans un premier temps, l'analyse de l'expression de la *PAL*, de la *CHR* et de l'*IFR* a été réalisée sur des graines non dormantes de *M. truncatula* imbibées 20 heures à 20°C en présence de différents analogues de sucres (Fig. 2.13). Seul le 3-OMG double la quantité de transcrits de la *PAL* et de l'*IFR* et multiplie par 1,5 celle de la *CHR* (Fig. 2.13). Le glucose n'induit pas de changement significatif d'expression de la *PAL* et de l'*IFR* alors qu'il multiplie par 1,5 la quantité de transcrits de la *CHR*. Enfin, le mannose induit une réduction de l'expression de l'*IFR* mais pas de la *PAL* ou de la *CHR* (Fig. 2.13). Le seul sucre montrant un effet activateur sur l'expression de ces gènes est donc le 3-OMG. C'est pourquoi son effet sur l'expression des gènes étudiés a été analysé dans des graines dormantes.

Les gènes de *PAL* et de *CHS* sont régulés par le glucose et activés par la voie de perception et de signalisation de sucres indépendante des hexokinases chez *A. thaliana* (Xiao et al., 2000 ; Loreti et al., 2001). Le 3-O-méthylglucose, un analogue du glucose, est capable d'activer cette voie de signalisation via les transporteurs (Loreti et al., 2001). L'effet du 3-OMG sur l'expression de la *PAL*, la *CHR* et l'*IFR* a été étudié dans les graines de type sauvage et les mutants RNAi *MtSNF4b* après deux et quatre semaines de PMS (Fig 2.14). Après deux semaines de PMS, l'analyse par RT-qPCR montre que l'expression différentielle prévue pour ces trois gènes entre les graines de type sauvage et les mutants dans l'eau est confirmée après 20h d'imbibition (Fig. 2.14A-C). La *PAL*, la *CHR* et l'*IFR* sont réprimées de 60% dans les embryons de type sauvage imbibés dans le 3-OMG par rapport à ceux imbibés dans l'eau (Fig. 2.14A-C). Après quatre semaines de PMS, le 3-O-méthylglucose ne réprime plus l'expression de la *PAL*, de la *CHR* et de l'*IFR* dans les embryons de type sauvage (Fig. 2.14D-F).

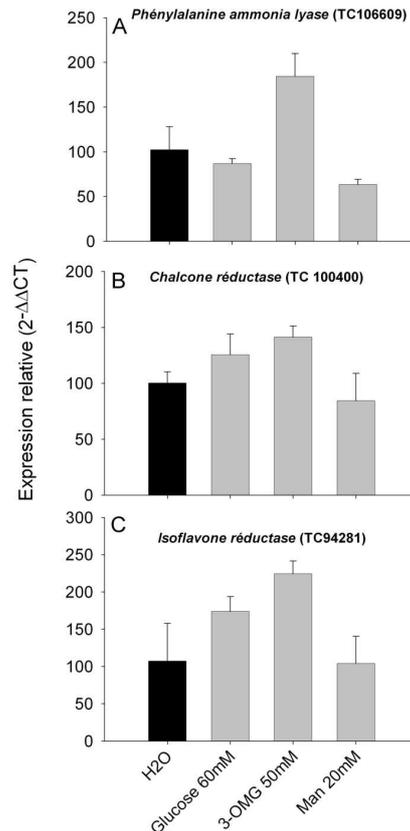


Figure 2.13 : Effet d'hexoses sur l'expression d'une PAL d'un CHR et d'une IFR. Les expressions sont mesurées par RT-qPCR sur des extractions d'ARN provenant de 30 embryons imbibés pendant 20 heures dans l'eau, le glucose à 60mM, le Mannose à 20mM, le 3-O-méthylglucose à 50mM après un an de post maturation à sec. Les ARN sont extraits à partir de 30 embryons et les écarts types sont donnés pour trois réplicats techniques.

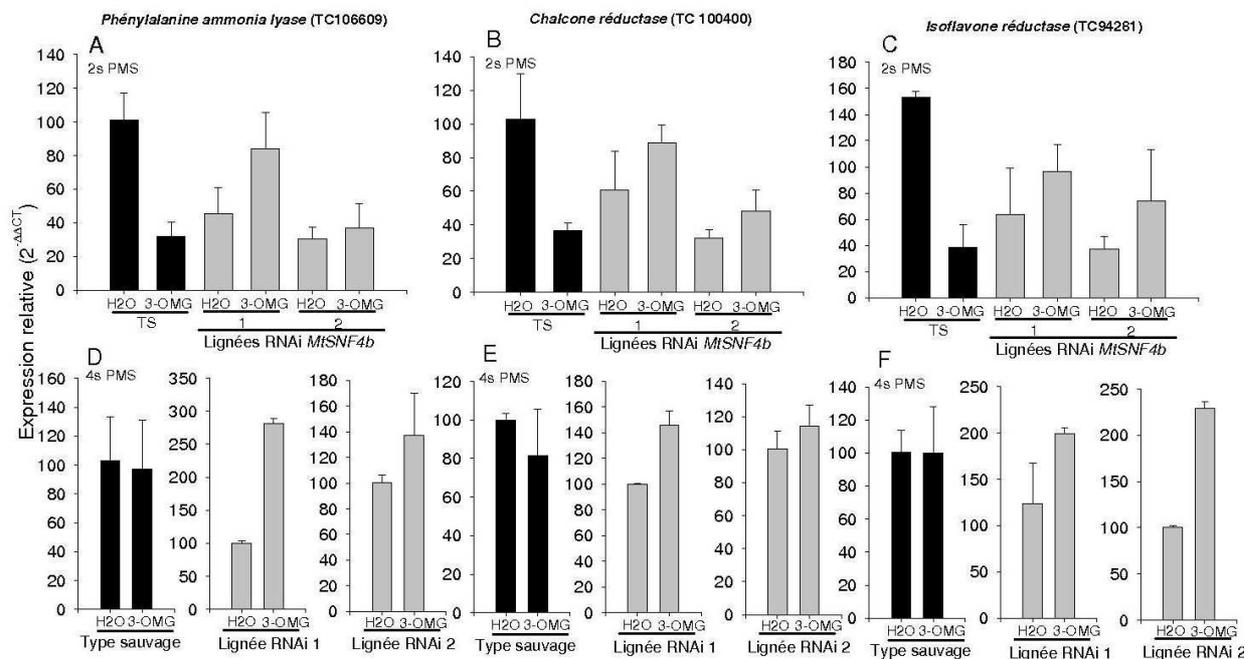


Figure 2.14 : Comparaison de l'expression d'une PAL , d'une CHR et d'une IFR dans le type sauvage et deux lignées RNAi *MtSNF4b* dans du 3-OMG. Les expressions sont mesurées par RT-qPCR sur des extractions d'ARN provenant de 30 embryons imbibés pendant 20 heures dans l'eau ou du 3-O-méthylglucose à 50mM après deux (A, B, C) et quatre semaines (D, E, F) de post maturation à sec (PMS : post maturation à sec).

Par contre, dans les embryons de mutants RNAi *MtSNF4b*, cette régulation différentielle en fonction du temps de PMS semble avoir disparue, les gènes étudiés sont sur-exprimés lors d'une incubation dans le 3-OMG dans les deux conditions de PMS (Fig. 2.14C, D).

Pour confirmer l'indépendance de la régulation de ces gènes par une voie liée à l'hexokinase, l'effet d'un inhibiteur d'hexokinase, le glucosamine, a également été étudié sur leur expression (Fig 2.15). Le glucosamine induit une répression de l'expression des trois gènes étudiés dans les lignées RNAi *MtSNF4b* comme dans la lignée de type sauvage (Fig. 2.15). Les différences d'expressions de ces trois gènes entre une incubation dans l'eau et une incubation dans le glucosamine sont similaires dans le type sauvage et les lignées RNAi *MtSNF4b* (Fig. 2.15).

2.8 Discussion

Les analyses transcriptomiques des embryons RNAi *MtSNF4b* et de type sauvage montrent que *MtSNF4b* régule l'expression de gènes liés à la défense et au métabolisme secondaire directement ou indirectement. Le nombre réduit de gènes différentiellement exprimés dans les lignées imbibées après une PMS indique que la régulation de ces gènes par *MtSNF4b* se fait en lien avec la dormance. Les embryons montrant des différences de vitesses de germination lorsqu'ils sont isolés des téguments (Fig. 1.11), présentent également une différence de profil d'expression de transcrits, ce qui confirme l'idée d'un rôle de *MtSNF4b* dans l'embryon modifiant la dormance embryonnaire. Dans un premier temps nous discuterons de l'implication de *MtSNF4b* dans la voie de biosynthèse de la médicarpine, puis de l'activation des gènes de défense et des voies de régulation que suggère notre analyse. Ensuite, nous tenterons de définir la place de *MtSNF4b* dans la signalisation des sucres contrôlant l'expression de gènes de la voie biosynthèse de la médicarpine. Enfin, nous discuterons de l'expression différentielle des transcrits corrélée avec la dormance chez *M. truncatula* en comparaison des données acquises chez d'autres espèces.

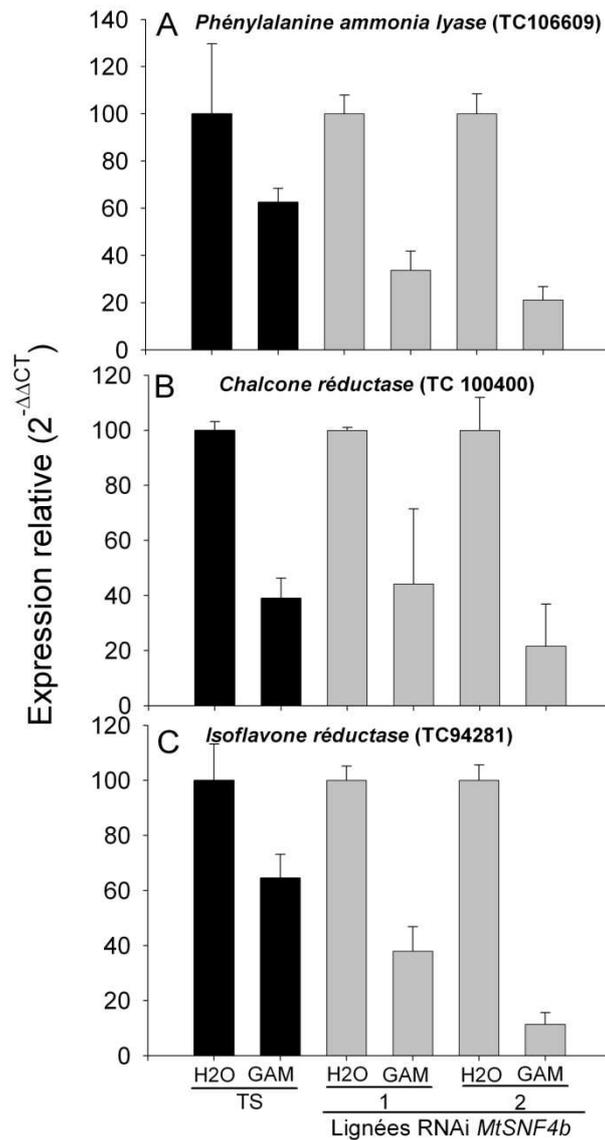


Figure 2.15 : Effet du glucosamine sur l'expression d'une PAL d'un CHR et d'une IFR dans une lignée de type sauvage et deux lignées RNAi *MtSNF4b*. Les expressions sont mesurées par RT-qPCR sur des extractions d'ARN provenant de 30 embryons imbibés pendant 20 heures dans l'eau, le glucose à 60mM, le mannose à 20mM, le 3-O-méthylglucose à 50mM après un an de post maturation à sec. Les ARN sont extraits à partir de 30 embryons et les écarts types sont donnés pour trois réplicats techniques.

2.8.1 Implication de MtSNF4b dans la voie de biosynthèse de la médicarpine

Le groupe de gènes le plus largement représenté dans l'analyse comparant les graines de type sauvage et les mutants RNAi *MtSNF4b* est lié au métabolisme secondaire (*PAL*, *C4H*, *CCR*, *CCoAOMT*) et plus particulièrement au métabolisme des flavonoïdes et des isoflavonoïdes (*CHS*, *CHR*, *CHI*, *IFS*, *HID*, *IFR* et *VR*). Un seul des gènes de cette voie de biosynthèse codant une *CHS* (TC106550) est retrouvé dans l'analyse des graines imbibées après six mois de PMS. Il constitue peut-être une expression résiduelle puisque cette *CHS* est l'un des gènes les plus différenciellement exprimés dans les embryons de type sauvage par rapport aux embryons RNAi *MtSNF4b* faiblement post-maturés. L'activation de cette voie semble donc liée à la dormance et sous contrôle de MtSNF4b. La médicarpine, qui dérive des isoflavonoïdes, est une phytoalexine antifongique de la famille des ptérocarpanes produite par de nombreuses *Fabaceae* (Ingham et al., 1982). La médicarpine est le ptérocarpane majeur chez *M. sativa*, (Higgins et al., 1972) et s'accumule dans les tissus infectés par un pathogène chez *V. faba* (Hargreaves et al., 1976). La médicarpine serait un élément important de la réponse de défense contre les pathogènes fongiques tel que *Phoma medicaginis* chez *M. truncatula* (Jasinski et al., 2009). Il a été observé que la teneur en médicarpine de feuilles infectées par *P. medicaginis* était corrélée au processus d'infection (Jasinski et al., 2009). La voie de biosynthèse de la médicarpine a été particulièrement étudiée sur des cultures cellulaires de cals de racines de *M. truncatula* (Frag et al., 2007 ; Naoumkina et al., 2007 ; 2008). La plupart de ces gènes sont inductibles par l'exposition de cultures cellulaires à un extrait de levure, reproduisant l'infection par un pathogène (Frag et al., 2007). Leur expression au niveau du transcriptome est corrélée à l'accumulation de médicarpine (Naoumkina et al., 2008).

La sur-expression de la 12-oxophytodionéate réductase (Annexe 2 : données supplémentaires S1 et S2) dans les lignées sauvages par rapport aux lignées RNAi *MtSNF4b* indique que MtSNF4b est lié à la voie de biosynthèse du jasmonate pendant l'imbibition. La 12-oxophytodionéate réductase est une enzyme clef de la biosynthèse du jasmonate permettant la réduction du méthyl-jasmonate (MeJA) en jasmonate (Stintzi et al., 2001). Le jasmonate a un effet protecteur contre l'infection de pathogène chez *A.*

thaliana, comme l'a démontré l'analyse de la résistance à des champignons nécrotrophes du genre *Pithium* de mutants déficients ou insensibles au jasmonate (Vijayan et al., 1998). Les jasmonates sont impliqués dans la réponse aux stress biotiques et ont été mis en évidence pour leur rôle dans l'induction de gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine (Naoumkina et al., 2008). L'induction de cette voie de biosynthèse par le méthyle de jasmonate est partielle (seulement des *PAL* et la *C4H*) et seul un éliciteur à base d'extrait de levure induit l'activation de tous les gènes de cette voie (Naoumkina et al., 2008). Or, bien que la 12-oxophytodionéate réductase soit toujours sur-exprimée dans les graines imbibées après post maturation, les gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine ne sont plus activés. Ce résultat semble indiquer que *MtSNF4b* joue un rôle dans l'activation de gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine en lien avec la signalisation des jasmonates.

2.8.2 Rôle de *MtSNF4b* dans la régulation développementale de gènes de défense

Notre analyse transcriptomique montre qu'un grand nombre d'autres gènes liés à la défense contre les stress biotiques sont sur-exprimés d'une manière constitutive dans les graines pendant la maturation et l'imbibition quand les graines restent dormantes. Au contraire, dans les mutants RNAi *MtSNF4b* des gènes liés aux stress abiotiques tels que des petites HSP et des protéines LEA sont sur-exprimés. Certains gènes tels que ceux codant des LTP-like ou *MtN5*, sont différenciellement exprimés entre les lignées RNAi *MtSNF4b* et le type sauvage indépendamment de la PMS. Leur rôle éventuel dans le phénotype de dormance semble donc infirmé. Les *MtN5* sont des marqueurs précoces exprimés avant l'infection durant le développement des nodules chez *M. truncatula* (Gamas et al., 1996 ; El Yahyaoui et al., 2004). *MtN5* appartient à une famille non spécifique de protéines de transfert de lipides incluant DIR, une protéine jouant un rôle clef dans la signalisation longue distance de la résistance systémique acquise (Maldonado et al., 2002).

Certains gènes de notre analyse sont sur-exprimés dans des conditions de stress biotiques chez de nombreuses espèces. Chez *P. patens*, les réponses à l'infection par des pathogènes du genre *Pithium* induisent un renforcement des parois, et l'induction de gènes de défense tels que la *CHS* ou la *PAL* ainsi que l'accumulation de jasmonate et d'acide

12-oxo-phytodionique (OPDA) (Oliver et al., 2009). Une analyse de l'expression de gènes pendant le développement d'embryons d'orge suggère également que l'embryon met en place un programme de défense lié au développement en fin de maturation, pendant la phase de dessiccation, caractérisée par la sur-expression de gènes classés dans la catégorie réponse aux stress biotiques. Cette réponse est notamment associée à l'expression de gènes codant des protéines de type 'pathogenesis related' ainsi que de gènes codant des protéines aux propriétés anti-oxydantes (Nielsen et al., 2006). Une analyse par clonage par PCR soustractif d'ADNc réalisée sur la papilionacée désertique *Retama raetam* a montré que la dormance de cette plante est accompagnée d'une accumulation de transcrits codant des protéines de type PR10, des déhydrines et des facteurs de transcription de type WRKY (Pnueli et al., 2002). Au contraire, des plantes non dormantes soumises à des conditions stressantes accumulent des transcrits codant des petites HSP et des co-activateurs de la transcription répondant à l'éthylène (Pnueli et al., 2002). Les différentes voies mises en évidence dans ces travaux sont similaires à celles observées dans notre analyse transcriptomique ce qui semble indiquer que le phénomène observé dans les graines dormantes sous contrôle de *MtSNF4b* est retrouvé à l'échelle de plantes entières tolérantes à la sécheresse. Les petites HSP et les protéines LEA sont généralement induites lors de stress abiotiques sur la plante entière ou bien par l'ABA dans les graines (Kermode et al., 1990 ; Abernethy et al., 1989 ; Wehmeyer et al., 2000). L'extinction de *MtSNF4b* semble provoquer une réaction de stress abiotique induisant l'expression de gènes associés à la réponse aux stress abiotiques. *MtSNF4b* jouerait donc un rôle dans la mise en place et le maintien de l'acquisition développementale à la défense, respectivement pendant la maturation et l'imbibition de graines dormantes permettant de mieux tolérer les éventuels dommages imposés par une attaque pathogène.

Il reste à savoir comment *MtSNF4b* et le complexe auquel elle participe activent l'expression de ces gènes de défense. Dans l'analyse transcriptomique, plusieurs gènes régulés (indirectement) par *MtSNF4b* sont impliqués dans les phases précoces de cette activation de la défense. Une première indication peut venir des gènes codant des facteurs de transcription de type WRKY qui apparaissent plusieurs fois sur-exprimés dans les graines de type sauvage dormantes par rapport aux graines RNAi *MtSNF4b*. Or, ces facteurs de transcription sont liés à la signalisation lors de réaction de défenses des plantes (Eulgem et al., 2007). Les WRKY sont une large famille de facteurs de transcription agissant en réseau et se liant à des boîtes W trouvées dans les promoteurs de nombreux gènes de défense co-régulés chez *A. thaliana* (Somssich et al., 2006). Leur expression à l'échelle du transcrit est sujette à

de nombreuses boucles de régulations positives et négatives, ce qui laisse suggérer que MtSN4b est liée à la régulation de la transcription pendant la germination. SNF1 est en effet connu pour activer des facteurs de transcription via leur phosphorylation par le complexe SNF1 chez la levure (Young et al., 2003). A l'heure actuelle, les substrats de SnRK1 n'incluent pas de facteurs de transcription. Cependant il a été démontré que SnRK1 orchestre la signalisation énergétique chez *A. thaliana* par l'intermédiaire de facteurs de transcription de type « basic leucine zipper » (Beana Gonzalez et al., 2007).

Un deuxième groupe de gènes présents dans l'analyse transcriptomique qui répondent de manière très précoce et transitoire à des éliciteurs, sont quatre gènes codant des *ATL* : des protéines RING-H2 (Serrano et al., 2004). Une analyse de mutants d'*A. thaliana* sur-exprimant une *ATL2* montre une sur-expression de *CHS* et d'une *PAL* (Serrano et al., 2004). MtSNF4b pourrait agir au sein d'un complexe SnRK1 dans la régulation de l'expression de gènes liant les stress biotiques et le métabolisme secondaire par le biais de l'activation de facteurs de transcription.

2.8.3 Signalisation des sucres liée à MtSNF4b contrôlant l'expression de gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine

L'analyse de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine en réponse aux sucres nous indique que le glucose, comme le mannose, n'ont pas d'effet dans les graines non dormantes (Fig. 2.13). Ce résultat corrobore ceux obtenus pour l'expression de la *PAL* et de la *CHS* dans les feuilles et les plantules d'*A. thaliana* qui sont induites par une voie indépendante de l'hexokinase (Sheen et al., 1999, Jossier et al., 2009). Dans les graines dormantes, la signalisation de la voie de biosynthèse de la médicarpine semble donc indépendante de l'hexokinase.

Partant du fait que seul le 3-OMG a un effet sur l'expression des gènes étudiés, l'induction des gènes a également été étudiée dans les graines dormantes. Etonnamment, il a été montré que, dans ces dernières, le 3-OMG réprime les gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine. Cet effet semble s'amoinrir durant la levée de la dormance et après quatre semaines de PMS, ni l'induction ni la répression ne sont observables. Donc, dans

les graines, la signalisation des sucres, via la voie hexokinase indépendante, semble s'inverser au cours de la PMS. Ceci illustre bien la complexité supposée de ces voies de signalisation des sucres chez les plantes, qui dépend fortement de l'organe, du stade physiologique et de l'environnement. A la vue de ce résultat, il semble que l'analyse de l'induction ou de la répression des gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine, par le glucose et le mannose dans les graines dormantes, soit nécessaire à une meilleure compréhension du phénomène observé.

A la différence du type sauvage, dans des graines de type RNAi dormantes l'expression des gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine est induite en lien à une exposition à du 3-OMG. Cette induction semble être retrouvée indifféremment de la durée de la PMS (deux et quatre semaines). Ce résultat peut être expliqué de deux façons : 1) La différence entre type sauvage et lignées RNAi *MtSNF4b* provient de la dormance moins profonde des lignées RNAi *MtSNF4b*. 2) La différence entre type sauvage dormant et non dormant, ou entre les lignées RNAi *MtSNF4b* après deux à quatre semaines de PMS, et les graines de type sauvage dormantes, est due à l'absence de MtSNF4b dans un complexe régulateur (Annexe 1). L'interprétation de la seconde hypothèse est la suivante : dans les tissus ne contenant pas *MtSNF4b* ou dans lesquels MtSNF4b est dissocié de son complexe, comme les feuilles ou les graines non dormantes, le 3-OMG active l'expression de gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine via une voie hexokinase et MtSNF4b indépendante. Dans les graines dormantes où MtSNF4b est associé en complexe durant l'imbibition, cette voie est contournée et/ou réprimée, via le complexe MtSNF1/MtSNF4b qui est réprimé par une voie indépendante des hexokinases. Il semble qu'une inversion progressive de la signalisation des sucres survienne durant la levée de la dormance. Cependant, une analyse de l'induction de ces gènes par le 3-OMG dans des graines RNAi *MtSNF4b* non post-maturées et totalement post-maturées sera nécessaire à l'élaboration d'une unique hypothèse concernant la régulation de la signalisation de la perception des sucres pendant la PMS en lien avec MtSNF4b.

2.8.4 Caractérisation du transcriptome de *M. truncatula* en relation avec la dormance

Lors de l'analyse comparant les gènes différentiellement exprimés dans les graines dormantes et non dormantes, 70% des gènes sont activés dans les graines non dormantes. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus dans la comparaison de l'expression des gènes dans des graines dormantes et non dormantes d'*A. thaliana*, qui montre que 62% à 69% des gènes sont plus exprimés dans les graines non dormantes (Cadman et al., 2006 ; Carrera et al., 2007). Cependant, le nombre de gènes identifiés dans notre analyse est plus faible que dans l'étude de Carrera et al., (2007) ou plus de 2000 gènes étaient différentiellement exprimés contre 200 dans notre analyse. La comparaison du nombre de gènes différentiellement exprimés reste cependant difficile à interpréter du fait de la différence de technique et du seuil de détection, ainsi que du fait que notre puce à ADNc ne représente que 40% du génome de *M. truncatula*.

Le groupe de gènes le plus représenté dans l'analyse comparant les embryons dormants et non dormants appartient au métabolisme secondaire. Par contre, des gènes associés au stress, notamment des ABR17/18 et LEA sont trouvés dans les graines dormantes mais pas dans les graines non dormantes. Ceci corrobore les données obtenues chez *A. thaliana* (Cadman et al., 2006).

Dans cette analyse comparative, aucun gène différentiellement exprimé n'est lié à la synthèse ou la dégradation de l'ABA. Or chez *A. thaliana*, des analyses indiquent que des gènes associés à la synthèse d'ABA (*NCED6* et 9) sont sur-exprimés dans les graines dormantes par rapport aux graines non dormantes et des gènes associés au catabolisme de l'ABA (*CYP707A1* et 2) sont sur-exprimés dans les graines non dormantes (Cadman et al., 2006). Les seuls gènes associés à l'ABA codent des phosphatases 2C (TC97909 et TC107841), qui ont été identifiées pour leur rôle négatif dans la signalisation de l'ABA (Pernas et al., 2007) et qui sont sous-exprimées dans les graines dormantes. Par contre, l'homologue du gène codant une *GASA4* sur-exprimé dans les graines non dormantes dans notre analyse est également sur-exprimé dans les graines non dormantes d'*A. thaliana* (Cadman et al., 2006).

Dans les graines non dormantes, de nombreux gènes sur-exprimés sont associés à l'utilisation des réserves carbonées, lipidiques et protéiques et leur utilisation ainsi qu'à la modification des parois. Ce résultat corrobore les analyses précédemment réalisées chez *A. thaliana* où quatre fois plus de gènes appartenant à ces classes sont sur-exprimés dans le type sauvage (Cadman et al., 2006). Une invertase sur-exprimée dans les graines non dormantes, pourrait notamment être liée à l'hydrolyse du saccharose observée dans les graines non dormantes dans le chapitre 1. En plus de ceux impliqués dans le métabolisme, plusieurs gènes associés à la synthèse protéique sont retrouvés dans les graines dormantes par rapport au non dormantes, notamment de nombreuses sous-unités ribosomales. Cette différence qualitative a déjà été observée chez *A. thaliana* par Cadman et al., (2006). Bien que la transcription ne soit pas indispensable à la germination (Rajjou et al., 2004), la néo-synthèse de nouvelles sous-unités ribosomales semble requise pour une germination rapide et pour la préparation de la croissance de l'embryon (Cadman et al., 2006).

Chapitre 3 :
Impact de MtSNF4b sur la croissance de
***Xanthomonas* dans les graines de**
M. truncatula

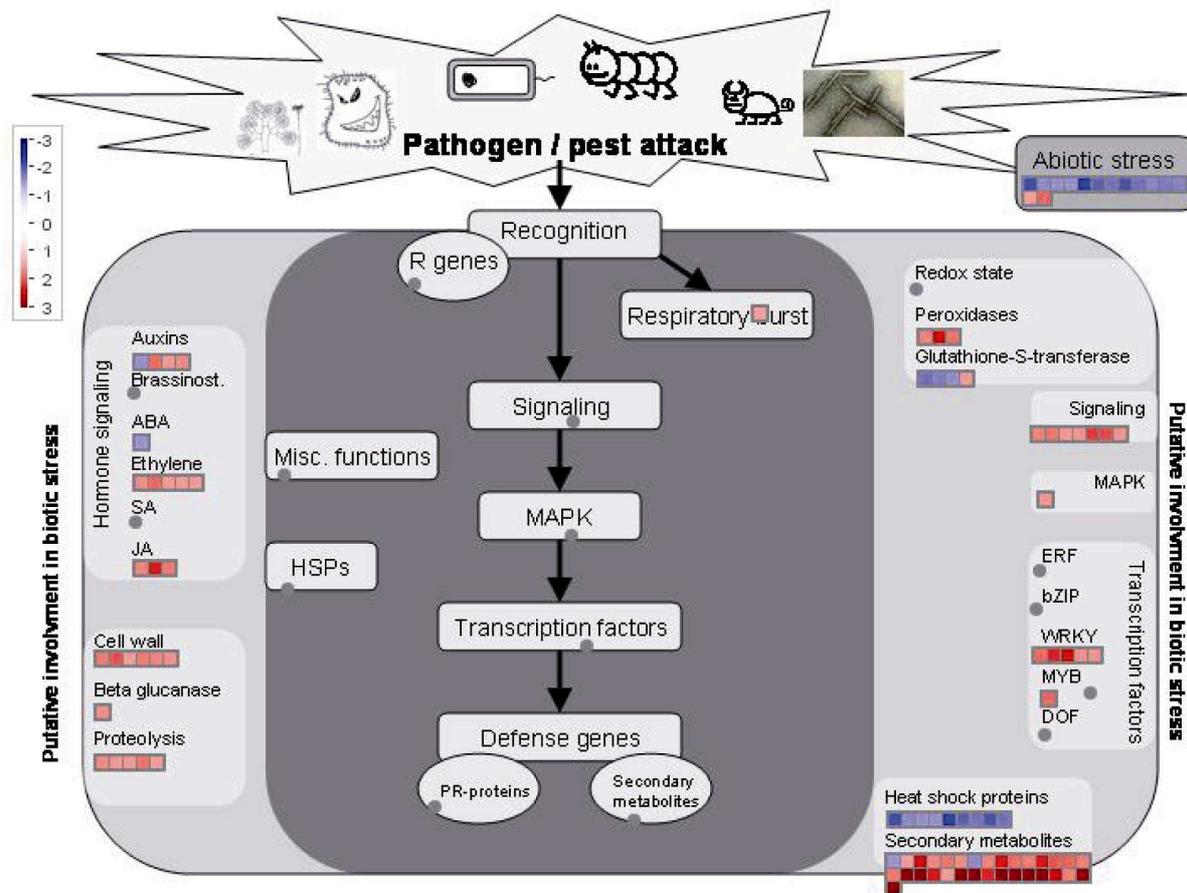


Figure 3.1 : Schéma de classification des transcrits liés aux stress biotiques. La classification est effectuée à l'aide du logiciel MAPMAN à partir des données des analyses transcriptomiques comparant le type sauvage aux lignées RNAi *MtSNF4b* imbibées après deux à trois semaines de PMS (ImageAnnotator 2.0.0). L'intensité relative des gènes provient de l'analyse des données transcriptomiques par le logiciel Genespring 7.0 (Agilent). Les cases de couleur rouge indiquent un gène dont l'expression est accrue dans le type sauvage.

Dans le chapitre 2, les résultats d'analyse transcriptomique des graines de mutants RNAi MtSNF4b par rapport aux graines de type sauvage montrent que la plupart des gènes réprimés sont liés à la défense biotique. Effectivement, une analyse des données transcriptomiques par le logiciel MAPMAN confirme que de nombreux gènes réprimés dans les mutants RNAi MtSNF4b se trouvent potentiellement dans la catégorie fonctionnelle des stress biotiques (Fig. 3.1). Dans les graines de type sauvage, l'expression de ces gènes est activée pendant la phase d'imbibition des graines dormantes. Ceci laisse supposer que MtSNF4b peut jouer un rôle dans la défense contre une attaque pathogène, maintenant une qualité et une vigueur optimales des graines en attente de la germination. Dans ce chapitre, nous avons voulu étudier cette hypothèse en nous appuyant sur l'expertise de l'équipe Ecologie, Diversité, Taxonomie des bactéries phytopathogènes de l'UMR Pavé. Cette équipe travaille sur les mécanismes de la transmission des bactéries appartenant au genre *Xanthomonas* ssp sur la légumineuse *Phaseolus vulgaris* (Darsonval et al., 2008 ; 2009). *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et *X. fuscans* subsp. *fuscans* sont des organismes de quarantaine responsables de la gousse commune du haricot et sont transmis par les semences de leur plante-hôte (Darrasse et al., 2007). La transmission des pathogènes est une problématique importante pour les semenciers. Les champignons, bactéries et virus peuvent en effet être transmis passivement par les semences aux plantes adultes et, parmi les pathogènes transportés par les semences, les bactéries sont particulièrement problématiques étant donné le nombre limité de stratégies de contrôle de ces pathogènes (Darsonval et al., 2009).

L'interaction entre plantes et pathogènes peut mener soit à la réussite de l'infection (interaction compatible), soit à une résistance (interaction incompatible). Dans le cadre d'une interaction incompatible, l'infection par un virus, une bactérie ou un champignon élicite des réponses localisées dans et autour des cellules infectées de l'hôte. Ces réponses incluent un choc oxydatif pouvant mener à la mort de la cellule, le pathogène est ainsi confiné dans une zone de cellules mortes, limitant ainsi sa diffusion depuis le site d'infection initial (Lamb et Dixon, 1997; Kombrink et Schmelzer, 2001). Les réponses locales incluent des changements dans la composition des parois pouvant inhiber la pénétration des pathogènes, et la néo-synthèse de composés antimicrobiens tels que des phytoalexines ou des protéines associées aux pathogènes (PR) (Heil et Bostock, 2002). En plus de cette réponse locale, un signal se diffuse dans la plante et induit des changements d'expression de gènes dans des parties non infectées des plantes. Cette réponse systémique inclut, dans de nombreux cas, la production de phytoalexines et de protéines PR (van Loon et al., 1997; van Loon et van Strein, 1999). Les

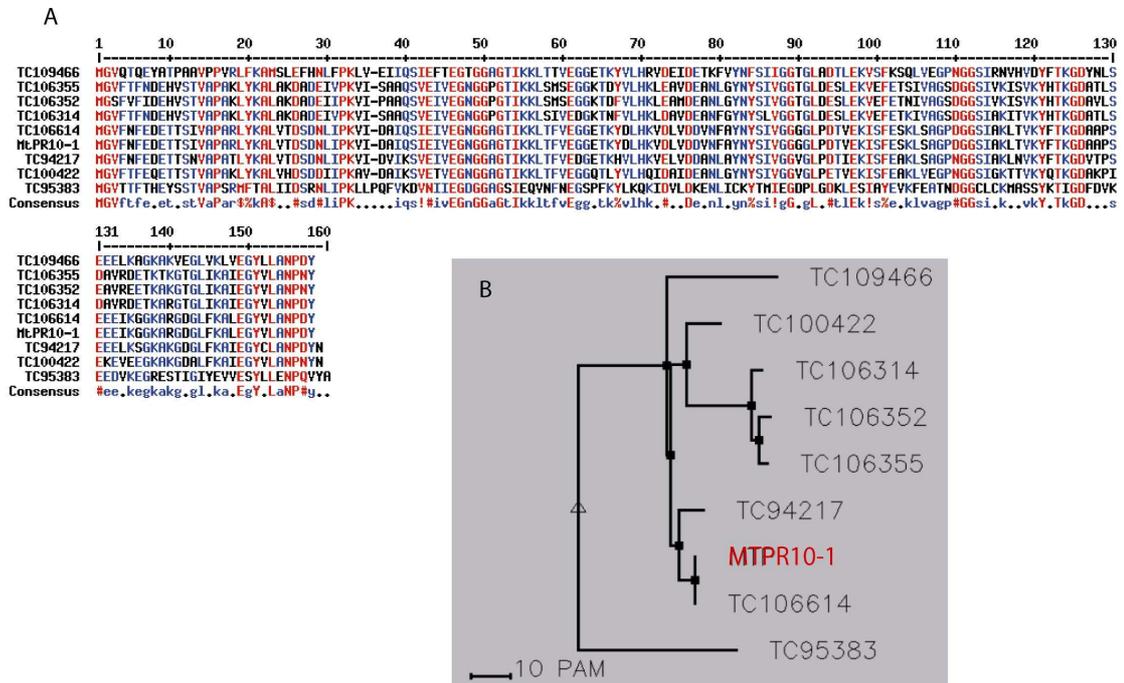


Figure 3.2 : Alignement protéique des protéines annotées PR10 dans l'analyse transcriptomique. L'alignement est réalisé au moyen du logiciel Multalin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>). Les acides aminés représentés par des lettres rouges sont conservés. Les acides aminés codés par des lettres bleues ou noires représentent une différence d'une protéine à l'autre.

gènes dont l'expression est réduite par l'extinction de *MtSNF4b* sont associés à la synthèse de phytoalexines (médicarpine), à la modification de la paroi cellulaire (glucanases, peroxydases) et à des protéines PR10 (chapitre 2).

Dans ce chapitre, nous avons d'abord vérifié l'expression différentielle de *MtPR10* entre le type sauvage et le mutant RNAi *MtSNF4b* aux niveaux transcriptionnel et traductionnel. Puis, avant d'évaluer le rôle de *MtSNF4b* dans la résistance aux pathogènes dans les graines dormantes de *M. truncatula*, une caractérisation du pathosystème *Xanthomonas* ssp / *M. truncatula* R108 a été réalisée sur de jeunes plantules avec une dizaine de souches de *Xanthomonas* pour identifier des souches compatibles et incompatibles. Ensuite, l'impact de l'inoculation de deux souches de *Xanthomonas* sur la physiologie des semences de *M. truncatula* a été étudié. Une étude de la sensibilité des semences à deux souches de *Xanthomonas* compatible et incompatible a été réalisée par l'analyse des dynamiques des tailles des populations bactériennes durant l'imbibition. Enfin l'impact de l'extinction de MtSNF4b sur les défenses contre les stress biotiques des semences a été étudié par le biais d'une analyse de la dynamique des tailles des populations bactériennes de deux souches de *Xanthomonas* dans des lignées RNAi MtSNF4b.

3.1 Impact de l'extinction de MtSNF4b sur l'expression de MtPR10

Lors de l'analyse transcriptomique par puce à ADNc, une importante classe fonctionnelle de gènes sur-exprimés dans les embryons de type sauvage par rapport aux embryons RNAi *MtSNF4b* est associée aux stress biotiques (Fig. 3.1). Parmi les gènes différentiellement exprimés, neuf codent des protéines proches de « pathogenesis related protein 10 » (PR10). Les PR10 appartiennent à la famille des PR qui est un groupe de protéines caractérisées par leur faible expression basale dans les tissus sains et leur accumulation dans les tissus infectés par un pathogène (Sels et al., 2008). Les PR10 forment une large famille de PR dont l'activité serait ribonuclease-like (Somssich et al., 1986). Parmi les transcrits présents dans l'analyse transcriptomique, TC106614, connu sous le nom *MtPR10-1* (Gamas et al., 1998), est sur-exprimé dans le type sauvage par rapport aux lignées RNAi *MtSNF4b* imbibées après deux à trois semaines de post maturation à sec (PMS) (Fig 3.2, annexe 1). Les autres transcrits annotés « PR » révélés par l'analyse transcriptomique ont une forte homologie de séquences protéiques avec MtPR10-1 (Fig. 3.2).

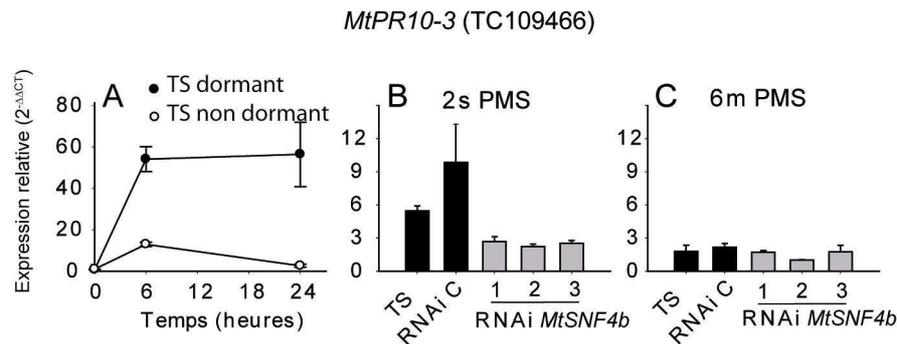


Figure 3.3 : Cinétique d'expression de *MtPR10-3* durant l'imbibition. La quantité relative de transcrits de TC109466 (*MtPR10-3*) de graines dormantes (cercles vides) et non dormantes (cercles pleins) de *M. truncatula* est analysée par RT-qPCR à 0, 6 et 24 heures d'imbibition (A). L'abondance des transcrits de *MtPR10-3* dans des embryons de type sauvage (TS), témoin RNAi (RNAi C) et mutants RNAi *MtSNF4b* à six heures d'imbibition après deux semaines (B) ou six mois (C) de PMS. Les extractions d'ARN sont réalisées sur 50 graines pour chaque point, et l'écart type est donné pour trois réplicats techniques.

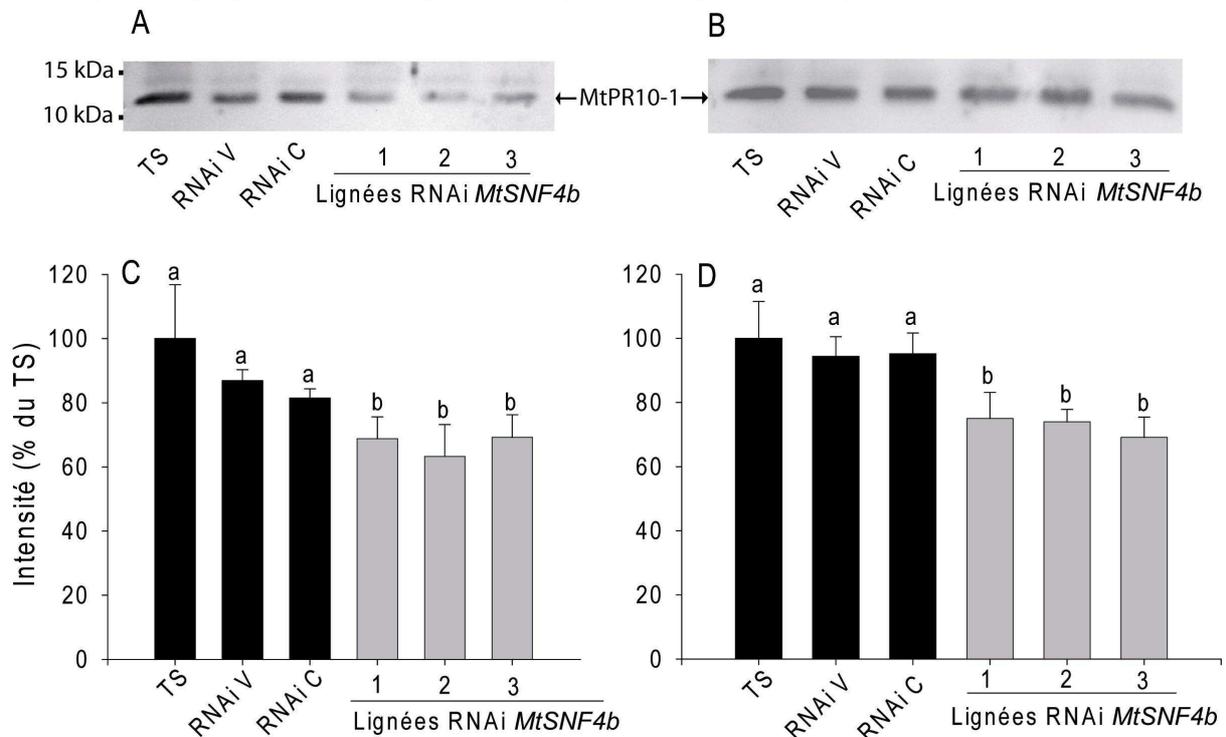


Figure 3.4 : Expression de la protéine MtPR10-1 pendant l'imbibition de graine de *M. truncatula*. Les protéines solubles de trois lignées exprimant *MtSNF4b* et trois lignées RNAi *MtSNF4b* sont extraites après six heures (A et C) et 36 heures (B et D) d'imbibition à 20°C dans des graines dormantes. Deux western blots représentatifs de six heures (A) et 36 heures (B) d'imbibition sont montrés. Ils ont été répétés trois à quatre fois par échantillon et l'intensité du marquage a été quantifiée à l'aide du logiciel Quantity One (Biorad) (C et D) et ramenée à l'intensité observée dans le type sauvage. Les écarts types sont calculés pour ces réplicats et un t-test a été réalisé avec une p-value seuil de 0,05.

Afin de confirmer l'analyse transcriptomique par puce à ADNc concernant l'expression des gènes codant des PR10, une analyse en RT-qPCR a été réalisée sur des embryons de type sauvage dormants et non dormants au cours d'une imbibition à 20°C (Fig. 3.3A). L'expression de TC109466 (nommé ici *MtPR10-2*) augmente de soixante fois dans les embryons dormants après six heures d'imbibition et se maintient à ce niveau après 24 heures. Dans les embryons non dormants, l'expression de *MtPR10-2* n'augmente que de dix fois après six heures d'imbibition et retrouve son niveau d'expression initial après 24 heures d'imbibition où la quantité de transcrits est équivalente à celle trouvée dans les graines sèches (Fig. 3.3A). Il semble donc que l'expression de *MtPR10-2* soit activée dans les graines dormantes pendant l'imbibition. L'effet de l'extinction de *MtSNF4b* sur l'expression de *MtPR10-2* a également été évalué après six heures d'imbibition sur des graines de type sauvage d'un témoin RNAi et de trois lignées RNAi *MtSNF4b* indépendantes, après deux semaines ou six mois de PMS (Fig. 3.3B et 3.3C). Après deux semaines de PMS, l'expression de *MtPR10-2* est deux à quatre fois plus élevée dans les embryons de type sauvage et le contrôle que dans les embryons RNAi *MtSNF4b* (Fig. 3.3B). Dans les embryons imbibés après six mois de PMS, l'expression de *MtPR10-2* est similaire dans toutes les lignées (Fig. 3.3C). Ces résultats confirment donc l'analyse transcriptomique par puces à ADNc concernant la différence d'expression de *MtPR10-2* entre les lignées de type sauvage et les lignées RNAi *MtSNF4b*, en lien avec la dormance.

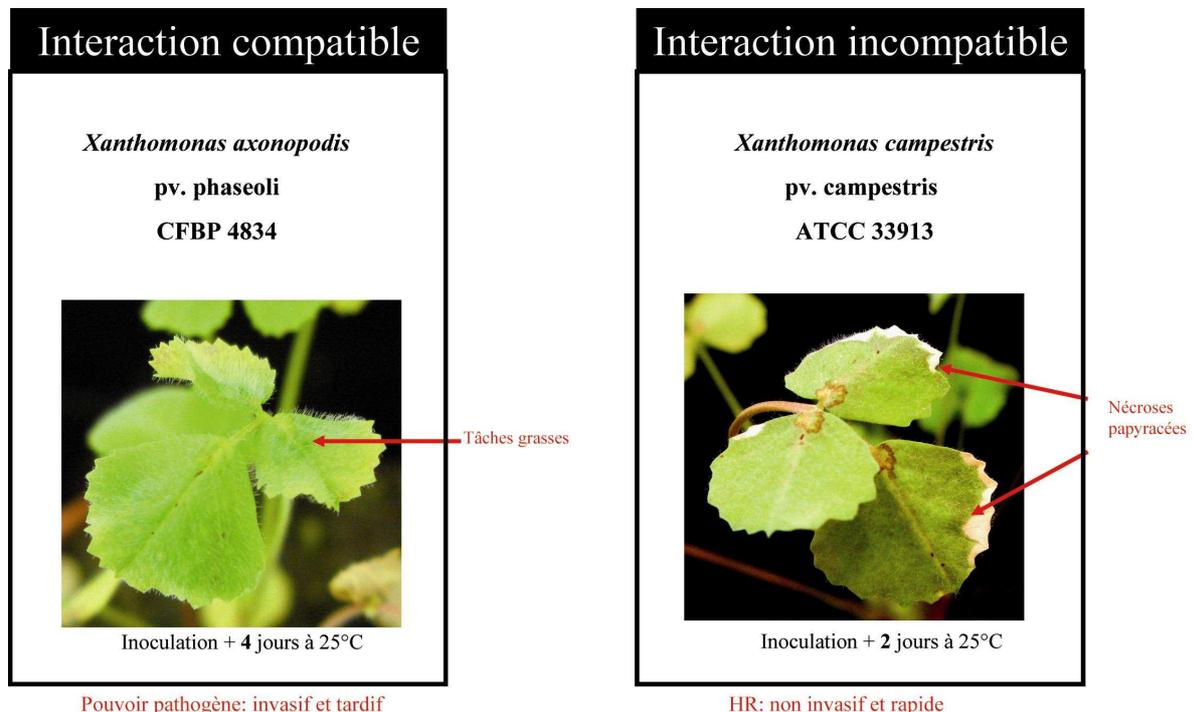
Afin de vérifier si la différence d'expression des *PR10* observée à l'échelle transcriptomique se retrouve à l'échelle protéique, une analyse par western blot a été réalisée sur des extraits protéiques solubles de graines entières imbibées six heures et 36 heures à l'obscurité à 20°C à l'aide d'un anticorps initialement dirigé contre une protéine du chevelu racinaire de *P. sativum* PsRH2 (Fig. 3.4). Ramos et al (2003) ont montré que cet anticorps anti-PsRH2 reconnaît l'homologue de PsRH2 chez *M. truncatula*, MtPR10-1 (TC106614). Les transferts ont été réalisés au minimum trois fois sur deux répétitions biologiques. La taille attendue de la protéine MtPR10-1 est 12 kDa (Ramos et al., 2003). Pour les deux temps d'imbibition, une bande est détectée aux environs de 12 kDa et l'expression est plus importante dans les embryons de type sauvage et de contrôle que dans les embryons RNAi *MtSNF4b* (Fig. 3.4). Ce résultat confirme que l'extinction de *MtSNF4b* impacte l'expression de MtPR10-1 à l'échelle protéique dans les semences dormantes de *M. truncatula*.

Tableau 3.1 : Symptômes foliaires de plantules de *M. truncatula* cv. R108 inoculées avec différentes souches de *Xanthomonas* spp représentant différents pathovars. Des plantules âgées d'une quinzaine de jours sont inoculées par infiltration sous vide dans des suspensions aqueuses titrant à 10^8 ufc/ml. Les plantules inoculées sont incubées à 25°C pendant une dizaine de jours. Les symptômes sont relevés après 2, 4 et 11 jours d'incubation et les photographies sont représentatives des symptômes majoritairement observés.

		Jours après inoculation		
		2	4	11
Souches de <i>Xanthomonas</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> CFBP 2526	Pas de symptôme	Pas de symptôme	Pas de symptôme
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> CFBP 4834-R	Pas de symptôme		
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> CFBP 6461			
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> CFBP 6989			
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> CFBP 6994			
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>alfalfae</i> CFBP 3836			
	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i> ATCC 33913		Pas de nouveau symptôme	Pas de nouveau symptôme

3.1 Interaction entre *M. truncatula* cv. R108 et différentes souches de *Xanthomonas*

Certains *Xanthomonas* sont connus pour leur capacité à contaminer les semences de papilionacées durant le cycle végétatif de la plante mère, contaminant ainsi la génération suivante (Darrasse et al., 2007). Dans le but d'étudier l'impact de l'extinction de *MtSNF4b* sur les populations de *Xanthomonas* dans des graines dormantes imbibées, le pathosystème *M. truncatula* cv. R108 versus *Xanthomonas* a été caractérisé. Des suspensions contenant 10^8 unités formant colonies (ufc)/ml de souches de *Xanthomonas* ont ainsi été inoculées par infiltration sous vide du système aérien de plantules âgées d'une vingtaine de jours. Les sept souches utilisées sont : quatre souches de *X. axonopodis* pv. phaseoli (CFBP 4834-R, CFBP 6461, CFBP 6989, et CFBP 6994), une souche de *X. axonopodis* pv. glycines (CFBP 2526), une souche de *X. axonopodis* pv. alfalfae (CFBP 3836) et une souche de *X. campestris* pv. campestris (ATCC 33913). Les feuilles des plantules sont plongées dans les inocula et placées dans une chambre à vide pendant deux minutes à une pression inférieure à 0,02 MPa. La rupture du vide dans la chambre permet l'infiltration de l'eau et des pathogènes qu'elle contient dans les espaces intercellulaires. Les plantes sont mises en culture à 25 °C pendant une dizaine de jours à raison de 16 heures de lumière par jour, et 95% d'humidité relative. Les symptômes sont notés après deux, quatre et onze jours d'incubation suivant une échelle de notation à trois classes : 1) pas de symptôme, 2) symptômes évolutifs gras, et 3) symptômes rapides de nécrose (Tab. 3.1). L'inoculation de *X. axonopodis* pv. glycines ne conduit au développement d'aucun symptôme sur les plantules de *M. truncatula* durant la période d'incubation (Tab. 3.1). La souche de *X. campestris* pv. campestris (Xcc33913) induit une forte réaction d'hypersensibilité visible dès le second jour d'incubation et aucun symptôme évolutif n'apparaît par la suite (Tab. 3.1). Ces symptômes sont typiques d'une interaction incompatible. Les souches de *X. axonopodis* pv. phaseoli CFBP 6461, CFBP 6989, CFBP 6994 ainsi que la souche de *X. axonopodis* pv. alfalfae induisent des symptômes précoces rappelant ceux d'une réaction d'hypersensibilité caractérisée par une nécrose localisée des feuilles visibles à partir du second jour d'incubation. Mais l'apparition de symptômes évolutifs d'aspect mouillé gras après 4 et 11 jours d'incubation indique qu'ils ne correspondent certainement pas à une HR. Le flétrissement est particulièrement visible au niveau des hydrotodes, des stomates aquifères à l'extrémité des folioles (Tab. 3.1). Enfin, la



Pouvoir pathogène: invasif et tardif

HR: non invasif et rapide

Figure 3.5 : Symptômes sur feuilles de *M. truncatula* consécutifs à l'inoculation de deux souches de *Xanthomonas* en interaction compatible et en interaction incompatible. Les symptômes caractéristiques de l'interaction entre *M. truncatula*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (CFBP 4834) à gauche et *X. campestris* pv. *campestris* (ATCC 33913) à droite sont montrés respectivement après quatre et deux jours d'incubation à 25°C (HR= Réaction Hypersensible).

souche de *X. axonopodis* pv. phaseoli CFBP 4834 n'induit pas de symptômes précoces, mais des symptômes évolutifs à l'aspect gras sont visibles après quatre et onze jours d'incubation (Tab. 1). La caractérisation des pathosystèmes sur les plantules permet donc de définir deux types d'interactions typiques rencontrées dans un pathosystème, compatible et incompatible, qui seront testées au niveau des semences dans la suite de ce chapitre. La dynamique des tailles des populations bactériennes sur graines se fera au travers de l'étude de *X. axonopodis* pv. phaseoli CFBP 4834 (Xap 4834-R) en situation compatible (Fig. 3.5A) et au travers de l'étude de *X. campestris* pv. campestris (Xcc 33913) en situation incompatible (Fig. 3.5.B).

3.2 Impact de l'inoculation de souches de *Xanthomonas* sur la physiologie des semences de *M. truncatula*

Dans un premier temps, l'impact de l'inoculation des bactéries sur la physiologie des semences de *M. truncatula* a été évalué notamment du point de vue de la vitesse de germination, sur laquelle MtSNF4b agit, mais également sur le pourcentage de mortalité. Les deux souches de *Xanthomonas* les plus contrastées du point de vue de l'interaction avec *M. truncatula*, i.e. *X. axonopodis* pv. phaseoli (Xap 4834-R) et *X. campestris* pv. campestris (Xcc) ont été utilisées pour inoculer des semences de *M. truncatula* de type sauvage préalablement imbibées pendant six heures. L'impact de l'inoculation par infiltration sous vide a été évalué sur la lignée de type sauvage avec des inocula contenant 10^7 ufc/ml, avec un témoin négatif infiltré sous vide avec de l'eau et un témoin non infiltré. Les semences ainsi traitées sont incubées à 20°C et 16 de lumière. Les graines témoins non infiltrées sont caractérisées par une T_{50} d'environ vingt jours (Fig. 3.6). Les graines infiltrées montrent toutes une forte augmentation de la vitesse de germination, avec une T_{50} de cinq à six jours. Aucune différence significative n'est notée entre le témoin infiltré dans l'eau et les semences infiltrées par les deux souches de *Xanthomonas* (Fig. 3.6). L'infiltration sous vide réduit la dormance des semences de *M. truncatula*, mais les deux souches de pathogènes testées ne modifient pas la dormance par rapport à une infiltration avec de l'eau.

Le taux de mortalité des semences a également été évalué après trente jours d'imbibition à 20°C pour le type sauvage et trois lignées RNAi *MtSNF4b* indépendantes non infiltrées, infiltrées avec de l'eau, une souche de Xap 4834-R ou une souche de Xcc (Fig. 3.6). Aucune différence significative de mortalité n'est observée entre les lignées de type sauvage

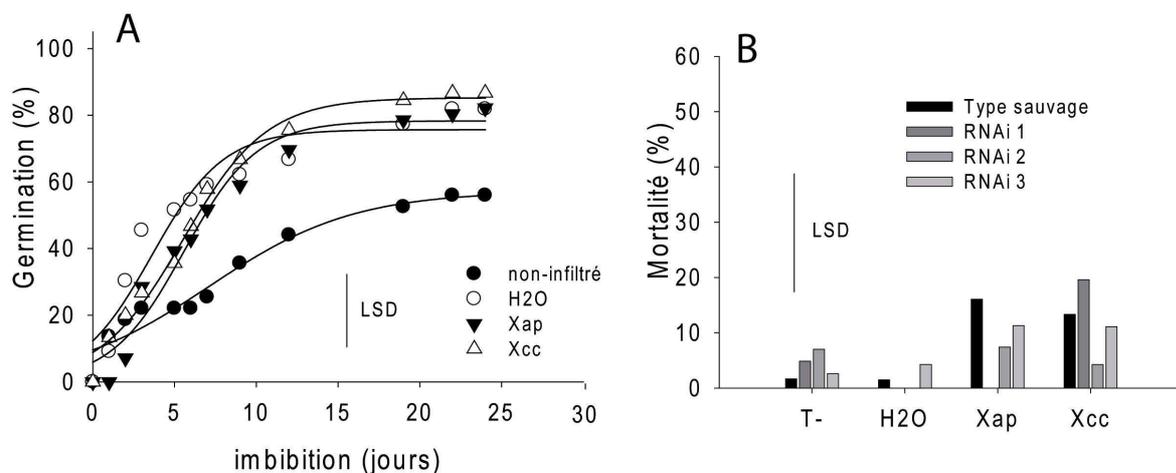


Figure 3.6 : Effet de l'inoculation sur la germination et la mortalité des semences de *M. truncatula*. (A) Les graines de type sauvage de *M. truncatula* cv. R108 sont imbibées puis infiltrées sous vide dans une suspension contenant 1×10^7 ufc/ml (triangles) ou de l'eau (cercles vides), le témoin non infiltré est trempé dans l'eau pendant deux minutes à pression atmosphérique (cercles pleins). Les souches utilisées pour l'infiltration sont *X. axonopodis* pv phaseoli CFBP4834-R (Xap ; triangles pleins) et *X. campestris* pv campestris ATCC 33913 (Xcc ; triangle vide). (B) Le pourcentage de semences mortes après 30 jours d'incubation à 20°C et 16 heures de lumière est relevé pour une lignée de type sauvage et trois lignées RNAi *MtSNF4b*. Le LSD est donné pour 50 graines avec une p-value de 0,05.

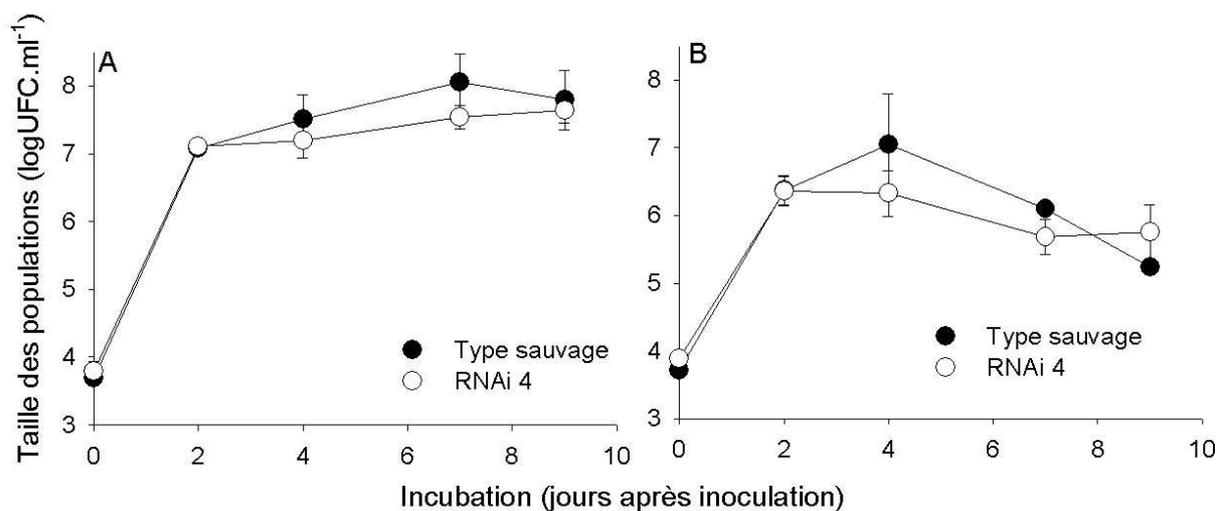


Figure 3.7 : Dynamique des tailles des populations de la flore totale (A) et de *X. axonopodis* pv. phaseoli (B) dans des semences de *M. truncatula*. Les graines de *M. truncatula* cv. R108 d'une lignée sauvage (cercles pleins) et d'une lignée RNAi *MtSNF4b* (cercles vides) sont imbibées à 25°C pendant six heures avant d'être infiltrées sous vide dans une suspension titrant 10^7 ufc/ml de *X. axonopodis* pv. phaseoli CFBP 4834-R. Les graines sont ensuite incubées à 25°C. Les écarts types sont donnés pour chaque point représentant une moyenne de trois échantillons de cinq graines.

imbibées ou infiltrées dans l'eau vis à vis de celles imbibées avec les deux souches de *Xanthomonas* (Fig. 3.6). De même, aucune augmentation de mortalité n'est retrouvée pour les trois lignées RNAi *MtSNF4b* par rapport au type sauvage. L'inoculation de souches de *Xanthomonas* pendant l'imbibition n'affecte donc pas la mortalité des semences de *M. truncatula*. De plus aucun symptôme d'hypersensibilité ou de pouvoir pathogène n'apparaît sur les semences au cours de l'imbibition alors que les bactéries sont présentes et vivantes dans la graine comme le montre la suite de ce chapitre.

3.3 Impact de l'extinction de MtSNF4b sur le développement de *Xanthomonas* dans les semences de *M. truncatula*.

3.3.1 Dynamique des tailles des populations bactériennes en situation compatible

Dans le but d'évaluer l'impact de l'extinction de MtSNF4b sur le développement de pathogènes en situation compatible dans les semences, la souche Xap 4834-R est inoculée à des semences de *M. truncatula*. Les semences sont imbibées pendant six heures imbibées après quatre semaines de PMS avant d'être inoculées avec une solution contenant 10^7 ufc/ml puis incubées à la lumière. Le liquide obtenu après macération de cinq graines individuellement pendant 2 minutes dans de l'eau distillée stérile est étalé après dilution sur du milieu gélosé TSA10% avec et sans rifamycine. Les souches Xap 4834-R et Xcc 33913 étant résistantes à la rifamycine, le milieu sans rifamycine permet la quantification de la flore totale alors que le milieu avec rifamycine permet la quantification des pathogènes inoculés. Lors d'une incubation à 25°C, l'augmentation de la taille des populations est très rapide, passant de 1×10^4 ufc.ml⁻¹ à 1×10^7 ufc.ml⁻¹ en seulement deux jours pour la flore totale du type sauvage et de la lignée RNAi *MtSNF4b* (Fig. 3.7A). La taille de la flore totale se maintient ensuite entre 1×10^7 ufc.ml⁻¹ et 1×10^8 ufc.ml⁻¹ jusqu'à dix jours après inoculation sans différence entre le type sauvage et la lignée RNAi *MtSNF4b* (Fig. 3.7A). La flore inoculée (Xap 4834-R) suit la même tendance, culminant à 1×10^7 ufc.ml⁻¹ entre deux et quatre jours après inoculation et diminuant légèrement pour le type sauvage après dix jours d'incubation

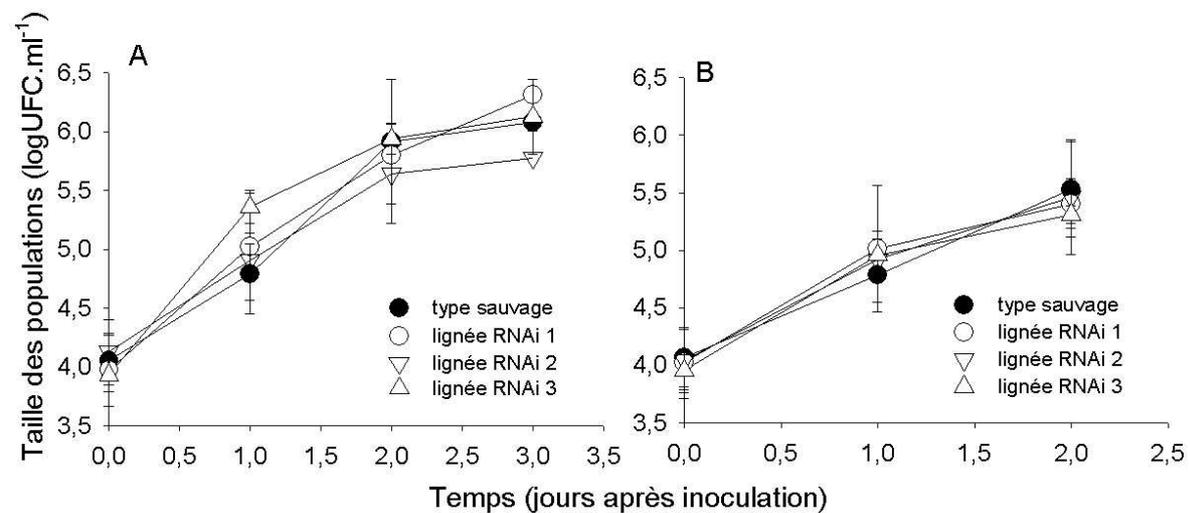


Figure 3.8 : Dynamique des tailles des populations de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* CFBP 4834-R (Xap) inocuées dans des semences de *M. truncatula* à 20°C. Les graines de *M. truncatula* cv. R108 d'une lignée sauvage (cercles pleins) et de trois lignées RNAi *MtSNF4b* indépendantes (symboles vides) sont infiltrées sous vide dans une suspension de Xap titrant 10⁷ ufc/ml . Les graines sont ensuite incubées à 20°C et la taille de la flore bactérienne totale (A) et de la flore inoculée (B) sont présentées pour trois échantillons de cinq graines (+/- écart type).

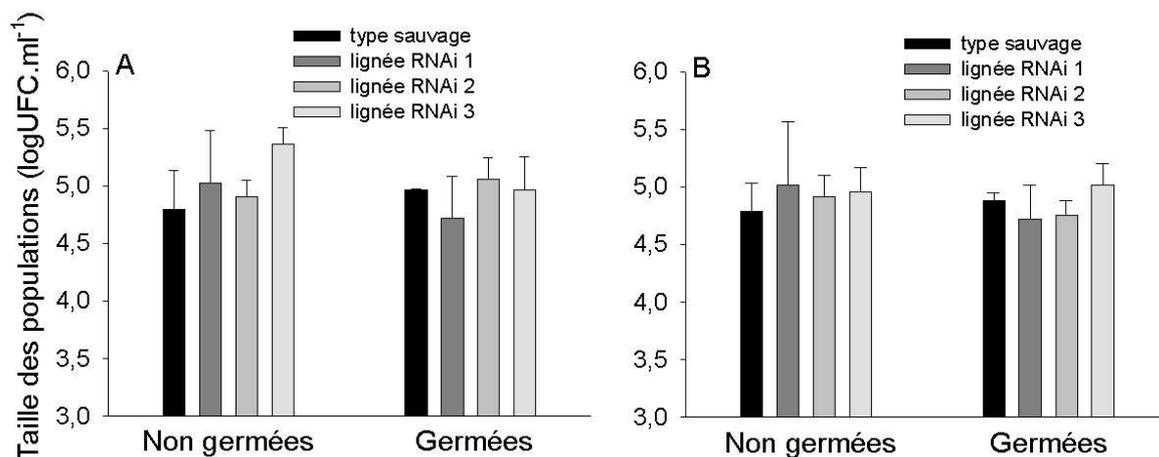


Figure 3.9 : Impact de la germination sur la dynamique des tailles des populations bactériennes à 20°C. Les graines de *M. truncatula* cv. R108 d'une lignée sauvage (cercles pleins) et de trois lignées RNAi *MtSNF4b* indépendantes (symboles vides) sont imbibées à 20°C et infiltrées sous vide dans une solution contenant la souche *X. axonopodis* pv. *phaseoli* CFBP4834-R. Les graines sont ensuite incubées à 20°C et la flore totale (A) et la flore inoculée (B) sont présentées pour sur trois échantillons de cinq graines (+/- écart type).

(Fig. 3.7B). Comme pour la flore totale, aucune différence significative n'est observée entre les deux lignées de *M. truncatula*.

Les flores totale et inoculée montrent des maxima similaires dans les semences de type sauvage et de type RNAi *MtSNF4b*. Cependant, l'augmentation de la taille des populations étant très rapide dans les conditions retenues, un deuxième essai a été conduit à 20°C, condition moins favorable à la croissance de *Xanthomonas*, afin de pouvoir éventuellement observer des différences entre la lignée exprimant MtSNF4b et trois lots de semences RNAi *MtSNF4b* indépendants (Fig. 3.8). La dynamique bactérienne globale est ralentie et la flore totale ne rejoint que 1×10^6 ufc.ml⁻¹ après trois jours d'incubation (Fig. 3.8A). De même, la dynamique de la flore inoculée est ralentie et ne rejoint que $3,2 \times 10^5$ ufc.ml⁻¹ après deux jours d'incubation (Fig. 3.8B). Cependant aucune différence de dynamique des tailles des populations bactériennes n'est observée entre le type sauvage et les lignées RNAi *MtSNF4b* pour la flore totale comme pour la flore inoculée (Fig. 3.8A et 3.8B).

La teneur en protéine MtSNF4b diminue rapidement après la germination des semences de *M. truncatula* (Rosnoblet et al., 2007). Dans le but de savoir si la germination et la dynamique bactérienne sont corrélées, une comparaison entre la quantité de bactéries dans les graines germées et non germées a été réalisée après 24 heures d'incubation à 20°C pour la lignée de type sauvage et trois lignées RNAi *MtSNF4b* (Fig. 3.9). Dans les graines non germées comme dans les graines germées la quantité de bactéries correspond à 1×10^5 ufc.ml⁻¹ pour les lignées sauvages et pour les lignées RNAi *MtSNF4b*. Aucune différence significative n'est observée entre graines germées et non germées pour la flore inoculée comme pour la flore totale (Fig. 3.9A et B). La quantité de bactéries n'est donc pas corrélée à la germination des semences de *M. truncatula*, ce qui corrobore le résultat obtenu dans la partie précédente concernant l'absence d'impact de l'inoculation sur la germination.

3.3.2 Comparaison des dynamiques bactériennes en fonction de la compatibilité du pathosystème

Dans une situation d'interaction compatible, Xap 4834-R se développe de façon similaire dans les graines sauvages et dans les graines RNAi *MtSNF4b*. Afin d'étudier l'impact de MtSNF4b en situation d'interaction incompatible, les dynamiques des tailles de populations bactériennes ont été suivies en situation incompatible (inoculation avec Xcc 33913) et en

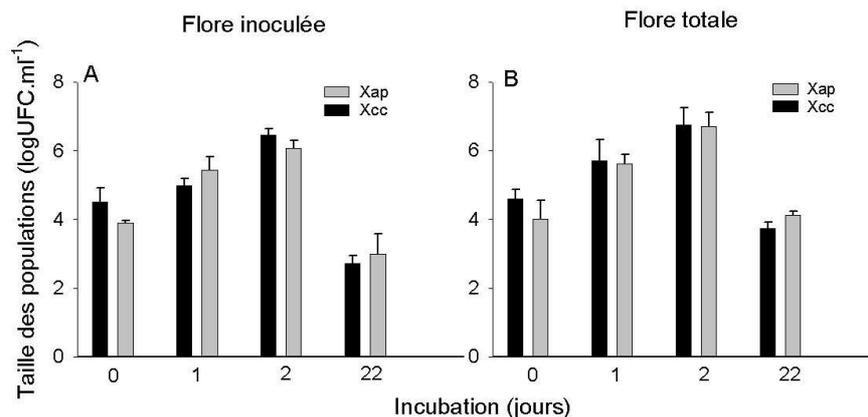


Figure 3.10 : Comparaison des dynamiques des tailles des populations bactériennes totales, de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et de *X. campestris* pv. *campestris* dans des semences de *M. truncatula*. Les graines de *M. truncatula* cv. R108 d'une lignée sauvage sont imbibées à 20°C pendant six heures avant d'être infiltrées sous vide dans une suspension de la souche *X. axonopodis* pv. *phaseoli* CFBP4834-R (Xap ; compatible (barres grises)) ou de la souche *X. campestris* pv. *campestris* ATCC 33913 (Xcc ; incompatible (barres noires)). Les graines sont ensuite incubées 22 jours à 20°C et les tailles des flores totale et inocuées sont présentées pour trois échantillons de cinq graines (+/- écart type).

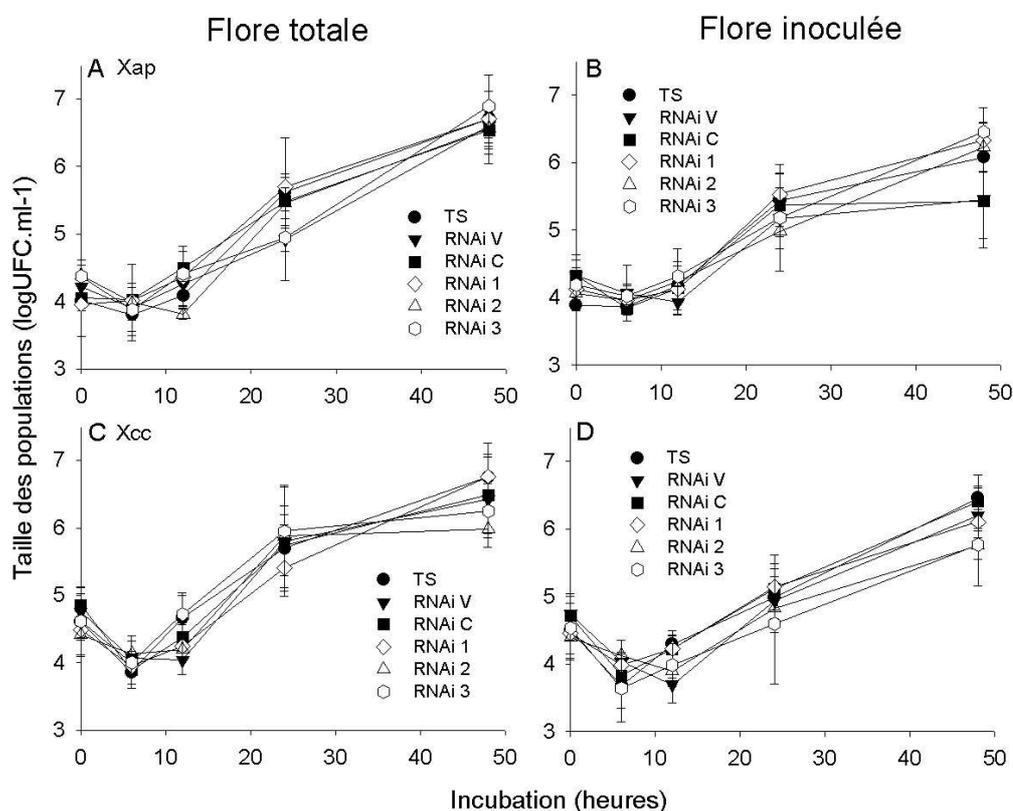


Figure 3.11 : Comparaison des dynamiques des tailles des populations bactériennes totales de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et de *X. campestris* pv. *campestris* dans des semences de *M. truncatula*. Les graines de *M. truncatula* cv. R108 d'une lignée sauvage (TS), d'une lignée RNAi de contrôle (RNAi C), d'une lignée de contrôle transformée avec un vecteur vide (RNAi V) et de trois lignées RNAi *MtSNF4b* indépendantes (symboles vides) sont imbibées six heures à 20°C avant d'être infiltrées sous vide dans une suspension de la souche *X. axonopodis* pv. *phaseoli* CFBP 4834-R (A et B) (compatible) ou de la souche *X. campestris* pv. *campestris* ATCC 33913 (C et D) (incompatible) titrant à 10⁷ ufc/ml. Les graines sont ensuite incubées à 20°C et les tailles de la flore totale (A et C) et la flore inocuée (B et D) sont présentées pour trois échantillons de cinq graines (+/- écart type).

situation compatible (inoculation avec Xap 4834-R) sur semences sauvages. Les dynamiques obtenues pour la souche Xap 4834-R en flore totale et en flore inoculées sont similaires à celles observées précédemment dans les mêmes conditions (Fig. 3.8 et 3.10). Les quantités de Xap 4834-R rejoignent les valeurs maximales observées précédemment avec entre 1×10^6 ufc.ml⁻¹ et 1×10^7 ufc.ml⁻¹ après 24 à 48 heures d'incubation (Fig. 3.10A et B). Ces premiers résultats indiquent une bonne reproductibilité de la dynamique en situation compatible sur deux récoltes indépendantes de *M. truncatula*.

Les populations de Xcc 33913 suivent la même tendance que celles de Xap 4834-R dans les semences de *M. truncatula* (Fig 3.10A) ; il en est de même pour la flore totale (Fig. 3.10B). Pour s'assurer de l'absence de différences de dynamique bactérienne entre les deux souches de *Xanthomonas* sur une durée plus importante, un prélèvement supplémentaire a été effectué après 22 jours d'inoculation à 20°C (Fig. 3.10A et B). Ce relevé montre que les tailles des populations de Xcc 33913 et de Xap 4834-R diminuent après 22 jours dans les graines de type sauvage avec 1×10^3 ufc.ml⁻¹ pour les deux souches inoculées et avec 1×10^4 ufc.ml⁻¹ pour la flore totale. Par ailleurs, aucune différence n'est observée entre la situation compatible et la situation incompatible concernant les tailles de populations bactériennes.

Afin de déterminer l'impact de l'extinction de *MtSNF4b* sur la dynamique bactérienne lors d'une situation d'interaction incompatible une inoculation a été réalisée avec la souche Xcc 33913. Des semences de type sauvage, de contrôle et RNAi *MtSNF4b* de *M. truncatula* sont imbibées pendant six heures après deux mois de PMS et inoculées avec Xcc 33913 et Xap 4834-R. Les dynamiques bactériennes sont réalisées pendant deux jours d'incubation à 20°C et deux points de mesure supplémentaires (6 et 12 heures) ont été ajoutés par rapport aux dynamiques précédentes afin d'évaluer le temps de démarrage de la croissance dans les deux cas (Fig. 3.11). Les points de cinétique additionnels à 6 et 12 heures permettent d'observer que le démarrage de la dynamique a lieu entre 12 et 24 heures après l'inoculation initiale avec Xap 4834-R comme avec Xcc 33913 (Fig. 3.11). Avant ce démarrage la quantité de bactéries des deux souches inoculées reste stable pendant les 12 premières heures pour la lignée sauvage et les lignées RNAi *MtSNF4b* (Fig. 3.10A). Le maximum d'ufc observé pour la flore inoculée (1×10^6 ufc.ml⁻¹) et la flore totale (1×10^7 ufc.ml⁻¹) est atteint en 48 heures d'incubation (Fig. 10C et 10D). La dynamique bactérienne de l'inoculation avec Xcc 33913 dans les semences de *M. truncatula* est identique dans les semences de type sauvage et les semences RNAi *MtSNF4b*. La dynamique de tailles des populations bactériennes de

Xanthomonas n'est pas affectée par l'extinction de MtSNF4b en situation incompatible (Fig. 3.10).

3.4 Discussion

Dans cette partie il a été démontré que l'extinction de *MtSNF4b* induit une diminution de la teneur en PR10 à l'échelle du transcrite et de la protéine. Par contre, cet effet n'impacte pas le développement de bactéries du genre *Xanthomonas* en situation compatible et incompatible dans des semences imbibées. Enfin, dans les semences, les dynamiques des tailles des populations bactériennes en situation compatible et incompatible sont identiques.

Les travaux préliminaires de mise en place du pathosystème ont permis de confirmer que *M. truncatula* est un hôte de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Ces essais ont également mis en évidence une interaction différentielle de la lignée testée face aux représentants des différentes lignées génétiques de ce pathogène. En effet, les agents responsables de la graisse commune du haricot forment un ensemble complexe comprenant quatre lignées génétiques distinctes (Alavi et al., 2008). Nous montrons que l'interaction avec le représentant de la lignée *fuscans* (Xap 4834-R) induit des symptômes caractéristiques d'une situation compatible, alors que les symptômes engendrés par les représentants des trois autres lignées sont moins caractéristiques, faisant initialement penser à une réaction incompatible (visible très rapidement) mais devenant évolutifs. Il serait intéressant de reproduire ces essais sur d'autres lignées de *M. truncatula* pour mettre éventuellement en évidence des hôtes différentiels pour ces lignées. *X. axonopodis* pv. *glycines* est un pathogène du soja et nous montrons que la souche testée n'induit aucun symptôme sur *M. truncatula*, confirmant la spécificité d'hôte restreinte, bien connue au sein de ce genre bactérien ainsi que la finesse de reconnaissance de la part de la plante hôte. Notre pathosystème peut donc se révéler intéressant du point de vue de l'étude des mécanismes mis en place dans le cadre d'une interaction compatible et incompatible.

Malgré les différences flagrantes d'interaction entre Xap 4834-R ou Xcc 33913 sur les feuilles de *M. truncatula*, on note l'absence de différence de comportement des bactéries sur semences imbibées en situation compatible (Xap 4834-R) ou en situation incompatible (Xcc) et l'absence de différence de réaction de la part de la plante hôte (mortalité). Ceci semble indiquer que la graine n'active pas de mécanismes de défense spécifiques face à la présence de

Xanthomonas. Le développement asymptomatique de souche de *Xanthomonas* sur graines a déjà été observé sur le haricot (Darrasse et al., 2007). Il a également été montré que lors des étapes précoces du développement de la plantule à partir de graines contaminées, le comportement des bactéries en situation compatible, incompatible ou nulle était comparable (Darsonval, 2008). Par ailleurs, une absence d'induction des mécanismes de défense laisse penser que la plante ne perçoit pas ou ne réagit pas à la présence des bactéries lors des étapes précoces du développement. La localisation des pathogènes dans la graine pourrait nous renseigner sur l'absence de réaction de la semence. Les *Xanthomonas* sont présentes sous deux types de populations dans les plantes, solitaires et agrégées en biofilm (Jacques et al., 2005). Cependant leurs localisations cellulaire et tissulaire dans les semences restent incertaines. Les bactéries nécrotrophes comme *Xanthomonas* sont généralement absentes de l'embryon lui-même et sont localisées à la périphérie entre les cotylédons et le tégument (Maude et al., 1996). La question est désormais de savoir si la réponse de la semence est constitutive ou bien activée par l'inoculum. L'étude de l'expression de gènes mis en évidence dans l'analyse transcriptomique lors de l'inoculation avec de l'eau et les deux souches, pourrait constituer une réponse à cette question.

Nos résultats indiquent que l'extinction de *MtSNF4b* n'a pas d'impact sur la dynamique des tailles des populations de *Xanthomonas* dans les graines dormantes de *M. truncatula* en termes de durée de phase de latence et de taille maximum atteinte. Cependant, l'expression de *PR10* est inhibée par l'extinction de *MtSNF4b* dans les graines dormantes à l'échelle transcriptomique et protéique (Fig. 3.1 et Fig. 3.3). Les protéines de type PR10 sont induites par la dormance (Pnueli et al., 2002) et l'expression constitutive de PR10-1 de *P. sativum* chez *B. napus* accroît sa germination dans des conditions de stress salins, suggérant un rôle de PR10-1 dans la tolérance aux stress abiotiques (Srivastava et al., 2004). Une première hypothèse consisterait à dire que les PR10 exprimées dans les semences n'ont qu'un rôle dans la tolérance aux stress abiotiques. Cependant les PR10 ne sont pas les seuls indices d'un lien entre *MtSNF4b* et les stress biotiques. D'autres gènes différentiellement exprimés, tels que ceux de la synthèse de phytoalexines, relient en effet *MtSNF4b* à des stress biotiques. Un mutant d'*A. thaliana* ne produisant pas de phytoalexines de type camalexine a montré une résistance diminuée à l'infection par un champignon nécrotrophe, mais ce même mutant n'a pas montré de sensibilité particulière à une bactérie et à deux champignons biotrophes (Thomma et al., 1999). La question du choix du pathogène utilisé se pose ici. Il

pourrait être judicieux de trouver d'autres pathogènes pour tester l'impact de l'extinction de MtSNF4b sur la protection contre les stress biotiques.

L'infiltration sous vide permet une inoculation très répétable des semences de *M. truncatula* mais lève la dormance et induit une réaction de la part des semences. L'impact de l'infiltration sous vide sur l'expression de MtSNF4b et sur l'expression de PR10 devrait être évaluée parce qu'il est possible que cette méthode active la mise en place de défenses indépendamment de MtSNF4b. Une méthode d'inoculation plus douce pourrait être envisagée, par exemple par trempage, par exemple, mimant ainsi l'inoculation externe par contact observé dans les fruits contaminés (Maude, 1996). Récemment, des mécanismes de défense mis en place sous contrôle développemental à l'échelle transcriptomique ont été décrits durant la maturation d'*Hordeum vulgare* (Nielsen et al., 2006). Dans cette étude, l'expression de gènes de défense est induite en fin de maturation en même temps que l'acquisition de la tolérance à la dessiccation. Cette activation correspondrait à une résistance systémique acquise développementale visant à protéger les graines dormantes d'*H. vulgare* contre les pathogènes (Nielsen et al., 2006). Parmi les gènes sur-exprimés en fin de maturation, certains codent des protéines antioxydantes et de protéines PR (Nielsen et al., 2006). Une étude d'inoculation *in planta* (apport sur le porte-graine) serait un autre modèle réaliste d'infection interne par un pathogène permettant en plus d'évaluer l'impact de MtSNF4b sur la dynamique bactérienne en fin de maturation. Cette méthode permettrait une inoculation alors que MtSNF4b commence à être exprimé dans les graines, *i.e.* en fin de maturation. Elle aurait également l'avantage de ne pas induire de biais de localisation des pathogènes dans les graines, permettant ainsi leur perception par les cellules de la plante.

Chapitre 4 :
Recherche des partenaires de MtSNF4b

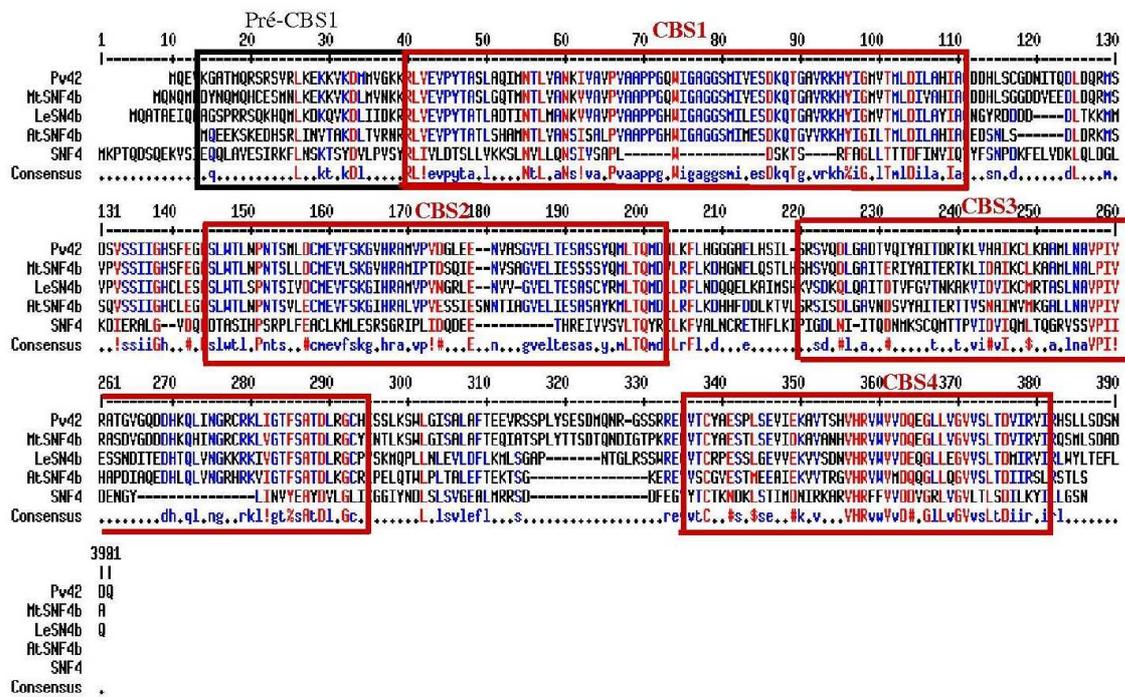


Figure 4.1 : Alignement des protéines de la famille de PV42/MtSNF4b/leSNF4. Les séquences de *P. vulgaris* Pv42 (AAA91175), de *M. truncatula* MtSNF4b (AAO61675), de *L. esculentum* LeSNF4b (AAF66638) et de *A. thaliana* AtSNF4b (AAY56406) sont alignées sur la séquence de SNF4 de levure (CAA96823). Les cadres rouges représentent les quatre domaines cystathionine beta-synthase caractéristiques des SNF4. Le cadre noir représente le domaine pré-CBS1, impliqué dans l'association avec la sous-unité β chez l'animal (Viana et al., 2007) (CBS : cystathionine beta-synthase).

La connaissance des partenaires formant un complexe de haut poids moléculaire avec MtSNF4b peut donner des pistes sur la compréhension de son rôle dans les graines de *M. truncatula*. Effectivement Rosnoblet et al., (2007) ont montré que MtSNF4b est associé dans un complexe de haut poids moléculaire dans les graines dormantes de *M. truncatula*. Chez *S. cerevisiae*, en plus de son interaction avec les sous-unités du complexe SNF1, SNF4 interagit avec de nombreuses autres protéines. Dans ce chapitre, nous avons d'abord voulu savoir si MtSNF4b est une vraie sous-unité d'un complexe SnRK1. Pour cela, la fonctionnalité de MtSNF4b a été testée par la complémentation d'un mutant $\Delta snf4$ de levure. Par ailleurs, l'interaction entre MtSNF4b et MtSNF1 a été testée par une analyse de double hybride bactérien dirigée. Ensuite, ce même système de double hybride a été utilisé pour le criblage d'une banque d'ADNc de radicule sèche dans le but de trouver les autres partenaires de MtSNF4b.

4.1 Etude de la fonctionnalité de MtSNF4b comme sous-unité activatrice du complexe SNF1

Malgré leur homologie avec la SNF4 de levure, la fonctionnalité d'un seul membre de la famille des PV42/SNF4b, LeSNF4, a été vérifié par complémentation d'un mutant de levure $\Delta snf4$ (Bradford et al., 2003). MtSNF4b montre 73% d'identité et 89% de similarité avec LeSNF4b et 42% d'identité et 62% de similarité avec la SNF4 de levure (Fig. 4.1). Les séquences des protéines de la famille PV42/MtSNF4b/LeSNF4 les plus conservées avec la séquence de levure correspondent aux quatre domaines CBS (Fig. 4.1). Le domaine pré-CBS1, constitué d'une vingtaine d'acides aminés en amont du premier domaine CBS, décrit comme jouant un rôle dans l'association des sous-unités γ avec les sous-unités β (Viana et al., 2007), est retrouvé chez MtSNF4b bien qu'il diverge fortement de celui des levures (Fig. 4.1).

Les mutants de levure $\Delta snf4$ sont viables mais incapables de croître sur des sources de carbones non fermentescibles (Schuller et al., 1988). En réalité, SNF4, en s'associant avec le complexe SNF1, lève l'auto-inhibition de la sous-unité catalytique SNF1 (Celenza et al., 1989a et 1989b). Dans le but de savoir si MtSNF4b est un homologue fonctionnel de SNF4 de levure, une analyse de complémentation a été effectuée sur le mutant $\Delta snf4$ au moyen d'un

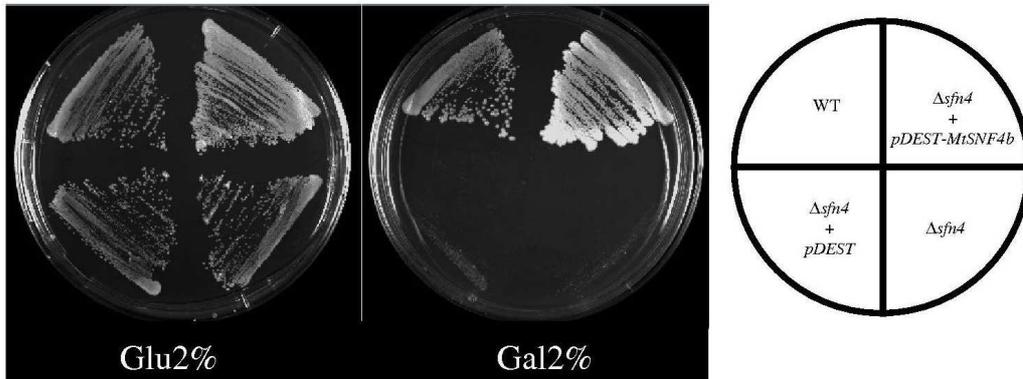


Figure 4.2 : Complémentation de $\Delta snf4$ de levure par $MtSNF4b$. Des cultures liquides de type sauvage (WT), de mutants $\Delta snf4$, et de mutants transformés soit avec pDEST soit avec pDEST- $MtSNF4b$ sont étalées sur milieu minimum YNB contenant 2% de glucose (Glu2%) ou 2% de galactose (Gal2%) comme source de carbone et incubées quatre jours à 30°C.

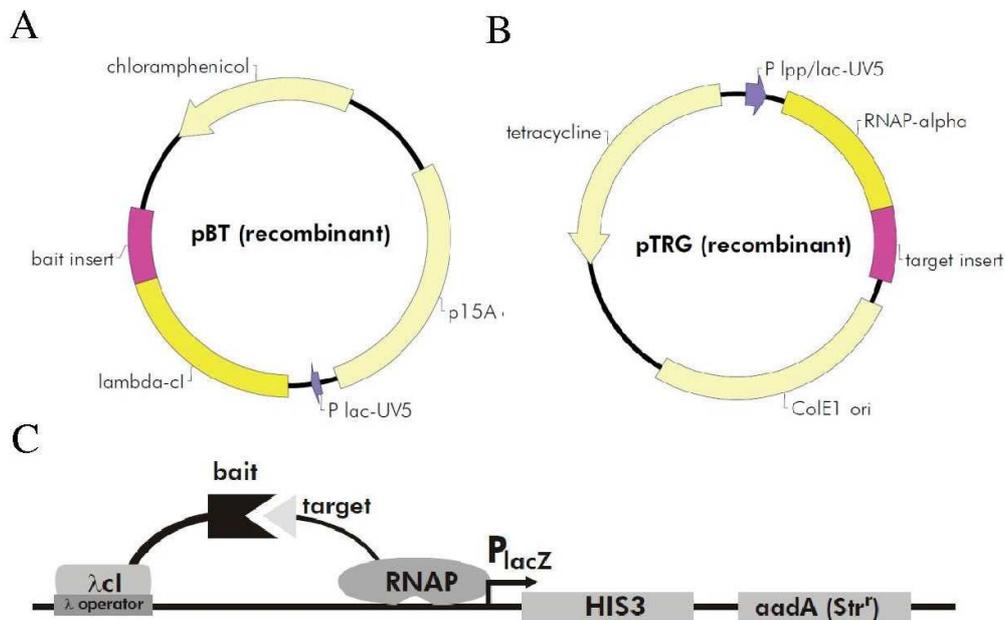


Figure 4.3 : Principe de la détection d'interaction protéines/protéines par double hybride bactérien. Le système double hybride bactérien permet de détecter l'interaction entre deux protéines, *in vivo*, par le biais de la reconstitution d'un facteur de transcription actif en cas d'interaction permettant aux bactéries de croître sur un milieu sélectif. Ce facteur de transcription est composé d'un motif reconnaissant un promoteur, λ LC, et d'une partie RNA polymérase II. La partie λ LC est contenue dans un plasmide d'amorce pBT conférant une résistance au chloramphénicol (A) et la partie RNAP II dans un plasmide de cible pTRG conférant une résistance à la tétracycline (B). L'amorce et la cible sont clonées dans leur vecteur respectif et des bactéries reportrices sont co-transformées avec les deux vecteurs. En cas d'interaction entre les deux protéines dans la bactérie reportrice, le facteur de transcription active la transcription du gène HIS3 qui permet la croissance sur un milieu contenant du 3 amino-1,2,4-triazole (3-AT) (un inhibiteur compétitif du produit du gène HIS3), et du gène *aadA* qui confère la résistance à la streptomycine (Strp) (C).

plasmide contenant la séquence codante de *MtSNF4b*. Une souche mutante de $\Delta snf4$ (MCY2634), la même souche transformée avec un plasmide pYES-DEST52 contenant l'ADNc du transcrit de *MtSNF4b* (pDEST-*MtSNF4b*), ou avec un plasmide pYES-DEST52 vide servant de témoin négatif (pDEST) et une souche sauvage SNF4 de levure (MCY2649) ont été étalées sur des milieux contenant du galactose à 2% (m/v) ou du glucose à 2% (m/v) et mis en culture à 28°C (Fig. 4.2). Les différentes souches de levures montrent une croissance sur le milieu contenant du glucose (Fig. 4.2A). Par contre, lorsque les mêmes levures sont mises en culture sur un milieu contenant un sucre non fermentescible tel que le galactose, seul le type sauvage et le mutant $\Delta snf4$ transformé avec pDEST-*MtSNF4b* montre une croissance alors que le mutant et le mutant témoin transformé avec pDEST ne croissent pas (Fig. 4.2B et 4.2C). Ces résultats montrent que la protéine MtSNF4b est capable de compléter le mutant $\Delta snf4$ de levure et est donc une protéine fonctionnelle de la famille des SNF4.

4.2 Caractérisation de l'interaction de MtSNF4b et MtSNF α 1 par double hybride bactérien

L'interaction entre des sous-unités non catalytiques de la famille des SNF4 de plantes et une sous-unité catalytique SNF1 a été démontrée par analyse double hybride chez *A. thaliana* (Bouly et al., 1999). Le système double hybride bactérien permet de détecter l'interaction entre deux protéines, *in vivo*, par le biais de la reconstitution d'un facteur de transcription actif. Les ADNc codant la protéine testée et la protéine cible sont clonés dans leur vecteur respectif et co-transformés dans *E. coli* (Fig. 4.3). En cas d'interaction entre les deux protéines, le facteur de transcription active la transcription du gène *HIS3* qui permet la croissance sur un milieu contenant du 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) (un inhibiteur compétitif du produit du gène *HIS3*), et du gène *aadA* qui confère la résistance à la streptomycine (Strp) (Fig. 4.3).

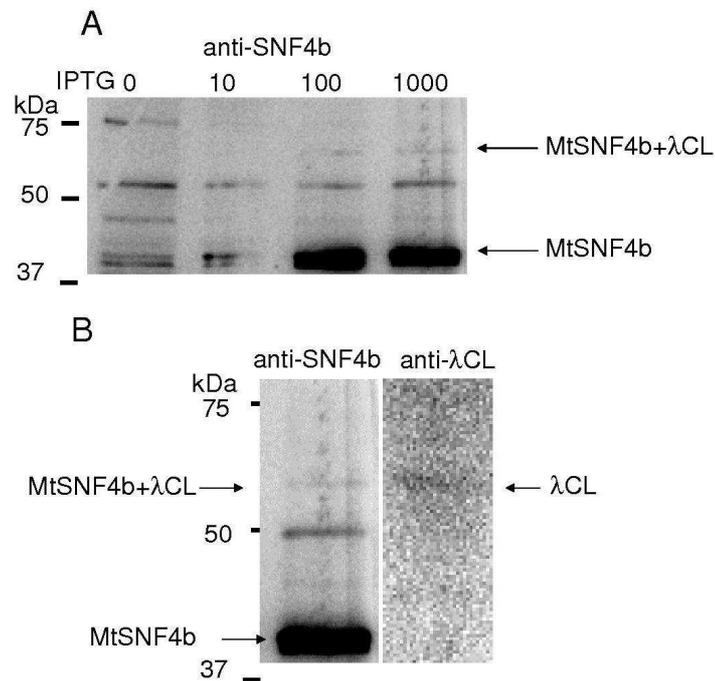


Figure 4.4 : Expression de MtSNF4b fusionné à λCL dans les bactéries reportrices. L'expression de MtSNF4b dans les bactéries reportrices a été testée à différentes concentrations de l'inducteur IPTG par western blot utilisant un anticorps antiMtSNF4b. L'induction est montrée après trois heures d'induction en milieu liquide à 37°C (A). Un western blot est réalisé après trois heures d'induction dans de l'IPTG à 100μM avec un anticorps antiSNF4b et un anticorp antiλCL.

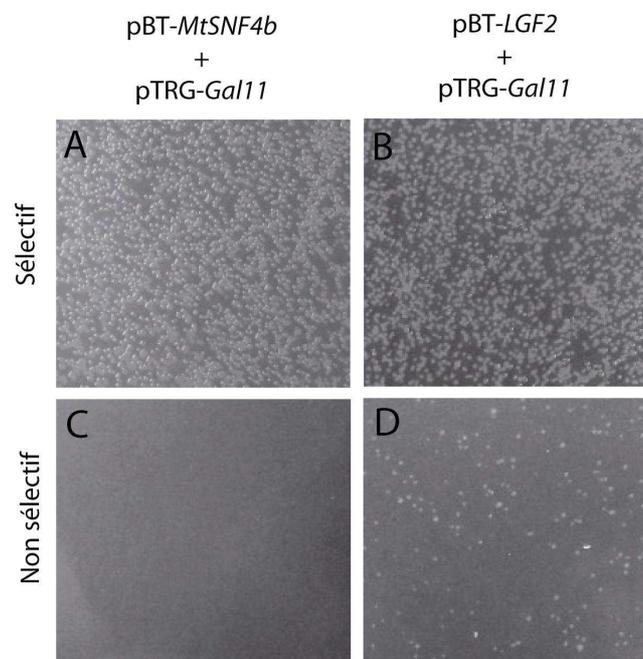


Figure 4.5 : Test d'auto-activation de MtSNF4b dans le système double hybride bactérien. Les bactéries reportrices sont co-transformées avec deux couples de vecteurs, pBT-MtSNF4b / pTRG-Gal11 (A et C) et pBT-LGF2 / pTRG-Gal11 (B et D). Les deux types de co-transformant sont étalés sur un milieu non sélectif (A et B) et sur milieu sélectif (C et D)

4.2.1 Vérification de l'expression de la protéine fusionnée à λ LC et de l'absence d'auto-activation par MtSNF4b

Afin de vérifier que la protéine MtSNF4b exprimée dans *E. coli* est fusionnée à λ LC, un western blot a été réalisé avec un anticorps anti-MtSNF4b sur des cultures d'*E. coli* transformée avec pBT-MtSNF4b après induction. Après transformation par le plasmide pBT-MtSNF4b, les bactéries sont incubées dans un milieu d'induction contenant de l'IPTG à différentes concentrations pendant trois heures. Après extraction, migration sur gel d'acrylamide et transfert sur membrane de nitrocellulose, les protéines sont mise en évidence à l'aide d'un anticorps antiSNF4b. La masse moléculaire théorique de MtSNF4b fusionnée à λ CL calculée avec le logiciel Compute pI/Mw (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) est de 68,7 kDa. L'analyse par western blot montre bien une bande de masse moléculaire comprise entre 50 et 75 kDa correspondant à la taille théorique de MtSNF4b fusionnée avec λ CL (Fig. 4.4A). L'intensité de cette bande augmente dans le gradient d'IPTG et n'est pas détectée dans l'échantillon incubé trois heures dans le milieu sans IPTG (Fig. 4.4A). Afin de s'assurer de la fusion entre MtSNF4b et λ CL, un western blot a également été réalisé au moyen d'un anticorps anti λ LC sur un échantillon protéique incubé trois heures dans l'IPTG à 10 μ M. Une bande de la même taille que la bande mise en évidence par l'anticorps anti-SNF4b est ainsi détectée (Fig. 4.4B). Ce résultat confirme donc l'expression de MtSNF4b fusionné avec λ CL dans les bactéries transformées avec le plasmide d'amorce. Cependant, une deuxième bande autour de 42 kDa apparaît également et pourrait représenter MtSNF4b sans fusion avec λ CL. Le séquençage de cette bande donnera une réponse à cette question, mais il reste à savoir comment et pourquoi la liaison entre MtSNF4b et λ CL est rompue.

L'un des facteurs du double hybride bactérien conduisant à la détection de faux positifs est la possibilité d'auto-activation de la transcription des gènes rapporteurs par la protéine testée seule. Afin d'évaluer cette auto-activation les cellules reportrices sont co-transformées avec pBT-MtSNF4b/pTRG-Gal11. Un contrôle positif de l'activation consiste en la co-transformation des cellules reportrices par des plasmides contenant pBT-LGF2/pTRG-Gal11. L'interaction entre LGF2 et GAL11 a été démontrée chez *E. coli* (Dove et al., 1998). Le

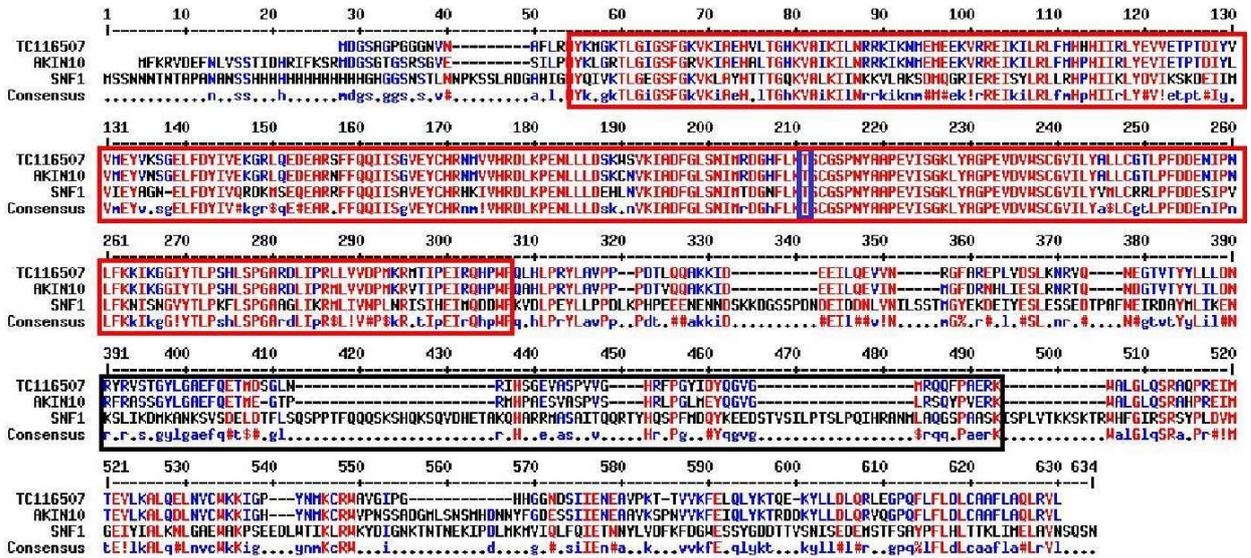


Figure 4.6 : Alignement de MtSNF α 1 avec SNF1 et AKIN10. Les séquences de la protéine cod e par le TC116507 (MtSNF α 1) ont été identifi es par un blastn sur le site de la DFCI report MtGI9 (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>). La séquence de l'homologue d'*A. thaliana* le plus proche de MtSNF α 1, AKIN10 (Q38997) et de SNF1 (YDR477W) de levure sont également repr esent es. Le cadre bleu représente la Thr210 phosphoryl e en cas d'activation du complexe. Le cadre noir cible le domaine autoinhibiteur de SNF1. Ce domaine inactif SNF1 interagit avec la partie catalytique de SNF1 (cadre rouge). Lors de l'activation de SNF1 par SNF4, le domaine autoinhibiteur cesse d'interagir avec le domaine kinase.

milieu non sélectif contient du chloramphénicol et de la tétracycline et permet d'isoler les bactéries co-transformées. Ces dernières, avec les deux couples de vecteurs, se développent sur le milieu non sélectif (Fig. 4.5A et 4.5B). Par contre, sur le milieu sélectif contenant du 3-AT et de la streptomycine, seules les bactéries transformées avec pBT-LGF2 et pTRG-Gal11 se développent, ce qui démontre l'absence d'auto-activation de la part de MtSNF4b (Fig. 4.5C et 4.5D).

4.2.2 Test de l'interaction entre MtSNF4b et MtSNF α 1

MtSNF4b est une SNF4 fonctionnelle capable de compléter le mutant $\Delta sfn4$ de levure mais cela n'implique pas qu'elle soit un partenaire de SNRK1 α chez *M. truncatula*. Afin de déterminer si MtSNF4b interagit avec la SnRK1 α de *M. truncatula*, une analyse de l'interaction entre ces deux protéines est réalisée par une technique de double hybride bactérien. Pour commencer, les séquences similaires à SNF1 de levure (YDR477W) ont été recherchées dans la base de données des séquences consensus de *M. truncatula* (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>). La recherche par un alignement de type blastn donne accès à une séquence consensus qui est notée TC116507 montrant 63% d'identité avec SNF1 de levure. L'alignement de la séquence TC116507 par un blastn chez *A. thaliana* présente une homologie de 77% avec AKIN10 (Q38997) (Fig. 4.6). Le TC116507 serait donc l'homologue d'AKIN10 chez *M. truncatula*. Les séquences des SNF1 de plantes sont conservées au niveau du domaine catalytique en N-terminal avec leur homologue chez la levure, compris entre les acides aminés 54 et 306 (Fig. 4.6). Le domaine d'auto-inhibition de SNF1, compris entre les acides aminés 389 et 493, est en revanche moins bien conservé et montre deux délétions d'une vingtaine d'acides aminés, chacune dans les homologues végétaux de SNF1 par rapport à SNF1 de levure (Fig. 4.6). Cette séquence auto-inhibitrice interagit avec SNF4 chez la levure (Leech et al., 2003). La thréonine 210, connue pour être phosphorylée dans la kinase active, est retrouvée dans les homologues végétaux de SNF1 (Fig. 4.6) (Estruch et al., 1992). La séquence TC116507, nommée MtSNF α 1, a été clonée dans le plasmide pTRG afin de tester son interaction avec MtSNF4b par double hybride bactérien. Dans la banque EST MTGI, ce TC est représenté par un EST provenant d'une banque issue de graines en cours de germination et d'une autre banque (GLSD) issue de

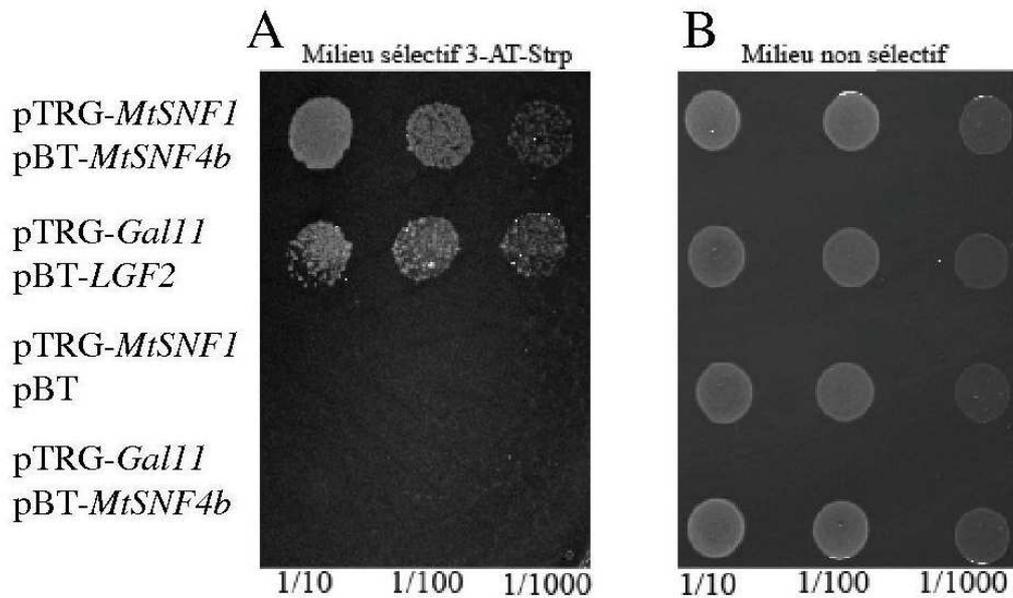


Figure 4.7 : Test de l'interaction entre MtSNF4b et MtSNF1 par double hybride. Des bactéries reportrices sont co-transformées avec quatre couples d'amorces : pBT-MtSNF4b+pTRG-MtSNF α 1, le témoin positif pBT-LGF2+pTRG-Gal11 et les deux témoins négatifs pBT-MtSNF4b+pTRGGal11 et pTRGMtSNF1+pBT. Les produits de transformation sont incubés une nuit en présence d'IPTG à 100 μ M avant d'être déposés sous forme de gouttes de trois dilutions différentes 1/10, 1/100 et 1/1000^{ème} sur deux milieux sélectif et non sélectif incubés trois jours à 37°C.

graines en seconde phase de la maturation. Une analyse *in silico* de l'expression du TC116507 dans le « Medicago truncatula Gene Expression Atlas », montre qu'il est exprimé de façon quasi constitutive dans tous les tissus. Afin de tester l'interaction entre les protéines MtSNF4b et MtSNF α 1, des bactéries reportrices sont co-transformées avec quatre couples de vecteurs : pBT-MtSNF4b/pTRG-MtSNF α 1, le témoin positif pBT-LGF2/pTRG-GAL11, et deux témoins négatifs pBT-MtSNF4b/pTRGGal11 et pBT/pTRG-MtSNF α 1. Ces témoins négatifs servent au contrôle de l'auto-activation due respectivement à MtSNF4b et MtSNF α 1. Les bactéries co-transformées avec pBT-MtSNF4b/pTRG-MtSNF α 1 montrent une croissance sur le milieu sélectif double, de même que le témoin positif (Fig. 4.7A). Les deux témoins négatifs ne présentent pas de croissance sur le milieu sélectif (Fig. 4.8A). Par contre, les quatre souches montrent une croissance sur le milieu non sélectif (4.7B). Ce résultat indique que MtSNF4b interagit avec MtSNF α 1.

4.3 Identification des partenaires potentiels de MtSNF4b par double hybride

Pour pouvoir identifier des partenaires de MtSNF4b, une banque d'ADNc a été produite à partir d'ARN extraits de 50 radicules d'embryons secs. MtSNF4b est le plus abondant à ce stade de développement des graines. Une transformation pilote a permis d'évaluer le nombre de transformations nécessaires au criblage de l'intégralité de la banque d'ADNc. Le nombre de transformants de la réaction pilote indique que la taille de la banque est de 5×10^6 unités formant colonies (ufc). L'efficacité de la co-transformation est également calculée grâce à une co-transformation pilote qui indique une efficacité de 4×10^4 ufc par co-transformation. Donc, théoriquement, il faut réaliser $5 \times 10^6 / 4 \times 10^4 = 125$ réactions pour couvrir l'intégralité de la banque d'ADNc. Le criblage de l'intégralité de la banque n'étant pas indispensable au criblage de tous les ADNc qu'elle représente, trois co-transformations ont été réalisées et permettent de considérer que 3/125 soit environ 2,4% de la banque a été criblé au cours de cette étude. Le criblage de la banque d'ADNc a été réalisé en co-transformant des bactéries reportrices avec pBT-MtSNF4b et pTRG-Banque. La sélection s'est déroulée en deux étapes : le produit de la co-transformation est étalé directement sur un premier milieu sélectif simple contenant du 3-AT puis les colonies qui se sont développées en moins de quatre jours sont

Table 4.1 : Résultats de séquençage du criblage de la banque d'ADNc. Les plasmides provenant de la banque d'ADNc de racines sèches et contenus dans les colonies se développant sur les milieux sélectifs sont séquencés. Les séquences sont alignées par blastn sur la base de données des transcrits consensus MtGI8 de la « Noble foundation » (<http://bioinfo.noble.org/gene-atlas/v2/>). Le produit du gène du meilleur alignement pour chaque séquence est noté et répertorié suivant la classification fonctionnelle MIPS. Le nombre de fois où un transcrit identique est trouvé dans le criblage et la quantité relative de transcrits dans les graines matures de *M. truncatula* sont donnés (d'après <http://bioinfo.noble.org/gene-atlas/v2/>).

numero de TC MtGI8	produit du gène	classification	expression normalisée dans les graines matures	occurrence
TC115224	pyruvate dehydrogenase E1 component	métabolisme	29	1
TC100344	putative phosphoribosylanthranilate isomerase (PRAI)	métabolisme	543	1
TC100606	Leucine-rich repeat, plant specific	métabolisme	3032	1
TC100741	P-type H+-ATPase	métabolisme	2621	3
TC106598	Methionine synthase	métabolisme	7683	1
TC107847	ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit	métabolisme	1795	1
TC93969	Ferredoxin III, chloroplast precursor	métabolisme	1225	1
TC100250	Legumin J precursor	réserve	23495	1
TC100252	Legumin A precursor	réserve	20766	1
TC100306	Convicilin precursor	réserve	1326	1
TC100455	HSP20-like chaperone	stress	2488	1
TC100457	18.2 kDa class I heat shock protein	stress	253	1
TC100458	18.2 kDa class I heat shock protein	stress	3820	3
TC107158	Late embryogenesis abundant protein D-34	stress	14581	1
TC107529	Heat shock 22 kDa protein	stress	2686	1
TC103415	HhH-GDP base-excision repair protein	stress	646	1
TC130306	GRF1-interacting factor 1	transcription	2162	1
TC100375	RNA polymerase II fifth largest subunit like protein	transcription	2316	2
TC111308	Phytochrome and flowering time 1 protein)	transcription	118	1
TC111449	TAFII55 protein conserved region	transcription	413	2
TC94534	Transcription factor Myb1	transcription	1895	1
TC94836	POZ/BTB containing protein	transcription	2286	1
TC106517	Ribosomal protein S27	translation	9960	1
TC94335	Elongation factor 1B alpha-subunit	translation	8309	1
TC94344	40S ribosomal protein S17	translation	11573	1
TC101128	Ubiquitin-associated	ubiquitine	4701	1
TC106312	Ubiquitin ligase enzyme E2	ubiquitine	12241	2
TC109860	F-box protein AtFBL5	ubiquitine	6013	1
TC94101	Ubiquitin ligase, ATL3	ubiquitine	182	1
TC97091	Probable 26S proteasome subunit	ubiquitine	462	1
TC121382	Hypothetical protein	inconnue	3431	2
TC115320	WD-40 repeat	inconnue	79	1
TC107162	Hypothetical protein	inconnue	2347	1
TC107856	Hypothetical protein	inconnue	1462	1
TC109339	Thylakoid lumenal 18 kDa protein	inconnue	203	1
TC109935	putative uncharacterized protein	inconnue	41	1
TC94016	Mitochondrial translocase	inconnue	3340	1
TC94132	heat- and acid-stable phosphoprotein	inconnue	5503	2
TC96254	Hydroxyproline rich protein	inconnue	1808	1
TC96439	Pore protein of 24 kD	inconnue	1350	1
TC96485	putative uncharacterized protein	inconnue	788	1
TC97100	putative uncharacterized protein	inconnue	636	1
TC106972	Progesterone-binding protein-like	inconnue	3797	1

repiquées sur un milieu sélectif double contenant du 3-AT et de la streptomycine. Entre ces deux étapes, en moyenne 60% des colonies sont capables de se développer. Finalement, 52 clones positifs sont retenus et le plasmide contenu dans chacun d'eux est séquencé. Les séquences obtenues sont alignées par blastn sur la base de données des transcrits consensus MtGI8 de la « Noble foundation » (<http://bioinfo.noble.org/gene-atlas/v2/>). Les 52 clones représentent les transcrits de 43 gènes (tableau 4.1).

La présence relative des transcrits appartenant à ces 52 clones identifiés a été évaluée par le biais de données d'analyses microarrays (<http://bioinfo.noble.org/gene-atlas/v2/>) de transcrits de graines matures. Ceci permet d'évaluer si le faible nombre de clones criblés a produit un biais par l'obtention des gènes les plus fortement exprimés. Des séquences de gènes faiblement exprimés sont retrouvées parmi les clones positifs du criblage double hybride (Tab. 4.1). Des classes très abondantes de transcrits sont également détectées et correspondent à des protéines de réserve de type légumine (Tab. 4.1). Nous considérons donc que le biais, s'il existe, n'est pas dû à la sur-représentation de transcrits fortement exprimés.

Les séquences des plasmides positifs appartiennent principalement à la classe du métabolisme et de l'énergie, du stress et de la transcription (Tab. 4.1). Parmi les clones classés dans la catégorie stress, six clones positifs contenaient des transcrits codant quatre petites HSP distinctes (TC100455, TC100457, TC100458, TC107529). Le transcrit TC100458, qui code une sHSP18, est représenté trois fois et apparaît dans deux des trois co-transformations indépendantes. Parmi les clones appartenant à la classe de la transcription, des ARNm codent un facteur de transcription similaire à un *Myb1* et trois co-activateurs de transcription dont un ARNm similaire à un homologue d'une protéine du complexe « TATA binding protein » (TBP) de type *TAFIID* (Tab. 4.1) et un autre à un régulateur de croissance *GRFP1* (TC130306). En plus de ces facteurs, deux transcrits codent une sous-unité large du complexe ARN polymérase II (TC100375). Parmi les clones classés dans la catégorie métabolisme et énergie, un transcrit code une ADP glucosyltransferase (TC107847) et un autre un pyruvate déshydrogénase impliqué dans la synthèse d'Acétyl-CoA (TC115224) et d'une méthionine synthase (TC106598). Enfin, un clone retrouvé trois fois pendant le criblage code une P-type H⁺ ATPase (TC100741). La classe des gènes liés à la signalisation par le système de dégradation par l'ubiquitine et le protéasome 26S est représentée par des ubiquitines ligases et une sous-unité du protéasome 26S. Parmi les transcrits liés à la dégradation par le protéasome, le TC106312, codant une ubiquitine ligase, apparaît deux fois dans le criblage et le TC94101 code un homologue du transcrit de *ATL3* chez *A. thaliana* (Tab. 4.1).

Un transcrit montre une homologie avec des protéines contenant un domaine F-box du complexe protéasomale SCF/ubiquitine dépendantes (TC109860) et un autre transcrit code une sous-unité régulatrice du protéasome 26S (TC97091).

4.4 Discussion

4.4.1 MtSNF4b est une sous-unité fonctionnelle SNF4 interagissant *in vivo* avec MtSNF1

Dans cette étude la preuve d'une interaction fonctionnelle entre MtSNF4b et SNF1 (TC116507) est démontrée pour la première fois par la complémentation d'un mutant $\Delta snf4$ de levure (Fig. 4.2). Malgré la divergence de séquences observées entre SNF4 et MtSNF4b (Fig. 4.1), la fonctionnalité de MtSNF4b reste donc effective comme c'est le cas pour son homologue LeSNF4 de la tomate (Bradford et al., 2003). D'autres sous-unités γ du complexe SnRK1 (AKIN $\beta\gamma$) chez les plantes complètent des mutants $\Delta snf4$ de levure (Lumbreras et al., 2001). Au contraire, la sous-unité AKIN γ d'*A. thaliana* ne complémente pas les mutants $\Delta snf4$ de levure (Bouly et al., 1999). Parmi les trois différentes classes de sous-unités γ connues chez les plantes, les AKIN $\beta\gamma$ et les PV42/LeSNF4/MtSNF4b sont donc des SNF4 fonctionnelles alors que les sous-unités γ semblent avoir perdu leurs fonctions initiales.

L'alignement de la séquence de MtSNF α 1 et son homologue AKIN10 avec SNF1 de levure montre que les kinases des plantes possèdent deux importantes insertions dans la région auto-inhibitrice par rapport à leur homologue chez la levure (Fig. 4.6). Il a été montré que la protéine SNF1 de levure ne possédant pas la région auto-inhibitrice était insensible à la mutation $\Delta snf4$ (Leech et al., 2003). La modification de cette zone particulière des SnRK1 par rapport à leur homologue chez la levure suggère également une modification des propriétés auto-inhibitrices de cette région.

Grâce à une analyse par double hybride bactérien dirigé, nous avons montré que MtSNF α 1 interagit avec MtSNF4b (Fig. 4.7). Chez *A. thaliana*, l'interaction entre les sous-

unités $\alpha 1/\beta 1\beta 2$, $\alpha 1/\gamma$, $\gamma/\beta 1\beta 2$ a pu être démontrée par une technique de double hybride dans *S. cerevisiae* (Bouly et al., 1999). La sous-unité AKIN $\beta\gamma$ d'*A. thaliana* interagit avec la sous-unité catalytique et une sous-unité β du complexe SnRK1 lors d'analyses double hybride (Lumbreras et al., 2001 ; Gissot et al., 2006). Cependant, notre criblage de la banque d'ADNc ne donne aucune indication quant aux autres sous-unités régulatrices composant ce complexe. Une étude a montré que le taux de transcrits de *MtSNF4b* est corrélé à celui de *MtAKIN* $\beta 2$ de *M. truncatula* dans les graines pendant la maturation et l'imbibition de radicules de 3mm dans une solution de PEG, ce qui n'est pas le cas des autres sous-unités β connues chez *M. truncatula* (Buitink et al., 2003). Cette sous-unité pourrait servir de nouvelle cible pour MtSNF4b lors d'expérience de double hybride bactériens à venir.

4.4.2 Validation du choix du matériel végétal et faux positifs

La banque d'ADNc a été constituée à partir de radicules sèches de graines matures de *M. truncatula*. L'imbibition de radicules de *M. truncatula* de 3mm dans une solution de PEG induit une forte augmentation de l'expression de *MtSNF4b* en même temps qu'une ré-induction de la tolérance à la dessiccation. Or l'expression de la protéine MtSNF4b est maximale dans les graines sèches (Rosnoblet et al., 2007), où près de la moitié des gènes sont exprimés chez *A. thaliana* (Nakabayashi et al., 2005). Le choix de ce matériel végétal nous a donc semblé le plus approprié. L'analyse double hybride par criblage d'ADNc nous offre des pistes de cibles potentielles de MtSNF4b mais n'est que partielle et nécessitera sûrement d'être complétée par d'autres co-transformations. Le fait de ne pas retrouver MtSNF $\alpha 1$ dans ce criblage, ni les autres sous-unités putatives connues du complexe SnRK1 chez *M. truncatula*, laisse supposer que les partenaires de MtSNF4b n'ont pas été mis en évidence. Les protéines révélées par cette technique sont donc peut-être des cibles d'un complexe SnRK1 formé de MtSNF $\alpha 1$ et MtSNF4b.

Le criblage d'une banque d'ADNc par double hybride bactérien donne accès à un nombre important de clones appelés faux positifs résultants d'interactions aspécifiques avec la cible (Serebriiskii and Golemis, 2001). Cela peut être le cas des protéines de réserves mises en évidence durant le criblage et présentes en un grand nombre de copies dans notre banque,

mais également des protéines liées à la traduction, à la post maturation et à la dégradation des protéines. Enfin, il arrive que des chaperonnes telles que les HSP soient des faux positifs, du fait de leur activité de liaison à des protéines. Cette méthode nécessite donc des validations de l'interaction par une technique soit *in vitro* (pull down) soit *in vivo* (co-immunoprécipitation). L'absence d'auto-activation des cibles devra également être vérifiée au moyen d'une co-transformation avec des vecteurs pBT-*vide* et pTRG-*cible*.

4.4.3 Rôles putatifs du complexe MtSNF α 1/MtSNF4b

L'interaction entre MtSNF4b et d'autres protéines pourrait nous indiquer le rôle joué par le complexe MtSNF4b/MtSNF α 1 si l'on considère que ces dernières sont des cibles du complexe. Le rôle de certains clones positifs a donc été discuté par rapport à la bibliographie et aux résultats de phénotypage.

MtSNF4b interagit avec des enzymes clefs du métabolisme primaire

Un des clones positifs interagissant avec MtSNF4b lors du double hybride bactérien correspond à un transcrite codant une ADP glucose pyrophosphorylase. L'ADP glucose pyrophosphorylase est une protéine impliquée dans la phosphorylation du glucose menant à la synthèse d'amidon. Or le rôle direct de SnRK1 dans la phosphorylation et l'activation de l'ADP glucose pyrophosphorylase a été démontré (Tiessen et al., 2003 ; Jossier et al., 2009). Pendant la maturation les graines de *M. truncatula*, l'amidon est dégradé, passant de 95 à 0,1 mg/g de matière sèche, au cours de la maturation entre 12 et 40 jours après pollinisation (Rosnoblet et al., 2007). Dans cette étude, les lignées RNAi *MtSNF4b* montrent une réduction de la quantité d'amidon légèrement moins rapide que chez le type sauvage à 28 jours après pollinisation. Les mutants contiennent alors quatre à cinq grammes d'amidon contre seulement 1,5 dans le type sauvage (Rosnoblet et al., 2007). Or, MtSNF4b est présent sous forme de complexe dans les graines de 28 jours après pollinisation (Rosnoblet et al., 2007). Donc MtSNF4b pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de l'ADP glucose pyrophosphorylase via son interaction avec MtSNF α 1.

MtSNF4b interagit avec des protéines de la signalisation protéasome/ubiquitine

MtSNF4b interagit dans le système double hybride avec quelques protéines homologues impliquées dans le protéasome. La séquence du TC109860, dont le produit interagit avec MtSNF4b, montre une homologie très forte (E-value=0) avec les gènes dupliqués *AtFBL5* (At1g77000) et *SPK2A* (At1g21410), codant des protéines F-box. Ces protéines sont des composantes de la reconnaissance du substrat du complexe SCF (complexe Skp1/Cullin/F box Ubiquitin ligase) qui cible les protéines avant leur dégradation par le protéasome 26S (Jackson et al., 2000). Le complexe SCF^{SKP2A} est responsable de la dégradation de la protéine E2Fc phosphorylée. Les protéines E2F et DP interagissent pour former des facteurs de transcription actifs et régulent ainsi l'expression de gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire. Le complexe joue un rôle important dans l'arrêt du cycle cellulaire et sa réactivation (Del Pozo et al, 2006). Par sur-expression d'une forme non dégradable d'E2Fc, il a été montré que le complexe E2Fc/DP est impliqué dans le retardement de la division cellulaire et la répression de l'expression de gènes de phase S (Del Pozo et al, 2006). Une hypothèse est que SKP2A de *M. truncatula* cible MtSNF4b vers le complexe SCF en vue de sa dégradation. Une deuxième hypothèse se base sur l'interaction MtSNF4b/SPK2A et son rôle dans la dégradation d'E2Fc. L'interaction de MtSNF4b avec SKP2A empêche peut être SK2A d'exercer sa fonction : dégrader E2Fc. Une augmentation de E2Fc conduit ensuite à un retard de potentiel de division cellulaire et une répression de gènes de phase S. Effectivement, les gènes de phase S, comme les expansines, sont plus fortement exprimées dans les graines non dormantes (Annexe 2 : données supplémentaires S6). Dans les bourgeons dormants, les cellules sont bloquées en phase G1, avant la phase S du cycle cellulaire (Gutierrez et al., 2002) et la levée de la dormance conduit à une activation de la transition de G1 vers la phase S. En plus, Del Pozo et al. (2006) ont montré que la dégradation d'E2Fc est activée pendant la transition de l'obscurité vers la lumière, ce qui pourrait expliquer l'effet négatif de la lumière sur la germination de graines dormantes de *M. truncatula*.

Un deuxième partenaire putatif lié au protéasome de MtSNF4b est un homologue de *ATL2* chez *Arabidopsis* (Tab. 4.1). Ce gène est un membre d'une famille multigénique codant pour des protéines RING-H2 zinc-finger, fonctionnant comme E3 ubiquitine ligases, responsables de la sélection du substrat destiné à être dégradé. L'accumulation de l'ARNm de

ATL2 est rapidement active après incubation des éliciteurs de réponse aux pathogènes (Salinas-Mondragon et al, 1999). Les plantes mutantes dans lesquelles *ATL2* est exprimé d'une manière constitutive (*eca*, pour expression constitutive de *ATL2*) montrent une activation de l'expression de *NPRI*, *PAL*, et *CHS* (Serrano et Guzman, 2004). En plus, un criblage de l'expression des autres membres de la famille *ATL* montre que ces gènes sont sur-exprimés également dans ces mutants. D'une manière intéressante, dans notre analyse transcriptomique, des homologues d'*ATLIR* (TC109454) et *ATL3F* (TC94101) sont réprimés dans les graines RNAi *MtSNF4b* après deux à trois semaines de PMS (Annexe 2 : données supplémentaires S). Il est suggéré que les *ATL* sont impliqués dans l'ubiquitination de régulateurs négatifs de la réponse de défense et sont donc responsables de l'activation de réponses aux pathogènes (Serrano et al, 2004). *MtSNF4b*, en formant un complexe avec *MtSNF α 1* pourrait donc être liée à la signalisation des stress biotiques via l'activation d'ubiquitines ligases.

MtSNF4b est liée aux stress abiotiques via les sHSP18

L'analyse double hybride met en évidence une interaction avec plusieurs petites HSP, dont une est codée par le TC100548 et qui a été identifiée à trois reprises. Le TC100458 a également été trouvé lors de l'analyse transcriptomique comme étant moins exprimé dans les lignées de type sauvage que dans les lignées RNAi *MtSNF4b* imbibées après deux à trois semaines de PMS. Donc, malgré son rôle de chaperonne, cette HSP reste potentiellement un bon candidat de cible du complexe formé par *MtSNF4b*. Par ailleurs, il a été démontré que SnRK1 interagit avec une sHSP17 chez *H. vulgare* par un criblage double hybride d'albumen (Slocombe et al., 2004). Par la suite, il a été démontré que cette sHSP17 est un substrat de SnRK1. Cette dernière phosphoryle le résidu sérine en position 35 de cette sHSP, bien que cette sérine soit inclut dans un motif qui diffère de celui traditionnellement reconnu par SNF1 (Slocombe et al., 2004). L'alignement protéique du produit du TC100458 et de la HvHSP17 montre une bonne homologie de séquence mais la sérine 35 de HvHSP17 est retrouvée à un acide aminé d'écart de la sérine trouvée chez le produit du TC100458.

Discussion et perspectives

1. Rôle de MtSNF4b dans la germination et la levée de la dormance

Les résultats du chapitre 1 montrent que la dormance observée chez *M. truncatula* n'est pas une dormance profonde comme celle observée chez les génotypes dormants d'*A. thaliana* tels que Cvi. Effectivement, les graines germent dans les deux-trois semaines après imbibition, un comportement similaire aux graines de *N. plumbaginifolia* (Grappin et al., 2000). Ceci est peut-être dû à l'absence de détection de gènes liés au métabolisme de l'ABA et GA dans l'analyse transcriptomique comparant les graines dormantes et non dormantes. Les seuls gènes associés à l'ABA codent des phosphatases 2C qui sont surexprimées dans les graines non dormantes et jouent un rôle négatif dans la signalisation de l'ABA (Pernas et al., 2007) (chapitre 2). Dans notre étude, la dormance est confondue avec la vitesse de germination dans de nombreux cas. La vitesse de germination correspond à la pente de la courbe de germination, et pour une graine vraiment dormante, cette pente à une dérivée nulle, ce qui n'est que rarement le cas avec le génotype R108. Une étude transcriptomique, par puce à ADNc de type affimetrix, sur un génotype plus dormant, comme DZA315.16, pourrait permettre une comparaison plus pertinente de profil d'expression de gènes par rapport à ceux obtenus par Cadman et al. (2006) chez *A. thaliana*. Une autre possibilité, qui peut expliquer l'absence de gènes liés au métabolisme ou à l'action des hormones, est que le temps d'imbibition du prélèvement est trop court. L'expression des gènes liés à la dormance arrive peut être plus tard pendant l'imbibition et Carrera et al. (2008) suggèrent que ces gènes sont exprimés après 24 à 48 heures chez *A. thaliana*. Une analyse après 24 ou 48 heures d'imbibition permettrait peut être de mieux comprendre les mécanismes liés à la dormance chez *M. truncatula*.

Le rôle de MtSNF4b dans la dormance des embryons semble être associé à l'activation des gènes liés au métabolisme secondaire et à la tolérance aux stress biotiques. Les métabolites secondaires comme la médicarpine ont un rôle dans l'inhibition de la germination chez *M. sativa* (Dornbos et al., 1990). La germination d'embryons isolés met en évidence l'impact de l'extinction de *MtSNF4b* sur la dormance embryonnaire. Il est possible que cette phytoalexine soit présente dans les graines en prévention de l'attaque de pathogènes, mais qu'elle exerce également un effet sur la germination dans les graines de légumineuses.

Malgré tout, l'inhibition de la synthèse d'ABA par le fluridone menant à une germination en 20 heures à la fois pour le type sauvage et les mutants RNAi *MtSNF4b* ne plaide pas en faveur de cette hypothèse.

Nous ne savons pas si MtSNF4b agit chez les autres espèces comme chez *M. truncatula*. Pourtant, chez *A. thaliana*, la PMS réprime l'expression d'*AtSNF4b* dans les graines imbibées indépendamment de la dormance (Carrera et al., 2008). De même, *LeSNF4b* est maintenu dans les graines dormantes de tomate (Bradford et al., 2003). L'analyse de mutants d'*A. thaliana* pour *AtSNF4b* pourrait constituer un élément de comparaison plus direct avec la littérature existante.

Notre étude indique que MtSNF4b est aussi bien présente dans l'albumen que dans l'embryon, et que les graines RNAi *MtSNF4b* semblent pouvoir germer à des potentiels hydriques plus bas que les graines de type sauvage (chapitre 1). Le potentiel osmotique de base dépend d'une part d'un paramètre embryonnaire, la pression exercée par la radicule sur l'albumen, et d'autre part d'un paramètre tégumentaire, la résistance opposée par l'albumen au niveau de la coiffe de la radicule (Bewley, 1999). Chez de nombreux membres des *Solanaceae* (tomate, tabac, datura) la rupture de la paroi des cellules de l'albumen micropillaire est accrue par l'action d'hydrolases pariétales régulées par le GA et par la lumière (Black et al., 1996 ; Bewley et al., 1997 ; Welbaum et al., 1995). De plus, la post maturation à sec lève la dormance lié à l'albumen chez le *N. tabacum* favorisant la rupture des téguments (Leubner et al., 2002). La présence et le rôle de MtSNF4b dans l'albumen pourrait donc également jouer un rôle dans la levée de la dormance des graines de *M. truncatula* en modifiant le potentiel osmotique de base. Dans l'embryon, l'extinction de *MtSNF4b* induit la répression de gènes potentiellement liés au renforcement des parois. Des gènes codant des peroxydases et des enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, comme la *PAL*, la *C4H*, ou la *CCoAOMT* sont sur-exprimés. De même, des gènes liés à l'inhibition de la dégradation des parois, des inhibiteurs de xyloglucanases (*EDGP*) sont réprimés en l'absence de MtSNF4b ce qui pourrait expliquer le phénotype de dormance observé. L'expression de ces gènes étant mesurée dans l'embryon, on ne sait donc pas si cette tendance existe également dans l'albumen. Le rôle de MtSNF4b dans l'activation de gènes de renforcement de la paroi, ou de ralentissement de leur dégradation (*EDGP*), pourrait avoir lieu dans l'albumen et expliquerait une partie de la différence de germination observée. De même, l'albumen, constituant la première barrière extérieure de l'embryon pourrait être le siège principal de la production de protéines de stress biotiques. Pour confirmer

cette hypothèse, la présence de MtSNF4b dans l'albumen nécessitera d'être validée par un western blot, et une analyse transcriptomique des transcrits présents dans l'albumen constituerait un élément de compréhension du rôle de MtSNF4b supplémentaire, si ce n'est déterminant. Le problème reste que l'extraction d'ARN provenant de l'albumen est très difficile dans les graines matures de *M. truncatula*.

2. Rôle de MtSNF4b dans la perception et signalisation des sucres pendant la germination

Le rôle de MtSNF4b semble être impliqué dans la perception et la signalisation des sucres que ce soit pour son rôle dans la dormance ou pour son rôle dans l'expression de gènes du métabolisme de la médicarpine. Cependant, la réaction des différentes lignées à l'application de sucres en terme de modification de la dormance n'est pas compréhensible en lien avec l'expression différentielle observée pour les gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine. En effet, durant les manipulations les hypothèses émises nous ont amené à restreindre progressivement les sucres utilisés afin d'économiser du matériel biologique, tout en se concentrant sur ceux qui avaient un effet. Certaines hypothèses concernant la position de cette protéine dans la perception et la signalisation des sucres peuvent tout de même être proposées notamment dans les graines dormantes (Fig. D1). Nous avons vu que le 3-OMG, via les transporteurs d'hexoses ou directement, diminue la vitesse de la germination des graines de type sauvage et RNAi *MtSNF4b*. Ce résultat indique que la perception et la signalisation des sucres dans la dormance, via la voie indépendante de l'hexokinase, sont également indépendantes de MtSNF4b (Fig. D1). Cependant, lors de l'analyse de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine, le 3-OMG montre un effet dépendant de MtSNF4b. Ce sucre semble diminuer l'expression de ces gènes dans les graines dormantes de type sauvage. Au contraire, dans les graines RNAi *MtSNF4b* et dans les graines non dormantes, où MtSNF4b n'est plus associé au complexe SnRK1, le 3-OMG induit une activation des gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine. L'effet du 3-OMG est donc à la fois de réprimer la germination indépendamment de MtSNF4b et d'inhiber l'expression de gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine sous contrôle de MtSNF4b dans les graines dormantes. Une hypothèse alternative est que les graines RNAi -

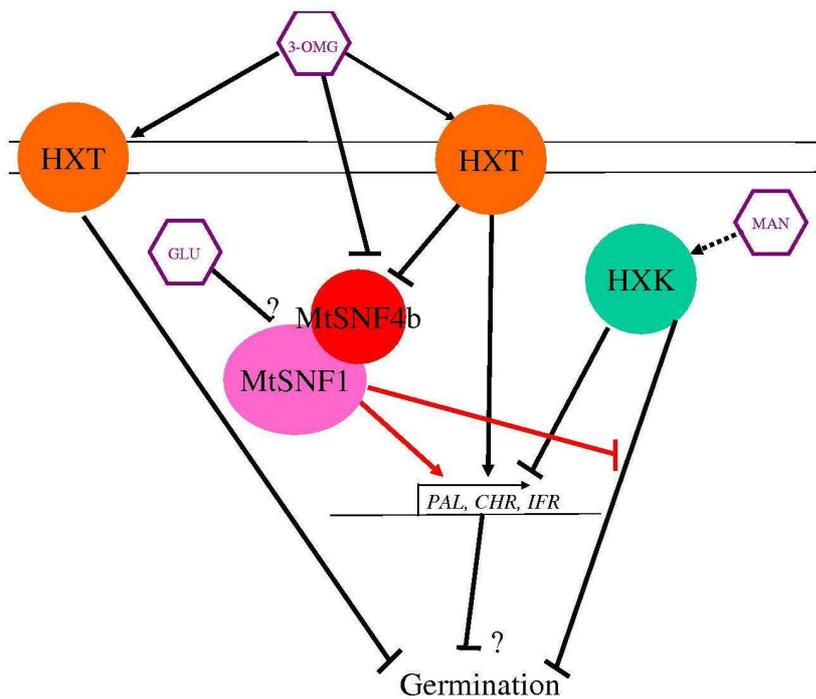


Figure D1 : Réseau de perception et de signalisation des sucres et de MtSNF4b dans les graines dormantes. Les traits finissant par une flèche indiquent une activation et ceux finissant par un trait une répression. Les traits rouges indiquent un effet de MtSNF4b (HXT : transporteur d'hexose ; HKK : hexokinase ; 3-OMG : 3-O-méthylglucose ; MAN : Mannose ; GLU : Glucose).

MtSNF4b sont déjà moins dormantes et que l'effet du 3OMG dans ces graines ressemble à celui attendu dans les graines non-dormantes. Il devient alors compliqué de faire un lien direct entre l'expression de ces gènes et l'état de dormance en utilisant ce sucre comme inducteur. Le mannose réprime la germination des graines RNAi MtSNF4b, mais pas celle des graines de type sauvage. Ce sucre est lié à l'activation de la voie hexokinase dépendante, et ce résultat semble indiquer que MtSNF4b inhibe ce signal dans les graines dormantes. Au contraire, le mannose diminue l'expression des gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine dans les graines indépendamment de MtSNF4b. Une nouvelle fois, l'expression des gènes ne semble pas liée au phénotype de dormance. La dormance induite par la voie dépendante des hexokinases semble être réprimée par MtSNF4b, alors que l'inhibition de l'expression des gènes par cette voie semble indépendante de MtSNF4b (Fig. D1). Les dernières données acquises concernent la perception du glucose, liée à la signalisation par la glycolyse. L'effet de ce sucre est de réduire la dormance en lien avec MtSNF4b. Cependant, l'expression des gènes de la voie de biosynthèse de la médicarpine nécessite d'être étudiée dans les graines dormantes afin de conclure au sujet de ce sucre, et de l'impact de MtSNF4b sur sa signalisation. Ces données corroborent les résultats sur la position de SNF1 dans la perception et la signalisation des sucres dans les plantes, qui n'est pas encore élucidée et semble relativement complexe du fait de son appartenance à plusieurs voies de perception et de signalisation. SnRK1 joue un rôle dans l'accumulation des sucres mais MtSNF4b semble conférer une fonction plus spécifiquement liée aux oligosaccharides. Ces données suggèrent que les voies de régulation qui lient MtSNF4b à la germination/dormance et à l'expression de gènes liés aux stress biotiques sont indépendantes. On retrouve ici l'idée que MtSNF4b permet une fonction spécifique au complexe SnRK1 dans les graines en fin de maturation et dans les graines dormantes pendant la germination.

3. Rôle de MtSNF4b dans la post maturation et le vieillissement

L'une des fonctions de MtSNF4b mise en évidence durant cette thèse est son rôle dans le ralentissement de la PMS et donc le ralentissement de la levée de la dormance primaire au cours d'une conservation à sec. Les mécanismes moléculaires levant progressivement la dormance au cours de la post maturation à sec ne sont pas bien compris, mais de récentes études indiquent un fonctionnement à différentes échelles, allant de la transcription de l'ARN aux réactions enzymatiques et non enzymatiques (Holdsworth et al., 2008). La production de

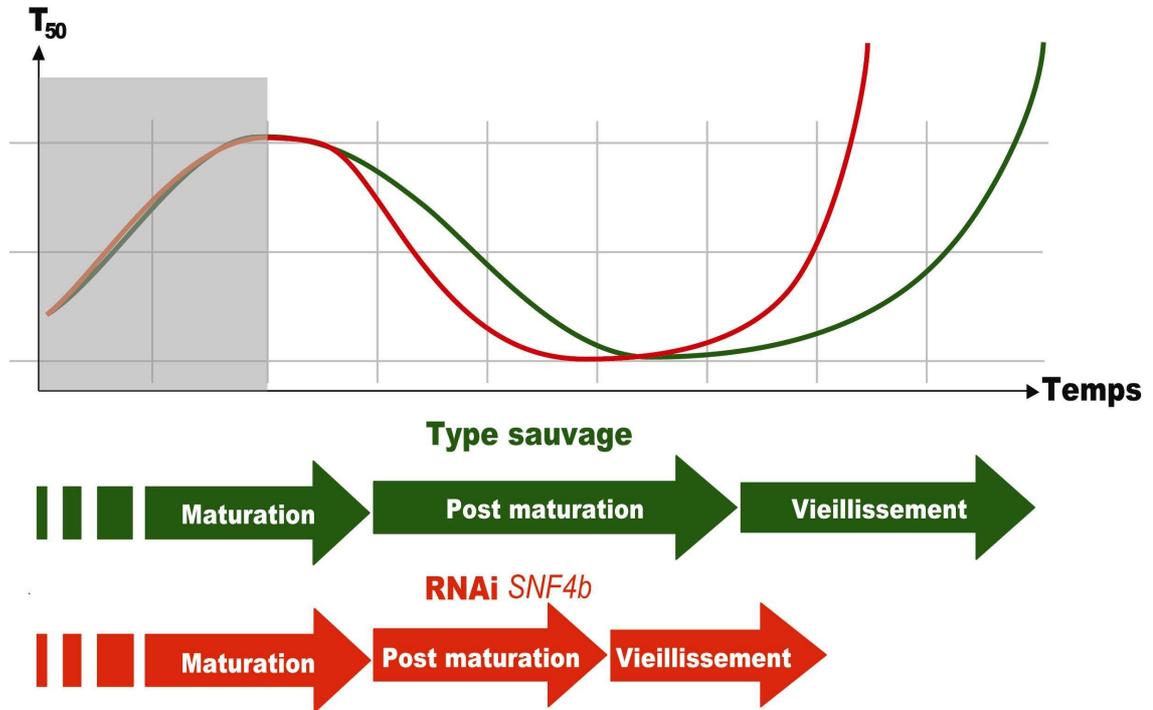


Figure D2 : Schéma de synthèse de l'impact de MtSNF4b sur la T_{50} au cours du temps pendant la maturation, la post maturation et le vieillissement des graines de *M. truncatula*. En vert est représentée l'évolution de la T_{50} d'une graine de type sauvage au cours du temps, alors que la même courbe est représentée en rouge pour un mutant RNAi *MtSNF4b*. Au début de la maturation MtSNF4b n'est pas exprimé dans la zone grisée. La dormance se met en place progressivement et à maturité, la dormance est maximale. Au cours de la post maturation à sec, les graines perdent progressivement leur dormance et ce plus rapidement pour les graines n'exprimant pas MtSNF4b. Un minimum de T_{50} est ensuite rejoint traduisant une absence de dormance et qui est partiellement commune aux deux types de graines. Enfin, le travail de Rosnoblet (2007) nous permet de compléter le schéma par une perte de vigueur progressive des graines. La T_{50} augmente de nouveau jusqu'à une asymptote verticale qui traduit le fait que 50% des graines sont mortes. La encore, les graines ne produisant pas MtSNF4b vieillissent plus rapidement, amplifiant le phénomène observé pendant la post maturation. Ce schéma permet d'émettre l'hypothèse de phénomènes communs liant la post maturation et le vieillissement régulés par MtSNF4b.

ROS est d'ailleurs proposée comme mécanisme de levée de la dormance par l'intermédiaire de l'action de ces derniers sur la peroxydation de lipides et la carbonylation de protéines spécifiques (Oracz et al., 2007). Il a été démontré que le vieillissement accéléré des semences RNAi *MtSNF4b* est plus rapide que celui des graines de type sauvage et que la vigueur germinative des semences RNAi *MtSNF4b* après un vieillissement accéléré est moins bonne que celle des graines de type sauvage (Rosnoblet et al., 2007). Le vieillissement des graines est décrit comme un processus mettant en jeu des phénomènes oxydatifs, durant le stockage et de réparation au cours de l'imbibition (Rajjou et al., 2008). L'impact du vieillissement est généralement pris en compte au travers d'indicateurs comme le pourcentage de germination et la vigueur germinative. On peut également représenter ce phénomène au moyen d'une courbe continue représentant la T_{50} d'un lot de graines au cours du temps de maturation, post maturation et de vieillissement (Fig. D2). Ce schéma de synthèse des travaux physiologiques réalisés durant la thèse de Claire Rosnoblet et celle-ci indiquent que les semences mutantes RNAi *MtSNF4b* évolueraient plus rapidement à l'état sec que les semences de type sauvage, depuis la perte de la dormance pendant la post maturation à sec induisant une diminution de la T_{50} , en passant par la perte de vigueur germinative induisant une augmentation de la T_{50} , jusqu'à la mort par vieillissement rendant la T_{50} infinie. Au vue des résultats physiologiques de cette thèse et de celle de Rosnoblet (2007), l'existence de mécanismes communs à la post maturation et au vieillissement semblent pouvoir être affectés par l'extinction de *MtSNF4b*. Une hypothèse suggèrerait que les semences exprimant *MtSNF4b* montrent un métabolisme ralenti, pendant la maturation comme pendant la germination, ce qui pourrait se traduire par une plus faible production de composés oxydants.

En conclusion, l'analyse transcriptomique et l'analyse double hybride mettent en lumière de nombreux mécanismes de réponse aux stress biotiques, abiotiques, et de régulation du métabolisme en lien avec *MtSNF4b*. Il est probable que cette protéine joue un rôle clef dans la coordination des mécanismes liés à la réponse constitutive aux stress dans les graines dormantes de *M. truncatula* pendant la maturation et pendant l'imbibition. L'étude du rôle de *MtSNF4b* dans la tolérance aux stress biotiques durant la maturation au cours de manipulations d'inoculations *in planta* permettra de compléter les données obtenues au cours de la germination. Les phénotypes des mutants RNAi *MtSNF4b* étant relativement semblables à ceux des graines de type sauvage dans les conditions testées indiquent que ce rôle est mineur dans des conditions optimales de développement et de germination.

Le rôle de MtSNF4b dans la dormance pourrait être une conséquence indirecte de l'activation basale de ces mécanismes, qui joue sûrement un autre rôle dans des conditions restant à identifier.

Matériel et méthodes

Tableau M1 : Listes des microorganismes utilisés dans les différentes manipulations.

	Genre	espèce	nom	nomenclature
Double hybride	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	XL1-Blue MRF ⁺ Kan	$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-nmr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIQZAM15 Tn5 (Kanr)]$
	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	Reporter Strain Competent Cells	$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-nmr})173 \text{ endA1 hisB supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' lacIQ HIS3 aadA Kanr]$
Complémentation	Genre	espèce	Souche, nom	nomenclature
	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	DH5 α	F- ϕ 80 <i>lacZAM15</i> $\Delta(\text{lacZYA-argF})$ U169 <i>recA1 endA1 szfR17</i> (r^+ , m^+) <i>phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>
	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	MCY2649, Type sauvage	MA1a his3- Δ 200 leu2-3,112ura3-52
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	MCY2634, Δ urk#	MA1a his3- Δ 200 leu2-3,112 ura3-52 snf4 Δ 2	
Pathologie	Genre	espèce	pathovar	nom collection française de bactéries phytopathogènes
	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	phaseoli	CFBP 6461
	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	phaseoli	CFBP 6989
	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	phaseoli	CFBP 6994
	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	phaseoli	CFBP 4834
	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	alfalfae	CFBP 3836
	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	glycines	CFBP 2526
<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	campestris	ATCC 33913	
			résistance rifamydne	sous lignée phaseoli
			Non	1
			Non	2
			Non	3
			Oui	fus canis
			Non	
			Non	
			Oui	

M1. Matériel végétal et conditions de cultures

M1.1 Génotypes étudiés

Pour le matériel biologique, quatre lignées de *M. truncatula* RNAi *MtSNF4b* dans le fond génétique R108 sont utilisées (Rosnoblet et al., 2007). Des plasmides binaires pFGC5941/ Gateway (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com/>) avaient été utilisés pour cloner l'ADNc du transcrit de *MtSNF4b* et réaliser la transformation de *M. truncatula* (Rosnoblet et al., 2007). En plus de ces lignées, deux lignées témoins ont été sélectionnées par un criblage par PCR sur 30-40 plantules de la génération N+1 provenant de graines issues de plantes hétérozygotes. Les PCR sont réalisées avec des amorces spécifiques d'un gène de marquage de la construction RNAi *MtSNF4b* : BAR (Phosphinothricine acétyltransferase) (Tab. M2). Le témoin RNAi vide, qui sert au contrôle de l'impact de la transformation, est une lignée de *M. truncatula* cv. R108 transformée avec le vecteur vide utilisé pour obtenir les mutants RNAi *MtSNF4b*. Le témoin RNAi est une lignée de *M. truncatula* cv. R108, transformée au moyen du même vecteur contenant une construction RNAi ciblant la partie 5'UTR du gène *MtENOD40-1* (obtenue de L. Brocard et M. Crespi, ISV, CNRS, Gif sur Yvette, France).

M1.2 Production de graines et tests de germination

Les plantes de *Medicago truncatula* Gaertn. (cv. R108) sont cultivées sur un mélange de vermiculite et de terreau dans une chambre de culture à 24°C/21°C, avec une photopériode de 16 heures à une intensité de 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{sec}^{-2}$. Les gousses sont récoltées au moment de l'abscission et, après dissection, les graines récoltées dans la même semaine sont utilisées pour les analyses comparatives. Les graines immatures sont prélevées à différents temps de maturation en prenant comme référence le jour d'ouverture des pétales de la fleur. Les fleurs sont annotées et les graines en développement sont récoltées à partir de gousses immatures et immédiatement congelées dans l'azote liquide pour l'extraction des ARN. Les gousses

Tableau M2 : Liste des amorces nucléotidiques utilisées dans les différentes manipulations. Les amorces ont été dessinées à partir des séquences consensus MtGI8 disponibles sur le site de la fondation Samuel Nobel (<http://bioinfo.noble.org/gene-atlas/v2/>) avec le logiciel AmplifiX 1.5.4 (<http://crn2m.univ-mrs.fr/AmplifX>)

MtGI8	nom	amorce sens	amorce antisens
RNAi			
	BAR	GACGGGGCGGTACCGGCAG	CATCCGCCGTGCCACCGAG
RT-qPCR			
TC109466	MtPR10-3	GGTGGAGAGACCAAGTATGTGCTA	TCCAATGTGTCAGCCAATCCAG
TC100400	CHR	CCATTGAGGAAAGGTGCAAGCAGA	GCAACAGACTTTCCCATGTGCATC
TC129694	MtSNF4bqPCR	TGAAGGCCTTAGCTTGTGACTCT	AGCACGTCCATTTGAGTCAGCA
TC96312	IFR	GTAACCTGGCTCAACTCGACGTCA	AAAGTCCCAACATCAGCCTCAGTG
TC106939	IFS	CTCTTCGCCACCTTCCAATCCA	AGAGTGTACAAAGGGCCATAACGC
TC106669	PAL	ACTCAGGCAAGTGTGGTAGATCA	GGCAAGAGGCTCTTCAACTCTTC
TC106535	MSC27	GTTGAAGTAGACATTGGTGCTAAC	AGCTGTGTCATCAACACCCTCAT
TC94321	CCoAOMT	TGGCTGTGGACCCTAGGATTGAAA	TGGAGCAGTGCAGTACATGCAA
TC99352	WRKY	GGGTTCAGCCATCAGAGTTATTG	GCTGTTGGTTCATGCTTTGGAC
TC100458	HSP18	CGTTTGGGACCCCTCAAGGATTT	CCTTCCAATCAATCCTGGTGCTCA
TC94309	EDGP	TATTCGGGGATGGACCTTACGGTT	CGATGAAATACTCGGCTGAAGGCT
Double hybride			
TC129694	MtSNF4bB2H	AAATAGAATTCCATGCAGAATCAGATGAAAGAT	AAAGGATCCCACATTCATGCATCTGCATCTG
TC116507	MtSNF1-1	CCGCGGCCGCTATGGATGGATCAGCTGGAC	GACTGAATTCTACAGAACACGAAGCTGCG
TC141233	MtSNF1-2	CCGCGGCCGCTATGCATCACCACATTATACG	CTGAATTCTCATGTATAGGGTCCAATTT
TC123527	MtSNF1-3	CCGCGGCCGCTATGGATGAGCACATCAAACA	CTGAATTCTCAAATTTCTCTTCTAAGG
	pTRG	TGGCTGAACAACTGGAAGCT	ATTCGTCGCCCGCCATAA
Complémentation			
TC129694	InterneMtSNF4b	CAGCACTGCGAGAGTATGAA	AGTCCACAAGCTAAGGCCTT
TC129694	TOPOMtSNF4b	CACCAATAATGCAGAATCAGATGAAAGA	TCATGCATCTGCATCTGATAA

matures sont récoltées après l'abscission et séchées trois jours à 20°C et 60% d'humidité relative avant d'extraire les graines.

La post maturation à sec est réalisée, sur les graines retirées des gousses, par conservation à 20°C et 60% d'humidité relative pendant différentes durées. La stratification consiste en l'exposition de graines imbibées 36 heures à 4°C dans l'eau.

Pour toutes les expériences, les graines sont imbibées sur un papier Whatmann n° 1 dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre avec 4 mL H₂O à 20°C à l'obscurité ou en lumière continue après avoir été scarifiées au moyen de papier de verre pour lever la dormance physique tégumentaire. Elles sont considérées comme étant germées lorsque leur radicule perce les enveloppes extérieures, *i.e.* albumen et tégument.

Les tests de germination sans albumen et sans tégument sont réalisés sur 50 graines à l'obscurité par une pré-imbibition des graines entières pendant six heures. Après six heures d'imbibition les embryons sont isolés du tégument et de l'albumen puis remis à imbiber dans une boîte de Pétri. La percée de la radicule ne pouvant être prise en compte pour déterminer la germination, c'est l'allongement visible de la radicule qui sert d'indicateur de la germination.

Les sensibilités à l'acide abscissique (ABA) et à l'acide gibbérellique (GA), ainsi qu'à leurs inhibiteurs de synthèse respectifs le fluridone et le paclobutrazol, sont évaluées en mesurant la T₅₀. Cette valeur correspond au temps mis par un lot de graines pour atteindre 50% de germination. Le pourcentage final de germination pour la sensibilité à l'ABA sur les 50 graines imbibées à l'obscurité à 20°C est également mesuré. Les solutions d'ABA (Sigma), de GA (Sigma, GA₃) et de leurs inhibiteurs, le fluridone (Duchefa) et le paclobutrazol (Riedel-de haën), ont été préparées en dissolvant les poudres dans de l'éthanol puis en reprenant ces solutions dans l'eau afin d'obtenir les concentrations désirées. La concentration maximale d'éthanol retrouvée dans les milieux d'imbibition contenant ces hormones est de 0,1% (m/v), et un test de germination a été réalisé sur des graines présentant une dormance résiduelle, indiquant que cette teneur en éthanol n'avait pas d'impact sur la germination des graines de *M. truncatula*.

Les sensibilités aux sucres sont évaluées par incubation de trois fois 50 graines dans des solutions de glucose (Sigma, 60mM) et différents analogues de glucose tels que le 3-O-méthyle glucose (Sigma, 50mM), le mannose (Sigma, 20mM) et un inhibiteur d'hexokinase, le glucosamine (Sigma, 40mM) à 20°C à l'obscurité.

Tableau M3 : Composition du gel d'acrylamide. (Protogel : 40% Acrylamide et Bis-acrylamide Solution, 37.5 :1, Bio-Rad, Glycérol à 80%, APS 40% : Ammonium persulfate) (Tampon de séparation 4x : 1,5M Tris-HCl pH 8.8 ; 0.4%SDS) (Tampon de concentration 4x : 0.5M Tris-HCl pH 6.8 ; 0.4%SDS).

Gels de Séparation	
% acrylamide	12%
Protogel	3ml
H₂O ultrapure	3.25ml
Glycérol 80%	1.25ml
Tp sep.4X	2.50ml
	10ml
APS 40%	14µl
TEMED	15µl
Gels de Concentration	
% acrylamide	4.5%
Protogel	0.55ml
H₂O ultrapure	3.20ml
Tp conc..4X	1.25ml
	5ml
APS 40%	8µl
TEMED	8µl

Les solutions de germination hyperosmotiques de polyéthylène glycol sont réalisées à partir de PEG8000 (Sigma), dissout dans l'eau à raison de 134 g/L afin d'obtenir une pression de -0,27MPa à 20°C (Michel et Kauffman, 1973).

Les courbes de germination sont générées par une régression sigmoïdale de type trois, telle que $y_0 = a/(1+e^{-((x-x_0)/b)})$. La méthode statistique utilisée est celle du « least square deviation » qui implique un seuil de différences significatives de germination de 22% pour 50 graines.

M2. Extraction protéique et détection western blot

Après broyage des échantillons dans l'azote liquide, les protéines solubles sont extraites avec un tampon de lyse (HEPES 50mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM) à 4°C et la teneur en protéines de chaque échantillon est mesurée par un dosage au réactif de Bradford (Bio-Rad Protein Assay), grâce à une gamme étalon de Bovine Serum Albumine (BSA). Les protéines sont séparées sur un gel d'acrylamide à 12% après avoir été concentrées au travers d'un gel de concentration à 4,5 % d'acrylamide (Tab. M3) dans un tampon d'électrophorèse (0,1M Tris, 0,768M Glycine, 0,1% SDS). Le gel d'acrylamide est transféré sur une membrane de nitrocellulose (PROTRAN, Schleicher et Schuell, Keene, N.H., USA) dans un tampon de transfert (Laemmli 1X, Méthanol 20% SDS20%) pour la détection de l'anticorps PR10. L'anticorps anti-PR10 (obtenue de H. Franssen, Wageningen University and Research Centre, Wageningen, Pays-Bas) reconnaît MtPR10-1 chez *M. truncatula* (Ramos et al., 2003). Un système de transfert semi sec est utilisé pour le transfert de l'anticorps antiMtSNF4b. L'anticorps antiMtSNF4b est dirigé contre un peptide synthétique correspondant à la partie N-terminale de MtSNF4b (KEKKVKDLMVNKKC-NH₂) et a été produit à partir de deux lapins, inoculés avec le peptide synthétique par la société Neosystem (Strasbourg, France) puis purifié sur colonne au laboratoire.

Pour la détection, la membrane est saturée une heure dans tampon de TBS/Tween 1,5%. La membrane est incubée dans une solution de TBS :Tween 0,05% additionné de l'AC

primaire pendant une heure à température ambiante. Les dilutions des différents anticorps sont 1/1000 pour anti-MtSNF4b, 1/10 000 pour anti-PR10 (Ramos et al., 2001). Après trois fois cinq minutes de rinçage dans TBS/Tween 0.05%, le deuxième anticorps, conjugué à une peroxydase (HRP) 1/50 000, est incubé pendant 45 minutes sur la membrane. La détection est réalisée par chimiluminescence (Immun-Star WesternC Chemiluminescent Kit, Biorad) et révélée par un analyseur d'image (QuantityOne) au travers d'un appareil de prise de vue Chemidoc (Biorad). La quantification des protéines est réalisée au moyen de l'application « vol. rect. Tool. » du logiciel QuantityOne (Biorad).

M3. Empreintes de tissus par western blot

Des membranes de transfert nitrocellulose PROTRAN sont pré-incubées dans une solution de chlorure de calcium à 0,2M pendant 30 minutes et disposées sur un papier filtre imbibé d'eau distillée. Les graines de type sauvage R108 et la lignée RNAi 1 *MtSNF4b* sont imbibées six heures à 20°C à l'obscurité, puis sont coupées à l'aide d'une lame de rasoir. La face coupée est mise en contact avec la feuille de nitrocellulose pendant quelques secondes pour réaliser une pré-empreinte non utilisée puis à nouveau mise en contact de nouveau pendant 15 secondes afin de réaliser l'empreinte d'analyse. La quantité de protéines totales déposée est évaluée par une coloration au rouge Ponceau. La membrane est ensuite rincée à l'eau pour enlever le rouge ponceau, puis saturée 45 minutes dans du TBS tween 1,5% (1mM Tris pH 7.5, 8 g NaCl, tween 1,5%). L'anticorps primaire anti-SNF4b (1/1000) est incubé sur la membrane pendant une heure. Après trois rinçages de cinq minutes, un anticorps secondaire Anti-Rabbit IgG-Alcaline Phosphatase (Sigma) 1/50000 est incubé pendant une heure. Après rinçage de l'anticorps, du BCIP/NBT Liquid substrate system (Sigma) est incubé à l'obscurité à 20°C pendant cinq minutes et la révélation est réalisée à même la paillasse.

M4. Isolement des ARN totaux et purification des ARN messagers

Les ARN totaux sont isolés selon le protocole phénol:chloroforme:isoamylalcool 25:24:1 de Verwoerd (1989). Pour l'analyse par puce à ADNc, les ARN sont obtenus à partir de 50 embryons isolés de graines après six heures d'imbibition à 20°C, à l'obscurité après deux à trois semaines et six mois de post maturation à sec. Ces embryons permettent de définir trois analyses comparant les différentes conditions. Les embryons sont directement congelés dans l'azote liquide pour prévenir les phénomènes de réponse à la blessure. Les aliquots d'ARN total (400-800 µg) sont utilisés pour purifier les ARN messagers avec le « PolyAtract mRNA isolation system III kit » selon le protocole décrit par le fournisseur (Promega, Madison, WI, USA). La qualité des ARN messagers est évaluée à l'aide du bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA), un « RNA Integrity Number » supérieur à cinq est exigé pour la suite de l'analyse. Pour l'analyse RT-qPCR, les ARN sont obtenus à partir de 50 embryons lors de l'imbibition dans l'eau et de 30 embryons lors de l'imbibition dans les sucres. La quantification des ARN totaux est réalisée par une analyse spectrométrique à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop® ND-1000 UV-Vis. Les échantillons sont dilués jusqu'à 100ng/µl et 10µl de chacun d'entre eux est utilisé pour réaliser une transcription reverse (RT).

M5. Marquage Cys des cibles à hybrider, hybridation, et acquisition image

La puce à ADNc Mt16kOLI1Plus contient 16 470 sondes de 70 nucléotides (Qiagen, Hilden, Germany) représentant toutes les tentatives consensus (TCs) de « The Institute for Genomic Research » (TIGR) *M. truncatula* Gene Index 8 (<http://www.tigr.org/tdb/mtgi>) (environ 40% du génome de *M. truncatula*). Les 16470 sondes sont répliquées deux fois par puces. Les protocoles utilisés pour la préparation des sondes et hybridation sont disponibles dans l'annexe 3 et seront repris brièvement ci-dessous. Les ARNm sont transcrits en ADNc et ces derniers sont marqués par deux types de cyanine Cy3 et Cy5 selon le protocole du

fournisseur CyScribe cDNA Post-Labeling Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Pour les graines imbibées après deux à trois semaines de PMS, les ADNc provenant de deux lignées RNAi indépendantes sont marqués avec les nucléotides Cy3 (six échantillons indépendants) et le pool d'ADNc de référence provenant des trois extractions indépendantes d'embryons de type sauvage est marqué avec Cy5 ou Cy3. Pour les graines imbibées après six mois de PMS, les ADNc provenant d'une lignée RNAi sont marqués avec les nucléotides Cy3 (trois échantillons indépendants) et le pool d'ADNc de référence provenant des trois extractions indépendantes d'embryons de types sauvages est marqué avec Cy5 ou Cy3. Pour la comparaison d'état dormant face au non-dormant, les pools d'ADNc provenant de type sauvage après deux à trois semaines de PMS sont marqués avec Cy3 et ceux imbibés après six mois de PMS avec Cy5. Afin d'écartier d'éventuels gènes faux positifs dus à la différence des marqueurs Cy3 et Cy5, des puces de contrôle de l'hybridation ont été réalisées en déposant sur deux puces des ADNc d'un type sauvage dormant, marqués par Cy3 et Cy5, ou d'un type sauvage non dormant, marqués par Cy3 et Cy5. Une pré-hybridation de nettoyage des puces à ADNc consiste en un rinçage avec SDS à 0,2% pendant deux minutes, trois lavages avec de l'eau ultrapure pendant 10 secondes, puis 20 minutes dans de l'eau ultrapure à 50 °C avant de réaliser un séchage par centrifugation trois minutes à 40g à 20°C. Chaque échantillon marqué par Cy3 est mélangé avec une quantité équivalente d'échantillon marqué par Cy5 (voir Figure 2.2 du chapitre 2), puis pré-incubé dans un mix d'hybridation avec de l'ARNt de levure et de l'ARN polyA puis dénaturé pendant deux minutes à 100°C, et pendant 30 minutes incubé à 37°C avant d'être hybridé sur la puce à ADNc. Après 16 heures d'hybridation à 42°C, les puces à ADNc sont lavées une fois avec du SSC 2x, SDS 0,2% pendant une minute à 20°C, puis une fois avec du SSC 1x, et enfin deux fois avec du SSC 0,2x pendant deux minutes à 20°C. Les lames sont séchées par centrifugation à 40g pendant trois minutes à 20°C. Les puces ainsi hybridées sont scannées par microscopie confocale à fluorescence à l'aide du scanner ScanArray Express Scanner (PerkinElmer, Boston, MA, USA) à une puissance de laser comprise entre 75% à 100% et un gain de tube photomultiplicateur entre 65% to 100%. Les mesures sont obtenues séparément pour chaque fluorochrome avec une résolution de 10 lm/pixel.

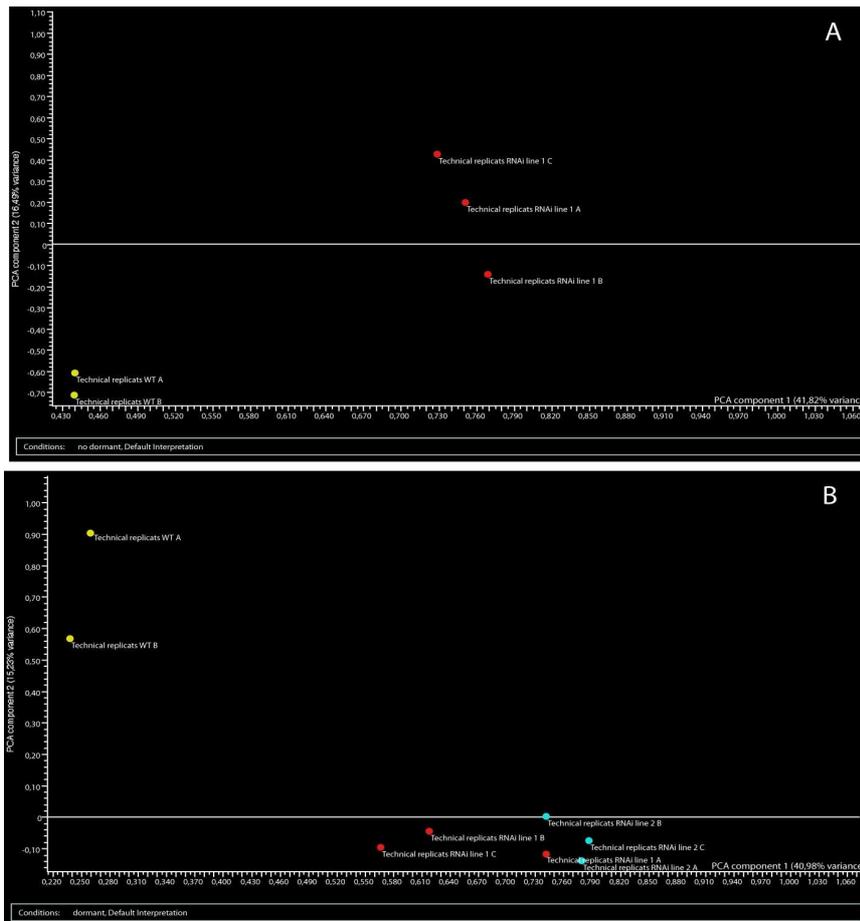


Figure M1 : Analyse en composante principale des puces des analyses comparant le type sauvage aux lignées RNAi *MtSNF4b*. L'analyse est réalisée avec le logiciel Genespring 7.0. Les points jaunes représentent les puces témoins, les points rouges et bleus, les puces d'analyses comparant des embryons RNAi *MtSNF4b* et des embryons de type sauvage imbibés six heures après six mois (A), et deux à trois semaines de PMS (B).

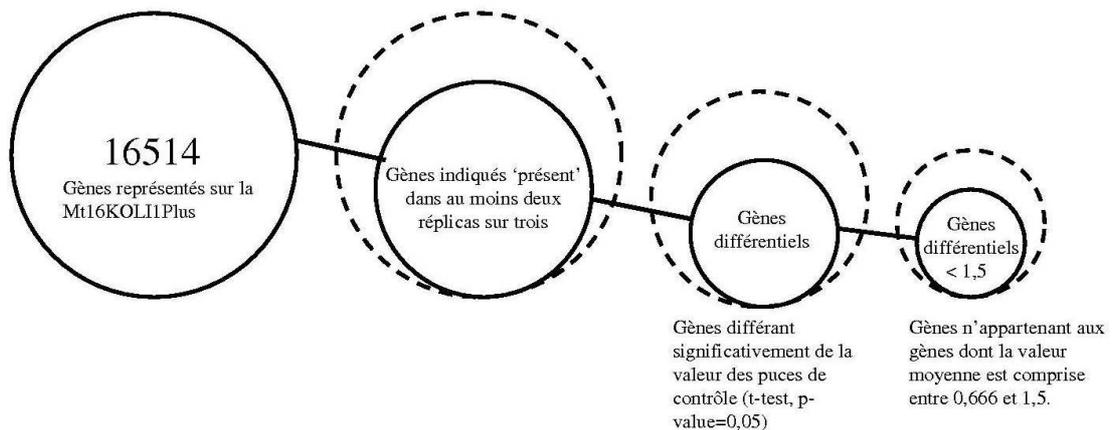


Figure M2 : procédure de sélection des gènes exprimés différemment. L'analyse est réalisée à l'aide du logiciel Genespring 7.0 sur la puce à ADNc Mtl6KOLI1Plus. Les trois étapes de sélection des gènes sont représentées sous forme de cercles et les conditions de sélections sont expliquées pour chaque étape.

M6. Validation de la qualité de l'hybridation et analyse des données

Une étape de contrôle des puces est nécessaire afin de se rendre compte de la qualité de l'hybridation et de sa reproductibilité technique. L'analyse en composante principale des huit puces de l'analyse comparant les lignées RNAi *MtSNF4b* et le type sauvage après deux à trois semaines et six mois de PMS montre la bonne reproductibilité technique des puces (Fig. M1). Par ailleurs, la puce à ADNc Mt16kOLI1Plus est constituée de gènes aliènes de référence. L'un de ces gènes, BAR, est présent dans le vecteur servant à l'insertion de la construction RNAi dans les lignées RNAi *MtSNF4b*. Il montre une expression différentielle de 5,2 en moyenne dans l'analyse d'embryons imbibés après deux à trois semaines de PMS, et de 1,95 dans l'analyse d'embryons imbibés après six semaines de PMS. Ce gène constitue un bon marqueur afin de vérifier le sens de lecture de l'analyse microarray.

L'intensité des signaux est mesurée avec le logiciel d'analyse d'image GENEPIX PRO 5.0 (Axon Instruments, Union City, CA, USA). L'analyse statistique des intensités des signaux est réalisée avec le logiciel GENESPRING 7.0 réglé sur une normalisation par point et par puce et un seuil d'intensité minimum de 200. Seuls les gènes présentant une différence significative entre les puces d'analyse et les puces de contrôle avec une p-value de 0,05 sont analysés. A partir de ces gènes, seuls ceux montrant une différence d'expression d'au moins 1,5 dans chaque réplicat biologique sont considérés comme étant différentiellement exprimés (Fig. M2).

M7. PCR et RT-qPCR en temps réel

Les conditions de température et de durée des programmes de PCR utilisés pour les différentes expériences réalisées et les amorces utilisées sont regroupées dans les Tableau M2 et X+1. Les réactions de transcription reverse sont faites sur 1 µg d'ARN total avec le kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) en suivant le protocole

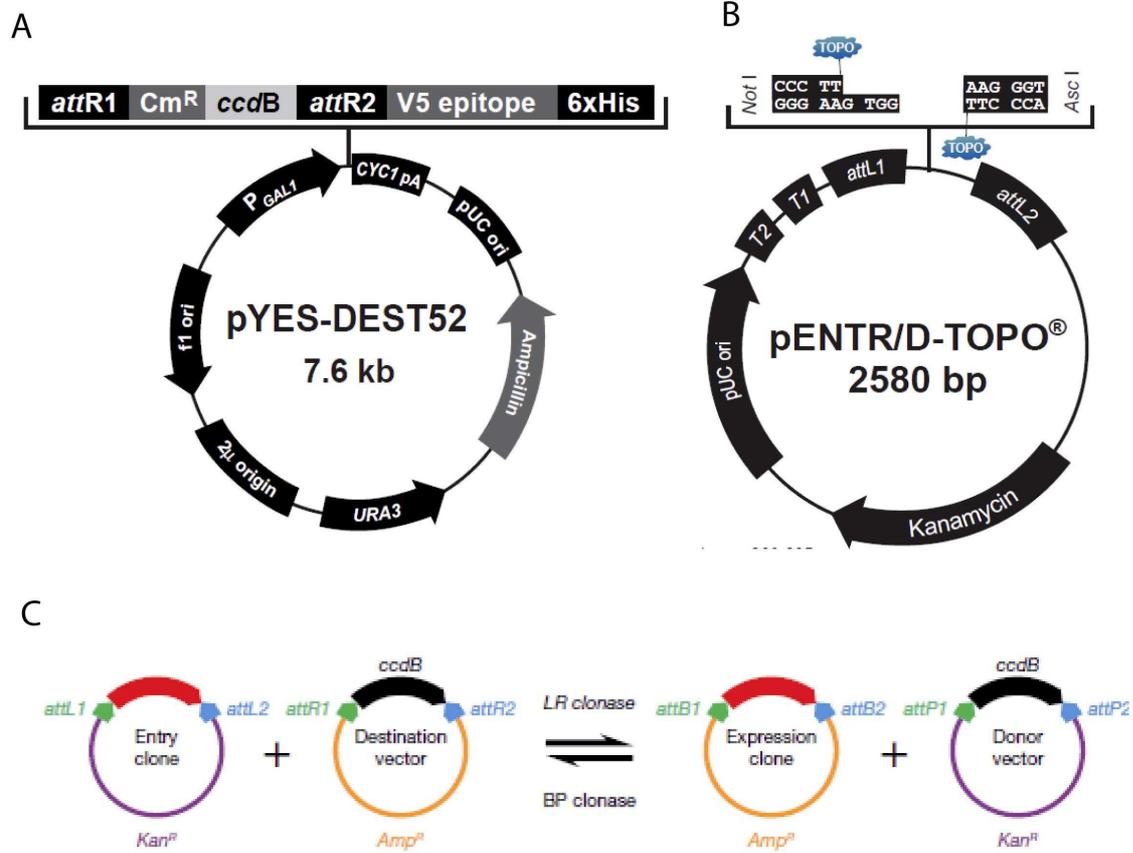


Figure M3 : Vecteurs utilisés pour la complémentation et réaction LR. (A) vecteur de destination : pYES-DEST52 utilisé pour l'expression dans la levure. (B) vecteur d'entrée : pENTR/D-TOPO. (C) Réaction LR entre le vecteur d'entrée et le vecteur de destination.

du fournisseur. Des triplicats de 10 µl de produit de RT dilué au 1/64^{ème} sont utilisés pour réaliser la PCR quantitative sur l'ABI PRISM 7100 Sequence Detection System et du SYBR Green comme marqueur de fluorescence spécifique des doubles brins d'ADN. Le blanc est évalué sur les cycles compris entre 3 et 19 et le seuil à environ ¾ du maximum d'intensité de fluorescence. L'ARNm de *MSC27*, un gène exprimé constitutivement, est utilisé comme transcrite de référence afin de normaliser les données en fonction de l'efficacité de la transcription reverse (Gallardo et al., 2007). Le logiciel d'analyse des courbes de dissociation d'Applied Biosystems est utilisé pour s'assurer de la spécificité du produit de l'amplification. Les différences d'abondance de transcrits sont représentées relativement à une condition de contrôle (l'expression la plus faible). Cette différence est calculée par l'équation du $2^{-\Delta\Delta Ct}$, où 2 est la valeur de l'efficacité théorique de l'amplification et où le terme $-\Delta\Delta Ct$ représente les différences de la valeur moyenne du CT entre la condition traitement et la condition control pour le gène cible et pour le gène de référence (i.e. *MSC27*), $\Delta\Delta Ct = (Ct_{cible} - moyenne(Ct_{MSC27}))_{tx} - (moyenne(Ct_{cible}) - moyenne(Ct_{MSC27}))_{t0}$ (Livak et al., 2001).

M8. Clonage et Plasmides

M8.1 Clonage des ADNc de *MtSNF4b* pour la complémentation

Les vecteurs utilisés pour la complémentation et le double hybride bactérien sont représentés dans la Figure M3. Les plasmides pENTR/D-TOPO et pYES-DEST52 sont utilisés pour réaliser le clonage dans la souche de bactéries et la transformation des souches de levures avec l'ADNc du transcrite de *MtSNF4b* (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com/>). Les plasmides pBT et pTRG sont utilisés pour réaliser l'analyse double hybride et confèrent aux souches de bactéries une résistance au chloramphénicol et à la tétracycline (Stratagene, www.stratagene.com). Pour la complémentation, la séquence codante de *MtSNF4b* est amplifiée en PCR avec les amorces TOPOMtSNF4b (Tab. M2) et rétro-transcrite avec un M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) suivant le protocole du fournisseur. Le fragment PCR est inséré dans le vecteur d'entrée pENTRY D/TOPO qui contient une cassette Gateway® (Invitrogen) suivant le protocole du fournisseur. Ensuite, grâce à la réaction LR, la séquence

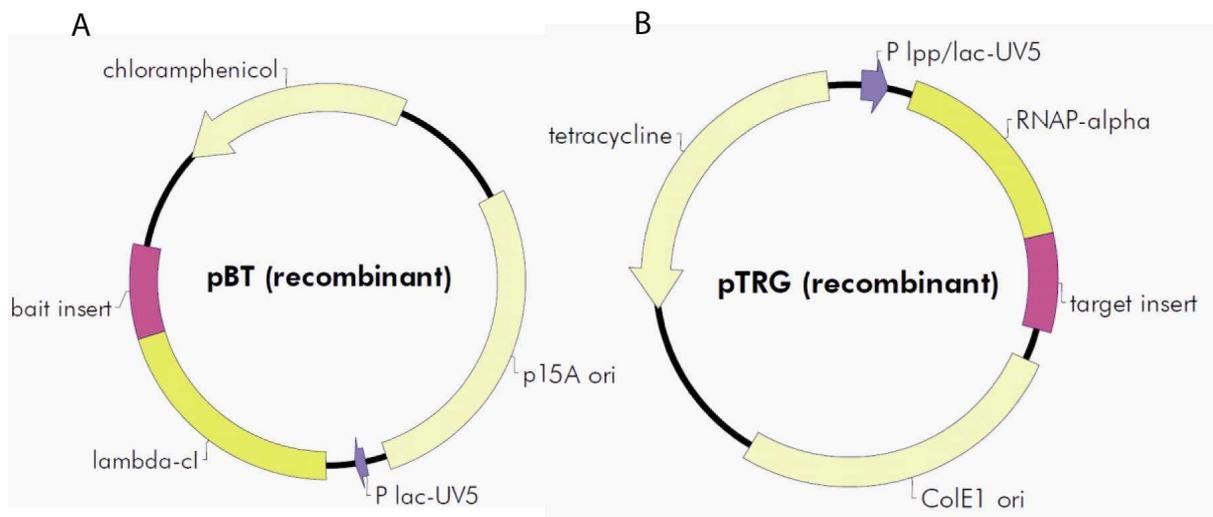


Figure M4 : Cartes des plasmides utilisés lors des manipulations de double hybride. (A) plasmide pBT utilisé pour accueillir la séquence « hameçon » *MtSNF4b*. (B) plasmide pTRG utilisé pour accueillir la séquence de *MtSNF α 1* et la banque d'ADNc.

MtSNF4b est insérée dans le vecteur de destination pYES-DEST52 via une recombinaison entre les sites AttL1 et AttL2 avec les sites AttR1 et AttR2 (Fig. M3). L'insertion a été confirmée par séquençage de *MtSNF4b* à partir des amorces TOPOMtSNF4b (Tab. M2)

M8.2 Construction d'une banque d'ADNc et clonage des ADNc de *MtSNF α 1* et *MtSNF4b*

L'ADNc de *MtSNF4b* a été amplifié à partir d'ARN de graines sèches. Après une étape de transcription inverse (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Quiagen), l'ARN reverse transcrit est cloné dans le vecteur pBT fusionné à une protéine reconnaissant le site λ -Ic en utilisant des amorces spécifiques contenant des sites de restriction EcoRI et BamHI (Fig. M4). La protéine cible, *MtSNF α 1* (TC116507), a été clonée à partir d'ARN de graines sèches dans le vecteur pTRG fusionné à une ARN polymérase α en utilisant des amorces spécifiques contenant des sites de restriction NotI et EcoRI (Fig. M4).

M9. Complémentation des mutants $\Delta snf4$ par *MtSNF4b*

M9.1 Préparation des cellules compétentes de *Saccharomyces cerevisiae*

Avant la transformation, les cellules souches de mutants $\Delta snf4$ (MCY2634) (obtenues de M. Carlson, Columbia university, Jiang et Carlson, 1997) sont rendues compétentes. Une colonie de la souche à rendre compétente estensemencée dans un milieu complet YPD (10 g Yeast Extract (Sigma), 20 g peptone (Difco), 20g Glucose (Sigma), qsp 1000 ml) à 30°C sous une agitation de 200rpm jusqu'à atteindre une $DO_{600} > 1$ (10^7 cellules par ml de YPD). La DO_{600} est ramenée à 0,2 dans 10ml de YPD et incubée pendant 4-5 heures à 30°C à 200 rpm jusqu'à un $DO=1$. Les levures sont centrifugées pendant 5 min à température ambiante, puis reprises dans 10 mL du 1X LiAc/0.5X TE (Acetate de lithium 100 mM pH 7,5 ; Tris-HCl 5 mM pH 7.5 ; EDTA 0,5 mM). Après une deuxième étape de centrifugation, les cellules sont reprises en suspension dans 15 μ L de LiAc 1X / TE 0,5X.

M9.2 Transformation et tests de complémentation de *Δsnf4*

Pour l'analyse de complémentation fonctionnelle, des souches de *S. cerevisiae* de type sauvage SNF4 (MCY2649) et de type *Δsnf4* (MCY2634) ont été utilisées (Tab. M1). La souche mutante *Δsnf4*, incapable de croître sur les sources non fermentescibles de carbone, est transformée avec les différents plasmides dérivant du pYES-DEST52 (Fig. M4). Le plasmide pYES-DEST52-*MtSNF4b* (pDEST52-*MtSNF4b*) (1μg) et le plasmide vide pYES-DEST52 (1μg) sont incubés avec 50μg d'ADN de sperme de saumon dénaturé et 50 μL des cellules compétentes dans 300μL de 1X LiAc/40%PEG-3350/1X TE (Acétate de lithium 100 mM pH 7,5 ; Tris-HCl 10 mM pH 7.5 ; EDTA 1 mM ; 40% PEG-3350), préparée extemporanément à 28°C sous agitation lente. Un choc thermique est effectué pendant 20 minutes à 42°C. Les levures sont ensuite centrifugées pendant 2 min à 5000g et reprises dans le milieu minimum YNB+GLU2% (YNB = 1,7 g/L Yeast Nitrogen Base (Difco), 5g/L Ammonium sulfate (Fluka), 0,1 g/L leucine (Sigma), 0,05 g/L histidine (Sigma), qsp un litre, 20 g/L glucose (Sigma)) pour être ensuite incubées à 30°C pendant 3 à 4 jours. Les levures *Δsnf4* montrant une auxotrophie pour l'uracile, seules les levures transformées par pYES-DEST52 peuvent se développer sur ce milieu. Une PCR réalisée avec des amorces internes de *MtSNF4b* permet de sélectionner une souche contenant pYES-DEST52 *MtSNF4b*. Les colonies positives sélectionnées par PCR ont été étalées sur un milieu YNB+GAL2% (YNB, 20g/L agar (Sigma), 20 g/L galactose (Sigma)). Les colonies se développant sur ce milieu sont sélectionnées pour la suite de la manipulation. La complémentation est testée par la restauration de la croissance d'une souche *Δsnf4* transformée par pDEST52-*MtSNF4b* sur le milieu YNB+URA+GAL2%. Les souches de type sauvage, de *Δsnf4*, de *Δsnf4*+pDEST52, de *Δsnf4*+pDEST52-*MtSNF4b*, sont remises en croissance dans un milieu YNB+GLU2% (YNB, 20g/L agar (Sigma), 20 g/L glucose (Sigma)) et dans un milieu YNB+URA+GLU2% (YNB, 0,1g uracile (Sigma), 20g/L agar (Sigma), 20 g/L glucose (Sigma)). Les cultures sont amenées à saturation et centrifugées avant d'être reprises dans un milieu YNB+GAL2%. Les différents inoculi sont étalés à l'ose sur des milieux solides YNB+URA+GAL2% et YNB+URA+GLU2% et incubés à 28°C pendant cinq jours.

M10. Double hybride bactérien

Deux souches d'*E. coli* ont été utilisées pour l'analyse double hybride (Tab. M1). La souche XL1-Blue MRF' Kan est utilisée pour la production de vecteurs et la souche de cellules reportrices compétentes (Stratagene), incluant un gène HIS3 et addA sous contrôle d'un promoteur reconnu par λ c, est utilisée pour le criblage (Tab. M1). Les milieux non sélectifs, sélectifs simples et sélectifs doubles sont préparés sous la hotte. La solution non sélective est réalisée à partir de 67,5mL de milieu additif M9 (10 ml de glucose 20% + 5 mL de adénine HCl 20 mM + 50 mL de His dropout amino acid 10 \times (BD, Clontech) 0,5 mL de 1 M MgSO₄, de 1 M Thiamine HCl, de 10 mM ZnSO₄ de 100 mM CaCl₂, et de 50 mM IPTG), de 50mL de sels M9 (Na₂HPO₄: 67.8g, KH₂PO₄: 30g, NaCl: 5g, NH₄Cl: 10g) et de 0,25mL de chloramphénicol et de tétracycline (respectivement à 25 et 12,5 mg/mL). Les solutions sélectives simples ou sélectives doubles sont complétées avec 5 mM de 3-AT ou 5 mM de 3-AT et 0,5 mg/mL de streptomycine. Pour les milieux solides, 7,5 g/L d'agar sont ajoutés à la solution de départ. Les cellules compétentes ont été transformées avec pBT-*MtSNF4b* et pTRG-*MtSNF α 1*, selon le protocole du fournisseur (Bacteriomatch two hybrid II system, <http://www.stratagene.com/manuals/200412.pdf>), puis étalées sur un milieu sélectif double contenant du 3-AT et de la streptomycine et un milieu non sélectif. Une colonie s'étant développée sur milieu sélectif est sélectionnée et mise en culture en même temps que des cellules reportrices de contrôle positif transformées avec pBT-*LGF2*/pTRG-*Gal11* et négatif transformées avec pBT/pTRG-*MtSNF α 1* ou avec pBT-*MtSNF4b*/pTRG-*Gal11* dans un milieu liquide inducteur contenant du chloramphénicol et de la tétracycline et 10 μ M d'IPTG. Après une nuit d'incubation à 37°C sous agitation à 250rpm, les cultures saturées sont diluées en cascades (1/10 ; 1/100 ; 1/1000) et des gouttes de 20 μ l de chaque culture sont déposées sur un milieu sélectif double et un milieu non sélectif. Les cultures sont alors incubées deux à trois jours à 37°C sur les différents milieux.

Pour la construction de la banque ADNc, les ARN sont extraits à partir de 50 radicules sèches de graines matures de *M. truncatula* avec le protocole phénol:chloroforme:isoamylalcool 25:24:1 de Verwoerd (1989). La banque d'ADNc a été construite selon le protocole du fournisseur et sa taille a été évaluée à 5x10⁶ UFC par nos collègues de l'équipe MORE grâce à une transformation témoin. Le criblage

de la banque d'ADNc est réalisé selon le protocole du fournisseur (Bacteriomatch two hybrid II system, <http://www.stratagene.com/manuals/200412.pdf>). Le produit de co-transformation entre la banque d'ADNc et pBT-*MtSNF4b* est étalé sur un milieu sélectif simple contenant du 3-AT : des colonies s'y développent en trois jours à 37°C. Or le protocole du fournisseur indique que ce développement intervient normalement après 24 à 36 heures. Nous avons décidé de ne sélectionner que les colonies se développant en moins de quatre jours. Les colonies sélectionnées sont repiquées sur un milieu sélectif double contenant du 3-AT et de la streptomycine. Environ 60% des colonies repiquées se développent sur ce milieu. Elles sont repiquées dans un milieu liquide non sélectif et des PCR sont réalisées sur ces colonies avec des amorces internes au vecteur pTRG flanquant l'ADNc inséré (Tab. M2). Le produit amplifié est ensuite séquencé et la séquence obtenue est alignée par un blastn dans la base de données de la fondation Samuel Nobel (<http://bioinfo.noble.org/gene-atlas/v2/>). Trois criblages indépendants ont été réalisés, représentant environ 2×10^4 UFC chacun, soit 2,4% de la banque d'ADNc.

M11. Dosage des sucres

Les graines de *M. truncatula* sont imbibées à 20°C dans l'obscurité et trois quinzaine d'embryons sont prélevées à 0, 6, 24, 48 heures d'imbibition pour chaque génotype (type sauvage, le témoin RNAi et trois lignées RNAi *MtSNF4b*). Les graines proviennent toutes d'une même récolte ayant été imbibée après deux à trois semaines ou six mois de PMS. Les embryons prélevés (15 à 20 mg) sont lyophilisés, pesés et broyés dans 1ml de MeOH80% (v/v) et 40µL de mélézitose 4g/L est ajouté comme standard interne pour la quantification. Les échantillons sont ensuite incubés 15 minutes à 76°C, puis séchés au speed-vac (40°C, 2h ½), les culots sont repris dans 1ml d'eau ultrapure avant l'analyse par HPLC d'une dilution au ¼ de l'échantillon. Les sucres sont analysés par un système DIONEX BioLC (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA) équipé d'une précolonne AS11 ion exchanger et d'une colonne Dionex CarboPac PA1 (2 x 250 mm) et d'un solvant compatible avec la cellule de détection électrochimique (électrode de travail en or et électrode de référence Ag/AgCl) en utilisant de l'eau ultrapure comme solution E1 et du NaOH à 0,1M comme solution E2. Les sucres sont séparés avec 100 mM NaOH à 0.25 mL/min pendant 45 minutes, suivi par une étape de rinçage

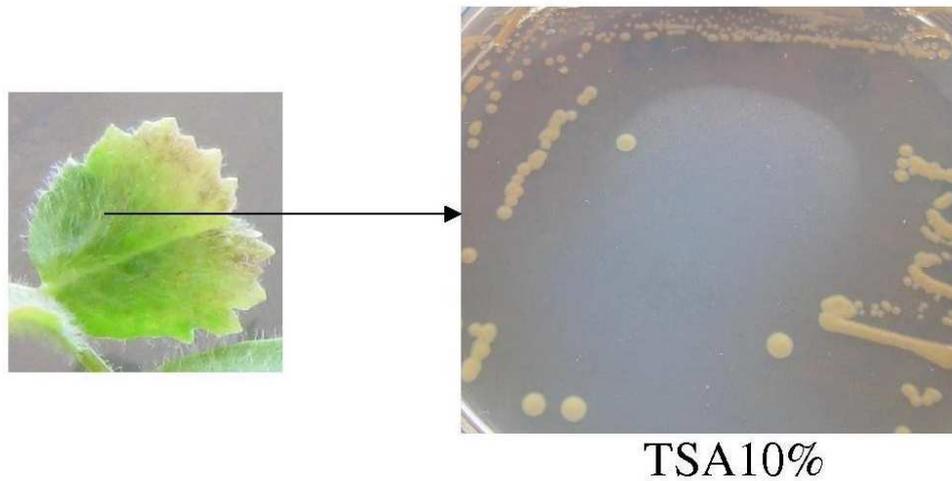


Figure M5 : Isolement de la souche de *Xanthomonas* de type *fuscans* à partir de symptômes foliaires. Les symptômes évolutifs sont prélevés et macérés dans de l'eau. Le liquide de macération est ensuite étalé sur un milieu TSA 10% et mis à incuber à 25°C pendant trois jours.

(150 mM NaAc, 850 mM NaOH) de 5 minutes avant de ré-équilibrer la colonne avec 100 mM de NaOH. Les temps de rétention de chaque sucre sont évalués par un standard qui permet également la quantification absolue des oses. Le nombre de molécules par mg de matière sèche est calculé à partir de la masse molaire de chaque sucre.

M12. Méthode d'inoculation et d'incubation des plantules et des semences

Les manipulations de pathologie ont été réalisées sur sept souches de *Xanthomonas* réparties dans différentes classes phylogénétiques (Tab. M1). Les milieux de culture utilisés lors des manipulations de pathologie sont un milieu TSA 10% (1.7 g/l tryptone, 0.3 g/l soybean peptone, 0,25 g/l glucose, 0,5 g/l NaCl, 0,5 g/l K₂HPO₄, 15 g/l d'agar 50 mg/l cycloheximide et 10 mg/l propiconazole) et un milieu TSA 10% sélectif contenant de la rifamycine (50mg/ml). Les plantules de *M. truncatula* (cv. R108), âgées de 20 jours, sont inoculées sous vide deux minutes à moins de 0,02 MPa par immersion des parties aériennes dans les inoculi de sept souches de *Xanthomonas* à 10⁻⁸ bactéries par ml d'H₂O (+ trois gouttes de Teepol pour 50ml d'H₂O) (Tab. M1). La concentration a été évaluée par une mesure au turbidimètre et contrôlée par un comptage des unités formant colonies (UFC)/ml sur un milieu TSA 10%. Un contrôle négatif consiste en une infiltration dans de l'eau afin d'évaluer les symptômes liés à la méthode d'inoculation. Les plantules sont ensuite incubées 15 jours à 25°C et 95% d'humidité relative et les symptômes sont notés sur quatre plantules par pathovar suivant une classification à trois entrées : compatible, incompatible et sans symptôme. Un ré-isolément à partir des symptômes provoqués par *X. axonopodis* pv *phaleoli* CFBP 4834 (fuscans) a été effectué pour boucler le cycle de Koch pour cette situation. Les feuilles montrant des symptômes évolutifs ont été dilacérées dans de l'eau distillée stérile et le liquide obtenu a été étalé sur un milieu TSA10% et incubé trois jours à 25°C. Les colonies de type fuscans sont aisément identifiables grâce à la production d'un pigment mélanique diffusible en milieu gélosé (Fig. M5).

Les graines imbibées pendant six heures à 20°C ou 25°C sont inoculées sous vide deux minutes à moins de 0,02 MPa dans un inoculum de *Xanthomonas spp.* à 10^{-7} MPa. Les graines sont alors incubées à 20°C ou 25°C et prélevées à raison de trois fois cinq graines par prélèvement, puis mises à macérer pendant deux minutes dans deux millilitres d'eau. La solution de macération est ensuite diluée en cascades et étalée sur un milieu sélectif (TSA10%+RIF) et un milieu non sélectif (TSA10%) au moyen d'un distributeur en spirale (Spiral). Le milieu non sélectif permet le comptage de la flore totale, *i.e.* inoculée et endogène, alors que le milieu sélectif permet le comptage de la flore inoculée seule du fait de la résistance à la rifamycine des souches sélectionnées pour l'inoculation sur graines. Le comptage du nombre d'ufc est réalisé après trois jours d'incubation à 25°C et le résultat du comptage est donné en nombre d'unités formant colonies (ufc) par millilitre de solution de macération.

M13. Bioinformatique

La classification des transcrits révélés par l'analyse micorarray a été réalisée à partir de la classification de The Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) (Mewes et al., 1999) et les gènes annotés automatiquement ont été vérifiés individuellement. Le programme multalin du génopôle de Toulouse a été utilisé afin de réaliser les alignements protéiques et nucléotidiques dans sa configuration par défaut (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/>) (Corpet et al., 1988). Les recherches de séquences ont été réalisées par des blastn ou des blastp à partir de la base de données The Gene Index Project (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=medicago>) dont un nombre significatif d'EST provient de The Samuel Roberts Noble Foundation et de The Institute for Genomic Research. Les diagramme de Venn ont été réalisés grâce à une application pour la comparaison de listes de gènes GeneVenn (Pirooznia et al., 2007). La carte représentant les gènes liés aux stress biotiques du chapitre III a été réalisée à l'aide du logiciel de représentation graphique de listes de gènes de grandes tailles MAPMAN (Thimm et al., 2004).

Annexe 1 :

Bolingue, W., Rosnoblet, C., Ly Vu, B., Leprince, O., Aubry, C., Buitink, J. (2009) MtSNF4b connects after-ripening and constitutive biotic defense responses in seeds of *Medicago truncatula*, *The Plant Journal*, in press.

MtSNF4b connects after-ripening and constitutive biotic defense responses in seeds of *Medicago truncatula*

William Bolingue, Claire Rosnoblet*, Benoit Ly Vu, Olivier Leprince, Catherine Aubry, Julia Buitink

Institut National de la Recherche Agronomique, Agrocampus Ouest, Université d'Angers, Unité Mixte de Recherche 1191 Physiologie Moléculaire des Semences, 16 boulevard Lavoisier, 49045 Angers, France

Corresponding author: J. Buitink, UMR PMS, 16 bd Lavoisier, 49045 Angers, France. Tel +33 241 22 55 44, fax: +33 241 22 55 49, julia.buitink@angers.inra.fr

william.bolingue@angers.inra.fr; claire.rosnoblet@iri.univ-lille1.fr;
benoit.lyvu@agrocampus-ouest.fr; olivier.leprince@agrocampus-ouest.fr;
c.aubry@univ-angers.fr; julia.buitink@angers.inra.fr

Running title: *MtSNF4b* enhances the biotic stress response in dormant seeds

* present address: Interdisciplinary Research Institute (IRI) - CNRS USR 3078 - 59658 Villeneuve d'Ascq, France

Key words: SNF4b, seeds, *Medicago truncatula*, dormancy, biotic stress

Word count: total 6671, Intro, 676; results, 2292; discussion, 1271, exp proc, 1046, references, 1486

Summary

Dormant seeds are capable of remaining alive in the hydrated state for extended periods of time without losing vigor, until environmental cues or after-ripening (AR) result in the release of dormancy. Here, we investigated the possible role of the regulatory subunit of the sucrose nonfermenting-related kinase complex, *MtSNF4b*, in germination and dormancy of *Medicago truncatula* seeds. We show that *MtSNF4b* expression and its involvement in a high Mw complex remains in dormant seeds, whereas imbibition of fully after-ripened, non-dormant seeds leads to dissociation of the complex. Transcriptome analyses on freshly harvested and after-ripened imbibed mutant and wild type embryos suggested that *MtSNF4b* plays a role in the regulation of a biotic stress response in hydrated dormant embryonic tissues, affecting the expression of genes encoding enzymes of flavonoid and phenylpropanoid metabolism, *WRKY* transcription factors and pathogenesis-related (PR) proteins. The silencing-induced reduction in *PR-10* transcripts was confirmed on the translational level. Silencing *MtSNF4b* also increased the speed of AR during dry storage, an effect that appears to be related to a change in base water potential $\psi\beta(g)$. No significant difference in ABA content or sensitivity was detected in mutant versus wild-type seeds during imbibition, suggesting an ABA-independent regulation by *MtSNF4b* on AR. Overall, the results suggest that SNF4b participates in the regulation of a constitutively activated biotic defense response in hydrated, dormant seeds.

Introduction

The end of seed development is characterized by the termination of seed filling, decrease in seed water content and progressive arrest of metabolism. During this final phase, seeds like those of *Medicago truncatula* acquire the capacity to resist the dry state for long periods of time, also referred to as longevity, and enter in a dormant state. Dormancy is a genetically and environmentally determined developmental state that is imposed during imbibition of freshly harvested seeds, during which metabolism is active, but growth processes are repressed (Finch-Savage *et al.*, 2006; Bewley *et al.*, 1994). Dormancy is gradually lost during the time-dependent process of after-ripening (AR) that occurs in the dry seed. In the dormant state, seeds are capable of remaining hydrated for extended periods of time without losing vigor (Finch-Savage *et al.*, 2006; Bewley *et al.*, 1994; Baskin *et al.*, 1998). In addition, fluctuations of the environmental conditions will cause the seeds to undergo hydration and dehydration cycles in the soil, and they can do so without losing their ability to germinate. Apparently, dormant seeds have developed an array of protective mechanisms to remain alive until environmental cues are provided to release dormancy and lead to germination and seedling establishment.

The sucrose non-fermenting related kinase (SnRK1) is known for its central role in energy metabolism, linking stress, sugar and developmental signals to regulate plant metabolism, energy balance, growth and stress response (Baena-Gonzalez *et al.*, 2008; Ananieva, *et al.*, 2008; Schwachtje *et al.*, 2006). The complex has also been shown to play a role during seed maturation, affecting storage accumulation and leading to occasional precocious germination (Radchuk *et al.*, 2006; Rosnoblet *et al.*, 2007). The SnRK1 complex is composed of an α auto-inhibitory catalytic subunit that is activated upon interaction with two other non-catalytic subunits, a β -subunit (SnRK β), suggested to play an essential role in the subcellular localization and specificity of recognition between the kinase complex and its targets, and a γ -subunit (SNF4/SnRK γ), thought to regulate the activity of the complex (Kleinow *et al.*, 2000; Halford *et al.*, 2000). Several regulatory β and γ subunits exist in plants that are differentially regulated at the transcriptional level according to stress and developmental stage (Bouly *et al.*, 1999; Buitink *et al.*, 2004). In seeds, several SnRK β and SnRK γ subunits are co-expressed, suggesting co-existence of several SnRK1 complexes formed by different regulatory subunits (Buitink *et al.*, 2004). This might explain the strong pleiotropic effects observed when the catalytic subunit is down-regulated (Baena-Gonzalez *et al.*, 2008; Radchuk *et al.*, 2006).

The expression of one subgroup of the SnRK γ subunits, Pv42/LeSNF4/MtSNF4b, is correlated with the final stage of maturation, when longevity and dormancy is acquired (Buitink *et al.*, 2004; Bradford *et al.*, 2003). *MtSNF4b* is expressed in parallel to the induction of desiccation tolerance and silencing affects oligosaccharide metabolism and longevity during maturation (Rosnoblet *et al.*, 2007; Bradford *et al.*, 2003). *LeSNF4* transcripts are ABA inducible in tomato seeds and their accumulation is linked to the inability of seeds to germinate, remaining high when radicle protrusion is blocked by ABA, water stress, far-red light or dormancy (Bradford *et al.*, 2003). LeSNF4 was shown to functionally complement a *snf4*-deficient yeast mutant, indicating that it represents a true regulatory subunit of the SnRK1 complex (Bradford *et al.*, 2003).

In this study, we investigated the possible role of MtSNF4b in seed germination and dormancy of *M. truncatula* seeds. We show that MtSNF4b expression and complex formation is related to the AR status of the imbibed seeds. A transcriptomic analysis on imbibed mutant and wild type embryos demonstrated that *MtSNF4b* silencing reduces gene expression related to biotic stress and secondary metabolism in dormant embryonic tissues. These genes represent a small subset (12%) of the differentially expressed genes between dormant and non-dormant wild-type tissues. In addition, a large number of other genes related to defense were repressed in the mutant seeds prior to AR. In addition, physiological analysis showed that silencing *MtSNF4b* increased the speed of AR independently from ABA. The results suggest that SNF4b plays a role in constitutive defense responses during hydration of dormant *M. truncatula* seeds.

Results

SNF4b expression and complex formation is related to dormancy

In order to investigate the role of *MtSNF4b* in dormancy in *M. truncatula* seeds, we first characterized its dormancy behavior. Seeds of *M. truncatula* do not germinate readily under optimal conditions when imbibed 4d after harvest; they exhibit non-deep dormancy comparable to that of *Nicotiana plumbaginifolia* (Faria *et al.*, 2005, Grappin *et al.*, 2000) (Fig. 1a). Subsequent storage of freshly harvested seeds under controlled, dry conditions led to the gradual release of dormancy, referred to as AR, and concomitant increase in germination speed (Fig. 1a). Seeds that are imbibed after two weeks of AR take 10-14 days to germinate at 20°C in the dark, whereas breaking of dormancy either by 1 year of AR or an incipient cold imbibition (48h at 4°C) results in a seed population that germinates within 24h under similar imbibition conditions. Incubation in fluridone to block ABA and carotenoid synthesis released dormancy and increased germination speed comparable to those of fully after-ripened seeds (Fig. 1a).

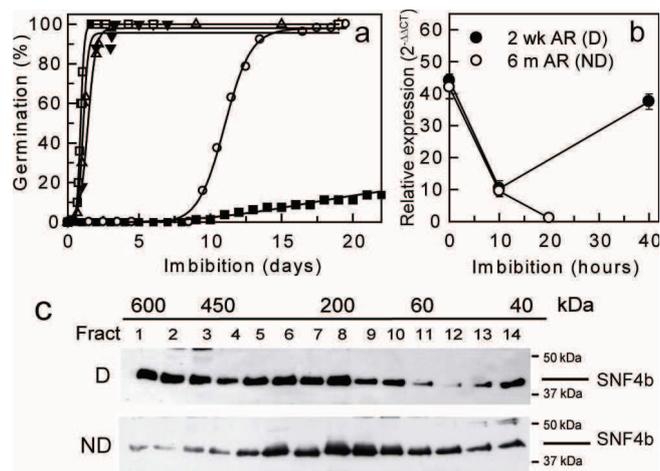


Fig. 1. SNF4b expression and complex formation in relation to dormancy and germination. (a) Germination curves of *M. truncatula* seeds at 4d of after-ripening (AR) (solid squares), at 2-3 weeks of AR (open circles), imbibed first for 48h at 4°C (open triangles), imbibed in 100 μM fluridone (open triangles) and seeds imbibed at 6 months AR (closed triangles). Seeds at different times of AR were imbibed at 20°C in the dark and germination was scored when radicles protruded the seed envelope. Data are significantly different when they differ by 18% or more (χ^2 -test, $P < 0.05$). (b) Relative transcript level (\pm SE) of *MtSNF4b* in seeds during imbibition at 20°C after 2-3 weeks (dormant, D) or 6 months (non-dormant, ND) of AR. (c) Western blot analysis of MtSNF4b in seeds of *M. truncatula* after 1-2 weeks of AR and 48h of imbibition at 20°C (D) or 4°C (ND) after separation of the protein extracts by their Mw using gel filtration chromatography according to Rosnoblet *et al.* (2007).

To investigate whether *MtSNF4b* gene expression was regulated in relation to dormancy, as found for *LeSNF4*, its expression was analyzed by RT-qPCR. *MtSNF4b* transcripts in embryos initially decreased during imbibition, but were re-induced upon further imbibition of freshly harvested, dormant seeds (Fig. 1b). In contrast, transcripts disappeared upon further imbibition and prior to germination in non-dormant seeds, obtained after 6 months of AR.

Previous studies using yeast and plant native extracts demonstrated, using chromatography techniques, that the catalytic subunits together with their regulatory counterparts were present in high-molecular-weight (Mw) fractions, and that this assembly corresponded to the activity of the SNF1 complex (Sugden *et al.*, 1999; Estruch *et al.*, 1992). We previously demonstrated that MtSNF4b moves into a high molecular weight (Mw) complex during the final stages of maturation (Rosnoblet *et al.*, 2007). To investigate the link between SNF4b complex formation and dormancy, soluble proteins were extracted from hydrated dormant seeds after imbibition for 48h at 20°C, or from hydrated seeds in which dormancy was released by imbibition at 4°C. Under either imbibition condition, no seeds had germinated after 48h, but cold-treated seeds germinated within 12h compared to 12-14d for the seeds that were imbibed directly at 20°C. Freshly extracted native proteins were separated by gel filtration after which the presence of the SNF4b protein in the different fractions was analyzed by western blot (Fig. 1c). SNF4b was not only visible in those fractions corresponding to its own Mw (around 42 kDa), but a high-Mw complex of 400-600 kDa containing SNF4b (fractions 1-4) was detected in dormant seeds. In contrast, imbibition of seeds in which dormancy was released resulted in a partial dissociation of the complex, evidenced by the almost complete absence of SNF4b in these same fractions. Further imbibition of non-dormant seeds was previously found to lead to complete disappearance of SNF4b in the fractions > 200 kDa (Rosnoblet *et al.*, 2007). This suggests that during hydration of dormant seeds, the SNF4b-associated complex remains intact.

Transcriptome profiling points to a role of MtSNF4b in gene regulation as a function of after-ripening time

To detect genes that are potentially regulated by *MtSNF4b*, we made use of the previously produced lines in which *MtSNF4b* was silenced by RNAi (Rosnoblet *et al.*, 2007), together with a set of controls to verify effects of transformation and RNAi mediated effects. Silencing *MtSNF4b* reduced protein levels of SNF4b to almost undetectable levels compared to wild type seeds (Rosnoblet *et al.*, 2007) (Fig. S1). A transcriptome analysis was performed on 6h-imbibed embryos of wild type and RNAi *MtSNF4b* lines at 2-3 weeks of AR, referred to as the fresh (F) dataset. Since the SNF4b complex remained present only in freshly harvested imbibed seeds, we also compared wild type versus RNAi *MtSNF4b* seeds at 6 months of AR, in which the complex dissociated upon imbibition (referred to as stored, S-dataset). A third analysis was added to identify the genes that are differentially expressed in dormant (freshly harvested) versus non-dormant (after AR), since this dataset is not yet available for *M. truncatula* seeds. For this purpose, a comparison was made between wild type seeds after 2-3 weeks of AR versus 6 months of AR, using the RNA of the F and S-datasets (dormancy, D-dataset). Sets of genes that showed enhanced or decreased expression in

each of the three datasets were identified and their overlap is presented in a Venn diagram (Fig. 2, Dataset S1).

A total of 217 genes are present in the F-dataset compared to only 37 genes in the S-dataset, confirming a dormancy-related link as found for *MtSNF4b* expression and complex formation (Fig. 2). Comparison between the F and S-datasets showed that irrespective of time of AR, only 7 genes were differentially up-regulated in both datasets, such as 12-oxophytodione (OPDA) reductase, a *Myb* TF and 2 genes encoding plant lipid transfer proteins (*MtN5*). Interestingly, when a threshold P-value of 0.05 instead of 0.01 was used, an additional 2 genes encoding 12-OPDA reductase as well as glutathione-S-transferase were detected.

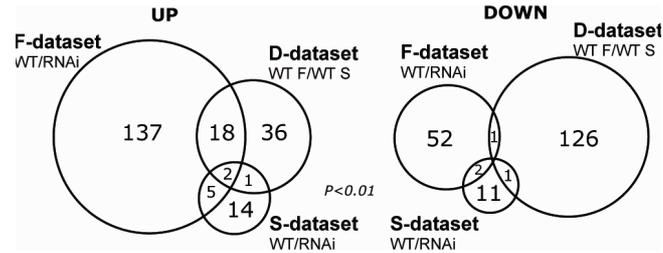


Fig. 2. Venn diagram comparing overlapping genes that are up-regulated or down-regulated in wild-type / RNAi *MtSNF4b* embryos at 2-3 weeks of AR (F-dataset), at 6 months of AR (S-dataset) or in wild type embryos at 2-3 week of AR / 6 months of AR (D-dataset). AR, after-ripening; F, fresh; S, stored; D, dormancy. $P < 0.01$.

Twenty-one genes were overlapping between the D-dataset and F-dataset. Twenty of them were up-regulated in wild type seeds at 2-3 weeks of AR, encoding several pathogenesis-related proteins (ABR17/18) that are developmentally regulated during seed development (Iturriaga *et al.*, 1994), as well as genes encoding chalcone synthase and chalcone reductase, peroxidases or caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase (Dataset S1). Only one gene overlapped between the down-regulated F- and D-datasets, encoding a small heat-shock protein. An additional 175 genes were found in the D-dataset that were not detected in the F-dataset, such as legumins and caleosins amongst the up-regulated genes and 126 down-regulated genes, such as ribosomal RNAs or several phosphatase 2C proteins that function as a negative regulator in ABA signaling (Yoshida *et al.*, 2006) (Fig. 2, Dataset S1). Apparently, silencing *MtSNF4b* changes the expression of a subset of genes that are regulated in relation to AR.

MtSNF4b silencing reduces gene expression related to secondary metabolism and biotic stress

From the comparison between the different datasets, it is evident that the largest set of genes that are regulated differentially between mutant and wild type are up-regulated genes of the F-dataset (Fig. 2). Apparently, silencing *MtSNF4* results in a decrease in the expression of these genes when seeds are not yet fully after-ripened. The main classes characterizing the 162 up-regulated genes in the F-dataset are related to secondary metabolism, biotic stress, cell wall, transcription factors and transport (Tab. 1). A large number of genes are implicated in secondary metabolism, encoding enzymes related to flavonoid and phenylpropanoid biosynthesis. A closer look among them revealed that 27 genes encode different isoforms of 11 out of 13 enzymes involved in medicarpin biosynthesis (Dataset S2 and Fig. S3). The class of transcription factors contains genes that are also known to be involved in biotic stress, including five *WRKY*

Table 1. Classification of up-regulated or down-regulated in wild-type / RNAi *MtSNF4b* embryos at 2-3 weeks of AR (F-dataset). $P < 0.01$, fold-difference > 1.5 .

Classification	WT/RNAi (fold change)	
	>1.5 ($P < 0.01$)	<-1.5 ($P < 0.01$)
Metabolism	48	4
Secondary metabolism	35	2
Amino acid metabolism	3	1
Lipid, fatty acid and isoprenoid	4	0
Hormone metabolism	4	0
Carbohydrate metabolism	1	1
Cell rescue	22	17
Disease, virulence and defense	19	0
Detoxification	2	4
Stress response	1	13
Cell wall	13	2
RNA regulation of transcription	9	1
Cellular transport	10	1
Energy	1	0
Protein synthesis	1	0
Protein fate	5	0
Development	2	0
Signal transduction	1	1
Unclassified proteins	51	29

transcription factors and 2 ethylene responsive TFs. In addition, four genes related to protein fate encode RING-H2 finger proteins were detected that belong to the ATL subfamily, suggested to be involved in the early steps of the plant defense signaling pathway (Serrano *et al.*, 2004). These results were confirmed for several genes by RT-qPCR (Fig 3, Fig S2). In wild type seeds, transcript levels of two genes found in the F-dataset, chalcone reductase (*CHR*) and a pathogenesis-related protein (*PR10*), increased

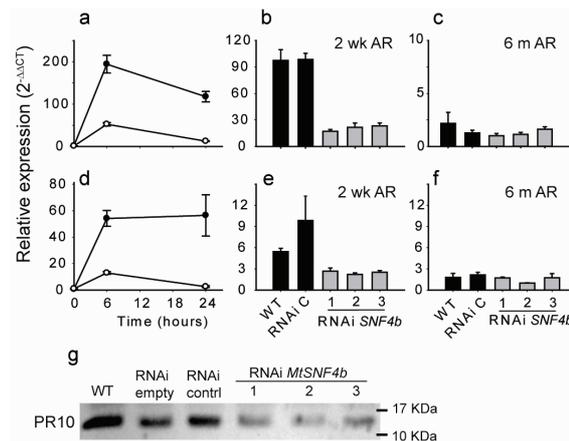


Fig. 3. Characterization of expression of chalcone reductase (TC100400) and pathogenesis-related protein (TC109466) in relation to time of AR. (a, d) Relative expression of CHR (a) and PR10 (d) during imbibition of wild type seeds after 2 weeks of AR (closed symbols) or 6 months (open symbols). (b, c, e, f) Relative expression of CHR (b, c) or PR10 (e, f) in 6h-imbibed embryos of control and RNAi *MtSNF4b* lines at 2 weeks (b, e) or 6 months (c, f) of AR. Data are the means of three replicates \pm SE (g) Western blot analysis of 6h-imbibed embryos of control and RNAi *MtSNF4b* lines using the PsRH2 antibody that recognizes MtPR10-1 (Ramos *et al.*, 2003). WT, wild type; RNAi empty, seeds transformed with the empty plasmid used for the silencing; RNAi contrl, the same plasmid containing an RNAi construction targeted against the proximal region (1.2 kb) of the *MtENOD40-1* promoter.

sharply during imbibition after only 2 weeks of AR, whereas transcript levels remain low when seeds were imbibed after complete AR (Fig. 3a, 3d). In addition, the RT-qPCR analysis confirmed both for *CHR* (Fig. 3a-c) and *PR10* (Fig. 3d-f) the reduced expression in 2 week AR mutant seeds compared to wild type seeds as found by the microarray analysis, using 3 independent RNAi lines together with wild type seeds and seeds transformed with a vector containing RNAi construction targeted against the proximal region of the MtENOD40-1 promoter to serve as control for RNAi-induced silencing. Comparable observations were made on a number of other genes involved in secondary metabolism (*IFR*, *IFS*, *PAL*) on two different harvests before and after AR (Fig. S2). It was verified that the differences in *PR10* gene expression were also detected at the protein level using a PR10 family specific antibody (Ramos *et al.*, 2003) (Fig. 3G). For three independent biological replicates, western blots confirmed that PR10 protein level was higher in control seeds than in mutant seeds.

Classification of the 55 down-regulated genes in the F-dataset reveals that 26 genes are related to abiotic stress, encoding 8 heat shock proteins, 5 LEA proteins and 4 detoxification enzymes (Tab. 1 and Dataset S2). Possible, the absence of SNF4b provokes a stress response, also evident from the up-regulation of a heat shock transcription factor in the mutant seeds. Overall, these data suggest a role of *MtSNF4b* in the activation of constitutive defense responses to biotic stress when seeds are in a dormant state.

Silencing MtSNF4b affects the speed of AR of freshly harvested seeds

Previously, we demonstrated that the germination speed of fully after-ripened seeds (after 6 months of dry storage at 20°C) was comparable for seeds of wild type compared to RNAi *MtSNF4b* seeds (Rosnoblet *et al.*, 2007). However, we observed for harvested seed batches that were after-ripened for only 2-4 weeks that RNAi *MtSNF4b* seeds germinated faster than wild type seeds. To further investigate this phenotype, we tested the effect of *MtSNF4b* silencing on germination speed in relation to AR, seeds of different lines that were grown under similar conditions were imbibed in the dark at 20°C for different times (Fig 4a-d). For wild type seeds, freshly harvested seeds germinated only partially (>20%) over three weeks of imbibition, whereas seed lots that were after-ripened for 2-3 weeks germinated within 8-16 days. Compared to wild type seeds, RNAi *MtSNF4b* seeds germinated approximately two-fold faster after 2-3 weeks of AR but were equally dormant when imbibed straight after harvest. This difference in germination speed after 2-3 weeks of AR was observed for several independent harvests in a reproducible manner (data not shown). AR of 3 months and 1 year led to a comparable germination speed between mutant and control lines (Fig. 4c-d). Progress towards completion of germination is a function of the mean base water potential ($\psi_b(g)$) during imbibition (Finch-Savage *et al.*, 2006, Bradford *et al.*, 2007). To see how suboptimal water conditions influenced germination time during the course of AR, wild type and mutant seeds at different times of AR were imbibed at -0.27 MPa using a polyethylene glycol (PEG) solution (Fig 4e-g). Imbibing seeds after 2-3 weeks of AR under these conditions exacerbated the differences in germination behavior between wild type and mutant seed batches (Fig. 4e). This difference was still observed but to a lesser extent after 3 m of AR and had completely disappeared in seeds stored after 1 year of AR (Fig. 4f-g). These data suggest that silencing *MtSNF4b* is to be related to a change in $\psi_b(g)$. While weakening of enclosing tissues is a prerequisite for germination,

embryo growth potential is a second factor that determines whether a seed germinates or not (Finch-Savage *et al.*, 2006, Bradford *et al.*, 2007). No difference in the penetration of tetrazolium was detected between mutant and wild type seeds (data not shown), discarding the hypothesis that cell wall permeability is at the origin of the reduced dormancy phenotype, as was found for the *Arabidopsis* testa mutants (Debeaujon *et al.*, 2000). Collectively, these data indicate that the phenotype observed by silencing *MtSNF4b* is under the influence of a time-dependent component controlled by dry storage and thus AR.

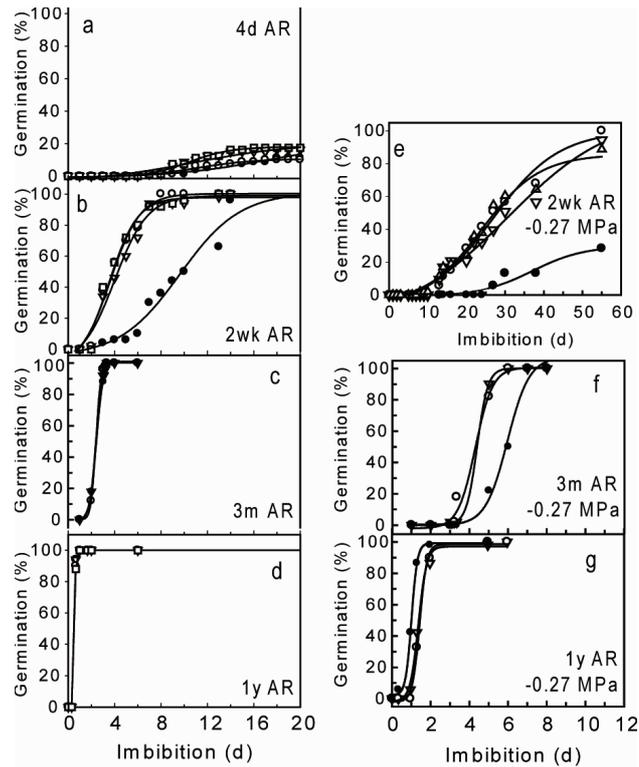


Fig. 4. Germination curves of wild type (solid symbols) and RNAi *MtSNF4b* seeds (open symbols) imbibed at different times of after-ripening (AR) (a) 4d of AR, (b) 2-3 weeks of AR, (c) 3 months of AR, (d) 1 year of AR (e), 2-3 weeks of AR, imbibed at -0.27 MPa in a polyethylene glycol (PEG) solution (f) 3 months of AR, imbibed at -0.27 MPa (g) 1 year of AR, imbibed at -0.27 MPa. Seeds of different lines grown under similar conditions were imbibed in the dark at 20°C in H₂O or PEG solution. Data are significantly different when they differ by 18% or more (χ^2 -test, $P < 0.05$).

Action of SNF4b is downstream of ABA

Considering the difference in dormancy or speed of AR that was induced by silencing *MtSNF4b*, we investigated the possible link between SNF4b and ABA signaling pathways. Western blot analysis demonstrated that ABA concentrations above 10 μ M induced a rapid accumulation of the SNF4b protein during imbibition of immature seeds (Fig. 5a). ABA content and sensitivity of the RNAi *MtSNF4b* lines were also determined. Germination behavior (Fig. 5b) and ABA contents (Fig. 5c, 5d) were assessed on seeds obtained from two different harvests at respectively 1 wk and 8 month of AR. No significant difference in ABA content at 1 week of AR was detected between wild type or RNAi seeds, regardless of whether they were dry or imbibed for 24h (Fig 5c), although a two-fold difference in germination speed was observed. In the

second seed batch at 8 months of AR, which almost completely relieved dormancy, also no difference between wild type and mutant ABA content was observed. Imbibition of these seeds resulted in a slight but significant decrease in ABA for the wild type and

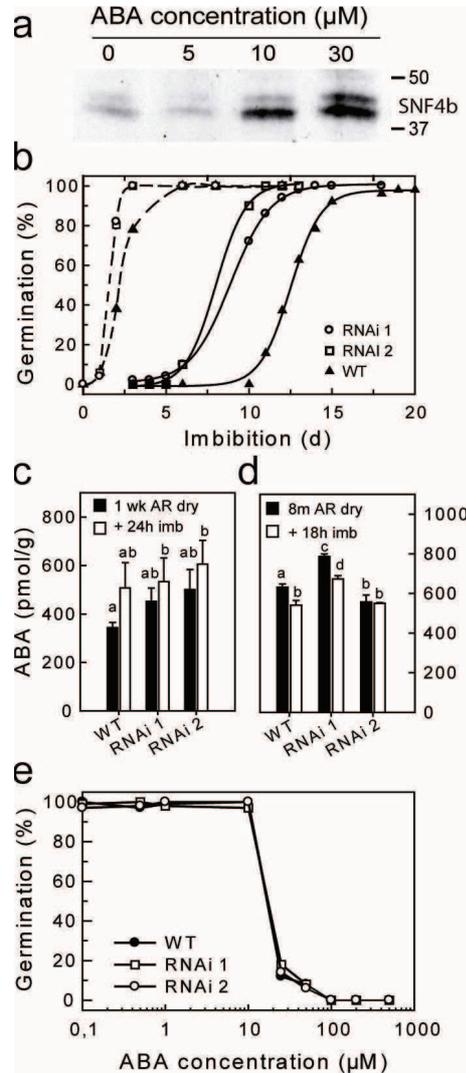


Fig. 5. Relation between ABA and SNF4b. (a) Western blot demonstrating the induction of MtSNF4b protein in immature, 16 days-old embryos of *M. truncatula* after 6h of incubation in ABA, (b) Germination curves of 1-week (dashed lines) or 8 month of AR (solid lines) of wild type (solid symbols) and two RNAi *MtSNF4b* lines (open symbols) used for determination of ABA concentration (c, d). Data are significantly different when they differ by 25% or more (χ^2 -test, $P < 0.05$). (c, d) ABA concentration in dry or imbibed seeds after 1 week AR (c) or 8 months of AR. Means and SE are shown. Different letters shown above the bars represent significant differences after multiple comparison of the means using the Student-Newman-Keuls test ($P < 0.05$). (d), Sensitivity of 8 months AR wild type (solid symbols) and two RNAi *MtSNF4b* lines (open symbols) seeds to ABA. AR, after-ripening.

one of the RNAi lines (Fig. 5d), but no large degradation of ABA was detected as found for non-dormant seeds of *N. plumbaginifolia* (Grappin *et al.*, 2000). ABA sensitivity was studied by evaluating the final percentage of germination of seed lots at 8 months of AR as a function of ABA concentration. A comparable sensitivity to ABA is observed for two independent seed lots of RNAi *MtSNF4b* lines (Fig. 3e). Fluridone was found to efficiently break dormancy of both wild type and mutant *M. truncatula*

seeds, decreasing the time of 50% of germination (T_{50}) from 152h to 20h for wild type seeds and from 80-102h to 20-23h for two RNAi *MtSNF4b* lines (Table S1). Incubation in paclobutrazol (100 μ M), a gibberellic acid (GA) inhibitor, doubled the germination speed both in wild type and mutant lines. In contrast, GA up to concentrations of 100 μ M had little effect on germination speed and did not change germination behavior between mutant or wild type seeds (Fig. S4). Thus, ABA is capable of inducing gene and protein expression of *MtSNF4b*, but downstream signaling pathways of *MtSNF4b* do not seem to be implicated in changing the content or sensitivity of ABA during imbibition of *M. truncatula* seeds.

Discussion

This analysis shows that *MtSNF4b* is involved in dormancy-related events in seeds of *M. truncatula*. Silencing *MtSNF4b* affects the expression of biotic stress-related genes that are expressed in seeds during imbibition only when they are dormant and will not germinate rapidly. In addition, silencing of *MtSNF4b* also resulted in faster AR of freshly harvested seeds. Whereas a previous study demonstrated a role of *MtSNF4b* during maturation, this study points out an additional role of *MtSNF4b* during the germination phase of seeds (Rosnoblet *et al.*, 2007). At the final stages of maturation, concomitant with the formation of a SnRK1/SNF4b complex, oligosaccharide accumulation was affected in RNAi *MtSNF4b* seeds, as well as the longevity of mature seeds (Rosnoblet *et al.*, 2007). Dormancy is also acquired at this final stage in *M. truncatula* seeds, suggesting that there might be a link between the longevity and AR phenotype. Both phenomena depend on storage humidity and temperature. However, storage conditions that lead to fully after-ripened seeds do not result in loss of germination or vigor (Fig. 1 and 4). To demonstrate a difference in vigor, storage conditions have to be much more extreme (e.g. high temperatures or RH). Alternatively, the effect of *MtSNF4b* on AR can have an indirect origin via modification of cell walls through biotic defense activation. In *MtSNF4b* deficient embryos, the transcriptomic analysis revealed an up-regulation of genes involved in cell wall metabolism and rigidity, such as or enzymes involved in breakdown of galactomannans (α -galactosidase, β -mannosidase), as well as down-regulation of a polygalacturonase inhibitor (Tab. 1 and dataset S1). Nonetheless, several papers have pointed to a role of SNF4b in dormancy or AR (Carrera *et al.*, 2008, Bradford *et al.*, 2003, Argyris *et al.*, 2008). A homologue of *MtSNF4b* in tomato, *LeSNF4*, was previously identified as being highly expressed in non-germinating tissues, and suggested to serve as an indicator of a high effective ABA/GA ratio in seeds (Argyris *et al.*, 2008). Indeed, genes associated with the synthesis and deactivation of GA and ABA are reciprocally regulated in association with the imposition and release of dormancy (Cadman *et al.*, 2006). Although we confirm that the regulatory subunit SNF4b is ABA-inducible, our study failed to demonstrate a direct downstream link with ABA, either by pharmacological approaches or transcriptomic analyses (Fig. 5, Dataset S1). Recently, a study aimed at separating the action of ABA in seed dormancy from AR-regulated gene expression using *Arabidopsis thaliana* mutants defective in ABA synthesis or perception (Carrera *et al.*, 2008). Interestingly, the homologue of *MtSNF4b* in *Arabidopsis*, At1g15330, was identified as one of the 103 AR down-regulated genes that were independent of ABA signaling (Carrera *et al.*, 2008). These data supports the suggestion that SNF4b plays a role in AR rather than dormancy, and confirms the ABA-

independent pathway downstream of *MtSNF4b*. Possibly, transcript and protein accumulation of MtSNF4b during seed development is regulated by ABA, when dormancy is installed, but subsequent maintenance and activity of the SnRK1/SNF4b complex during imbibition is regulated by other factors.

The effect of *MtSNF4b* on biotic stress-related gene expression during hydration of dormant seeds seems to be uncoupled from the maturation phenotype. We showed that the expression of these genes is activated during imbibition of dry seeds in freshly harvested wild type, and not the result of transcript levels accumulated during maturation. In SNF4b-deficient seeds, this activation is largely impeded. The subset of genes that are differentially expressed through silencing *MtSNF4b* are classified in the groups 'disease, virulence and defense', 'cell wall', and 'secondary metabolism'. *MtSNF4b* silencing-induced reduction in *PR10* transcripts was also found on the translational level. This remains to be tested for the largest group of genes, which are related to phenylpropanoid metabolism (*PAL*, *C4H*, *CCoAOMT*) and flavonoid and isoflavonoid biosynthesis genes (*CHS*, *CHR*, *CHI*, *IFS*, *HID*, *IFR* and *VR*). Most of these genes were found to be induced by pathogens or elicitors in *M. truncatula* and correlate with accumulation of medicarpin (Naoumkina *et al.*, 2007; Dhaubhadel *et al.*, 2007; Deavours *et al.*, 2005). Medicarpin is an antifungal pterocarpan phytoalexin produced by many legumes, and are thought to be important components of the defense response to fungal pathogens (Mundodi *et al.*, 2001). Furthermore, medicarpin has been found to delay alfalfa seed germination (Dornbos *et al.*, 1990 and Miller *et al.*, 1988). It might be envisaged that this phytoalexin is present in seeds primarily to avoid predation or microbial infections, but also has an effect on the regulation of germination in legume seeds.

What might be the downstream targets of the SnRK1/SNF4b complex that are responsible for the differential gene expression in relation to biotic stress? Direct targets are most likely (de)activated through phosphorylation by the catalytic α -subunit and will not be picked up by the transcriptome analysis. Nonetheless, the expression of several *WRKY* genes in the F-dataset points towards possible downstream regulation by *MtSNF4b*. A recent study on a kinase-protein interaction in rice identified SnRK1 as a potential phosphorylation candidate of WRKY (Ding *et al.*, 2009). WRKY proteins are involved in regulation of plant defense responses (Eulgem *et al.*, 2007). A massive induction of *WRKY* TF genes is correlated with the induction of genes involved in the central phenylpropanoid pathway and the downstream steps in the biosynthesis of medicarpin (Naoumkina *et al.*, 2007). Over-expression of the same *WRKY* genes as those found in our transcriptomic analysis (W100630 and W108715) in transgenic tobacco enhances typical defense responses such as PR protein production and accumulation of soluble and wall bound phenolic compounds (Naoumkina *et al.*, 2008). In addition, they were shown to be induced by either yeast elicitor or methyl jasmonate (Naoumkina *et al.*, 2008). Our transcriptomic analysis also revealed a link to jasmonic acid (JA). Three copies of 12-OPDA reductase genes are down-regulated by silencing MtSNF4b, irrespective of the AR status of the seeds. These genes are responsible for the reduction of 12-OPDA to form OPC:8, which is subjected to β -oxidation to yield JA. JA and OPDA both are active as signaling molecules and induce the expression of overlapping but distinct sets of genes involved in biotic stresses (Taki *et al.*, 2005). Jasmonates are able to induce the expression of nodulation genes and promote nodulation and N fixation in soybean under controlled environment conditions (Mabood *et al.*, 2006). In this respect, it is interesting to note that two highly down-regulated

genes both in fresh and AR mutant seeds encode the nodulin MtN5, belonging to the family of nonspecific lipid transfer proteins and expressed during nodulation of *M. truncatula* with *Sinorhizobium meliloti* (El Yahyaoui *et al.*, 2004).

Although a number of genes regulated by *MtSNF4b* are also found in the D-dataset, additional genes related to defense are also differentially regulated when *MtSNF4b* is silenced, suggesting that this subset of genes is directly related to the action of SNF4b and not simply to the reduced dormancy status of the mutant embryos. Imbibed dormant *M. truncatula* seeds have seed coats that remain devoid of any contaminating fungi and bacteria for months, whereas isolated seed coats are readily infected (personal observation W. Bolingue). Expression studies in dormant Arabidopsis seeds demonstrate that genes related to defense and protection are also highly expressed (Cadman *et al.*, 2006). An interesting parallel can be made with the developmentally induced dormancy in the drought-tolerant plant *Retama raetam*, a desert legume (Pnueli *et al.*, 2002). Dormancy in this plant is accompanied by the accumulation of transcripts of PR10-like protein and WRKY, whereas non-dormant plants subjected to stress conditions contained transcripts encoding sHSP. In conclusion, our results suggest that a SNF4b/SnRK1/ β complex participates in the regulation of a developmental, constitutive basal defense in dormant seeds to provide protection until their germination is induced by environmental cues.

Experimental procedures

Plant material and treatments

Plants of *Medicago truncatula* Gaertn. (cv. R108) were grown and developing seeds were labeled as described in (Rosnoblet *et al.*, 2007). Mature pods were harvested after abscission and dried for a further two days at 60% RH after which seeds were excised manually. AR was performed under controlled conditions (60% HR, 20°C in the dark). For comparative analysis, plants were grown under similar conditions and seeds were harvested at the same time for all genotypes. At different times of AR, seed lots of 50-100 seeds were scarified by sand paper and imbibed on wet filter paper at 20°C in the dark and were considered germinated when the radicle protruded from the surrounding envelope. The effect of *MtSNF4b* silencing on germination speed was repeated on three independent cultures. Data from one representative experiment are shown. Statistical analysis on the germination data was carried out using the χ^2 -test and differences were regarded as significant at $P < 0.05$. To release dormancy, seeds were either imbibed for 48h at 4°C and subsequently transferred to 20°C or imbibed in 100 μ M 1-methyl-3-phenyl-5-(3-trifluoromethyl-(phenyl))-4-(1H)-pyridinone (fluridone) (Duchefa, Haarlem, The Netherlands). The speed of germination of partially or completely after-ripened seeds was also determined under osmotic stress (-0.27 MPa) at 20°C in the dark. ABA sensitivity was tested on seeds at 8 months of AR that were imbibed at different ABA concentrations (control in 0.1% EtOH) in the dark at 20°C and final percentage of germination was scored. For the microarray analysis, seeds at 2-3 weeks and 6 months of AR were imbibed in the dark for 6h, corresponding to the beginning of phase II of imbibition (after 6 months of storage, seeds start to germinate around 16h). For verification of expression by RT-qPCR, new seed batches were grown to check for biological reproducibility.

Plasmid construction and plant transformation

SNF4b RNAi plasmid construction with the binary vector pFGC5941/Gateway (pFRB), transformation of the plasmid into *M. truncatula* and selection of positive lines were described in (Rosnoblet *et al.*, 2007). Four homozygous lines (T2) were retained for further analysis. Two additional transformants were used as negative controls; a R108 line transformed with the empty vector (RNAi empty) and a R108 line transformed with the pFGC5941 vector containing an RNAi construction targeted against the proximal region (1.2 kb) of the *MtENOD40-1* promoter (RNAi control). All studies were performed on the seeds of the T2 or T3 generation.

Gel filtration chromatography and western blot

Seeds of *M. truncatula* at 1-2 weeks of AR were imbibed for 48h at 4°C or at 20°C in the dark after which soluble proteins were extracted and separated following their molecular weight on a Superdex 200 HR 10/30 column (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) according to (Rosnoblet *et al.*, 2007). Fractions were analysed by Western blotting using an anti-SNF4b antibody as described in (Rosnoblet *et al.*, 2007). To study the effect of ABA on SNF4b, seeds were harvested at 16 days after pollination and incubated for 6h in different concentrations of ABA. Soluble proteins were extracted and analysed by Western blot (10µg/lane) using the anti-SNF4b-antibody. For PR10 protein induction, soluble proteins were extracted from 36h imbibed embryos at 2 weeks AR and analysed by Western blotting using an antibody to the pea epidermis specific protein PsRH2 that recognizes MtPR10-1 (Ramos *et al.*, 2003). Western blots were performed according to (Rosnoblet *et al.*, 2007).

ABA measurements

ABA content was measured in dry and imbibed seeds at 1 week of AR and at 8 months of AR, using two different harvests. Imbibed seeds were either taken after 24h or 18h, for 1 week and 8 months of AR, respectively. Only non-germinated seeds were taken for the analysis. Extraction was performed on 3 biological replicates of 25 seeds according to (Jiang *et al.*, 2001). ABA concentration was determined using the Phytodetek ABA immunoassay kit according to the manufacturer's protocol (Idetek, Inc., Sunnyvale, CA).

Isolation of Total RNA and mRNA purification

Total RNA was isolated according to (Verwoerd *et al.*, 1989). Embryos were directly frozen into liquid nitrogen to prevent a wounding response. Purification of mRNA was performed using the PolyATract mRNA isolation system III kit according to the manufacturer's protocol (Promega, Madison, WI, USA). The quality of mRNA was assessed using an Agilent 2100 bioanalyser (Agilent, Palo Alto, CA, USA).

Microarray analysis

Three microarray experiments were conducted to compare expression: 1) embryos of wild-type versus two RNAi lines at 2-3 weeks of AR (2 wk AR) with differential

germination speed, 2) embryos of wild-type versus one RNAi line at 6 months of AR (6 m AR) and 3) wild-type embryos at 2 wk versus 6 months of AR (D vs ND). Microarray analysis replicates consisted of three independent biological replicates of 50 embryos, obtained from different plants. Cys3- and Cys5-labeled cDNA was prepared using the CyScribe cDNA Post-Labeling Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Dye-specific variations were accounted for by applying a dye swap between the different wild type RNA samples. Hybridisation was performed using Mt16kOLI1Plus chips, containing a 70mer oligonucleotide collection representing all TCs from the TIGR *M. truncatula* Gene Index version 5, extended by 384 probes targeted against transcription factors and other regulators (Hohnjec *et al.*, 2005). Probe-labeling, hybridisation and image acquisition were realised as described in (Buitink *et al.*, 2006). Signal intensities were extracted with the GENEPIX PRO 5.0 image analysis software (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Image data processing was performed using the GENESPRING software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Genes with a significant difference (p-value < 0.01) and >1.5 fold change in expression were retained.

Real time quantitative PCR analysis

Reverse transcription reactions were performed on 1 µg of total RNA by using QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Quantification of cDNA by RT-qPCR was performed using an ABI PRISM 7100 Sequence Detection System and SYBR Green as a double-stranded DNA-specific fluorescent dye. Values are based on three repetitions. The constitutively expressed mRNA *Msc27* was used as a housekeeping gene for standardizing data and following RT-qPCR efficiency (Gallardo *et al.*, 2007). Amplification primers are listed in Table S2. Melting curves were performed using Dissociation Curves software (Applied Biosystems) to ensure only a single product was amplified. Changes in transcript abundance were estimated as fold change (FC) relative to a control condition (Livak *et al.*, 2001).

Acknowledgements

We thank Dr. Marten Denekamp (Syngenta Seeds, Enkhuizen, the Netherlands) for providing the pFRB RNAi binary vector and Dr. P. Ratet (Institut des Sciences Végétales, CNRS, Gif sur Yvette, France) for the gift of seeds of *Medicago truncatula* cv R108. We are indebted to Dr H. Franssen (Wageningen University and Research Centre, Wageningen, the Netherlands) for providing the PsRH2 antibody to perform the PR10 analysis. Lysianne Brocard and Martin Crespi (Institut des Sciences Végétales, CNRS, Gif sur Yvette, France) are gratefully acknowledged for the gift of mutants containing an RNAi construction targeted against the proximal region (1.2 kb) of the *MtENOD40-1* promoter.

References

Ananieva, E.A., Gillaspay, G.E., Ely, A., Burnette, R.N. and Erickson, F.L. (2008) Interaction of the WD40 domain of a myoinositol polyphosphate 5-phosphatase

- with SnRK1 links inositol, sugar, and stress signaling. *Plant Physiol* **148**, 1868-1882.
- Argyris, J., Dahal, P., Hayashi, E., Still, D.W. and Bradford, K.J.** (2008) Genetic variation for lettuce seed thermoinhibition is associated with temperature-sensitive expression of abscisic Acid, gibberellin, and ethylene biosynthesis, metabolism, and response genes. *Plant Physiol* **148**, 926-947.
- Baena-Gonzalez, E. and Sheen, J.** (2008) Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci.* **13**, 474-482.
- Baskin, C.C. and Baskin, J.M.** (1998) *Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. San Diego, Academic Press.
- Bewley, J.D. and Black, M.** (1994) *Seeds: Physiology of development and germination* (Plenum Press, New York, London).
- Bouly, J.P., Gissot, L., Lessard, P., Kreis, M. and Thomas, M.** (1999) *Arabidopsis thaliana* proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKINalpha1, an SNF1-like protein kinase. *Plant J.* **18**, 541-550.
- Bradford, K.J., Chen, F. and Nonogaki, H.** (2007) in *Seed development, dormancy and germination*, eds Bradford, K. J. & Nonogaki, H. (Blackwell Publishing, Oxford), pp. 264-295.
- Bradford, K.J., Downie, A.B., Gee, O.H., Alvarado, V., Yang, H. and Dahal, P.** (2003) Abscisic acid and gibberellin differentially regulate expression of genes of the SNF1-related kinase complex in tomato seeds. *Plant Physiol* **132**, 1560-1576.
- Buitink, J., Leger, J.J., Guisle, I., Vu, B.L., Wuillème, S., Lamirault, G., Le Bars, A., Le Meur, N., Becker, A., Kuster, H. and Leprince, O.** (2006) Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. *Plant J.* **47**, 735-750.
- Buitink, J., Thomas, M., Gissot, L. and Leprince, O.** (2004) Starvation, osmotic stress and desiccation tolerance lead to expression of different genes of the regulatory beta and gamma subunits of the SnRK1 complex in germinating seeds of *Medicago truncatula*. *Plant Cell Environ* **27**, 55-67.
- Cadman, C.S., Toorop, P.E., Hilhorst, H.W. and Finch-Savage, W.E.** (2006) Gene expression profiles of *Arabidopsis Cvi* seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *Plant J.* **46**, 805-822.
- Carrera, E., Holman, T., Medhurst, A., Dietrich, D., Footitt, S., Theodoulou, FL. and Holdsworth, MJ.** (2008) Seed after-ripening is a discrete developmental pathway associated with specific gene networks in *Arabidopsis*. *Plant J.* **53**, 14-224.
- Deavours, B.E. and Dixon, R.A.** (2005) Metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. *Plant Physiol* **138**, 2245-2259.
- Debeaujon, I., Leon-Kloosterziel, K.M. and Koornneef, M.** (2000) Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **122**, 403-414.
- Dhaubhadel, S., Gijzen, M., Moy, P. and Farhangkhoe, M.** (2007) Transcriptome analysis reveals a critical role of CHS7 and CHS8 genes for isoflavonoid synthesis in soybean seeds. *Plant Physiol* **143**, 326-338.
- Ding, X., Richter, T., Chen, M., Fujii, H., Seo, Y.S., Xie, M., Zheng, X., Kanrar, S., Stevenson, R.A., Dardick, C., Li, Y., Jiang, H., Zhang, Y., Yu, F., Bartley, L.E., Chern, M., Bart, R., Chen, X., Zhu, L., Farmerie, W.G., Gribskov, M., Zhu, J.-**

- K., Fromm, M.E., Ronald, P.C. and Song, W.-Y.** (2009) A rice kinase-protein interaction map. *Plant Physiol* **149**, 1478-1492.
- Dornbos, D.L., Jr., Spencer, G.F. and Miller, R.W.** (1990) Medicago pin delays alfalfa seed germination and seedling growth. *Crop Sci* **30**, 162-166.
- El Yahyaoui F., Küster, H, Ben Amor, B., Hohnjec, N., Pühler, A., Becker, A., Gouzy, J., Vernié, T., Gough, C., Niebel, A., Godiard, L. and Gamas, P.** (2004) Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program. *Plant Physiol* **136**, 3159-3176.
- Estruch, F., Treitel, M.A., Yang, X.L. and Carlson, M.** (1992) N-Terminal mutations modulate yeast Snf1 protein-kinase function. *Genetics* **132**, 639-650.
- Eulgem, T. and Somssich, I.E.** (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 366-371.
- Faria, J.M., Buitink, J., van Lammeren, A.A. and Hilhorst, H.W.** (2005) Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. *J. Exp. Bot.* **56**, 2119-2130.
- Finch-Savage, W. E. and Leubner-Metzger, G.** (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* **171**, 501-523.
- Gallardo, K., Firnhaber, C., Zuber, H., Héricher, D., Belghazi, M., Henry, C., Küster, H. and Thompson, R.** (2007) A combined proteome and transcriptome analysis of developing *Medicago truncatula* seeds: evidence for metabolic specialization of maternal and filial tissues. *Mol. Cell Proteomics.* **6**, 2165-2179.
- Grappin, P., Bouinot, D., Sotta, B., Miginiac, E. and Jullien, M.** (2000) Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta* **210**, 279-285.
- Halford, N. G., Bouly, J.-P. and Thomas, M.** (2000) SNF1-related protein kinases (SnRKs) - Regulators at the heart of the control of carbon metabolism and partitioning. *Adv. Bot. Res.* **32**, 405-434.
- Hohnjec, N., Vieweg, M.F., Pühler, A., Becker, A. and Küster, H.** (2005) Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different Glomus fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol.* **137**, 1283-1301.
- Iturriaga, E.A., Leech, M.J., Barratt, D.H. and Wang, T.L.** (1994) Two ABA-responsive proteins from pea (*Pisum sativum* L.) are closely related to intracellular pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* **24**, 235-240.
- Jiang, M. & Zhang, J.** (2001) Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiol* **42**, 1265-1273.
- Kleinow, T., Bhalerao, R., Breuer, F., Umeda, M., Salchert, K. and Koncz, C.** (2000) Functional identification of an Arabidopsis Snf4 ortholog by screening for heterologous multicopy suppressors of snf4 deficiency in yeast. *Plant J* **23**, 115-122.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Mabood, F., Souleimanov, A., Khan, W. and Smith, D.L.** (2006) Jasmonates induce Nod factor production by Bradyrhizobium japonicum. *Plant Physiol Biochem.* **44**, 759-765.

- Miller, R.W., Kleiman, R., Powell, R.G. and Putnam, A.R.** (1988) Germination and growth inhibitors of alfalfa. *J. Nat. Prod.* **51**, 328-330.
- Mundodi, S.R., Watson, B.S., Lopez-Meyer, M. and Paiva, N.L.** (2001) Functional expression and subcellular localization of the *Nectria haematococca* Mak1 phytoalexin detoxification enzyme in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **46**, 421-432.
- Naoumkina, M., Farag, M.A., Sumner, L.W., Tang, Y., Liu, C.J. and Dixon, R.A.** (2007) Inaugural Article: Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **104**, 17909-17915.
- Naoumkina, M.A., He, X. and Dixon, R.A.** (2008) Elicitor-induced transcription factors for metabolic reprogramming of secondary metabolism in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol.* **8**, 132.
- Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Kranner, I., Bogatek, R., Corbineau, F. and Bailly, C.** (2009) The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiol* **150**, 494-505
- Pnueli, L., Hallak-Herr, E., Rozenberg, M., Cohen, M., Goloubinoff, P., Kaplan, A. and Mittler, R.** (2002) Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *Plant J.* **31**, 319-330.
- Radchuk, R., Radchuk, V., Weschke, W., Borisjuk, L. and Weber, H.** (2006) Repressing the expression of the SUCROSE NONFERMENTING-1-RELATED PROTEIN KINASE gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. *Plant Physiol* **140**, 263-278.
- Ramos, J. and Bisseling, T.** (2003) A method for the isolation of root hairs from the model legume *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot* **54**, 2245-2250.
- Rosnoblet, C., Aubry, C., Leprince, O., Ly Vu, B., Rogniaux, H. and Buitink, J.** (2007) The regulatory gamma subunit SNF4b of the sucrose non-fermenting-related kinase complex is involved in longevity and stachyose accumulation during maturation of *Medicago truncatula* seeds. *Plant J.* **51**, 47-59.
- Schwachtje, J., Minchin, P.E.H., Jahnke, S., Van Dongen, J.T., Schittko, U. and Baldwin, I.T.** (2006) SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **103**, 12935-12940.
- Serrano, M. and Guzman, P.** (2004) Isolation and gene expression analysis of *Arabidopsis thaliana* mutants with constitutive expression of *ATL2*, an early elicitor-response RING-H2 zinc-finger gene. *Genetics* **167**, 919-929.
- Sugden, C., Crawford, R.M., Halford, N.G. and Hardie, D.G.** (1999) Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J.* **19**, 433-439.
- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., Yagi, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Masuda, T., Takamiya, K.i., Shibata, D., Kobayashi, Y. and Ohta, H.** (2005) 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**, 1268-1283.
- Verwoerd, T.C., Dekker, B.M. and Hoekema, A.** (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* **17**, 2362.

Yoshida, T., Nishimura, N., Kitahata, N., Kuromori, T., Ito, T., Asami, T., Shinozaki K. and Hirayama, T. (2006) ABA-hypersensitive germination 3 encodes a protein phosphatase 2C (AtPP2CA) that strongly regulates abscisic acid signaling during germination among arabidopsis protein phosphatase 2Cs. *Plant Physiol.* **140**, 115-126.

Short legends for supporting information

Table S1. Effect of fluridone on germination wild type and RNAi MtSNF4b seeds at 2-3 weeks of after-ripening (AR). T50 was measured as time in hours to reach 50% of germination of a seed lot imbibed in the dark at 20°C in 0.01% EtOH (H₂O control) or fluridone.

Table S2: Primer sequences used for quantitative RT-qPCR experiments.

Dataset S1: Sets of genes that showed enhanced or decreased expression in the three dataset analysed using 16K MtOLI1plus microarrays. Differential expression ($P < 0.01$, > 1.5 -fold change) was determined on the following datasets: 1) 6h fully imbibed embryos of wild type and RNAi MtSNF4b lines at 2-3 weeks of after-ripening (AR) (fresh, F-dataset); 2) 6h-imbibed embryos of wild type versus RNAi lines at 6 months of AR (stored, S-dataset); 6h-imbibed wild type seeds at 2-3 weeks of AR versus 6 months of AR (dormancy, D-dataset), using the same RNA from the first and second analysis.

Dataset S2: Classification of genes that are differentially expressed in the F-dataset. A total of 55 genes are down-regulated in wild type embryos compared to mutant embryos at 2-3 weeks of AR.

Figure S1: Western blot analyses of four independent RNAi *MtSNF4b* lines and three controls for the expression of SNF4b protein. Controls were wild type seeds, seeds transformed with the empty plasmid (empty) used for the silencing and the same plasmid containing an RNAi construction targeted against proximal region (1.2 kb) of the *MtENOD40-1* promoter. An estimation of the amount of *MtSNF4b* was calculated as a percentage of the total intensity.

Figure S2: Confirmation of microarray data by expression analysis using quantitative RT-PCR of phenylalanine lyase (TC106669), chalcone synthase (TC100400), isoflavone synthetase (TC106939), and isoflavone reductase (TC96312). Expression was analysed in seeds from three different harvests. For one harvest, expression was analysed at 2 weeks of AR, for a second harvest, expression was analysed after 6 months of AR, and for the last harvest, expression was either analysed at 2 weeks of AR or stored and analysed 6 months of AR. Gene expression was determined on 6h-imbibed embryos of seeds of three independent RNAi MtSNF4b lines and two controls (wild type seeds and mutants transformed an RNAi construction using the same plasmid as in our study, but targeted against proximal region (1.2 kb) of the MtENOD40-1 promoter). Bars represent the standard deviation.

Figure S3: Changes in differential expression of genes encoding enzymes of the medicarpin pathway that were identified in F-dataset. For comparison, the level of

differential expression of these genes in the D-dataset and S-dataset are also shown. F-dataset: wild-type / RNAi *MtSNF4b* embryos at 2-3 weeks of AR, S-dataset: wild-type / RNAi *MtSNF4b* embryos at 6 months of AR, D-dataset: wild type embryos at 2-3 week of AR / 6 months of AR

Figure S4: Effect of gibberellic acid and paclobutrazol on germination of wild type and RNAi *MtSNF4b* seeds at 2-3 weeks of AR. Seeds were imbibed in the dark 20°C in 0.01% EtOH (control) or 100 µM gibberellic acid or paclobutrazol.

Annexe 2 :
Données supplémentaires du chapitre 2 : Liste des gènes identifiés lors de l'analyse par puce à ADNc.

Groupe F surexprimé

Données supplémentaires S1

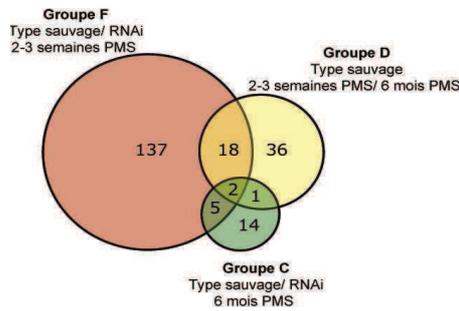
Groupe de gènes montrant une augmentation d'expression analysée avec la puce à AdNc Mt16kOL1plus (Foldchange>1,5 et p-value<0,01).

La différence d'expression est déterminée sur des embryons de grains de type sauvage versus des embryons RNAi MTSN4fb imbibés pendant six heures après deux à trois semaines de post maturation à 8°C

No MT	TIGR_MtG8	Blast NCBI GenBank ID	E-value	Produit du gène	WT 2-3sem/ WT 6m AR	p-value	WT/RNAi 2-3 sem AR	p-value	WT/RNAi 6m AR	p-value	F	F+S	F+D	Tous	Blast A.L. locus tag	E-value	Classification
MT009604	TC107554	G86268	1.00E-59	F-box family protein	0,871	2.1E-01	1,501	3.9E-03	1,255	3.6E-01	x				AT1G13570	2.3E-65	unknown
MT001599	TC101960	G66372	3.00E-22	hypothetical protein	1,342	9.0E-02	1,502	3.3E-03	1,399	2.6E-02	x				AT1G23830	6.4E-22	unknown
MT0014380	AW687772	G48179	3.00E-40	respiratory burst oxidase; putative	1,071	4.9E-01	1,511	5.9E-03	1,124	2.3E-01	x				AT5G47910	2.1E-35	Cell rescue
MT001716	TC106705	G84825	1.00E-174	zinc finger	0,942	1.5E-01	1,513	3.8E-03	1,078	2.1E-01	x				AT3G55980	1.8E-162	Protein fate
MT005205	TC104768	Q94824	1.00E-23	Snakin-1	0,817	2.2E-01	1,518	2.4E-05	1,414	7.0E-03	x				AT2G14900	1.0E-21	Cell rescue
MT008202	TC95395	CF40462	9.00E-34	Polygalacturonase inhibitor precursor	1,221	3.8E-02	1,519	8.5E-03	1,112	3.8E-01	x				AT5G08860	5.4E-31	cell wall
MT01094	TC102009	Q8A526	1.00E-19	hypothetical protein	0,533	4.3E-03	1,52	5.3E-05	0,884	4.7E-02	x				AT4G35320	7.5E-21	unknown
MT0010485	TC102995	Q84U00	2.00E-68	terpene synthase/cyclase family protein	1,189	6.7E-02	1,521	1.5E-03	1,221	3.5E-01	x				AT2G24210	1.3E-55	Metabolism
MT000306	TC106826	Q9SRK9	1.00E-43	Wound-induced protein 1.	1,173	3.8E-02	1,524	2.7E-05	0,835	2.5E-01	x				AT3G10980	2.0E-43	unknown
MT007028	TC106619	G9SE40	0	aquaporin; putative	1,199	8.2E-02	1,525	1.3E-03	1,161	2.0E-01	x				AT5G06060	6.1E-122	transport
MT009701	TC97194	No hits found		unknown	1,137	2.4E-01	1,529	7.0E-06	1,027	7.3E-01	x						unknown
MT000748	TC107091	Q8LDD8	2.00E-85	LOB domain-containing protein 41.	0,798	1.6E-02	1,538	1.3E-03	1,179	6.9E-02	x				AT3G02550	1.3E-66	Development
MT012828	TC105017	Q9HG63	1.00E-20	hypothetical protein	1,274	3.9E-02	1,539	6.5E-03	1,299	2.0E-02	x				AT2G20145	4.6E-37	unknown
MT003279	TC108912	Q8LKW3	2.00E-29	dehydration-induced protein	1,007	9.7E-01	1,54	5.4E-03	1,067	6.8E-01	x				AT2G41430	3.9E-26	Cell rescue
MT008892	TC94207	No hits found		unknown	1,403	1.3E-01	1,541	8.9E-04	1,449	7.5E-02	x						transport
MT007306	TC107684	Q9AVQ9	0	Inorganic phosphate transporter 1-7	1,284	5.2E-02	1,541	3.8E-03	1,287	1.7E-01	x				AT2G38940	2.0E-162	unknown
MT009554	TC108306	T02437	2.00E-37	hypothetical protein	0,701	5.0E-03	1,542	2.3E-04	1,026	7.7E-01	x						Metabolism
MT009563	TC101117	Q8RW90	0	fumarylacetoacetate hydrolase	1	1.0E+00	1,542	8.4E-08	0,995	9.3E-01	x				AT1G12050	1.4E-181	unknown
MT010247	TC97474	CAE45639	9.00E-32	hypothetical protein	1,26	6.6E-02	1,547	5.2E-05	1,027	7.6E-01	x				AT3G23230	7.6E-28	unknown
MT008079	TC107892	Q9AR57	1.00E-113	Cytochrome b561 / ferric reductase transmembrane	1,076	4.1E-01	1,547	8.2E-05	1,026	8.4E-01	x				AT3G08760	6.1E-106	unknown
MT009444	TC109934	Q9L806	2.00E-37	universal stress protein	1,019	3.5E-01	1,547	8.1E-02	1,431	3.1E-01	x				AT3G36530	2.8E-37	Protein fate
MT012809	TC98358	T48216	1.00E-101	Serine/threonine/protein kinase PBS1	1,305	1.8E-01	1,553	7.5E-04	1,140	6.0E-01	x				AT4G37150	5.6E-16	Cell rescue
MT009281	TC108175	B59200	1.00E-156	calcineurin-like phosphoesterase family protein	1,104	1.3E-01	1,554	8.0E-07	1,152	2.5E-01	x				AT2G16430	1.1E-138	Protein fate
MT003712	TC97814	No hits found		unknown	0,846	6.8E-02	1,557	1.6E-03	1,153	2.0E-01	x						unknown
MT004117	TC104011	T48196	2.00E-45	Uncharacterized protein At5g01750.	0,862	1.6E-01	1,568	3.8E-05	1,160	3.3E-02	x				AT5G01750	1.9E-65	unknown
MT014921	TC105598	A33654	9.00E-87	glutathione S-transferase; putative	1,007	9.3E-01	1,57	1.3E-04	1,543	3.9E-02	x				AT2G29420	1.2E-52	Cell rescue
MT002007	TC93445	Q7XAE3	1.00E-156	pifB-type carboxylate kinase family protein	0,997	9.7E-01	1,573	2.1E-04	1,269	6.9E-02	x				AT3G59480	2.7E-142	Metabolism
MT013617	TC105790	Q9L709	2.00E-124	WRKY transcription factor 11R	1,176	4.4E-02	1,574	8.2E-03	1,016	8.9E-01	x				AT1G62310	8.1E-127	unknown
MT007670	TC100770	Q8KA9A	2.00E-96	RING-H2 finger protein ATL3B precursor	1,046	6.9E-01	1,581	7.4E-06	1,264	2.9E-02	x				AT3G05200	1.8E-65	Protein fate
MT007216	TC100498	T09622	0	mitogen-activated protein kinase	1,136	1.9E-01	1,594	4.6E-05	1,036	7.0E-01	x				AT3G45640	2.0E-130	Signaling
MT003755	TC110184	T51161	5.00E-39	Sulfate transporter 3.1	0,806	4.2E-02	1,596	1.5E-05	1,110	3.0E-01	x				AT3G51895	9.4E-38	unknown
MT000437	TC94571	A84533	2.00E-39	hypothetical protein	0,836	6.8E-02	1,601	1.9E-06	0,866	1.8E-01	x				AT2G15760	3.4E-41	unknown
MT009304	TC102017	BAD03098	0.003	hypothetical protein	1,163	2.2E-01	1,602	3.8E-04	0,979	6.0E-01	x						unknown
MT008616	TC94741	BA016003	4.00E-37	expressed protein	1,125	8.5E-02	1,616	1.6E-03	1,368	3.3E-02	x				AT5G65520	5.1E-31	transcription
MT015308	TC109430	F86340	4.00E-51	WRKY transcription factor 6	1,093	3.9E-02	1,616	1.2E-03	1,076	9.4E-01	x				AT1G62310	8.1E-127	unknown
MT004001	TC110143	Q9FF77	0	Pectinesterase PPE8B precursor	1,029	3.7E-01	1,618	3.6E-03	1,042	8.1E-01	x				AT5G04970	4.3E-187	cell wall
MT004112	TC106892	CH8H65	3.00E-59	Vegetative incompatibility protein HET-E-1.	1,064	1.5E-01	1,619	5.6E-06	0,912	3.7E-01	x				AT3G15880	0	Development
MT009947	TC102282	Q8VWJ2	5.00E-51	Probable WRKY transcription factor 28	1,412	4.3E-02	1,624	2.6E-03	1,093	1.8E-01	x				AT4G18170	3.8E-59	transcription
MT000126	TC94228	Q96471	1.00E-144	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzym	1,26	3.2E-02	1,626	3.2E-05	1,026	9.5E-01	x				AT3G51950	2.4E-120	Metabolism
MT000490	TC100814	Q8W4L9	1.00E-130	expressed protein	1,224	1.8E-02	1,628	7.8E-04	1,203	1.9E-02	x				AT3G17800	2.0E-123	unknown
MT019188	TC94215	B65313	6.00E-33	Snakin	0,788	3.6E-01	1,629	7.4E-03	1,479	5.9E-02	x				AT1G75750	2.1E-32	Cell rescue
MT007572	TC100713	T48945	2.00E-11	hypothetical protein	1,161	3.9E-02	1,636	2.8E-04	1,021	7.8E-02	x				AT5G09530	9.7E-12	unknown
MT000682	TC94581	Q7XJZ9	2.00E-10	glutathione peroxidase; putative	0,886	1.3E-01	1,645	3.0E-04	1,101	1.0E-01	x						Cell rescue
MT008393	TC95177	T50645	0	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor	1,089	2.0E-01	1,646	1.9E-05	0,989	8.8E-01	x				AT3G55430	2.7E-135	cell wall
MT001109	TC95319	T09538	0	acetyl-CoA carboxylase 2	1,943	1.3E-02	1,649	1.2E-03	1,057	6.8E-01	x				AT1G36160	8.7E-265	unknown
MT009521	TC109233	B86305	3.00E-05	hypothetical protein	1,048	4.3E-01	1,649	1.7E-03	1,000	1.0E+00	x						Metabolism
MT008774	TC107817	Q9FMN6	1.00E-126	N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase 6	1,208	9.3E-02	1,659	5.0E-05	1,202	8.1E-02	x				AT5G42830	6.9E-122	unknown
MT011162	TC95190	Q8S928	1.00E-149	U-box domain-containing protein	1,039	7.8E-01	1,664	9.7E-05	1,055	4.5E-01	x				AT3G02840	1.9E-57	transcription
MT008470	TC100783	A84789	1.00E-134	expressed protein	1,001	9.5E-02	1,674	5.8E-06	1,041	5.9E-01	x				AT2G37940	8.1E-127	unknown
MT000719	TC100991	AAQ68342	6.00E-48	AP2/EREBP transcription factor ERF-1	0,967	6.1E-01	1,684	2.6E-05	1,189	1.1E-02	x				AT3G15210	7.2E-48	unknown
MT000229	TC100534	Q9FZ09	1.00E-156	Patinin precursor	1,43	3.5E-01	1,667	3.4E-04	1,059	2.7E-01	x				AT2G26560	4.4E-135	Metabolism
MT007583	TC107191	BAD07484	0	Pleiotropic drug resistance protein 12.	1,058	3.6E-01	1,679	6.4E-04	1,215	4.9E-02	x				AT1G15520	0	transport
MT009460	TC101963	T17020	3.00E-25	Auxin-induced SAUR-like protein	0,974	8.5E-01	1,681	2.0E-03	0,934	1.6E-01	x				AT4G34800	1.2E-24	Cell rescue
MT007492	TC100838	T48643	1.00E-103	cinnamoyl-CoA reductase-related	1,212	2.2E-01	1,684	6.3E-04	1,751	2.4E-02	x				AT5G14700	1.2E-98	Metabolism
MT002063	TC108794	T49903	1.00E-106	UDP-glucosyltransferase	0,877	1.4E-01	1,688	1.8E-03	1,052	5.9E-01	x				AT1G12890	1.1E-106	Metabolism
MT007045	TC94101	Q8L9T5	2.00E-56	RING-H2 finger protein ATL3F	1,161	3.9E-02	1,698	8.8E-06	1,287	2.8E-02	x				AT1G12890	1.1E-106	Protein fate
MT011524	TC104928	Q8L828	1.00E-113	Coatomer subunit beta'	1,654	6.4E-02	1,709	2.9E-03	1,425	3.3E-02	x				AT3G15980	5.3E-109	transport
MT000358	TC94408	BAD06521	1.00E-128	12-oxophylodienate reductase 2	0,711	2.4E-03	1,712	6.2E-04	1,678	1.4E-02	x				AT1G76960	6.0E-112	Metabolism
MT002654	TC102151	Q9LIE6	1.00E-12	hypothetical protein	1,081	5.7E-01	1,716	4.6E-05	1,092	3.2E-01	x				AT3G22160	4.9E-14	unknown
MT008738	TC95824	Q93W66	6.00E-18	hypothetical protein	1,037	6.2E-01	1,722	7.3E-04	1,370	2.7E-03	x				AT1G19530	8.6E-20	transport
MT007687	TC101063	Q8LQB6	0	Oligopeptide transporter 4	1,089	2.9E-01	1,722	6.0E-05	1,010	9.2E-01	x				AT5G64410	0	unknown
MT005293	TC939075	Q8CPQ4	9.00E-04	hypothetical protein	1,102	2.9E-01	1,723	1.2E-03	0,506	9.9E-04	x						unknown
MT001189	TC102009	Q8AQ51	1.00E-116	WRKY transcription factor 11R	1,053	3.9E-02	1,728	1.0E-03	1,041	5.9E-01	x				AT5G04500	1.3E-105	unknown
MT008385	TC107629	Q8AQW5	9.00E-99	expressed protein	1,045	6.4E-01	1,734	6.2E-05	1,092	5.3E-01	x				AT4G27460	3.1E-95	unknown
MT008551	TC108315	B38265	1.00E-140	peroxidase; putative	1,24	4.1E-02	1,745	2.2E-03	1,021	9.3E-01	x				AT2G41480	1.7E-103	Metabolism
MT008661	TC95804	G84825	2.00E-50	zinc finger	1,192	2.0E-01	1,746	4.3E-03	1,156	3.9E-01	x				AT3G55980	7.4E-34	cell wall
MT007173	TC100486	T07678	1.00E-140	xyloglucan endotransglycosylase	0,935	4.0E-01	1,746	1.6E-03	1,397	2.1E-02	x				AT3G23730	2.2E-117	unknown
MT015382	TC100839	T48643	1.00E-103	hypothetical protein	1,533	2.3E-02	1,748	7.4E-04	1,109	4.9E-01	x				AT5G14700	1.2E-98	

MT000163	TC93930	A96615	3,00E-47	disease resistance response protein-related	1,483	7,7E-02	2,837	2,4E-04	1,101	3,8E-01	x	AT1G26910	9,9E-108	Protein
MT000209	BE941365	AAQ2040	0	Cytochrome P450 81E1	2,031	6,3E-02	3,063	1,4E-05	1,244	3,5E-01	x	AT4G37330	7,5E-20	Metabolism
MT000187	TC94309	Q7XJE7	1,00E-163	Basic 7S globulin precursor	2,222	2,2E-02	3,204	2,9E-04	1,280	1,6E-01	x	AT1G03220	5,0E-143	cell wall
MT015080	TC106554	S44370	1,00E-174	chalcone and stilbene synthase family protein	2,644	1,1E-02	3,208	1,3E-04	1,399	6,3E-02	x	AT5G13930	2,1E-135	Metabolism
MT001636	TC106939	Q84Y08	0	cytochrome P450 family protein	1,887	3,2E-02	3,236	1,7E-05	1,550	8,6E-02	x	AT2G42250	9,9E-77	Metabolism
MT003528	TC109496	Q7FNV7	5,00E-48	Pathogenesis-related protein class 10	1,367	2,2E-01	3,283	3,8E-06	0,981	9,2E-01	x			Cell rescue
MT007268	TC100399	S14222	1,00E-128	aldol/keto reductase; putative	1,429	1,5E-02	3,379	2,6E-06	1,111	2,8E-01	x			Metabolism
MT015148	TC106537	S44370	1,00E-104	chalcone synthase	2,384	1,9E-02	3,577	3,9E-06	1,647	3,3E-02	x	AT5G13930	1,6E-171	Metabolism
MT014241	TC98312	Q8LK06	4,00E-58	isoflavone reductase	2,625	2,6E-02	4,154	7,6E-05	1,616	2,2E-02	x	AT1G19540	1,1E-28	Metabolism
MT015144	TC106559	S35164	6,00E-66	chalcone synthase	3,292	3,0E-02	4,43	7,1E-05	1,776	4,5E-02	x	AT5G13930	2,8E-56	Metabolism
MT015072	TC106539	S35164	0	chalcone synthase	2,773	8,0E-03	1,537	1,8E-04	1,372	1,5E-01	x	AT5G13930	2,5E-171	Metabolism
MT003514	TC109407	T48228	3,00E-55	Putative wall-associated receptor kinase-like 20 precursor	1,555	1,0E-03	1,572	6,3E-03	1,130	2,3E-01	x	AT5G02070	7,5E-53	unknown
MT001268	TC107655	Q7XJE7	1,00E-129	Basic 7S globulin 2 precursor	1,585	8,2E-03	1,791	6,2E-04	1,468	5,0E-02	x	AT1G03220	8,9E-105	cell wall
MT015934	TC99305	Q7X6N6	2,00E-35	hypothetical protein	1,673	3,2E-03	1,791	2,8E-05	0,923	6,1E-01	x	AT4G27250	9,1E-14	Metabolism
MT015062	TC106556	JC4780	1,00E-179	peroxidase; putative	1,948	7,1E-03	1,878	4,2E-03	1,166	2,1E-01	x	AT5G06730	1,0E-96	Metabolism
MT014283	TC94321	T09399	1,00E-140	caffoyl-CoA 3-O-methyltransferase; putative	2,175	1,6E-03	1,974	2,6E-05	1,232	9,7E-02	x	AT4G26220	1,9E-70	Metabolism
MT007704	TC100992	Q8GUN1	1,00E-136	DNA repair ATPase-related	1,557	6,3E-03	2,158	2,3E-04	1,351	3,5E-02	x	AT4G30090	3,2E-31	unknown
MT014271	TC100398	Q40310	1,00E-176	aldol/keto reductase family protein	2,471	1,2E-03	2,377	4,3E-05	1,661	1,8E-02	x	AT1G06080	4,5E-12	Metabolism
MT015058	TC106558	JC4780	0	peroxidase; putative	1,635	5,5E-03	2,538	8,7E-04	1,412	1,7E-01	x	AT5G06730	2,3E-97	Metabolism
MT007870	TC95121	Q84TK8	6,00E-32	hypothetical protein	1,614	6,3E-04	2,572	1,9E-03	1,600	7,1E-02	x	AT1G01490	1,9E-22	unknown
MT014167	TC106314	Q8L6K8	3,00E-74	ABA-responsive protein ABR17.	2,409	7,0E-05	2,603	4,5E-04	1,669	1,7E-01	x			Cell rescue
MT014166	TC106449	Q8L6K8	2,00E-33	ABA-responsive protein ABR17.	2,501	1,0E-03	2,655	3,1E-04	1,393	1,7E-01	x			Cell rescue
MT015147	TC106555	S35165	1,00E-32	Chalcone synthase 2	2,368	1,2E-04	3,378	1,3E-05	1,776	3,1E-02	x	AT5G13930	1,7E-48	Metabolism
MT014270	TC100402	S48850	1,00E-114	aldol/keto reductase; putative	2,602	2,4E-03	3,385	1,5E-04	1,695	9,4E-02	x	AT1G06080	4,5E-12	Metabolism
MT015363	BQ138448	S47140	3,00E-72	ABA-responsive protein ABR18.	2,722	1,9E-03	3,464	2,0E-04	1,689	1,0E-01	x			Cell rescue
MT014269	TC100400	S48850	1,00E-174	chalcone reductase	2,634	1,1E-03	3,626	3,2E-06	1,980	4,4E-02	x	AT1G14780	2,0E-43	Metabolism
MT015083	TC106554	S44370	1,00E-174	chalcone and stilbene synthase family protein	2,041	1,4E-03	3,759	4,7E-05	1,613	3,5E-02	x	AT5G13930	2,5E-171	Metabolism
MT015362	TC100422	S47140	3,00E-73	ABA-responsive protein ABR18.	2,828	6,1E-05	4,088	2,6E-04	1,460	5,8E-02	x			Cell rescue
MT008021	TC107549	Q9XIU9	1,00E-96	myb family transcription factor	1,268	3,2E-01	1,958	4,3E-04	1,527	9,4E-04	x	AT2G31180	3,8E-65	transcription
MT014354	TC94407	BAQ06575	1,00E-169	12-oxophytodienoate reductase 2	0,935	4,3E-01	2,356	7,9E-09	1,695	2,1E-03	x	AT1G76690	5,1E-157	Metabolism
MT015279	TC103145	Q24101	5,00E-55	MN5	1,017	8,4E-01	2,952	3,7E-07	2,137	1,5E-04	x	AT5S55450	9,4E-14	Cell rescue
MT015278	TC106608	Q24101	4,00E-55	MN5	0,93	7,1E-01	3,295	8,3E-06	1,980	4,6E-05	x	AT5S55450	9,5E-14	Cell rescue
MT013679	TC97653	Q84Q74	5,00E-67	SH3 domain-containing protein 2	2,782	3,6E-02	3,847	1,4E-04	1,686	4,2E-03	x	AT4G19810	5,7E-94	unknown
MT015466	TC95122	Q84TK8	4,00E-24	hypothetical protein	1,563	5,6E-03	1,718	1,3E-03	1,805	7,6E-03	x	AT1G01490	4,6E-21	Cell rescue
MT015146	TC106550	S35166	0	chalcone synthase	3,391	3,9E-03	5,084	8,7E-05	1,908	6,0E-03	x	AT5G13930	2,5E-171	Metabolism

Sur exprimés



Groupe F sous-exprimé

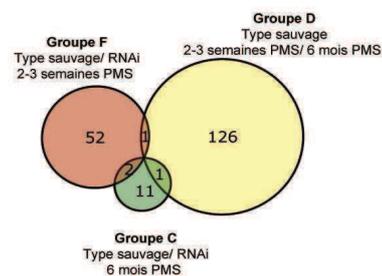
Données supplémentaires S2

Groupe de gènes montrant une diminution d'expression analysée avec la puce à ADNc Mt16kOL1plus (Foldchange<0,666 et p-value<0,01).

La différence d'expression est déterminée sur des embryons de graines de type sauvage contre les embryons RNAi imbibés pendant six heures deux à trois semaines de post maturation à sec

No MT	TIGR_MtG18	Blast NCBI GenBank ID	E-value	Produit du gene	WT 2-3sem/ AR	WT 6m	p-value	WT/ RNAi 2-3sem AR	p-value	WT/ RNAi 6m AR	p-value	F	F+S	F+D	Blast A.t. Locus tag	E-value	Classification
MT000970	TC107409	Q8VWL8	0	glycosyl hydrolase family 1 protein	1,168		2,8E-03	0,387	3,7E-03	1,096	3,8E-01	x			AT3G18080	2,5E-219	cell wall
MT015728	TC102411	S04046	3,00E-30	Late embryogenesis abundant protein D-34	1,165		3,3E-01	0,419	4,1E-04	0,809	1,4E-01	x			AT3G22490	7,9E-26	Cell rescue
MT015870	B312202	T05719	1,00E-29	metallothionein-like protein	1,151		9,1E-02	0,421	1,8E-04	0,398	1,5E-02	x			AT2G42000	1,6E-20	unknown
MT015727	TC102412	S04046	3,00E-30	Late embryogenesis abundant protein D-34	0,996		9,6E-01	0,429	1,4E-04	0,852	4,2E-02	x			AT3G22490	7,9E-26	Cell rescue
MT010741	TC108710	Q8VXL4	4,00E-64	17.8 kDa class I heat shock protein	0,833		2,8E-02	0,442	3,7E-03	0,692	4,2E-02	x			AT5G59720	2,3E-58	Cell rescue
MT004897	TC111644	Q8VWL8	7,00E-25	glycosyl hydrolase family 1 protein	1,197		1,5E-01	0,463	5,2E-03	1,179	8,0E-02	x			AT3G18080	2,0E-23	cell wall
MT003764	TC108198	S53498	1,00E-158	Heat shock 70 kDa protein.	0,593		5,2E-01	0,478	4,3E-03	0,918	3,5E-01	x			AT3G12580	2,1E-302	Cell rescue
MT015439	TC100458	S16247	3,00E-80	18.2 kDa class I heat shock protein.	1,865		1,4E-01	0,491	9,7E-04	0,855	1,6E-01	x			AT2G29500	5,8E-62	Cell rescue
MT002652	TC108940	Q85997	1,00E-162	Glucosyltransferase-2	0,982		8,4E-01	0,503	2,3E-03	1,040	7,5E-01	x			AT1G22400	7,6E-76	unknown
MT014499	TC100455	S16247	9,00E-80	18.2 kDa class I heat shock protein.	0,934		4,9E-01	0,527	5,3E-04	0,900	1,1E-01	x			AT2G29500	1,5E-61	Cell rescue
MT000905	TC100787	AAQ20042	0	cytochrome P450 family protein	0,68		1,4E-02	0,504	9,2E-04	1,000	1,0E+00	x			AT3G28740	3,2E-148	Metabolism
MT001639	TC101362	S47177	4,00E-99	Lactylglutathione lyase	1,175		4,0E-02	0,556	2,8E-03	1,330	1,1E-01	x			AT1G17180	2,2E-76	Cell rescue
MT015973	TC105103	T34137	3,00E-20	hypothetical protein	1,099		2,6E-01	0,557	1,1E-03	2,222	2,8E-03	x			AT3G28770	1,1E-15	transcription
MT015437	TC100454	S16247	1,00E-78	18.2 kDa class I heat shock protein.	0,746		1,4E-02	0,568	7,8E-03	0,831	2,5E-02	x			AT2G29500	2,2E-60	Cell rescue
MT010465	TC109219	T06329	1,00E-22	basic helix-loop-helix	0,686		6,1E-03	0,583	2,9E-05	1,133	1,9E-01	x			AT4G37850	9,3E-23	unknown
MT013511	TC102178	BAD09471	2,00E-49	glycine-rich protein	1,228		6,1E-03	0,585	4,0E-03	0,853	6,4E-03	x			AT4G32740	8,0E-43	unknown
MT007192	TC106694	T08896	1,00E-107	Embryonic abundant protein VF30.1 precursor.	1,312		9,3E-02	0,587	1,7E-05	0,758	2,3E-04	x			AT5G25610	6,6E-34	unknown
MT011574	TC101361	Q9FQE9	1,00E-102	Lactylglutathione lyase	0,921		8,1E-01	0,59	7,2E-03	1,183	6,3E-01	x			AT1G78380	5,3E-75	Cell rescue
MT014205	TC100256	AA700599	4,00E-21	Plant lipid transfer/seed storage/trypsin-alpha amylase inhibitor	1,882		2,0E-04	0,602	3,3E-03	0,703	1,3E-02	x			unknown		unknown
MT015151	TC107014	Q24092	1,00E-108	hypothetical protein	0,748		4,5E-02	0,605	5,9E-03	0,750	5,2E-02	x			unknown		unknown
MT009225	TC96031	Q9SHJ6	2,00E-35	myosin heavy chain-related	0,814		3,5E-02	0,606	8,9E-07	0,917	3,4E-01	x			AT1G06530	2,9E-35	unknown
MT015324	TC108916	T00809	1,00E-132	eslerase, putative	1,388		1,3E-02	0,606	1,3E-04	1,517	9,0E-03	x			AT2G41530	2,2E-124	unknown
MT015266	TC106693	T08896	1,00E-116	Embryonic abundant protein USP92 precursor.	1,435		9,9E-02	0,607	4,0E-03	1,066	7,5E-01	x			AT5G25610	2,5E-32	unknown
MT016432	CA990321	no hits found		unknown	1,399		5,2E-02	0,607	1,4E-04	1,506	1,8E-02	x			unknown		unknown
MT014825	TC111162	T06371	1,00E-105	unknown	0,655		1,2E-04	0,609	4,8E-04	1,550	2,4E-02	x			AT1G22360	8,2E-92	unknown
MT015129	TC100264	Q9M603	5,00E-66	hypothetical protein	1,331		9,4E-02	0,613	1,4E-05	1,399	3,8E-03	x			AT1G54410	3,2E-14	Cell rescue
MT003270	TC103702	Q9MA97	1,00E-17	hypothetical protein	1,024		7,8E-01	0,614	1,6E-03	1,064	3,4E-01	x			AT5G46730	8,0E-14	Cell rescue
MT016311	BFC33960	no hits found		unknown	1,465		4,4E-02	0,619	1,3E-07	1,681	4,5E-02	x			unknown		unknown
MT015127	TC94049	A84629	3,00E-39	expressed protein	0,752		1,2E-02	0,62	1,3E-03	0,839	9,3E-02	x			unknown		unknown
MT014977	TC111710	Q9LJN8	7,00E-20	hypothetical protein	1,378		4,5E-03	0,621	7,8E-04	0,976	7,7E-01	x			AT3G26380	7,0E-20	unknown
MT004365	PC-MT004365	T06535	1,00E-114	Heat shock factor protein HSF30	1,394		1,3E-10	0,623	7,4E-17	1,529	4,0E-10	x			AT2G26150	1,5E-86	transcription
MT009021	TC108254	Q8GSM7	1,00E-33	transferase	1,717		1,7E-01	0,623	5,0E-05	1,145	1,2E-01	x			AT5G48930	7,2E-68	unknown
MT010925	TC104834	Q6GKW4	3,00E-16	hypothetical protein	1,318		1,3E-02	0,624	5,6E-05	1,575	1,9E-02	x			AT2G04795	2,4E-15	unknown
MT009839	TC102424	Q9FM50	1,00E-151	2-nitropropane dioxygenase precursor	1,098		3,8E-01	0,626	8,6E-03	0,980	9,0E-01	x			AT5G64250	4,0E-141	unknown
MT009448	TC96236	S55521	1,00E-146	beta-hydroxylase	0,673		1,0E-01	0,63	1,6E-04	0,867	6,1E-01	x			AT1G12240	1,0E-96	Metabolism
MT014012	TC100571	Q9FQE3	2,00E-83	glutathione S-transferase; putative	0,687		1,3E-03	0,633	8,2E-03	1,181	6,3E-02	x			AT3G09270	7,4E-46	Cell rescue
MT013984	TC111916	Q9SR38	6,00E-37	expressed protein	1,282		1,2E-02	0,633	2,5E-05	1,325	3,1E-02	x			unknown		unknown
MT014550	TC95611	S56716	0	serine/threonine protein kinase; putative	1,416		6,4E-04	0,636	3,2E-05	1,401	1,8E-02	x			AT1G10940	1,3E-165	Signaling
MT011908	TC106056	Q8CJUP0	1,00E-29	hypothetical protein	1,201		7,7E-02	0,64	5,8E-05	1,220	7,4E-03	x			unknown		unknown
MT008445	TC101298	Q94HP3	1,00E-136	Limonoid UDP-glucosyltransferase	0,797		7,2E-03	0,643	2,5E-03	1,022	5,1E-01	x			AT4G14090	3,7E-106	Cell rescue
MT009918	TC96521	S04046	6,00E-53	Late embryogenesis abundant protein D-34	0,97		7,4E-01	0,643	5,7E-03	0,751	1,2E-02	x			AT3G22500	2,8E-44	unknown
MT007400	TC106853	Q9M9E7	1,00E-148	Indole-3-acetate beta-glucosyltransferase	0,691		1,6E-03	0,647	8,0E-04	1,047	7,8E-01	x			AT1G05680	1,6E-112	Cell rescue
MT004773	TC109542	B84729	0	Heat shock cognate 70 kDa protein.	1,019		6,7E-01	0,648	4,1E-03	0,944	3,0E-01	x			AT2G31210	1,9E-230	Cell rescue
MT015828	TC94917	Q7XZD0	3,00E-33	hypothetical protein	1,377		2,5E-02	0,649	6,8E-05	1,408	1,2E-02	x			AT2G15490	1,6E-17	Metabolism
MT009612	TC95948	HS83_IPONI	0	Heat shock protein 81-1	1,431		8,5E-04	0,65	1,6E-04	1,460	7,4E-02	x			AT5G52640	0	Cell rescue
MT002235	TC96127	Q49900	1,00E-63	hypothetical protein	0,795		8,5E-02	0,651	3,0E-04	0,560	9,4E-02	x			AT2G22795	2,8E-12	unknown
MT004002	TC111110	Q8F9Y5	5,00E-32	expressed protein	1,238		9,9E-02	0,652	3,4E-03	0,930	3,3E-02	x			AT5G49600	1,2E-31	unknown
MT013888	TC96799	P93510	6,00E-43	Em6 LEA	1,429		2,1E-02	0,655	4,7E-04	1,182	2,4E-01	x			AT2G04070	7,7E-35	Cell rescue
MT002727	TC100419	AA546245	4,00E-28	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase	0,768		1,0E-01	0,657	2,9E-05	0,895	2,1E-01	x			AT4G11820	3,9E-198	Metabolism
MT004561	TC95607	Q9M6B6	1,00E-20	Plant lipid transfer	0,96		7,2E-01	0,657	1,0E-03	0,997	9,7E-01	x			AT3G08770	8,2E-15	unknown
MT013066	TC101882	Q84SN9	2,00E-23	hypothetical protein	1,089		3,1E-01	0,657	2,8E-05	0,923	1,4E-01	x			AT5G43490	4,8E-12	unknown
MT011983	TC106023	Q9LJN8	3,00E-45	alpha-galactosidase family protein / melibiase family protein	1,429		6,2E-02	0,66	1,7E-03	1,248	7,0E-02	x			AT3G26380	5,6E-48	unknown
MT007309	TC94500	T08124	1,00E-104	Ferritin-2; chloroplast precursor	0,998		9,9E-01	0,642	4,5E-05	0,527	1,5E-04	x			AT3G11050	2,7E-87	Cell rescue
MT001063	TC107811	ORLKG0	2,00E-50	dormancy/auxin associated family protein	1,063		4,3E-01	0,643	5,1E-03	0,633	6,7E-04	x			AT1G56220	4,4E-32	unknown
MT0016071	TC97409	HHPM17	8,00E-77	17.1 kDa class II heat shock protein.	0,642		7,1E-03	0,561	4,7E-03	1,052	2,9E-01	x			AT5G12020	1,7E-48	Cell rescue

Sous exprimés



Groupe S surexprimé

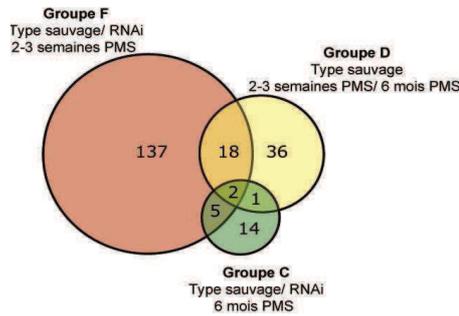
Données supplémentaires S3

Groupe de gènes montrant une augmentation d'expression analysée avec la puce à ADNc Mt16kOLI1plus (Foldchange>1,5 et p-value<0,01).

La différence d'expression est déterminée sur des embryons de graines de type sauvage contre des embryons RNAi imbibées pendant six heures après six mois de post maturation à sec

No MT	TIGR_MtGIs	Blast NCBI GenBank ID	E-value	Produit du gene	WT 2-3sem/ WT 6m AR	p-value	WT/ RNAi 2 3sem AR	p-value	WT/ RNAi 6m AR	p-value	S	F+S	F+D	Tous	Blast At. Locus tag	E-value	Classification
MT015973	TC105103	Q9LW95	3,00E-20	hypothetical protein	1,099	2,6E-01	0,557	1,1E-03	2,222	2,8E-03	x				AT3G28770	1,1E-15	unknown
MT015542	TC107738	O82615	2,00E-27	wound-responsive protein; putative	1,23	3,9E-02	1,175	2,0E-01	1,527	4,9E-03	x				AT4G10270	1,6E-27	stress
MT015324	TC106916	T00809	1,00E-132	esterase; putative	1,388	1,3E-02	0,606	1,3E-04	1,517	9,0E-03	x				AT2G41530	2,2E-124	metabolism
MT013169	TC105900	Q8VYC6	3,00E-26	expressed protein	1,388	3,6E-02	0,699	6,8E-05	1,610	3,5E-04	x				AT1G19400	1,8E-26	unknown
MT011999	CX534757	AAO04802	5,00E-71	hypothetical protein	1,375	5,3E-03	0,672	1,4E-04	1,502	2,5E-03	x				AT4G17030	6,9E-27	unknown
MT010141	TC102972	Q9M3Z7	1,00E-90	Subtilisin inhibitor CLSI-II	1,26	4,9E-02	0,72	4,1E-04	1,527	3,0E-03	x				AT1G17860	8,9E-18	proteine degradation
MT008472	TC107927	O53022	3,00E-71	Basic 7S globulin precursor	1,233	2,8E-02	1,091	2,3E-01	1,553	1,0E-02	x				AT1G03220	3,5E-58	cell wall
MT006590	TC110945	Q9FG22	4,00E-30	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein	1,449	5,2E-03	0,767	4,3E-05	1,608	1,3E-03	x				AT5G06480	1,5E-32	unknown
MT004365	PC-MT004365	T06535	1,00E-114	Heat shock factor protein HSF30	1,394	1,3E-10	0,623	7,4E-17	1,529	4,0E-10	x				AT2G26150	1,5E-86	stress
MT004106	TC108813	Q9FQL7	0,00E+00	Kinesin-like	1,14	1,4E-01	1,219	1,1E-02	1,658	4,2E-03	x				AT5G65930	6,9E-200	development
MT003752	TC96774	Q8GWK6	9,00E-72	NAC domain-containing protein 19	1,411	1,9E-02	0,717	5,4E-04	1,570	4,8E-03	x				AT5G64530	3,2E-68	transcription
MT001199	TC107840	Q9LJB4	2,00E-48	Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase	1,215	2,4E-02	0,803	6,5E-04	1,504	5,3E-03	x				AT3G29590	3,4E-48	metabolism
MT000882	TC107288	BAD16930	1,00E-179	Putative NAD-dependent isocitrate dehydrogenase.	1,429	1,3E-03	0,691	6,1E-06	1,637	3,2E-03	x				AT4G35260	5,8E-165	metabolism
MT000489	TC107107	Q9XIW0	1,00E-135	CBL-interacting protein kinase 7	1,407	7,0E-05	0,735	2,4E-03	1,515	9,1E-03	x				AT3G23000	3,4E-128	signaling
MT006225	TC107945	AAS55083	1,00E-156	Flavonol-3-O-glycoside-7-O-glucosyltransferase 1	1,569	9,9E-03	0,672	3,8E-03	1,709	5,2E-04	x				AT4G34131	3,1E-130	metabolism
MT015279	TC103145	O24101	5,00E-55	MIN5 protein precursor.	1,017	8,4E-01	2,952	3,7E-07	2,137	1,5E-04	x				AT5G55450	9,4E-14	stress
MT015278	TC100608	O24101	4,00E-55	MIN5 protein precursor.	0,93	7,1E-01	3,295	8,3E-06	1,980	4,6E-05	x				AT5G55450	9,5E-14	stress
MT014354	TC94407	BAD06575	1,00E-169	12-oxophytodienoate reductase 2	0,935	4,3E-01	2,356	7,9E-09	1,695	2,1E-03	x				AT1G76690	5,1E-157	metabolism
MT013679	TC97653	Q8AQ74	5,00E-67	SH3 domain-containing protein 2	2,782	3,6E-02	3,847	1,4E-04	1,686	4,2E-03	x				AT1G31440	1,9E-67	unknown
MT008021	TC107549	Q9XIU9	1,00E-96	myb family transcription factor	1,268	3,2E-01	1,958	4,3E-04	1,527	9,4E-04	x				AT2G31180	3,8E-65	transcription
MT015148	TC106530	EC 2.3.1.74	0,00E+00	chalcone synthase	3,391	3,9E-03	5,064	6,7E-05	1,968	6,0E-03	x				AT5G13930	2,5E-171	metabolism
MT015466	TC95122	Q84TK8	4,00E-24	hypothetical protein	1,563	5,6E-03	1,718	1,3E-03	1,805	7,6E-03	x				AT1G01490	4,6E-21	unknown

Sur exprimés



Groupe S sous-exprimé

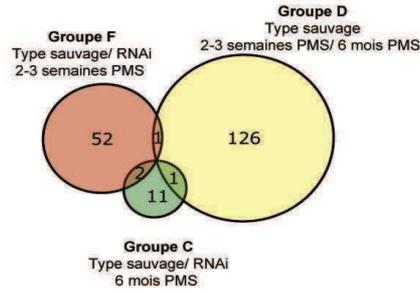
Données supplémentaires S4

Groupe de gènes montrant une diminution d'expression analysée avec la puce à ADNc Mt16kOLI1plus (Foldchange<0,666 et p-value<0,01).

La différence d'expression est déterminée sur des embryons de graines de type sauvage contre des embryons RNAi imbibées pendant six heures après six mois de post maturation à sec

No MT	TIGR_MtGI8	Blast NCBI GenBank ID	E-value	Produit du gene	WT 2-3sem/ WT 6m AR	p-value	WT/ RNAi 2-3sem AR	p-value	WT/ RNAi 6m AR	p-value	S	F+S	F+D	Blast A.t. Locus tag	E-value	Classification
MT014100	TC93922	O23758	2,00E-48	Non-specific lipid-transfer protein precursor	0,947	7,5E-01	0,845	1,3E-01	0,405	8,5E-03	x			AT5G59320	4,4E-32	stress
MT005283	TC99075	Q6CQE6	9,00E-04	hypothetical protein	1,102	2,9E-01	1,723	1,2E-03	0,506	9,9E-04	x					unknown
MT000153	TC106656	Q40984	1,00E-151	glycosyl hydrolase family 1	0,669	3,3E-03	0,754	8,1E-04	0,596	4,9E-03	x			AT5G24550	4,4E-116	cell wall
MT014114	TC94143	O23758	5,00E-46	Non-specific lipid-transfer protein precursor	1,163	1,0E-01	0,979	6,9E-01	0,601	3,8E-04	x			AT2G38540	7,2E-32	stress
MT010009	TC98420	Q39862	4,00E-97	Homeobox-leucine zipper protein HAT4	0,917	4,2E-02	1,094	1,1E-01	0,616	1,0E-03	x			AT4G16780	6,9E-82	transcription
MT007586	TC107222	Q9ATR0	1,00E-165	cell elongation protein / DWARF1 / DIMINUTO	0,95	5,2E-01	1,055	2,3E-01	0,621	4,9E-03	x			AT3G19820	6,0E-257	development
MT001018	TC94970	Q6QIL2	1,00E-145	NIP2	0,63	1,4E-02	1,069	4,8E-01	0,630	2,1E-03	x			AT4G18910	1,8E-97	transport
MT000088	TC106330	Q947H2	2,00E-85	60S ribosomal protein L17-1.	0,728	1,8E-03	1,047	3,4E-01	0,644	1,4E-04	x			AT1G27400	1,5E-79	translation
MT013063	TC104086	Q8LBQ5	8,00E-74	Putative receptor protein kinase CRINKLY4 precursor	1,197	1,5E-01	1,298	1,0E-01	0,649	1,5E-03	x			AT5G63410	1,5E-70	signaling
MT007664	TC107333	T07634	0	Putative monocopper oxidase precursor expressed protein	0,854	7,7E-02	0,842	9,9E-03	0,652	7,0E-03	x			AT4G12420	1,3E-254	metal binding
MT009453	TC102602	Q8GUK5	1,00E-96	expressed protein	0,569	1,9E-02	1,079	3,7E-01	0,657	2,0E-03	x			AT3G05625	1,2E-91	unknown
MT000468	TC94619	Q9ZS12	1,00E-52	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 8	0,511	5,9E-04	1,194	5,0E-02	0,650	9,7E-04	x			AT4G00660	4,1E-61	metabolism
MT007309	TC94500	FR12_VIGUN	1,00E-104	Ferritin-2; chloroplast precursor	0,998	9,8E-01	0,442	4,8E-05	0,527	1,5E-04		x		AT3G11050	2,7E-87	stress
MT001063	TC107811	Q8LKG0	2,00E-50	dormancy/auxin associated family protein	1,063	4,3E-01	0,643	5,1E-03	0,633	6,7E-04		x		AT1G56220	4,4E-32	unknown

Sous exprimés



Groupe D surexprimé

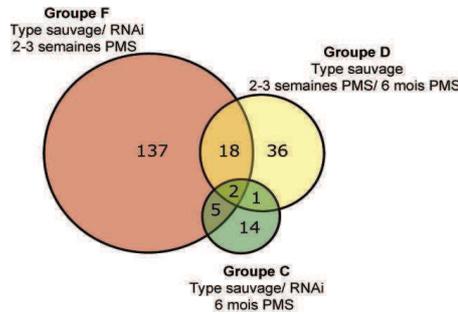
Données supplémentaires S5

Groupe de gènes montrant une augmentation d'expression analysée avec la puce à ADNc Mt16kOL1plus (Foldchange>1,5 et p-value<0,01).

La différence d'expression est déterminée sur des embryons de graines de type sauvage imbibés six heures après deux à trois versus six mois de post maturation à sec

No MT	TIGR_MtG18	Blast NCBI GenBank ID	E-value	Produit du gène	WT 2-3sem/ WT 6m AR	p-value	WT/ RNAi 2-3sem AR	p-value	WT/ RNAi 6m AR	p-value	D	F+S	F+D	Tous	Blast A.t. Locus tag	E-value	Classification
MT015157	TC100250	S37241	1,00E-169	Legumin J precursor	4,027	0,0037	1,192	0,0005	0,978	0,8480	x				AT5G44120	1.6E-67	reserve
MT007040	TC100253	S37241	0	Legumin J precursor	3,509	0,0060	1,066	0,1400	1,116	0,1210	x				AT5G44120	1.9E-91	reserve
MT014834	TC104233	No hits found	0	hypothetical protein	2,54	0,0021	1,01	0,8840	1,104	0,2350	x						unknown
MT000117	TC100252	S14393	0	Legumin A precursor	2,312	0,0074	1,027	0,7410	0,730	0,0000	x				AT1G03880	5.9E-86	reserve
MT011749	TC104233	Q9LDN8	0,01	hypothetical protein	2,311	0,0000	0,971	0,6750	1,025	0,7210	x						unknown
MT000116	TC100259	S14393	0	Legumin A precursor	2,237	0,0001	1,257	0,0186	0,740	0,0266	x				AT1G03880	6.6E-76	reserve
MT014205	TC100256	AAT00599	4,00E-21	hypothetical protein	1,882	0,0002	0,602	0,0033	0,703	0,0134	x						unknown
MT006780	TC112411	Q9XES7	1,00E-26	hypothetical protein	1,872	0,0057	1,11	0,0340	0,897	0,1030	x						unknown
MT015017	TC095572	Q7XYX9	2,00E-16	MISNF4b	1,872	0,0001	1,337	0,0142	0,978	0,8740	x						signaling
MT000350	TC094340	T06459	0	Sucrose-binding protein precursor	1,829	0,0032	0,89	0,2160	0,887	0,3480	x				AT3G22640	1.4E-28	unknown
MT005189	TC05878	AAO27827	1,00E-09	hypothetical protein	1,696	0,0002	1,268	0,0170	0,978	0,7200	x						unknown
MT005853	TC103779	AAP49688	1,00E-28	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	1,658	0,0016	0,797	0,0155	1,318	0,0159	x				AT5G59540	7.5E-100	metabolism
MT008296	TC107621	Q9LLQ6	1,00E-147	short-chain dehydrogenase/reductase	1,657	0,0040	1,297	0,0042	1,030	0,6510	x						metabolism
MT014825	TC111162	T06371	1,00E-105	Cytokinin-O-glucosyltransferase 2	1,655	0,0001	0,609	0,0005	1,550	0,0237	x				AT1G22360	2.8E-92	metabolism
MT007766	TC107226	Q8LD97	3,00E-73	lactoylglutathione lyase family protein	1,645	0,0027	1,236	0,0016	1,117	0,1080	x				AT1G80160	2.2E-69	stress
MT015737	TC102741	Q9FL02	3,00E-29	expressed protein	1,641	0,0013	0,866	0,0303	0,955	0,4750	x				AT5G66780	5.8E-30	unknown
MT006768	TC104777	Q9LVN8	0,001	hypothetical protein	1,633	0,0006	1,042	0,4540	1,164	0,1690	x						unknown
MT014670	TC05880	Q6F4I8	1,00E-34	glutamate-cysteine ligase	1,625	0,0011	0,941	0,3000	1,152	0,1530	x				AT4G23100	1.3E-62	stress
MT003446	TC101513	D84900	2,00E-32	IQ domain-containing protein	1,609	0,0028	0,846	0,2720	1,447	0,0314	x				AT2G46240	2.3E-27	unknown
MT010857	TC09744	Q96674	2,00E-10	hypothetical protein	1,595	0,0015	0,799	0,0000	1,131	0,1430	x				AT1G65090	3.5E-11	unknown
MT015895	TC104435	T07092	1,00E-66	calceosin-related family protein	1,594	0,0098	0,74	0,0318	0,758	0,0158	x				AT4G26740	7.4E-85	Cell rescue
MT014789	TC104435	T07092	1,00E-66	calceosin-related family protein	1,591	0,0027	0,719	0,0135	0,756	0,0262	x				AT4G26740	7.4E-85	Cell rescue
MT008780	TC101811	AAS49101	6,00E-39	PM32	1,59	0,0015	1,188	0,0102	1,100	0,1420	x				AT5G44310	4.4E-39	Cell rescue
MT008631	TC108056	T07661	2,00E-83	PM3	1,582	0,0011	0,976	0,6170	1,148	0,0057	x				AT1G04560	1.3E-66	stress
MT000332	TC106669	S17444	3,00E-75	histidine ammonia-lyase	1,563	0,0018	0,993	0,8920	1,348	0,0248	x				AT2G37040	0	metabolism
MT008226	TC107542	T47981	3,00E-56	Homeobox-leucine zipper protein ATHB-12	1,552	0,0082	0,939	0,0438	0,665	0,0595	x				AT3G61890	2.7E-55	transcription
MT012550	TC09260	Q6RVE2	3,00E-20	hypothetical protein	1,549	0,0004	0,742	0,0005	1,290	0,0366	x				AT4G28440	9.9E-19	unknown
MT002226	TC096173	H84857	6,00E-33	expressed protein	1,532	0,0023	0,679	0,0002	1,585	0,0350	x						unknown
MT015506	TC107683	Q9AR57	1,00E-113	hypothetical protein	1,532	0,0010	1,07	0,3570	1,094	0,0774	x				AT3G25290	5.5E-25	unknown
MT012588	TC097834	AAS99701	8,00E-13	hypothetical protein	1,523	0,0002	0,816	0,0021	1,225	0,0262	x				AT5G56370	9.4E-18	unknown
MT013480	TC100063	Q8LP18	6,00E-43	agenet domain-containing protein	1,522	0,0036	1,018	0,8880	0,881	0,1980	x						unknown
MT010574	TC097201	Q9SML3	1,00E-130	cytochrome P450 family protein	1,513	0,0061	1,379	0,0097	1,188	0,1380	x				AT1G33720	1.8E-67	unknown
MT011874	TC101850	Q8LDX8	1,00E-30	expressed protein	1,513	0,0064	0,797	0,0042	1,233	0,1510	x				AT5G39210	2.8E-30	unknown
MT015572	TC102424	No hits found	0	unknown	1,511	0,0090	2,179	0,0597	0,545	0,1070	x						unknown
MT011941	TC096236	Q6ZTZ3	2,00E-72	Vacuolar acid invertase	1,509	0,0078	1,27	0,0048	1,188	0,0180	x				AT2G23640	1.2E-31	metabolism
MT013138	TC110894	T01531	0,062	Probable glycerol-3-phosphate acyltransferase 8	1,5	0,0000	0,767	0,0008	1,339	0,0273	x				AT4G00400	5.8E-46	metabolism
MT015362	TC100422	S47140	3,00E-73	ABA-responsive protein ABR18.	2,828	0,0001	4,088	0,0003	1,460	0,0582	x						Cell rescue
MT015072	TC106539	S35164	0	chalcone synthase	2,773	0,0080	1,537	0,0002	1,372	0,1480	x				AT5G13930	2.5E-171	metabolism
MT015363	BQ138448	S47140	3,00E-72	ABA-responsive protein ABR18.	2,722	0,0019	3,464	0,0002	1,689	0,1030	x						Cell rescue
MT014269	TC100400	S48850	1,00E-114	expressed protein	2,634	0,0011	3,626	0,0000	1,980	0,0437	x				AT1G14780	2.0E-43	unknown
MT014270	TC100402	S48850	1,00E-114	aldo/keto reductase; putative	2,602	0,0024	3,385	0,0002	1,695	0,0941	x				AT1G60680	4.5E-12	metabolism
MT014166	TC106449	Q8L6K8	2,00E-33	ABA-responsive protein ABR17.	2,501	0,0010	2,655	0,0003	1,393	0,1650	x						Cell rescue
MT014271	TC100398	Q40310	1,00E-176	aldo/keto reductase family protein	2,471	0,0012	2,377	0,0000	1,661	0,0183	x				AT1G60680	4.5E-12	metabolism
MT014167	TC106314	Q8L6K8	3,00E-74	ABA-responsive protein ABR17.	2,409	0,0001	2,603	0,0005	1,669	0,1680	x						Cell rescue
MT015147	TC106555	S35165	1,00E-32	Chalcone synthase 2	2,388	0,0001	3,378	0,0000	1,776	0,0309	x				AT5G13930	1.7E-48	metabolism
MT014283	TC094321	T09399	1,00E-140	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase; putative	2,175	0,0016	1,974	0,0000	1,232	0,0969	x				AT4G26220	1.9E-70	metabolism
MT015083	TC106554	S44370	1,00E-174	chalcone and stilbene synthase family protein	2,041	0,0014	3,759	0,0000	1,613	0,0347	x				AT5G13930	2.5E-171	metabolism
MT015062	TC106556	JC4780	1,00E-179	peroxidase; putative	1,948	0,0071	1,878	0,0042	1,166	0,2140	x				AT5G06730	1.0E-96	cell wall
MT015934	TC100419	Q7X6N6	2,00E-35	hypothetical protein	1,673	0,0032	1,791	0,0000	0,923	0,6100	x				AT4G27250	9.1E-14	unknown
MT015958	TC106558	JC4780	0	peroxidase; putative	1,635	0,0055	2,538	0,0009	1,412	0,1650	x				AT5G06730	2.3E-97	cell wall
MT007670	TC05121	Q84TK8	6,00E-32	hypothetical protein	1,614	0,0006	2,572	0,0019	1,600	0,0707	x				AT1G01490	1.9E-22	unknown
MT001268	TC106023	Q7XJE7	1,00E-129	Basic 7S globulin 2 precursor	1,585	0,0082	1,791	0,0006	1,468	0,0503	x				AT1G03320	8.9E-105	cell wall
MT007704	TC100992	Q8GLN1	1,00E-136	DNA repair ATPase-related	1,557	0,0063	2,158	0,0002	1,351	0,0346	x				AT4G30090	3.2E-31	cell rescue
MT003514	TC109407	T48228	3,00E-55	Putative wall-associated receptor kinase-like 20	1,555	0,0010	1,572	0,0063	1,130	0,2310	x				AT4G02070	7.5E-53	cell wall
MT006225	TC107945	AAS55083	1,00E-156	Flavonol-3-O-glycoside-7-O-glucosyltransferase 1	1,569	0,0099	0,672	0,0038	1,709	0,0005	x				AT4G34131	3.1E-130	metabolism
MT015146	TC106550	S35166	0	chalcone synthase	3,391	0,0039	5,084	0,0001	1,908	0,0060	x				AT5G13930	2.5E-171	metabolism
MT015468	TC05122	Q84TK8	4,00E-24	hypothetical protein	1,563	0,0056	1,718	0,0013	1,805	0,0076	x				AT1G01490	4.6E-21	unknown

Sur exprimés



Groupe D sous-exprimé

Données supplémentaires S6

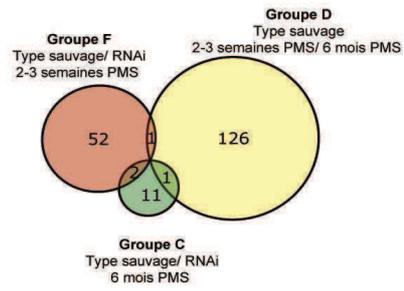
Groupe de gènes montrant une diminution d'expression analysée avec la puce à ADNc Mt16kOL1plus (Foldchange <0,666 et p-value<0,01).

La différence d'expression est déterminée sur des embryons de graines de type sauvage imbibés six heures après deux à trois versus six mois de post maturation à sec

No MT	TIGR_MiG8	Blast NCBI GenBank ID	E-value	Produit du gene	WT 2-3sem/6m AR	WT	p-value	WT/RNAI 2-3sem AR	p-value	WT/RNAI 6m AR	p-value	D	F+SD	Blast At. Locus tag	E-value	Classification	
MT003782	TC97501	No hits found				0.373	5.4E-04	1.239	4.6E-02	0.891	5.5E-01	x					unknown
MT005052	TC111299	B84919	5.00E-76	alpha-1,3-mannosyltransferase/ catalytic		0.475	1.3E-04	1.19	8.5E-03	0.701	4.1E-02	x		AT2G47760	1.0E-80	unknown	
MT014689	TC103094	Q6F1U9	5.00E-24	ribosomal protein		0.486	2.6E-03	1.007	8.7E-01	0.901	9.0E-03	x				unknown	
MT004212	TC103628	Q8LAH6	4.00E-19	NAC domain		0.492	7.1E-03	1.246	1.6E-02	0.837	3.6E-01	x		AT4G31050	4.8E-20	transcription	
MT005343	CC516596	Q8LCL7	9.00E-42	NiRu-like protein 3; chloroplast precursor		0.503	1.3E-04	1.152	2.0E-02	0.767	3.6E-02	x		AT4G25910	1.3E-64	unknown	
MT012259	TC105422	AAM91464	2.00E-49	U3 small nuclear RNA-associated protein 18 homolog.		0.511	1.4E-03	1.312	4.1E-02	0.660	3.2E-02	x		AT5G14050	3.0E-81	DNA binding	
MT004100	TC110657	E71416	5.00E-52	fringe-related protein		0.512	2.5E-06	1.151	1.1E-01	0.716	2.3E-02	x		AT4G15240	5.7E-64	unknown	
MT012246	TC103786	No hits found				0.515	8.6E-05	1.217	2.5E-02	0.626	1.3E-02	x				unknown	
MT005957	TC98739	Q89R95	3.00E-18	Mesozoosporium P-type ATPase-like protein		0.515	6.7E-03	1.176	1.2E-01	0.725	7.6E-03	x		AT4G33520	1.1E-19	metal binding	
MT005941	TC110896	A85343	8.00E-26	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase; putative		0.53	1.7E-04	0.943	2.5E-01	0.828	2.3E-02	x		AT4G03390	4.3E-39	signaling	
MT004236	TC95315	Q8L5Y5	1.00E-134	pantothenate kinase 4		0.531	6.6E-03	1.267	8.0E-03	0.780	8.6E-03	x		AT4G32180	2.1E-126	energie	
MT011094	TC102009	Q9ASZ6	1.00E-18	hypothetical protein		0.533	4.3E-03	1.52	5.3E-05	0.884	4.7E-02	x		AT4G35320	7.5E-21	unknown	
MT013099	TC104426	Q9ATQ4	1.00E-49	Putative receptor protein kinase ZmPK1 precursor		0.534	3.5E-03	0.956	4.7E-01	0.970	6.1E-01	x		AT116090	2.4E-49	unknown	
MT009350	TC102982	BAD10188	1.00E-50	transcription RAU1		0.535	3.7E-03	1.161	1.4E-01	0.791	2.9E-02	x		AT2G42280	2.1E-41	transcription	
MT000050	TC106321	T01285	8.00E-12	18S ribosomal protein		0.545	6.8E-03	1.136	3.4E-01	0.953	6.4E-01	x				unknown	
MT003020	TC96789	BAD06945	1.00E-177	CER1 protein/Lipid transfer protein		0.551	2.1E-03	0.964	6.9E-01	0.763	1.3E-01	x		AT5G57800	4.5E-165	stress	
MT011135	TC102954	No hits found				0.556	3.6E-03	1.108	7.1E-02	0.729	1.2E-01	x				unknown	
MT009340	TC100328	No hits found				0.556	2.8E-03	1.222	1.7E-01	0.885	9.7E-02	x				unknown	
MT013166	TC110117	Q84P54	1.00E-127	gamma aminobutyrate transaminase		0.559	5.4E-03	0.907	7.9E-03	0.908	5.1E-02	x		AT3G22200	1.5E-143	metabolism	
MT012494	TC109764	A33654	3.00E-79	glutathione S-transferase; putative		0.561	2.4E-03	1.173	8.5E-03	0.796	6.2E-02	x		AT3G02700	1.6E-57	stress	
MT000393	TC94109	Q6I673	4.00E-32	cytochrome B561 family protein		0.561	9.2E-05	1.246	3.2E-02	0.702	7.5E-03	x		AT4G25570	3.8E-81	energie	
MT006781	TC105425	Q944H2	1.00E-109	ATP-binding cassette transporter subfamily I		0.564	2.3E-03	1.067	4.9E-01	0.798	6.7E-03	x				transport	
MT001231	TC107841	Q9W4L2	1.00E-105	protein phosphatase 2C family protein / PP2C family protein		0.564	3.8E-03	1.06	4.3E-01	0.788	4.5E-02	x		AT3G02750	1.1E-104	signaling	
MT002056	TC108995	T04590	2.00E-45	expressed protein		0.564	1.0E-03	1.329	3.9E-03	0.807	9.0E-02	x				unknown	
MT011279	TC102038	Q9AVAZ	0.003	hypothetical protein		0.566	7.7E-03	1.093	1.6E-01	0.930	4.4E-01	x				unknown	
MT004472	TC103953	No hits found				0.566	2.8E-03	1.314	1.3E-02	0.885	1.4E-03	x				unknown	
MT002442	TC102632	D86225	6.00E-34	bHLH		0.567	4.8E-03	1.116	7.2E-03	0.993	6.9E-01	x		AT11G09250	1.7E-32	transcription	
MT012445	TC105417	Q9LRP9	2.00E-73	expressed protein		0.57	7.4E-03	0.99	9.0E-01	0.941	5.4E-01	x		AT3G15550	2.2E-69	unknown	
MT011437	TC104008	T52608	1.00E-130	Nitrate/chlorate transporter.		0.575	2.3E-03	0.881	5.4E-02	1.044	7.5E-01	x		AT2G26690	2.3E-145	transport	
MT007068	TC100323	T09944	1.00E-157	Cytochrome P450 72A1		0.576	5.4E-04	0.697	2.8E-04	0.666	3.0E-03	x		AT3G14690	9.0E-144	unknown	
MT009962	TC95108	Q9ZUM2	1.00E-137	tobamovirus multiplication protein 3; putative / TOM3; putative		0.576	1.6E-04	1.272	7.9E-03	0.737	2.0E-02	x		AT2G01280	5.7E-131	stress	
MT000236	TC106680	RSN72	1.00E-143	Chloroplast SDS ribosomal protein L2.		0.578	5.6E-03	0.955	6.4E-01	0.814	1.5E-01	x				translocation	
MT012510	TC105502	No hits found				0.579	3.1E-03	1.063	5.6E-01	0.833	2.3E-01	x				unknown	
MT011160	TC102424	Q9F169	1.00E-42	DnaJ protein family		0.579	1.6E-03	1.091	2.5E-02	0.903	2.1E-01	x		AT5G44800	7.5E-39	stress	
MT009479	TC98236	E84677	5.00E-39	Acid sucrose-6-phosphate hydrolase		0.581	1.8E-04	0.931	1.4E-01	1.094	2.3E-01	x		AT2G27830	3.8E-37	metabolism	
MT012934	TC112072	Q9M571	2.00E-63	phosphoethanolamine N-methyltransferase 1 / PEAMT 1		0.582	5.8E-03	1.001	9.9E-01	0.930	3.9E-01	x		AT11G48600	1.8E-58	metabolism	
MT012326	TC103022	T05077	2.00E-45	expressed protein		0.583	5.6E-03	0.981	8.2E-01	0.887	6.9E-02	x		AT2G30230	4.7E-44	unknown	
MT006148	TC110400	Q93V18	8.00E-91	Tubby-like F-box protein 7		0.585	2.8E-03	1.114	4.0E-02	0.886	1.3E-01	x		AT11G53320	1.6E-89	protein	
MT011055	TC96013	Q40211	1.00E-107	Ras-related protein Rab7.		0.586	3.2E-04	1.098	3.0E-01	0.704	1.4E-02	x		AT11G22740	8.0E-88	nucleotide	
MT005202	TC104348	Q8GUH7	1.00E-65	early-responsive to dehydration protein-related		0.587	6.6E-03	1.191	3.0E-03	0.724	3.8E-01	x		AT3G21620	3.1E-59	stress	
MT003390	TC109049	B96569	1.00E-32	oxidoreductase; ZOG-Fe		0.587	1.0E-03	1.183	9.3E-02	0.790	7.4E-02	x		AT11G52800	1.2E-70	stress	
MT009035	TC98508	P33276	1.00E-22	28S ribosomal RNA		0.588	2.9E-04	1.385	4.6E-04	0.969	7.3E-01	x				translocation	
MT011566	TC98285	No hits found				0.588	8.3E-05	0.798	2.0E-02	0.851	8.6E-02	x				unknown	
MT004418	TC109885	Q7REN5	0.018	hypothetical protein		0.589	7.0E-04	1.15	2.3E-01	0.791	5.4E-02	x				unknown	
MT011211	TC110820	D84609	2.00E-06	hypothetical protein		0.59	1.0E-03	1.271	3.4E-05	0.742	1.3E-02	x				unknown	
MT010529	TC96965	Q9LIR8	3.00E-35	F-box family protein		0.59	4.0E-03	1.105	8.0E-02	0.783	8.8E-03	x		AT3G23880	4.6E-37	protein	
MT003967	TC97992	B86460	1.00E-32	KH domain-containing protein		0.59	8.1E-04	1.146	7.1E-03	0.909	3.5E-01	x		AT4G10070	5.0E-35	unknown	
MT006829	TC111851	Q94B74	6.00E-49	Glycosyl transferase		0.592	1.8E-04	1.115	1.6E-01	0.935	4.9E-01	x		AT4G25430	1.5E-49	metabolism	
MT011806	TC100419	E96514	1.00E-103	3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase		0.596	3.3E-03	1.037	5.8E-01	0.831	1.4E-01	x		AT11G47340	4.8E-97	metabolism	
MT009898	TC97373	T51424	7.00E-13	hypothetical protein		0.598	2.9E-03	1.124	4.8E-02	0.698	1.5E-01	x				unknown	
MT004536	TC92497	AAS99706	2.00E-04	hypothetical protein		0.598	7.8E-05	1.097	2.8E-01	0.921	2.6E-01	x				unknown	
MT011189	TC110603	Q8GVK7	4.00E-47	alpha galactosidase		0.599	9.8E-03	1.127	1.1E-01	0.816	5.8E-02	x		AT5G14280	3.5E-46	metabolism	
MT014923	TC110735	No hits found				0.6	3.6E-03	1.045	4.8E-01	1.196	1.2E-01	x				unknown	
MT014504	TC94150	Q8ET40	0.048	hypothetical protein		0.601	3.9E-03	1.093	2.3E-01	1.029	7.2E-01	x				unknown	
MT000009	TC106467	Q6CQE3	2.00E-27	18S ribosomal protein		0.603	8.8E-03	1.383	2.5E-04	0.816	1.1E-01	x				translocation	
MT013240	TC105089	Q852A0	1.00E-14	protein kinase like		0.604	7.9E-03	0.98	7.2E-01	0.973	8.0E-01	x		AT2G28930	1.3E-13	signaling	
MT000845	TC107382	T47996	2.00E-96	hydrolase		0.607	7.7E-04	1.147	1.2E-02	0.837	7.0E-03	x		AT3G62040	1.4E-76	cell wall	
MT010437	TC98712	T52988	1.00E-100	Nuclease S1 precursor		0.607	7.5E-04	1.138	4.8E-02	0.794	1.1E-01	x		AT11G30920	4.2E-51	DNA binding	
MT001607	TC108231	T45890	4.00E-96	expressed protein		0.608	6.7E-03	1.093	0.6E-01	0.678	3.3E-03	x		AT3G53430	2.1E-97	unknown	
MT000550	TC107135	Q9RW50	0	Fasciclin-like arabinogalactan protein 16 precursor.		0.609	6.1E-04	1.161	4.8E-02	0.927	4.4E-01	x		AT2G35860	4.0E-180	unknown	
MT013835	TC104312	No hits found				0.61	5.7E-04	0.997	9.7E-01	0.747	2.1E-02	x				unknown	
MT015525	TC93984	T49958	5.00E-38	Gibberellin-regulated protein 4 precursor.		0.61	5.3E-04	0.792	2.6E-03	0.495	5.2E-02	x		AT5G15230	8.3E-38	signaling	
MT003883	TC105604	O82023	1.00E-176	N7 protein		0.612	2.5E-03	1.161	7.5E-02	0.937	5.0E-01	x		AT4G06910	1.4E-42	transcription	
MT004304	TC108823</																

MT000268	TC94470	Q8LD66	2,00E-04	hypothetical protein	0,66	4,8E-03	0,97	5,5E-01	0,929	3,8E-01	x	unknown
MT011737	TC96147	No hits found		unknown	0,66	3,1E-03	1,026	7,4E-01	0,899	1,9E-01	x	unknown
MT016071	TC97409	HSPH17	8,00E-77	17,1 kDa class II heat shock protein	0,642	7,1E-03	0,561	4,7E-03	1,052	2,9E-01	x	AT5G12020 1,7E-48 stress
MT000468	TC94619	T01230	1,00E-52	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 8	0,511	5,9E-04	1,194	5,0E-02	0,650	9,7E-04	x	AT4G00660 4,1E-61 metabolism

Sous exprimés



Annexe 3 :

Procédure de marquage et d'hybridation des puces à ADNc

Marquages à partir d'ARNt –GE Healthcare- Kit CyScribe cDNA Post Labelling

(Ref : RPN 5660-X)

[http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/AAB8E546F7367F44C1256EB40044AD37/\\$file/RPN5660PL.pdf](http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/AAB8E546F7367F44C1256EB40044AD37/$file/RPN5660PL.pdf)

Réactifs et matériel :

- **CyScribe cDNA Post labelling kit – GE Healthcare-** (24Rxns) avec 50 colonnes GFX
- **NaOH 2,5 M** (H₂O nucléase free) filtrée, stockée à température ambiante (max 3 mois)
- **HEPES 2 M free acid** (H₂O nucléase free), filtrée, stockée à température ambiante (max. 3 mois)
- **NaHCO₃ 0,1M pH9.0** (0.84 g / 100ml H₂O nucléase free, pH ajusté par NaOH 1M) filtrée
Conservation en aliquots à -20°C, ou préparer extemporanément
- **Hydroxylamine 4M** (27.8 g / 100 ml H₂O nucléase free) filtrée. Conservation en aliquots à -20°C, ou préparer extemporanément
- **H₂O nuclease free**
- **Centrifugeuse tubes eppendorf 1,5 ml**
- **Blocs chauffants à 70°C, 42°C, 37°C**

1 – Synthèse de l'ADNc marqué par incorporation de AminoAllyl-dUTP

Porter des gants pour toute cette étape
Régler 1 bloc chauffant à 70°C et 1 autre à 42°C

Hybridation des primers

- Décongeler les produits du kit (sauf l'enzyme) sur la glace → Vortexer
- Centrifuger 15sec un aliquot de AA-dUTP et le resuspendre dans 30 µl d'H₂O → glace
Le reste de l'aliquot est conservé à -20°C, au maximum 1 mois
- Dans un tube de 1,5 ml par réaction préparer
 - ARNt (10 à 15 µg) 6 µl
 - Randoms nonamers 1 µl
 - Anchored oligo (dT) 2 µl
 - H₂O (kit) 2 µlMélanger doucement à la pipette
- Incuber 5 min. à 70°C
Cg. 15 sec, laisser refroidir à température ambiante 10 min (hybridation des primers)
Cg. 15 sec, puis placer les tubes sur la glace

Elongation

- A chaque tube ajouter dans l'ordre
 - CyScript buffer 5X 4 µl
 - DTT 0.1 M 2 µl
 - Nucléotide mix 1 µl
 - AA-dUTP 1 µl
 - CyScript RT 1 µlMélanger doucement avec la pipette, Cg 30 sec

Préparation Cibles-P3.2- Marquages Indirect- GE Healthcare

Rédigé par Richard Danger
Validé par Chevalier Catherine

Version 2
24/04/08

- Incuber 1 H 30 à 42°C
Cg. 30 sec

Possibilité de conserver à -20°C

A partir de cette étape, le port de gant n'est plus nécessaire

2 - Purification des AA-cDNAs

Régler le bain-marie à 37°C

Dégradation de l'ARNm

- Ajouter 2 µl de NaOH 2,5M à chaque tube
Vortexer et cg 15 sec
- Incuber 15 min. à 37°C
- Ajouter 10 µl d'HEPES 2M
Vortexer et cg 15 sec

Purification ou Possibilité de conserver à -20°C

Purification de l'ADNc sur colonnes GFX

A chaque tube neuf de Wash Buffer, rajouter 40 ml d'Ethanol 100%

- Ajouter 500 µl de Capture buffer (dans le kit) → mélanger à la pipette
- Transférer la totalité de la réaction sur une colonne GFX
Cg 30 sec à 13 000 rpm
- Eliminer l'éluat (=garder le même tube) et laver la colonne par 600 µl de Wash Buffer
Cg. 30 sec à 13 000 rpm
- Répéter 2 fois le lavage (3 lavages au total)
Cg. 15 sec à 13 000 rpm « à vide »
- Placer la colonne sur un tube eppendorf
- Déposer 60 µl d'H₂O préchauffée à 70°C sur le **centre de la colonne**
Incuber à température ambiante 3 min
Cg 1 min à 13 000 rpm

Réaction de couplage ou stockage à -20°C

3 – Marquage des AA-cDNAs par les CyDyes

- Sécher le cDNA purifié au speed-vac (environ 30 min)
- Resuspendre le cDNA sec par 15 µl d'H₂O nucléase free → Mélanger à la pipette
- Reprendre un aliquot de CyDye (1 tube par cible) par 15 µl de NaHCO₃, 0.1M
- Mélanger immédiatement un aliquot de CyDye préparé avec les 15 µl d'AA-cDNA purifiés
Vortexer, centrifuger
- Incuber 2 heures à température ambiante à l'abri de la lumière
- Ajouter 15 µl d'Hydroxylamine 4M à chaque réaction → Vortexer
- Incuber 15 minutes à T.amb. à l'abri de la lumière

Préparation Cibles-P3.2- Marquages Indirect- GE Healthcare

Rédigé par Richard Danger
Validé par Chevalier Catherine

Version 2
24/04/08

Possibilité de conserver à -20°C

4 – Purification des cDNA marqués sur colonnes GFX

- Ajouter 500 μl de Capture buffer (dans le kit) → Mélanger à la pipette
- Transférer la totalité de la réaction sur une colonne GFX
Cg 30 sec à 13 000 rpm
- Eliminer l'éluat en vidant le tube et laver la colonne par 600 μl de Wash Buffer
Cg 30 sec à 13 000 rpm
- Répéter 2 fois le lavage (3 lavages au total)
Cg. 15 sec à 13 000 rpm « à vide »
- Placer la colonne sur un tube eppendorf
- Déposer 60 μl d'H₂O préchauffée à 70°C sur le **centre de la colonne**.
Incuber à température ambiante 3 min
Cg. 1 min. à 13 000 rpm

Dosage des cDNA au NanoDrop

- Sécher le cDNA marqué au speed-vac (environ 30mn)
- Le cDNA est prêt pour être hybridé ou pour être conservé à -20°C .

Microarray Hybridation-P2.2- Lames Epoxy Spottées sur LUCIDEA

Rédigé par DANGER Richard
Validé par Chevalier Catherine

Version 2
28/04/08

Préparation et hybridation des lames Epoxy spottées (Zone d'hybridation de 24 x 60 mm)

Réactifs et matériel

- PolyA RNA 10 mg/ml – SIGMA / Ref P 9403 (25 mg)
- Yeast tRNA 10 mg/ml – Life Technologies / Ref 15401-019 (25 mg)
- SSC 20X - Invitrogen life technologies / Ref 15557-044 (1000 ml)
- SDS 10% filtré
- Denhardt 50X - SIGMA / Ref. D 2532 (5 ml)
- Formamide
- BSA fraction V powder - SIGMA / Ref. A 2153 (100g)
- Ethanolamine free base - SIGMA / Ref. E 9508 (100ml)
- SDS solution 20% (W/V) Sodium dodecyl sulfate – BIO-RAD / Ref 161-0418 (1000 ml)
- Cuves à coloration
- Centrifugeuse tubes eppendorf 1,5 ml
- Bain-marie à 42 °C
- Etuve à 42°C et à 50°C
- Lamelles 24x60

1 – Préparation des solutions stocks

- Mix d'hybridation

	[C] finale	Pour 1ml
- Denhardt 50X	5 X	100 µl
- SSC 20X	3.5 X	175 µl
- SDS 20%	0.3 X	15 µl
- Yeast RNA 10µg/µl	0.5 µg/µl	50 µl
- PolyA RNA 10µg/µl	0.5 µg/µl	50 µl
- Formamide	50 X	500 µl
- H2O		110 µl

Aliquoter le mix d'hybridation : 0.5 ml/ tube (stockage à -20°C)

- BSA 10 %
BSA 10% en H2O milli-Q. A congeler (-20°C) par 15ml en tube Falcon. (Non filtrée)
 - Ethanolamine 50mM, Tris base 100mM, pH9
 - Trizma base 6.055 g
 - Trizma Hcl 7.88 g
 - H2O milli Q 900 ml
- Dissoudre
- Ethanolamine 3 ml

Ajuster à pH 9 avec Hcl 6N ou NaOH si besoin
QSP 1000 ml avec H2O milli-Q et filtrer

2 – Préparation des lames (MWG-Oligo)

Microarray Hybridation-P2.2- Lames Epoxy Spottées sur LUCIDEA

Rédigé par DANGER Richard
Validé par Chevalier Catherine

Version 2
28/04/08

- Placer les lames sur un portoir
- Incuber les lames 15 min à 50°C dans un bain Ethanolamine 50mM, Tris base 100mM, pH9, (préchauffé à 50°C) additionné **au dernier moment** de SDS 0.1% en concentration finale

Tris éthanolamine, SDS 0.1% (150mL)	
<i>Solution stock Ethanolamine 50mM, Tris base 100mM, pH9</i>	149 mL
<i>SDS 20%</i>	750 µL

- Réaliser 2 lavages dans de l'eau Milli-Q (5 up and down dans 2 baigns d'H₂O différents)
- Incuber les lames 15 mn à 50°C dans un bain SSC4X, 0.1% SDS (préchauffé à 50°C)

SSC4X, 0.1% SDS (150mL)	
<i>SSC 20X</i>	30 mL
<i>H2O Milli Q</i>	100 ml
<i>SDS 20%</i>	750 µl
<i>H2O Milli Q</i>	QSP 150 ml

- Un lavage dans un bain d'eau Milli-Q (5 up and down)
- Centrifugation des lames 3 min à 1 000 rpm à T°C ambiante
- Préhybrider 1 heure à 42°C, dans 150 ml de mix SSC 3.5 X / SDS 0.3% / BSA 1% (solution préchauffée à 42°C)

Mix de préhybridation : SSC 3.5 X, SDS 0.3%, BSA 1% (150ml) :	
<i>BSA 10%</i>	15 ml
<i>SSC 20X</i>	26.4 ml
<i>H2O milli Q</i>	80 ml
<i>SDS 20%</i>	2.25 ml
<i>H2O milli Q</i>	QSP 150 ml
Filtrer	

- Lavage des lames par 5 up and down dans 5 baigns d'H₂O différents à T°C ambiante
- Egoutter rapidement le portoir sur un « Kimwipes »
- Cg immédiatement 3min à 1 000 rpm à T°C ambiante

3 – Hybridation

Pour les étapes suivantes, travailler un maximum à l'abri de la lumière
Attention, le protocole diffère légèrement entre les cibles amplifiées et non amplifiées

- Cibles non amplifiées : reprendre chaque cible séchée, par 20 µL de mix d'hybridation
Cibles amplifiées : reprendre chaque cible séchée dans du mix d'hybridation à raison de 20 µL / µg
- Mélanger 20 µL d'une cible Cy3 avec 20 µL d'une cible Cy5
- Dénaturer les cibles 2 min à 100°C, puis incuber 30 min à 37°C
Cg 2 min à 13 000 rpm
- Placer la cible sur la zone spottée, recouvrir d'une lamelle (dimensions 24x60) en évitant les bulles
- Placer l'ensemble dans une chambre d'hybridation Telechem

Microarray Hybridation-P2.2- Lames Epoxy Spottées sur LUCIDEA

Rédigé par DANGER Richard
Validé par Chevalier Catherine

Version 2
28/04/08

- Mettre 20 µl de 3X SSC dans chaque réservoir de la chambre
- Fermer hermétiquement la chambre d'hybridation et l'immerger dans un bain-marie fermé (dans l'obscurité) une nuit à 42°C

4 – Lavages

- Immerger les lames dans un tampon SSC 2X / SDS 0.1%, afin de laisser tomber les lamelles au fond du bain
- Placer les lames sur un portoir, et les immerger dans un deuxième bain de tampon SSC 2X / SDS 0.1%
Placer sous agitation douce pendant 2 minutes sur l'agitateur, et agiter manuellement le portoir
- Transférer dans un bain de tampon SSC 1X en évitant de transférer trop de tampon contenant du SDS (égoutter)
Agiter 2 min
- Transférer dans un bain de SSC 0.2 X. Agiter 2 min
- Refaire un autre lavage de 2 min. en SSC 0.2 X
- Egoutter rapidement le portoir sur un « Kimwipes »
- Centrifuger immédiatement 3 min à 1000 rpm à température ambiante
- Conserver au sec, à température ambiante et dans l'obscurité
- Lire au scanner

Solutions à préparer :

SSC 2X, 0.1% SDS (1 L)	
SSC 20X	100 mL
H2O Milli Q	400 mL
SDS 20%	5 ml
H2O Milli Q	QSP 1L

SSC 1X (1 L)	
SSC 20X	50 mL
H2O Milli Q	QSP 1L

SSC 0.2X (1 L)	
SSC 20X	10 mL
H2O Milli Q	QSP 1L

Références

A:

- Abe H., Kamiya Y. et Sakurai A.A.** (1995) cDNA Clone Encoding Yeast SNF4-Like Protein from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol*, 110, 336.
- Abernethy R.H., Thiel D.S., Petersen N.S. et Helm K.** (1989) Thermotolerance is developmentally dependent in germinating wheat seed. *Plant Physiol*, 89, 569-576.
- Allen, E., Hooks, M., Moing, A., Marcourt, M., Tomos, D., Rolin, D., and Ebbels, T.** (2007). Metabolite regulation of gene expression during the heterotrophic to autotrophic transition in developing seedling of Arabidopsis. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 146(4), S252-S252.
- Adams J., Chen Z-P., Van Denderen B.J.W., Morton C.J., Parker M.W., Witters L.A., Stapleton D. et Kemp B.E.** (2004) Intracellular control of AMPK via the γ_1 subunit AMP allosteric regulatory site. *Prot Sci*, 13, 155-165.
- Alavi, S.M., Sanjari, S., Durand, F., Brin, C., Manceau, C., and Poussier, S.** (2008). Assessment of the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a basis to identify putative pathogenicity genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by multiple suppression subtractive hybridizations. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 3295-3301.
- Alboresi A., Gustin C., Leydecher M-T., Bedu M., Meyer C. et Truong H-N.** (2005) Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. *Plant Cell Environ*, 28, 500-512.
- Albrecht V, Ritz O, Linder S, Harter K, Kudla J** (2001) The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca^{2+} -regulated kinases. *EMBO J* 20: 1051–1063
- Aldasoro, J.J., and Nicolas, G.** (1979). Changes in the Concentrations of Glycolytic-Intermediates and Adenosine Phosphates During Germination of Seeds of *Cicer-Arietinum-L.* *International Journal of Biochemistry* 10, 947-950.
- Alderson A., Sabelli P.A., Dickinson J.R., Cole D., Richardson M., Kreis M., Shewry P.R. et Halford N.G.** (1991) Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 8602-8605.
- Alfenas-Zerbini P, Maia IG, Fávoro RD, Cascardo JC, Brommonschenkel SH, Zerbini FM.** (2009) Genome-wide analysis of differentially expressed genes during the early stages of tomato infection by a potyvirus. *Mol Plant Microbe Interact.* 22(3), 352-61.
- Ali-Rachedi S., Bouinot D., Wagner M-H., Bonnet M., Sotta B., Grappin P. et Jullien M.** (2004) Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 219, 479-488.
- Almoguera, C., and Jordano, J.** (1992). Developmental and Environmental Concurrent Expression of Sunflower Dry-Seed-Stored Low-Molecular-Weight Heat-Shock Protein and Lea Messenger-Rnas. *Plant Molecular Biology* 19, 781-792.

Ananieva E.A., Gillaspay G.E., Ely A., Burnette R.N. et Les Erickson F. (2008) Interaction of the WD40 Domain of a Myo-Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase with SnRK1 links inositol, Sugar and Stress Signaling. *Plant Physiol*,

Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J., and Leon, P. (2000). Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes & Development* 14, 2085-2096.

Argyris,J.; Dahal,P.; Hayashi,E.; Still,D.W.; Bradford,K.J. (2008) Genetic variation for lettuce seed thermoinhibition is associated with emperature-sensitive expression of abscisic Acid, gibberellin, and ethylene biosynthesis, etabolism, and response genes. *Plant Physiol* 148.2, 926-47.

B:

Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J. (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 23, 448(7156), 938-42.

Baena-González E, Sheen J. (2008) Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci.*, 13(9), 474-82.

Bagatharia S.B., Chanda S.V. (1998) Modification of cell wall polysaccharides during cell elongation in *Phaseolus vulgaris* hypocotyls. *Acta Physiol. Plant.* 20(1), 15-18.

Baskin J.M. et Baskin C.C. (2004) A classification system for seed dormancy. *Seed Sci Res*, 14, 1-16.

Baskin JM, Baskin CC. (1985) The annual dormancy cycle in buried weed seeds: a continuum. *BioScience* 35, 492–498.

Bateman A. (1997) The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem Sci.* Jan;22(1):12-3.

Baud S., Boutin J.P., Miquel M., Lepiniec L., Rochat C. (2002) An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS *Plant Physiol. Biochem.* 40, 151–160

Bäumlein H., Miséra S., Luerßen H., Kölle K., Horstmann C., Wobus U. et Müller A.J. (1994) The FUS3 gene of *Arabidopsis thaliana* is a regulator of gene expression during late embryogenesis. *Plant J.* 6(3), 379-387

Beaudoin N., Serizet C., Gosti F., et Giraudat J. (2000) Interactions between Abscisic Acid and Ethylene Signaling Cascades *Plant Cell* 12, 1103-1116

Beg ZH, Allmann DW, Gibson DM. (1973) Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and wth protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem Biophys Res Commun.* 54(4), 1362-9.

Belin, C., de Franco, P.O., Bourbousse, C., Chaignepain, S., Schmitter, J.M., Vavasseur, A., Giraudat, J., Barbier-Brygoo, H. and Thomine, S. (2006). Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells. *Plant Physiol.* 141, 1316–1327.

- Benamar A., Tallon C. et Macherel D.** (2003) Membrane integrity and oxidative properties of mitochondria isolated from imbibing pea seeds after priming or accelerated ageing. *Seed Sci Res*, 13, 35-45.
- Bentsink L., Alonso-Blanco C., Vreugdenhil D., Tesnier K., Groot S.P.C. et Koornneef M.** (2000) Genetic analysis of seed-soluble oligosaccharides in relation to seed storability of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 124, 1595-604.
- Bertram C, Hass R.** (2008) Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. *Biol Chem*. 389(3), 211-20
- Buellens M., Mbonyi K., Geerts L., Gladines D., Katrien Detremerie K., Jans A.W.H. and. Thevelein J.M.** (1988) Studies on the mechanism of the glucose-induced CAMP signal in glycolysis and glucose repression mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem*. 172,227-231
- Bewley D.J.** (1979) Biological aspects of desiccation tolerance. *Annu Rev Plant Physiol*, 30, 195-238.
- Bewley D.J.** (1982) Protein and nucleic acid synthesis during germination and early seedling growth. Dans : *Encyclopedia of Plant Physiology*, 14A, Boulter D. et Parthier B. éds. New-York, Springer-Verlag, 61-81.
- Bewley D.J.** (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9, 1055-1066.
- Bewley D.J. et Black M.** (1994) *Seeds: Physiology of development and germination*. New York : Plenum Press.
- Bhalerao R.P., Salchert K., Bako L., Okresz L., Szabados L., Muranaka T., Machida T., Schell J. et Koncz C.** (1999) Regulatory of interaction of PRL1 WD protein with *Arabidopsis* SNF1-like protein kinases. *Proc Natl Acad Sci*, 96, 5322-5327.
- Bianchi G., Gamba A., Murelli C., Salamini F., Bartels D.** (1992) Low molecular weight solutes in desiccated and ABA-treated calli and leaves of *Craterostigma plantagineum*. *Phytochemistry* 31(6), 1917-1922
- Black M., Corbineau F., Gee H. et Côme D.** (1999) Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiol*, 120, 463-472.
- Bloch, A., Peterbauer, T., and Richter, A.** (2007). Inhibition of raffinose oligosaccharide breakdown delays germination of pea seeds. *Journal of Plant Physiology* 164, 1093-1096.
- Botta, D., Franklin, C.C., White, C.C., Krejsa, C.M., Dabrowski, M.J., Pierce, R.H., Fausto, N., and Kavanagh, T.J.** (2004). Glutamate-cysteine ligase attenuates TNF-induced mitochondrial injury and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* 37, 632-642.
- Boudet J., Buitink J., Hoekstra F.A., Rogniaux H., Larre C., Sator P. et Leprince O.** (2006) Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant Physiol*, 140, 1418-1436.
- Bouly J-P., Gissot L., Lessard P., Kreis M. et Thomas M.** (1999) *Arabidopsis thaliana* proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKIN α 1, an SNF1-like protein kinase. *Plant J*, 18, 541-550.

Bove J., Lucas P., Godin B., Ogé L., Jullien M. et Grappin P. (2005) Gene expression analysis by cDNA-AFLP highlights a set of new signaling networks and transcriptional control during seed dormancy breaking in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol Biol*, 57, 593-612.

Boy-Marcotte E, Perrot M, Bussereau F, Boucherie H, Jacquet M. (1998) Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 180(5), 1044-52

Bradford K.J., Downie A.B., Gee O.H., Alvarado V., Yang H. et Dahal P. (2003) Abscisic acid and gibberellin differentially regulate expression of genes of the SNF1-related kinase complex in tomato seeds. *Plant Physiol*, 132, 1-17.

Braybrook SA, Harada JJ. (2008) LECs go crazy in embryo development. *Trends Plant Sci.* 13(12), 624-30.

Braybrook SA, Stone SL, Park S, Bui AQ, Le BH, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ. (2006) Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 28;103(9), 3468-73.

Brenac, P., Horbowicz, M., Downer, S.M., Dickerman, A.M., Smith, M.E., and Obendorf, R.L. (1997). Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize (*Zea mays* L) seed development and maturation. *Journal of Plant Physiology* 150, 481-488.

Buitink J., Leger J.J., Guisle I., Ly Vu B. Wuillème S., Lamirault G., Le Bars A., Le Meur N., Becker N., Küster-H. et Leprince O. (2006) Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. *Plant J*, 47, 735-750.

Buitink J., Hemminga M.A. et Hoekstra F.A. (2000b) Is there a role for oligosaccharides in seed longevity? An assessment of intracellular glass stability. *Plant Physiol*, 122, 1217-1224.

Buitink J., Hoekstra F.A. et Leprince O. (2002) Biochemistry and biophysics of desiccation tolerance systems. Dans : Desiccation and survival in plants, drying without dying. Black M., Pitchard H.W. éds. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, 293-318.

Buitink J., Leprince O. et Hoekstra F.A. (2000a) Dehydration-induced redistribution of amphiphilic molecules between cytoplasm and lipids is associated with desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol*, 124, 1413-1426.

Buitink J., Ly Vu B., Sator P. et Leprince O. (2003) A physiological system to study the re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. Seeds. *Seed Sci Res*, 13, 273-286.

Buitink J., Thomas M., Gissot L. et Leprince O. (2004) Stravation, osmotic stress and desiccation tolerance lead to expression of different genes of the regulatory β and γ subunits of the SnRK1 complex in germinating seeds of *Medicago truncatula*. *Plant Cell Environ*, 27, 55-67.

C :

- Cadman CS, Toorop PE, Hilhorst HW, Finch-Savage WE.** Gene expression profiles of Arabidopsis Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *Plant J.* 46(5), 805-22
- Cai D, Kleine M, Kifle S, Harloff HJ, Sandal NN, Marcker KA, Klein-Lankhorst RM, Salentijn EM, Lange W, Stiekema WJ, et al** (1997) Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* 275, 832–834
- Cao D., Cheng H., Wu W., Meng Soo H. and Peng J.** (2006) Gibberellin Mobilizes Distinct DELLA-Dependent Transcriptomes to Regulate Seed Germination and Floral Development in Arabidopsis *Plant Physiology* 142:509-525
- Carling D., Aguan K., Woods A., Verhoeven A.J., Beri R.K., Brennan C.H., Sidebottom C., Davison M.D. et Scott J.** (1994) Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *J Biol Chem*, 269, 11442-11448.
- Carling D., Clarke P.R., Zammit V.A. et Hardie D.G.** (1989) Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem*, 186, 129-136.
- Carlson M., Osmond B.C. et Botstein D.** (1981) Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics*, 98, 25-40.
- Carrera E, Holman T, Medhurst A, Dietrich D, Footitt S, Theodoulou FL, Holdsworth MJ.** (2008) Seed after-ripening is a discrete developmental pathway associated with specific gene networks in Arabidopsis. *Plant J.* (2), 214-24
- Carrera E, Holman T, Medhurst A, Peer W, Schmutz H, Footitt S, Theodoulou FL, Holdsworth MJ.** (2007) Gene expression profiling reveals defined functions of the ATP-binding cassette transporter COMATOSE late in phase II of germination. *Plant Physiol.* 143(4), 1669-79.
- Casal J.J. et Sanchez R.A.** (1998) Phytochromes and seed germination. *Seed Sci Res* 8, 317–329
- Celenza J.L. et Carlson M.** (1986) A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science*, 233, 1175-1180.
- Celenza J.L. et Carlson M.** (1989a) Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4. *Mol Cell Biol*, 9, 5034-5044.
- Celenza J.L., Eng F.J. et Carlson M.** (1989b) Molecular analysis of the *SNF4* gene of *Saccharomyces cerevisiae* : evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase. *Mol Cell Biol*, 9, 5045-5054.
- Cheung P.C., Salt I.P., Davies S.P., Hardie D.G., Carling D.** (2000) Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J.* 346, 659–669.
- Chibani K., Ali-Rachedi S., Job C., Job D., Jullien M. et Grappin P.** (2006) Proteomic analysis of seed dormancy in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 142, 1493-1510.

Chiou T.J., Bush D.R. (1998) Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 4784–4788.

Chiwocha S.D.S., Cutler A.J., Abrams S.R., Ambrose S.J., Yang J., Ross A.R.S., Kermodé A.R. (2005) The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *Plant J.* 42, 35–48.

Clerkx E.J.M., Blankenstijn-de Vries H., Ruys G.J., Groot S.P.C., et Koornneef M. (2004b) Genetic differences in seed longevity of various *Arabidopsis* mutants. *Physiologia Plantarum* 121(3), 448 – 461.

Clerkx E.J.M., El-Lithy M.E., Vierling E., Ruys G.J., Blankenstijn-de Vries H., Groot S.P.C., Vreugdenhil D., Koornneef M. (2004a) Analysis of natural allelic variation of *Arabidopsis* seed quality traits between the accessions Landsberg *erecta* and Shakhara, using a new recombinant inbred population. *Plant Physiol.* 135, 432–443.

Close T.J. (1996) Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration pro-heat-shock protein. *Physiol Plant*, 97, 795-803.

Close T.J. (1997) Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant*, 100, 291-296.

Cohn M.A. et Butera D.L. (1982) Seed dormancy I, red rice (*Oryza sativa*). II. Response to cytokinin. *Weed science* 30, 200-205.

Cohn, M.A. (1996) Operational and philosophical decisions in seed dormancy research. *Seed Sci. Res.* 6, 147–153.

Colditz, F., Braun, H.P., Jacquet, C., Niehaus, K., and Krajinski, F. (2005). Proteomic profiling unravels insights into the molecular background underlying increased *Aphanomyces euteiches* tolerance of *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology* 59, 387-406.

Colombo S., Ronchetti D., Thevelein D., Windedrickx J. et Martegani E. (2004) Activation state of Ras2 protein and glucose-induced signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 279, 46715-46722.

Colombo, S., Ma, P.S., Cauwenberg, L., Winderickx, J., Crauwels, M., Teunissen, A., Nauwelaers, D., de Winde, J.H., Gorwa, M.F., Colavizza, D., and Thevelein, J.M. (1998). Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo Journal* 17, 3326-3341.

Cutler, S., Ghassemian, M., Bonetta, D., Cooney, S., and McCourt, P. (1996). A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Science* 273, 1239-1241.

D:

Dale S., Arro M., Becerra B., Morrice N.G., Boronat A., Hardie D.G. et Ferrer A. (1995a) Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (isoform HMGR1) from *Arabidopsis thaliana*, and its inactivation by phosphorylation at Ser577 by *Brassica oleracea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *Eur J Biochem*, 233, 506-513.

- Dale S., Wilson W.A., Edeman A.M. et Hardie D.G.** (1995b) Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase kinase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase I. *FEBS Lett*, 361, 191-195.
- Darrasse, A., Bureau, C., Samson, R., Morris, C.E., and Jacques, M.A.** (2007). Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. *European Journal of Plant Pathology* 119, 203-215.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Durand, K., Bureau, C., Cesbron, S., and Jacques, M.A.** (2009). Adhesion and Fitness in the Bean Phyllosphere and Transmission to Seed of *Xanthomonas fuscans* subsp *fuscans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 747-757.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Meyer, D., Demarty, M., Durand, K., Bureau, C., Manceau, C., and Jacques, M.A.** (2008). The type III secretion system of *Xanthomonas fuscans* subsp *fuscans* is involved in the phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of susceptible beans. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2669-2678.
- Da-Silva, W.S., Rezende, G.L., and Galina, A.** (2001). Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. *Journal of Experimental Botany* 52, 1191-1201.
- Davies S.P., Carling D. et Hardie D.G.** (1989) Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay. *Eur J Biochem*, 186, 123-128.
- Deavours, B.E., Liu, C.J., Naoumkina, M.A., Tang, Y.H., Farag, M.A., Sumner, L.W., Noel, J.P., and Dixon, R.A.** (2006). Functional analysis of members of the isoflavone and isoflavanone O-methyltransferase enzyme families from the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology* 62, 715-733.
- Debeaujon I. et Koornneef M.** (2000) Gibberellin requirement for *Arabidopsis thaliana* seed germination is determined both by testa characteristic and embryonic ABA. *Plant Physiol*, 122, 415-424.
- del Pozo, J.C., Diaz-Trivino, S., Cisneros, N., and Gutierrez, C.** (2006). The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCFSKP2A pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 2224-2235.
- DeVit M.J. et Johnston M.** (1999) The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol*, 9, 1231-1241.
- Dierking, E.C., and Bilyeu, K.D.** (2009). Raffinose and stachyose metabolism are not required for efficient soybean seed germination. *Journal of Plant Physiology* 166, 1329-1335.
- Djemel N., Guedon D., Lechevalier A., Salon C., Miquel M., Prospero JM., Rochat C. et Boutin JP.** (2005) Development and composition of the seeds of nine genotypes of the *Medicago truncatula* species complex. *Plant Physiol Biochem*, 43, 557-566.
- Dong, J.X., Chen, C.H., and Chen, Z.X.** (2003). Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Molecular Biology* 51, 21-37.

Dornbos, D.L., Spencer, G.F., and Miller, R.W. (1990). Medicago Delays Alfalfa Seed-Germination and Seedling Growth. *Crop Science* 30, 162-166.

Dove S.L., Hochschild A. (1998) Conversion of the omega subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase into a transcriptional activator or an activation target. *Genes dev.* 12, 745-754.

Downie, A.B., Dirk, L.M.A., Xu, Q.L., Drake, J., Zhang, D.Q., Dutt, M., Butterfield, A., Geneve, R.R., Corum, J.W., Lindstrom, K.G., and Snyder, J.C. (2004). A physical, enzymatic, and genetic characterization of perturbations in the seeds of the brownseed tomato mutants. *Journal of Experimental Botany* 55, 961-973.

Dunfield, K., Srivastava, S., Shah, S., and Kav, N.N.V. (2007). Constitutive expression of ABR17 cDNA enhances germination and promotes early flowering in *Brassica napus*. *Plant Science* 173, 521-532.

Dure L. III (1993) A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J*, 3, 363-369.

Dure L. III, Crouch M., Harada J., Ho T-HD., Mundy J., Quatrano R., Thomas T. et Sung ZR. (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol Biol*, 12, 475-486.

Dyck, J.R.B., Kudo, N., Barr, A.J., Davies, S.P., Hardie, D.G., and Lopaschuk, G.D. (1999). Phosphorylation control of cardiac acetyl-CoA carboxylase by cAMP-dependent protein kinase and 5'-AMP activated protein kinase. *European Journal of Biochemistry* 262, 184-190.

E:

El Yahyaoui, F., Kuster, H., Ben Amor, B., Hohnjec, N., Puhler, A., Becker, A., Gouzy, J., Vernie, T., Gough, C., Niebel, A., Godiard, L., and Gamas, P. (2004). Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program(1[w]). *Plant Physiology* 136, 3159-3176.

Erickson J.R. et Johnston M. (1993) Genetic and molecular characterization of *GAL83*: its interaction and similarities with other genes involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 135, 655-664.

Estruch F., Treitel M.A., Yang X. et Carlson M. (1992) N-terminal mutations modulate yeast SNF1 protein kinase function. *Genetics*, 132, 639-650.

Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *Fems Microbiology Reviews* 24, 469-486.

Eulgem, T., and Somssich, I.E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 366-371.

Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., and Somssich, I.E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* 5, 199-206.

F:

Farag, M.A., Broeckling, C.D., Huhman, D.V., Urbanczyk-Wochniak, E., and Lei, Z. (2007). Integrated functional genomic studies of biotic stress responses in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Biology (Rockville)* 2007, 240.

Faria J.M.R., Buitink J., van Lammeren A.A.M. et Hilhorst H.W.M. (2005) Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. *J Exp Bot*, 56, 2119-2130.

Fields, S., and Song, O.K. (1989). A Novel Genetic System to Detect Protein Protein Interactions. *Nature* 340, 245-246.

Finch-Savage WE, Cadman CS, Toorop PE, Lynn JR, Hilhorst HW. (2007) Seed dormancy release in Arabidopsis Cvi by dry after-ripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing. *Plant J*. 51(1), 60-78.

Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 2006;171(3):501-23

Finkelstein R.R, Wang M.L., Lynch T.J., Rao S. et Goodman H.M. (1998) The Arabidopsis abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell*, 10, 1043-1054.

Finkelstein R.R. (1994) Mutations at two new Arabidopsis ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J*, 5, 765-771.

Finkelstein R.R. et Lynch T.J. (2000) The Arabidopsis abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*, 12, 599-610.

Foley, M.E., Nichols, M.B., and Myers, S.P. (1993). Carbohydrate concentrations and interactions in afterripening-responsive dormant *Avena fatua* caryopses induced to germinate by gibberellic acid. *Seed Science Research* 3, 271-278.

Francois, J., and Parrou, J.L. (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Microbiology Reviews* 25, 125-145.

Frey A., Godin B., Bonnet M., Sotta B. et Marion-Poll A. (2004) Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta*, 218, 958-964.

G:

Gaff D.F. (1971) Desiccation-tolerant flowering plants in Southern Africa. *Science*, 174, 1033-1034.

Gallardo K., Le Signor C., Vandekerckhove J., Thompson R.D. et Burstin J. (2003) Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. *Plant Physiol*, 133, 664-682.

Gallardo, K., Firnhaber, C., Zuber, H., Hericher, D., Belghazi, M., Henry, C., Kuster, H., and Thompson, R. (2007). A combined proteome and transcriptome analysis of developing *Medicago truncatula* seeds. *Molecular & Cellular Proteomics* 6, 2165-2179.

Gallardo, K., Kurt, C., Thompson, R., and Ochatt, S. (2006). In vitro culture of immature *M. truncatula* grains under conditions permitting embryo development comparable to that observed in vivo. *Plant Science* 170, 1052-1058.

- Gamas P., de Billy F., et Truchet, G.** (1998) Symbiosis-specific expression of two *Medicago truncatula* nodulin genes, *MtN1* and *MtN13*, encoding products homologous to plant defense proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 393-403.
- Gamas, P., Niebel, F.D.C., Lescure, N., and Cullimore, J.V.** (1996). Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9, 233-242.
- Gancedo, C., and Flores, C.L.** (2004). The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. *Fems Yeast Research* 4, 351-359.
- Geigenberger P.** (2003) Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tuber. *J Exp Bot*, 54, 457-465.
- Giraudat J., Hauge B.M., Valon C., Smalle J., Parcy F. et Goodman H.M.** (1992) Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell*, 4, 1251-1261.
- Gissot L, Polge C, Jossier M, Girin T, Bouly JP, Kreis M, Thomas M. (2006)** AKINbetagamma contributes to SnRK1 heterotrimeric complexes and interacts with two proteins implicated in plant pathogen resistance through its KIS/GBD sequence. *Plant Physiol.* 142(3), 931-44
- Gissot L., Polge C., Bouly J.P., Lemaitre T., Kreis M. et Thomas M.** (2004) AKINbeta3, a plant specific SnRK1 protein, is lacking domains present in yeast and mammals non-catalytic beta-subunits. *Plant Mol Biol*, 56, 747-759.
- Godt, D.E., Riegel, A., and Roitsch, T.** (1995). Regulation of Sucrose Synthase Expression in *Chenopodium-Rubrum* - Characterization of Sugar Induced Expression in Photoautotrophic Suspension-Cultures and Sink Tissue-Specific Expression in Plants. *Journal of Plant Physiology* 146, 231-238.
- Gorner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M.T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H., and Schuller, C.** (1998). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes & Development* 12, 586-597.
- Graham, I.A., Denby, K.J., and Leaver, C.J.** (1994). Carbon Catabolite Repression Regulates Glyoxylate Cycle Gene-Expression in Cucumber. *Plant Cell* 6, 761-772.
- Grappin P., Bouinot D., Sotta B., Miginiac E. et Jullien M.** (2000) Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia* : post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta*, 210, 279-285.
- Grelet, J., Benamar, A., Teyssier, E., Avelange-Macherel, M.H., Grunwald, D., and Macherel, D.** (2005). Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiology* 137, 157-167.
- Groot S.P.C. et Karszen C.M.** (1987) Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta*, 171, 525-531.
- Gutierrez L, Van Wuytswinkel O, Castelain M, Bellini C.** (2007) Combined networks regulating seed maturation. *Trends Plant Sci.* 12(7), 294-300.

Gutierrez, C., Ramirez-Parra, E., Castellano, M.M., and del Pozo, J.C. (2002). G(1) to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 480-486.

H:

Halford N.G. et Hardie D.G. (1998) SNF1-related protein kinase (SnRKs) : regulators of carbon catabolism in plants? *Plant Mol Biol*, 37, 735-748.

Halford N.G. et Paul M.J. (2003) Carbon metabolite sensing and signalling. *Plant Biotech J*, 1, 381-398.

Halford N.G., Bouly J.P. et Thomas M. (2000) SNF1-related protein kinases (SnRKs) — Regulators at the heart of the control of carbon metabolism and partitioning . *Adv Bot Res*, 32, 405-434.

Halford N.G., Hey S., Jhurrea D., Laurie S., McKibbin R.S., Paul M. et Zhang Y. (2003) Metabolic signalling and carbon partitioning : role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J Exp Bot*, 54, 467-475.

Hallows, K.R., Raghuram, V., Kemp, B.E., Witters, L.A., and Foskett, J.K. (2000). Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by novel interaction with the metabolic sensor AMP-activated protein kinase. *Journal of Clinical Investigation* 105, 1711-1721.

Hao L., Wang H., Sunter G. et Bisaro D.M. (2003) Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell*, 15, 1034-1048.

Hara M., Terashima S., Fukaya T. et Kuboi T. (2003) Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, 217, 290-298.

Hardie, D.G. (2003). Minireview: The AMP-activated protein kinase cascade: The key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 144, 5179-5183.

Hardie, D.G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 774-785.

Hardtke, C.S., and Berleth, T. (1998). The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *Embo Journal* 17, 1405-1411.

Hargreaves, J.A., Mansfield, J.W., and Coxon, D.T. (1976). Identification of Medicago as a Phytoalexin in Broad Bean Plant (*Vicia-Faba-L*). *Nature* 262, 318-319.

Harper, J.E., Breton, G., and Harmon, A. (2004). Decoding Ca²⁺ signals through plant protein kinases. *Annual Review of Plant Biology* 55, 263-288.

Harthill JE, Meek SE, Morrice N, Peggie MW, Borch J, Wong BH, Mackintosh C. (2006) Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. *Plant J.* 47(2), 211-23

Hawley S.A., Boudeau J., Reid J.L., Mustard K.J., Udd L., Makela T.P., Alessi D.R. et Hardie D.G. (2003) Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol.* 2, 28-44.

- Hay, F.R., Mead, A., Manger, K. and Wilson, F.J.** (2003) One-step analysis of seed storage data and the longevity of *Arabidopsis thaliana* seeds. *J. Expt. Bot.* 54, 993-1011.
- Hedbacker K. et Carlson M.** (2008) SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci.* 1(13), 2408-2420.
- Hedbacker, K., Hong, S.P., and Carlson, M.** (2004a). Pak1 protein kinase regulates activation and nuclear localization of Snf1-Gal83 protein kinase. *Molecular and Cellular Biology* 24, 8255-8263.
- Hedbacker, K., Townley, R., and Carlson, M.** (2004b). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates the subcellular localization of Snf1-Sip1 protein kinase. *Molecular and Cellular Biology* 24, 1836-1843.
- Hedges, D., Proft, M., and Entian, K.D.** (1995). Cat8, a New Zinc Cluster-Encoding Gene Necessary for Derepression of Gluconeogenic Enzymes in the Yeast *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 15, 1915-1922.
- Heil, M., and Bostock, R.M.** (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany* 89, 503-512.
- Hennig L., Stoddart W.M., Dieterle M., Whitelam G.C. et Schäfer E.** (2002) Phytochrome E controls light-induced germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 128, 194–200
- Hernandez, I., Alegre, L., Van Breusegem, F., and Munne-Bosch, S.** (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science* 14, 125-132.
- Hey S, Mayerhofer H, Halford NG, Dickinson JR.** (2007) DNA sequences from *Arabidopsis*, which encode protein kinases and function as upstream regulators of Snf1 in yeast. *J Biol Chem.* 6;282(14), 10472-9
- Higgins, V.J.** (1972). Role of Phytoalexin Medicago in 3 Leaf Spot Diseases of Alfalfa. *Physiological Plant Pathology* 2, 289-&.
- Hilhorst H.M.W.** (1990) Dose-response analysis of factors involved in germination and secondary dormancy of seeds in *Sisymbrium officinale*. *Plant Physiol*, 94, 1090-1095.
- Hilhorst H.W.M., Smitt A.I., Karsen C.M.** (1986) Gibberellin-biosynthesis and -sensitivity mediated stimulation of seed germination of *Sisymbrium officinale* by red light and nitrate. *Physiologia Plantarum* 67(2), 285-290
- Hilhorst, H.W.M.** (2007). Definitions and hypotheses of seed dormancy. *Seed development, dormancy and germination*, 50-71.
- Hilhorst, H.W.M., and Downie, B.** (1996). Primary dormancy in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv Moneymaker): Studies with the sitiens mutant. *Journal of Experimental Botany* 47, 89-97.
- Hilhorst, H.W.M., Derkx, M.P.M., and Karsen, C.M.** (1996). An integrating model for seed dormancy cycling: Characterization of reversible sensitivity. *Plant dormancy: Physiology, biochemistry and molecular biology*, 341-360.

Hilton, J.R. (1984). The Influence of Light and Potassium-Nitrate on the Dormancy and Germination of *Avena-Fatua* L (Wild Oat) Seed and Its Ecological Significance. *New Phytologist* 96, 31-34.

Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJ. (2008) Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol.* 179(1), 33-54

Holman TJ, Jones PD, Russell L, Medhurst A, Ubeda Tomás S, Talloji P, Marquez J, Schmuths H, Tung SA, Taylor I, Footitt S, Bachmair A, Theodoulou FL, Holdsworth MJ. (2009) The N-end rule pathway promotes seed germination and establishment through removal of ABA sensitivity in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(11), 4549-4554.

Homrichhausen, T.M., Hewitt, J.R., and Nonogaki, H. (2003). Endo-beta-mannanase activity is associated with the completion of embryogenesis in imbibed carrot (*Daucus carota* L.) seeds. *Seed Science Research* 13, 219-227.

Hong S.P., Leiper F.C., Woods A., Carling D. et Carlson M. (2003) Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci*, 100, 8839-8843.

Hou, J.Q., and Simpson, G.M. (1992). After-Ripening and Phytochrome Action in Seeds of Dormant Lines of Wild Oat (*Avena-Fatua*). *Physiologia Plantarum* 86, 427-432.

Hrabak E.M., Chan C.W.M., Gribskov M., Harper J.F., Choi J.H., Halford N., Kulda J., Luang S., Nimmo H.G., Sussman R., Thomas M., Walker-Simmons K., Zhu J-K. et Harmon A.C. (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol*, 132, 666-680.

Hu, X.L., Zhang, A.Y., Zhang, J.H., and Jiang, M.Y. (2006). Abscisic acid is a key inducer of hydrogen peroxide production in leaves of maize plants exposed to water stress. *Plant and Cell Physiology* 47, 1484-1495.

Huijsser C., Kortstee A., Pego J., Weisbeek P., Wisman E. et Smeekens S. (2000) The Arabidopsis *Sucrose uncoupled-6* gene is identical to *abscisic acid insensitive-4*: involvement of abscisic acid in sugar responses. *Plant J*, 23, 577-585.

Hurley, R.L., Anderson, K.A., Franzone, J.M., Kemp, B.E., Means, A.R., and Witters, L.A. (2005). The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *Journal of Biological Chemistry* 280, 29060-29066.

I:

Ibrahim, G., Owen, H., and Ingham, J.L. (1982). Accumulation of Medicago in Broad Bean Roots - a Possible Factor in Resistance to Fusarium-Oxysporum Root-Rot. *Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology* 105, 20-26.

Ingram J. et Bartels D. (1996) The molecular basis of tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47, 377-403.

J:

Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K., and Reimann, J.D.R. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends in Cell Biology* 10, 429-439.

- Jacques, M.A., Josi, K., Darrasse, A., and Samson, R.** (2005). *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2008-2015.
- Jang, J.C., and Sheen, J.** (1997). Sugar sensing in higher plants. *Trends in Plant Science* 2, 208-214.
- Jasinski, M., Kachlicki, P., Rodziewicz, P., Figlerowicz, M., and Stobiecki, M.** (2009). Changes in the profile of flavonoid accumulation in *Medicago truncatula* leaves during infection with fungal pathogen *Phoma medicaginis*. *Plant Physiology and Biochemistry (Paris)* 47, 847-853.
- Jefferson, R., Goldsbrough, A., and Bevan, M.** (1990). Transcriptional Regulation of a Patatin-1 Gene in Potato. *Plant Molecular Biology* 14, 995-1006.
- Jiang R. et Carlson M.** (1996) Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev*, 10, 3105-3115.
- Jiang R. et Carlson M.** (1997) The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol Cell Biol*, 17, 2099-2106.
- Job, C., Rajjou, L., Lovigny, Y., Belghazi, M., and Job, D.** (2005). Patterns of Protein Oxidation in Arabidopsis Seeds and during Germination. *PLANT PHYSIOLOGY* 138, 790-802.
- Johnston, M., and Kim, J.H.** (2005). Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Society Transactions* 33, 247-252.
- Jordi, M.-R., Espunya, M.C., Maria, P., Joaquin, A., and Martínez, M.C.** (2008). A role for protein kinase CK2 in plant development: evidence obtained using a dominant-negative mutant. *The Plant Journal* 55, 118-130.
- Jorgensen, S.B., Nielsen, J.N., Birk, J.B., Olsen, G.S., Viollet, B., Andreelli, F., Schjerling, P., Vaultont, S., Hardie, D.G., Hansen, B.F., Richter, E.A., and Wojtaszewski, J.F.P.** (2004). The alpha 2-5 ' AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading. *Diabetes* 53, 3074-3081.
- Jossier M, Bouly JP, Meimoun P, Arjmand A, Lessard P, Hawley S, Grahame Hardie D, Thomas M.** (2009) SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 59(2), 316-28
- Journet E.P., Harrison D. et Kondorosi E.** (2001) *Medicago truncatula* as biological material (Module 1). Dans : *EMBO practical course on the new plant model system Medicago truncatula*, 1-29.
- Jung, H.W., Kim, W., and Hwang, B.K.** (2003). Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. *Plant Cell and Environment* 26, 915-928.
- K:**
- Kagaya, Y., Toyoshima, R., Okuda, R., Usui, H., Yamamoto, A., and Hattori, T.** (2005). LEAFY COTYLEDON1 controls seed storage protein genes through its regulation of FUSCA3 and ABCISIC ACID INSENSITIVE3. *Plant and Cell Physiology* 46, 399-406.

- Kahn, B.A., Stoffella, P.J., Sandsted, R.F., and Hymes, W.L.** (1980). Effects of between-row spacing, cultivation, and genotype on growth and yield of black beans. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 106, 719-723.
- Katagiri, T., Ishiyama, K., Kato, T., Tabata, S., Kobayashi, M., and Shinozaki, K.** (2005). An important role of phosphatidic acid in ABA signaling during germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 43, 107-117.
- Kav, N.N.V., Srivastava, S., Goonewardene, L., and Blade, S.F.** (2004). Proteome-level changes in the roots of *Pisum sativum* in response to salinity. *Annals of Applied Biology* 145, 217-230.
- Keith, K., Kraml, M., Dengler, N.G., and McCourt, P.** (1994). *Fusca3* - a Heterochronic Mutation Affecting Late Embryo Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6, 589-600.
- Kemp, B.E.** (2004). Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract. *Journal of Clinical Investigation* 113, 182-184.
- Kermode A.R.** (1990) Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Crit Rev Plant Sci*, 9, 155-195.
- Kermode A.R.** (1997) Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seeds. *Seed Sci Res*, 7, 75-95.
- Kleinow T., Bahlero R., Breuer F., Umeda M., Salchert K. et Koncz C.** (2000) Functional identification of an *Arabidopsis* *Snf4* ortholog by screening for heterologous multicopy suppressors of *snf4* deficiency in yeast. *Plant J*, 23, 115-122.
- Koike, M., Takezawa, D., Arakawa, K., and Yoshida, S.** (1997). Accumulation of 19-kDa plasma membrane polypeptide during induction of freezing tolerance in wheat suspension-cultured cells by abscisic acid. *Plant and Cell Physiology* 38, 707-716.
- Kolbe, A., Tiessen, A., Schluepmann, H., Paul, M., Ulrich, S., and Geigenberger, P.** (2005). Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11118-11123.
- Kombrink, E., and Schmelzer, E.** (2001). The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European Journal of Plant Pathology* 107, 69-78.
- Koornneef M. et van der Veen J.H.** (1980) Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh. *Theoretical and Applied Genetics* 58(6), 257-263.
- Koornneef M., Hanhart C.J., Hilhorst H.W.M. et Karsen C.M.** (1989) *In vivo* inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 90, 463-469.
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P.S., Teunissen, A., Donaton, M.C.V., Van Dijck, P., Winderickx, J., de Winde, J.H., and Thevelein, J.M.** (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, *Gpr1*, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Molecular Microbiology* 32, 1002-1012.
- Kroj, T., Savino, G., Valon, C., Giraudat, J., and Parcy, F.** (2003). Regulation of storage protein gene expression in *Arabidopsis*. *Development* 130, 6065-6073.

- Kubler, E., Mosch, H.U., Rupp, S., and Lisanti, M.P.** (1997). Gpa2p, a G-protein alpha-subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 272, 20321-20323.
- Kucera B., Cohn M.A. et Leubner-Metzger G.** (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci Res*, 15, 281-307.
- Kuchin, S., Treich, I., and Carlson, M.** (2000). A regulatory shortcut between the Snf1 protein kinase and RNA polymerase II holoenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 7916-7920.
- Kulma, A., Villadsen, D., Campbell, D.G., Meek, S.E.M., Harthill, J.E., Nielsen, T.H., and MacKintosh, C.** (2004). Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Plant Journal* 37, 654-667.
- Kurup, S., Jones, H.D., and Holdsworth, M.J.** (2000). Interactions of the developmental regulator ABI3 with proteins identified from developing Arabidopsis seeds. *Plant Journal* 21, 143-155.
- Kushiro T., Okamoto M., Nakabayashi K., Yamagishi K., Kitamura S., Asami T., Hirai N., Koshiba T., Kamiya Y. et Nambara E.** (2004) The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases : key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J*, 23, 1647-1656.
- L:**
- Laby, R.J., Kincaid, M.S., Kim, D.G., and Gibson, S.I.** (2000). The Arabidopsis sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant Journal* 23, 587-596.
- Lakatos L., Klein M., Höfgen R. et Bánfalvi Z.** (1999) Potato StbSNF1 interacts with StbGAL83: a plant protein kinase complex with yeast and mammalian counterparts. *Plant J*, 17, 569-574.
- Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J.W., Frommer, W.B., and Ward, J.M.** (1999). The dual function of sugar carriers: Transport and sugar sensing. *Plant Cell* 11, 707-726.
- Lamb, C., and Dixon, R.A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 251-275.
- Laurie S., McKibbin R. et Halford N.G.** (2003) Antisense SNF1-related (SnRK1) protein kinase gene represses transient activity of an α -amylase (α -Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos. *J Exp Bot*, 54, 739-747.
- Le Guen L., Thomas M., Bianchi M., Halford N.G. et Kreis M.** (1992) Structure and expression of a gene from *Arabidopsis thaliana* encoding a protein related to SNF1 protein kinase. *Gene*, 120, 249-254.
- Lee S., Cheng H., King K.E., Wang W., He Y., Hussain A., Lo J., Harberd N.P. et Peng J.** (2002) Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA*-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev*, 16, 646-658.

- Leech A., Nath N., McCartney R.R. et Schmidt M.C.** (2003) Isolation of mutations in the catalytic domain of the Snf1 kinase that render its activity independent of the Snf4 subunit. *Eukaryot Cell*, 2, 265-273.
- Leopold A.C.** (1986) Membranes, metabolism, and dry organisms. Cornell University Press, Ithaca, New York, 17-21.
- LePageDegivry, M.T., Garello, G., and Barthe, P.** (1997). Changes in abscisic acid biosynthesis and catabolism during dormancy breaking in *Fagus sylvatica* embryo. *Journal of Plant Growth Regulation* 16, 57-61.
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N., and Caboche, M.** (2006). Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology* 57, 405-430.
- Leprince O. , van Aelst A.C., Pritchard H.W. et D.J. Cohn, MA** (1996) Chemical mechanisms of breaking seed dormancy. *Seed Sci Res.*, 6: 95-99
- Leprince O., Bronchart R. et Deltour R.** (1990) Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. *Plant Cell Environ*, 13, 539-546.
- Leprince O., Hendry G.A.F. et McKersie B.D.** (1993) The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci Res.*, 3, 231-246.
- Leprince, O., van Aelst, A.C., Pritchard, H.W., and Murphy, D.J.** (1998). Oleosins prevent oil-body coalescence during seed imbibition as suggested by a low-temperature scanning electron microscope study of desiccation-tolerant and -sensitive oilseeds. *Planta* 204, 109-119.
- Lesage, P., Yang, X.L., and Carlson, M.** (1996). Yeast SNF1 protein kinase interacts with SIP4, a C-6 zinc cluster transcriptional activator: A new role for SNF1 in the glucose response. *Molecular and Cellular Biology* 16, 1921-1928.
- Lessard P.** (1997) Caractérisation de la famille de gènes codant les protéines kinases homologues à SNF1, chez *Arabidopsis thaliana*. Contribution à l'étude de leur fonction chez les plantessupérieures. 244 pages. Thèse de doctorat, biologie. Université Paris Sud, faculté de sciences d'Orsay, 1997, n°1997PA112031.
- Leubner-Metzger, G.** (2001). Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. *Planta* 213, 758-763.
- Leubner-Metzger G.** (2002) Seed after-ripening and over-expression of class I beta-1,3-glucanase confer maternal effects on tobacco testa rupture and dormancy release *Planta* 215(6):959-68.
- Leubner-Metzger G.** (2003) Functions and regulation of β -1,3-glucanase during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Sci Res*, 13, 17-34.
- Leubner-Metzger, G.** (2005). beta-1,3-glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. *Plant Journal* 41, 133-145.

- Leung, J., Bouvierdurand, M., Morris, P.C., Guerrier, D., Cheddor, F., and Giraudat, J.** (1994). Arabidopsis Aba Response Gene *Abi1* - Features of a Calcium-Modulated Protein Phosphatase. *Science* 264, 1448-1452.
- Li, J., Hu, X.Y., Selvakumar, P., Russell, R.R., Cushman, S.W., Holman, G.D., and Young, L.H.** (2004). Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 287, E834-E841.
- Light, P.E., Wallace, C.H.R., and Dyck, J.R.B.** (2003). Constitutively active adenosine monophosphate - Activated protein kinase regulates voltage-gated sodium channels in ventricular myocytes. *Circulation* 107, 1962-1965.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* 25, 402-408.
- Lo, W.S., Duggan, L., Emre, N.C.T., Belotserkovskya, R., Lane, W.S., Shiekhattar, R., and Berger, S.L.** (2001). *Snf1* - a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase *Gcn5* to regulate transcription. *Science* 293, 1142-1146.
- Lopez-Molina L., Mongrand S. et Chua N-H.** (2001) A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci*, 98, 4782-4787.
- López-Paz C, Vilela B, Riera M, Pagès M, Lumbreras V.** (2009) Maize AKINbetagamma dimerizes through the KIS/CBM domain and assembles into SnRK1 complexes. *FEBS Lett.* 18;583(12), 1887-94
- Loreti, E., De Bellis, L., Alpi, A., and Perata, P.** (2001). Why and how do plant cells sense sugars? *Annals of Botany* 88, 803-812.
- Lotan, T., Ohto, M., Yee, K.M., West, M.A.L., Lo, R., Kwong, R.W., Yamagishi, K., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., and Harada, J.J.** (1998). Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93, 1195-1205.
- Lovas A., Sos-Hegedus A., Bimbo A. et Banfalvi Z.** (2003b) Functional diversity of potato SNF1-related kinases tested in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 321, 123-129.
- Lu CA, Lin CC, Lee KW, Chen JL, Huang LF, Ho SL, Liu HJ, Hsing YI, Yu SM.** (2007) The SnRK1A protein kinase plays a key role in sugar signaling during germination and seedling growth of rice. *Plant Cell.* 19(8), 2484-99.
- Ludin, K., Jiang, R., et Carlson, M.** (1998). Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the *Snf1* protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6245-6250.
- Luerssen, H., Kirik, V., Herrmann, P., et Misera, S.** (1998). FUSCA3 encodes a protein with a conserved VP1/ABI3-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 15, 755-764.
- Lumbreras, V., Alba, M.M., Kleinow, T., Koncz, C., et Pages, M.** (2001). Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. *Embo Reports* 2, 55-60.

M:

Maldonado A.M., Doerner P., Dixon R.A., Lamb C.J. et Cameron R.K. (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **419**, 399-403.

Man A.L., Purcell P.C., Hannappel U. et Halford N.G. (1997) Potato SNF1-related protein kinase: molecular cloning, expression analysis and peptide kinase activity measurements. *Plant Mol Biol*, **34**, 31-43.

Manz, B., Muller, K., Kucera, B., Volke, F., et Leubner-Metzger, G. (2005). Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated in vivo by nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiology* **138**, 1538-1551.

Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B., Hugueney, P., Frey, A., et MarionPoll, A. (1996). Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *Embo Journal* **15**, 2331-2342.

Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D., et Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current Biology* **10**, 1247-1255.

Matilla, A.J. (2000). Ethylene in seed formation and germination. *Seed Science Research* **10**, 111-126.

Matsumoto K., Toh-e A. et Oshima Y. (1981) Isolation and characterization of dominant mutations resistant to carbon catabolite repression of galactokinase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **1**, 83-93.

Maude, R.B. (1996). Seedborne diseases and their control: principles and practice. *Seedborne diseases and their control: principles and practice.*, xvii + 280 pp.

McCartney R.R. et Schmidt M.C. (2001) Regulation of Snf1 kinase. *J Biol Chem*, **28**, 36460-36466.

McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.P., and Steber, C.M. (2003). The *Arabidopsis* SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **15**, 1120-1130.

McKibbin, R.S., Muttucumar, N., Paul, M.J., Powers, S.J., Burrell, M.M., Coates, S., Purcell, P.C., Tiessen, A., Geigenberger, P., and Halford, N.G. (2006). Production of high-starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1. *Plant Biotechnology Journal* **4**, 409-418.

McQueenmason, S.J., and Cosgrove, D.J. (1995). Expansin Mode of Action on Cell-Walls - Analysis of Wall Hydrolysis, Stress-Relaxation, and Binding. *Plant Physiology* **107**, 87-100.

Meinke D.W. (1992) A homoeotic mutant of *Arabidopsis thaliana* with leafy cotyledons. *Science*, **258**, 1647-1650.

Meinke D.W., Franzmann L.H., Nickle T.C. et Yeung E.C. (1994) *Leafy cotyledon* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **6**, 1049-1064.

Mewes, H.W., Heumann, K., Kaps, A., Mayer, K., Pfeiffer, F., Stocker, S., and Frishman, D. (1999). MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Research* 27, 44-48.

Michel B.E., Kaufmann M.R. (1973) The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant physiol.* 51, 914-916.

Mitchell, K.I., Stapleton, D., Gao, G., House, C., Michell, B., Katsis, F., Witters, L.A., and Kemp, B.E. (1994). Mammalian Amp-Activated Protein-Kinase Shares Structural and Functional Homology with the Catalytic Domain of Yeast Snf1 Protein-Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 269, 2361-2364.

Mitchum, M.G., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kuwahara, A., Yoshioka, Y., Kato, T., Tabata, S., Kamiya, Y., and Sun, T.P. (2006). Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in Arabidopsis development. *Plant Journal* 45, 804-818.

Miura, K., Lin, S.Y., Yano, M., and Nagamine, T. (2002). Mapping quantitative trait loci controlling seed longevity in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 104, 981-986.

Moise, J.A., Han, S., Gudynaite-Savitch, L., Johnson, D.A., and Miki, B.L.A. (2005). Seed coats: structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 41, 620-644.

Moriya, H., and Johnston, M. (2004). Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 1572-1577.

Muller, K., Tintelnot, S., and Leubner-Metzger, G. (2006). Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: Abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 47, 864-877.

Muoio, D.M., Seefeld, K., Witters, L.A., and Coleman, R.A. (1999). AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochemical Journal* 338, 783-791.

Muranaka T., Banno H. et Machida Y. (1994) Characterization of tobacco protein kinase NKP5, a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 that constitutively activates expression of the glucose-repressible *SUC2* gene for a secreted invertase of *S. cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 14, 2958-2965.

N:

Naested, H., Frandsen, G.I., Jauh, G.Y., Hernandez-Pinzon, I., Nielsen, H.B., Murphy, D.J., Rogers, J.C., and Mundy, J. (2000). Caleosins: Ca²⁺-binding proteins associated with lipid bodies. *Plant Molecular Biology* 44, 463-476.

Nakabayashi K, Okamoto M, Koshiha T, Kamiya Y, Nambara E (2005) Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant J* 41, 697-709

Nakamura, S., Lynch, T.J., and Finkelstein, R.R. (2001). Physical interactions between ABA response loci of Arabidopsis. *Plant Journal* 26, 627-635.

Naoumkina, M., Farag, M.A., Sumner, L.W., Tang, Y.H., Liu, C.J., and Dixon, R.A. (2007). Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17909-17915.

Naoumkina, M.A., He, X.Z., and Dixon, R.A. (2008). Elicitor-induced transcription factors for metabolic reprogramming of secondary metabolism in *Medicago truncatula*. *Bmc Plant Biology* 8.

Nehlin, J.O., Carlberg, M., and Ronne, H. (1991). Control of Yeast Gal Genes by Mig1 Repressor - a Transcriptional Cascade in the Glucose Response. *Embo Journal* 10, 3373-3377.

Neugeborn L., Carlson M. (1984) Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 108(4), 845-858.

Ni, B.R., and Bradford, K.J. (1992). Quantitative Models Characterizing Seed-Germination Responses to Abscisic-Acid and Osmoticum. *Plant Physiology* 98, 1057-1068.

Ni, B.R., and Bradford, K.J. (1993). Germination and Dormancy of Abscisic Acid-Deficient and Gibberellin-Deficient Mutant Tomato (*Lycopersicon-Esculentum*) Seeds - Sensitivity of Germination to Abscisic-Acid, Gibberellin, and Water Potential. *Plant Physiology* 101, 607-617.

Nicolás, G., and Aldasoro, J.J. (1979). Activity of the pentose phosphate pathway and changes in nicotinamide nucleotide content during germination of seeds of *Cicer arietinum* L. *J. Exp. Bot.* 30,1163-1 170.

Nielsen, M.E., Lok, F., and Nielsen, H.B. (2006). Distinct developmental defense activations in barley embryos identified by transcriptome profiling. *Plant Molecular Biology* 61, 589-601.

Nonogaki H., Chen F., Bradford K.J. (2007) Mechanisms and genes involved in germination sensus stricto *Seed development, dormancy and germination*, 50-71.

Nonogaki H., Gee O.H. et Bradford K.J. (2000) A germination-specific endo-beta-mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. *Plant Physiol*, 123, 1235-1246.

Nuccio, M.L., and Thomas, T.L. (1999). ATS1 and ATS3: two novel embryo-specific genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 39, 1153-1163.

O:

Ogas, J., Kaufmann, S., Henderson, J., and Somerville, C. (1999). PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13839-13844.

Ogawa M., Hanada A., Yamauchi Y., Kuwahara A., Kamiya Y. et Yamaguchi S. (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell*, 15, 1591-1604.

Oliver, J.P., Castro, A., Gaggero, C., Cascon, T., Schmelz, E.A., Castresana, C., and Ponce Leon, I. (2009). Pythium infection activates conserved plant defense responses in mosses. *Planta* 230, 569-579.

Olsson, A.S.B., Engstrom, P., and Soderman, E. (2004). The homeobox genes ATHB12 and ATHB7 encode potential regulators of growth in response to water deficit in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 55, 663-677.

Oracz, K., Bouteau, H.E.M., Farrant, J.M., Cooper, K., Belghazi, M., Job, C., Job, D., Corbineau, F., and Bailly, C. (2007). ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant Journal* 50, 452-465.

Osborne, D.J. (1980). Senescence in seeds. *Senescence in plants.*, 13-37.

Ouaked, F., Rozhon, W., Lecourieux, D., and Hirt, H. (2003). A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *Embo Journal* 22, 1282-1288.

Ozcan, S., Dover, J., and Johnston, M. (1998). Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo Journal* 17, 2566-2573.

P:

Parcy F., Valon C., Kohara A., Misera S et Giraudat J. (1997) The *abscisic acid-insensitive3*, *fusca3*, and *leafy cotyledon1* loci act in concert to control multiple aspects of Arabidopsis seed development. *Plant Cell*, 9, 1265-1277.

Parcy, F., Valon, C., Raynal, M., Gaubier-Comella, P., Delseny, M., and Giraudat, J. (1994). Regulation of Gene Expression Programs during Arabidopsis Seed Development: Roles of the ABI3 Locus and of Endogenous Abscisic Acid. *THE PLANT CELL* 6, 1567-1582.

Pego, J.V., Weisbeek, P.J., and Smeekens, S.C.M. (1999). Mannose inhibits Arabidopsis germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiology* 119, 1017-1023.

Pellny, T.K., Ghannoum, O., Conroy, J.P., Schluempmann, H., Smeekens, S., Andralojc, J., Krause, K.P., Goddijn, O., and Paul, M.J. (2004). Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. *Plant Biotechnology Journal* 2, 71-82.

Penfield, S., Gilday, A.D., Halliday, K.J., and Graham, I.A. (2006). DELLA-mediated cotyledon expansion breaks coat-imposed seed dormancy. *Current Biology* 16, 2366-2370.

Peng, J.R., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., and Harberd, N.P. (1997). The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes & Development* 11, 3194-3205.

Pernas, M., Garcia-Casado, G., Rojo, E., Solano, R., and Sanchez-Serrano, J.J. (2007). A protein phosphatase 2A catalytic subunit is a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant Journal* 51, 763-778.

Petruzzelli, L., Coraggio, I., and Leubner-Metzger, G. (2000). Ethylene promotes ethylene biosynthesis during pea seed germination by positive feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase. *Planta* 211, 144-149.

Pirooznia, M., Nagarajan, V., and Deng, Y. (2007). GeneVenn - A web application for comparing gene lists using Venn diagrams. *Bioinformatics* 1, 420-422.

Platará, M., Ruiz, A., Serrano, R., Palomino, A., Moreno, F., and Arino, J. (2006). The Transcriptional Response of the Yeast Na⁺-ATPase ENA1 Gene to Alkaline Stress Involves Three Main Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry* 281, 36632-36642.

Pnueli L., Hallak-Herr E., Rozenberg M., Cohen M., Goloubinoff P., Kaplan A. et Mittler R. (2002) Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *Plant J*, 31, 319-330.

Polge C. Etude de la structure des complexes kinase AKIN chez *Arabidopsis thaliana*; expression et fonctions des sous-unités de type beta. 134 pages. Thèse de doctorat, biologie. Université Paris Sud, faculté de sciences d'Orsay, 2004, n°2004PA112031.

Pourcel, L., Routaboul, J.-M., Cheynier, V., Lepiniec, L., and Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science* 12, 29-36.

Pourcel, L., Routaboul, J.-M., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L., and Debeaujon, I. (2005). TRANSPARENT TESTA10 Encodes a Laccase-Like Enzyme Involved in Oxidative Polymerization of Flavonoids in Arabidopsis Seed Coat. *THE PLANT CELL* 17, 2966-2980.

Price, A.H., and Hendry, G.A.F. (1991). Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. *Plant, Cell and Environment* 14, 477-484.

Price, J., Li, T.C., Kang, S.G., Na, J.K., and Jang, J.C. (2003). Mechanisms of glucose signaling during germination of Arabidopsis. *Plant Physiology* 132, 1424-1438.

Probert, R.J. (2000). The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination. In *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities, 2nd edition*, M. Fenner, ed (CAB International), pp. 261-292.

Purcell, P.C., Smith, A.M., and Halford, N.G. (1998). Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *Plant Journal* 14, 195-202.

Purkrtova, Z., Le Bon, C., Kralova, B., Ropers, M.H., Anton, M., and Chardot, T. (2008). Caleosin of Arabidopsis thaliana: Effect of Calcium on Functional and Structural Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 11217-11224.

Q:

Quinlivan B.J. (1961) The effect of constant and fluctuating temperatures on the permeability of the hard seeds of some legume species. *Aust. J. Agric. Res.* 12, 1009-1022.

R:

Radchuk R., Radchuk V., Weschke W., Borisjuk L et Weber H. (2006) Repressing the expression of the sucrose nonfermenting-1-related protein kinase gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. *Plant Physiol*, 140, 263-278.

Rajjou, L., and Debeaujon, I. (2008). Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus Biologies* 331, 796-805.

- Rajjou, L., Belghazi, M., Huguet, R., Robin, C., Moreau, A., Job, C., and Job, D.** (2006). Proteomic Investigation of the Effect of Salicylic Acid on Arabidopsis Seed Germination and Establishment of Early Defense Mechanisms. *PLANT PHYSIOLOGY* 141, 910-923.
- Rajjou, L., Gallardo, K., Debeaujon, I., Vandekerckhove, J., Job, C., and Job, D.** (2004). The effect of alpha-amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiology* 134, 1598-1613.
- Ramaih, S., Guedira, M., and Paulsen, G.M.** (2003). Relationship of indoleacetic acid and tryptophan to dormancy and preharvest sprouting of wheat. *Functional Plant Biology* 30, 939-945.
- Ramanjulu S. et Bartels D.** (2002) Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ*, 25, 141-151.
- Ramon, M., Rolland, F., Thevelein, J., Dijck, P., and Leyman, B.** (2007). ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on Arabidopsis growth and starch breakdown. *Plant Molecular Biology* 63, 195-206.
- Ramos, J., and Bisseling, T.** (2003). A method for the isolation of root hairs from the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany* 54, 2245-2250.
- Randez-Gil, F., Sanz, P., Entian, K.D., and Prieto, J.A.** (1998). Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Molecular and Cellular Biology* 18, 2940-2948.
- Raz V., Bergervoet J.H.W. et Koornneef M.** (2001) Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 128, 243-252.
- Rider, S.D., Henderson, J.T., Jerome, R.E., Edenberg, H.J., Romero-Severson, J., and Ogas, J.** (2003). Coordinate repression of regulators of embryonic identity by PICKLE during germination in Arabidopsis. *Plant Journal* 35, 33-43.
- Roberts, E.H., and Smith, R.D.** (1977). Dormancy and the pentose phosphate pathway. In *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination.*, A.A. Khan, ed (Amsterdam: Elsevier), pp. 385-411.
- Roitsch, T.** (1999). Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 198-206.
- Rolland F., Moore B. et Sheen J.** (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell*, S185-S205.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J.** (2006). Sugar sensing and signalling in plants: Conserved and Novel Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57, 675-709.
- Rosnoblet C, Aubry C, Leprince O, Vu BL, Rogniaux H, Buitink J.** (2007) The regulatory gamma subunit SNF4b of the sucrose non-fermenting-related kinase complex is involved in longevity and stachyose accumulation during maturation of *Medicago truncatula* seeds. *Plant J.* 51(1), 47-59

Roxrud, I., Lid, S.E., Fletcher, J.C., Schmidt, E.D.L., and Opsahl-Sorteberg, H.G. (2007). GASA4, one of the 14-member Arahidopsis GASA family of small polypeptides, regulates flowering and seed development. *Plant and Cell Physiology* 48, 471-483.

Ruifen L., Junwen Z., Jianhua W., Hongzhi W., Yanzhen W. et Rongcai M. (2009) Functions and mechanisms of the CBL–CIPK signaling system in plant response to abiotic stress. *Progress in Natural Science* 19(6), 667-676.

Russell, R.R., and Young, L.H. (1999). Inhibitors of AMP-activated protein kinase (AMPK) block hypoxia-mediated glucose uptake in ventricular papillary muscle. *Circulation* 100, 1807.

S:

Saha, A.K., Kaushik, V., Prentki, M., and Ruderman, N.B. (2000). Activation of 5'-AMP-activated protein kinase concurrently increases malonyl CoA decarboxylase and decreases acetyl CoA carboxylase in rat skeletal muscle. *Faseb Journal* 14, 334.

Sallon, S., Solowey, E., Cohen, Y., Korchinsky, R., Egli, M., Woodhatch, I., Simchoni, O., and Kislev, M. (2008). Germination, Genetics, and Growth of an Ancient Date Seed. *Science* 320, 1464.

Salon, C., Raymond, P., and Pradet, A. (1988). Quantification of carbon fluxes through the tricarboxylic acid cycle in early germinating lettuce embryos. *Journal of Biological Chemistry* 263, 12278-12287.

Salt, I., Celler, J.W., Hawley, S.A., Prescott, A., Woods, A., Carling, D., and Hardie, D.G. (1998). AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha 2 isoform. *Biochemical Journal* 334, 177-187.

Santangelo, G.M. (2006). Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70, 253-282.

Santos-Mendoza, M., Dubreucq, B., Baud, S., Parcy, F., Caboche, M., and Lepiniec, L. (2008). Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 54, 608-620.

Sanz, P., Alms, G.R., Haystead, T.A.J., and Carlson, M. (2000). Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Molecular and Cellular Biology* 20, 1321-1328.

Sattler, S.E., Gilliland, L.U., Magallanes-Lundback, M., Pollard, M., and DellaPenna, D. (2004). Vitamin E Is Essential for Seed Longevity and for Preventing Lipid Peroxidation during Germination. *Plant Cell* 16, 1419-1432.

Schmidt M.C. et McCartney R.R. (2000) β -subunits of Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition. *EMBO J*, 19, 4936-4943.

Schmitz, N., Abrams, S.R., and Kermode, A.R. (2000). Changes in abscisic acid content and embryo sensitivity to (+)-abscisic acid during the termination of dormancy of yellow cedar seeds. *Journal of Experimental Botany* 51, 1159-1162.

Schopfer, P., and Plachy, C. (1984). Control of Seed Germination by Abscisic Acid : II. Effect on Embryo Water Uptake in *Brassica napus* L. *PLANT PHYSIOLOGY* 76, 155-160.

- Schopfer, P., and Plachy, C.** (1985). Control of seed germination by abscisic acid: III. Effect on embryo growth potential (minimum turgor pressure) and growth coefficient (cell wall extensibility) in *Brassica napus* L. *PLANT PHYSIOLOGY* 77, 676-686.
- Schüller H.J., et Entian K.D.** (1988) Molecular characterization of yeast regulatory gene CAT3 necessary for glucose derepression and nuclear localization of its product. *Gene* 67(2), 247-257.
- Schüller H-J.** (2003) Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast. *Curr Genet*, 43, 139-160.
- Schwachtje J, Minchin PE, Jahnke S, van Dongen JT, Schittko U, Baldwin IT.** (2006) SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *Proc Natl Acad Sci*, 22;103(34), 12935-40.
- Schwechheimer, C., and Willige, B.C.** (2009). Shedding light on gibberellic acid signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 57-62.
- Scott, J.W., Ross, F.A., Liu, J.K.D., and Hardie, D.G.** (2007). Regulation of AMP-activated protein kinase by a pseudosubstrate sequence on the gamma subunit. *Embo Journal* 26, 806-815.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M.A., Cammue, B.P.A., and De Bolle, M.F.C.** (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* 46, 941-950.
- Senaratna T. et MC Kersie B.D.** (1986) Loss of desiccation tolerance in seed germination: a free radical mechanism of injury. Dans : *Membranes, Metabolism and Dry Organisms*. Leopold A.C. éd. Cornell University Press, Ithaca, NY, 85-101.
- Senaratna T., MC Kersie B.D. et Borochoy A.** (1987) Desiccation and free radical mediate changes in plant membranes. *J Exp Bot*, 38, 2005-2014.
- Serebriiskii, I.G., and Golemis, E.A.** (2001). Two-hybrid system and false positives. Approaches to detection and elimination. *Methods Mol Biol* 177, 123-134.
- Serrano, M., and Guzman, P.** (2004). Isolation and gene expression analysis of *Arabidopsis thaliana* mutants with constitutive expression of ATL2, an early elicitor-response RING-H2 zinc-finger gene. *Genetics* 167, 919-929.
- Sheen, J., Zhou, L., and Jang, J.C.** (1999). Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 410-418.
- Shen W, Reyes MI, Hanley-Bowdoin L.** (2009) *Arabidopsis* protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop. *Plant Physiol.* 150(2), 996-1005
- Sherwin H.W. Farrant J.M.** (1996) Differences in rehydration of three desiccation-tolerant angiosperm species. *Annu Bot*, 78, 703-710.
- Shinomura, T., Nagatani, A., Hanzawa, H., Kubota, M., Watanabe, M., and Furuya, M.** (1996). Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8129-8133.

- Shinomura, T., Hanzawa, H., Schafer, E., and Furuya, M.** (1998). Mode of phytochrome B action in the photoregulation of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 13, 583-590.
- Shirra, M.K., McCartney, R.R., Zhang, C., Shokat, K.M., Schmidt, M.C., and Arndt, K.M.** (2008). A Chemical Genomics Study Identifies Snf1 as a Repressor of GCN4 Translation. *Journal of Biological Chemistry* 283, 35889-35898.
- Shirra, M.K., Patton-Vogt, J., Ulrich, A., Liuta-Tehlivets, O., Kohlwein, S.D., Henry, S.A., and Arndt, K.M.** (2001). Inhibition of acetyl coenzyme a carboxylase activity restores expression of the INO1 gene in a snf1 mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 21, 5710-5722.
- Skriver K. et Mundy J.** (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell*, 2, 503-512.
- Slocombe SP, Beaudoin F, Donaghy PG, Hardie DG, Dickinson JR, Halford NG.** (2004) SNF1-related protein kinase (snRK1) phosphorylates class I heat shock protein. *Plant Physiol Biochem.* 2004 Feb;42(2):111-6.
- Smalle, J., Kurepa, J., Yang, P., Emborg, T.J., Babiychuk, E., Kushnir, S., and Vierstra, R.D.** (2003). The Pleiotropic Role of the 26S Proteasome Subunit RPN10 in Arabidopsis Growth and Development Supports a Substrate-Specific Function in Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell* 15, 965-980.
- Smeeckens S.** (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Mol Biol*, 51, 49-81.
- Smeeckens, S., Huijser, C., Pego, J., and Kortstee, A.** (1999). Sugar sensing in plants. *Journal of Experimental Botany* 50, 10.
- Smith, A., Ward, M.P., and Garrett, S.** (1998). Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *Embo Journal* 17, 3556-3564.
- Somssich, I.E.** (2006). Networks of transcriptional regulation underlying plant defense responses toward phytopathogens. *Regulation of transcription in plants*, 266-284.
- Somssich, I.E., Schmelzer, E., Bollmann, J., and Hahlbrock, K.** (1986). Rapid Activation by Fungal Elicitor of Genes Encoding Pathogenesis-Related Proteins in Cultured Parsley Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 2427-2430.
- Srivastava, S., Emery, R.J.N., Kurepin, L.V., Reid, D.M., Fristensky, B., and Kav, N.N.V.** (2006). Pea PR 10.1 is a ribonuclease and its transgenic expression elevates cytokinin levels. *Plant Growth Regulation* 49, 17-25.
- Srivastava, S., Fristensky, B., and Kav, N.N.V.** (2004). Constitutive expression of a PR10 protein enhances the germination of *Brassica napus* under saline conditions. *Plant and Cell Physiology* 45, 1320-1324.
- Steadman, K.J., Bignell, G.P., and Ellery, A.J.** (2003). Field assessment of thermal after-ripening time for dormancy release prediction in *Lolium rigidum* seeds. *Weed Research* 43, 458-465.

- Steber C.M., Cooney S.E. et McCourt P.** (1998) Isolation of the GA-response mutant *sly1* as a suppressor of *ABII-1* in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 149, 509-521.
- Still, D.W., and Bradford, K.J.** (1997). Endo- β -Mannanase Activity from Individual Tomato Endosperm Caps and Radicle Tips in Relation to Germination Rates. *PLANT PHYSIOLOGY* 113, 21-29.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., and Farmer, E.E.** (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 12837-12842.
- Stone, S.L., Kwong, L.W., Yee, K.M., Pelletier, J., Lepiniec, L.c., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., and Harada, J.J.** (2001). LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11806-11811.
- Sugden C., Crawford R.M., Halford N.G. et Hardie D.G.** (1999a) Regulation of spinach SNF1-related (SNRK1) kinase by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J*, 19, 433-439.
- Sugden C., Donaghy P.G., Halford N.G. et Hardie D.G.** (1999b) Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiol*, 120, 257-274.
- Sun W.Q., Irving T.C. et Leopold A.C.** (1994) The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. *Physiol Plant*, 90, 621-628.
- Sun, T.P., and Gubler, F.** (2004). Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 55, 197-223.
- Sutherland C.M., Hawley S.A., McCartney R.R., Leech A., Stark M.J.R., Schmidt M.C. et Hardie D.G.** (2003) Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Curr Biol*, 13, 1299-1305.
- T :**
- Takano M., Kajiya-Kanegae H., Funatsuki H. et Kikuchi S.** (1998) Rice has two distinct classes of protein kinase genes related to SNF1 of *Saccharomyces cerevisiae*, which are differently regulated in early seed development. *Mol Genet Genomics*, 260, 388-394.
- Taylor G.B.** (1996) Effect of the environment in which seeds are grown and softened on the incidence of autumn seed softening in two species of annual medics. *Aust J Agric Res*, 47, 141-159.
- Thelander M., Olson T. et Ronne H.** (2004) Snf1-related protein kinase 1 is needed for growth in a normal day-night light cycle. *EMBO J*, 23, 1900-1910.
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L.A., Rhee, S.Y., and Stitt, M.** (2004). mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal* 37, 914-939.

- Thomma, B., Nelissen, I., Eggermont, K., and Broekaert, W.F.** (1999). Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant Journal* 19, 163-171.
- Thompson-Jaeger, S., Francois, J., Gaughran, J.P., and Tatchell, K.** (1991). Deletion of SNF1 Affects the Nutrient Response of Yeast and Resembles Mutations Which Activate the Adenylate Cyclase Pathway. *Genetics* 129, 697-706.
- Thornton C., Snowden M.A. et Carling D.** (1998) Identification of a novel AMP-activated protein kinase β subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 273, 12443-12450.
- Tiessen A., Prescha K., Branscheid A., Palacios N., McKibbin R., Halford N.G. et Geigenberger P.** (2003) Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylation. *Plant J*, 35, 490-500.
- Tirajoh A., Aung T.S.T., McKay A.B. et Plant A.L.** (2005) Stress-responsive a-dioxygenase expression in tomato roots. *J Exp Bot*, 56, 713-723.
- To A., Valon C., Savino G., Guilleminot J., Devic M., Giraudat J et Parcy F.** (2006) A network of local and redundant gene regulation governs *Arabidopsis* seed maturation. *Plant Cell*, 18, 1642-1656.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., and Wigler, M.** (1987). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase 50, 277-287.
- Tommasi, F., Paciolla, C., and Arrigoni, O.** (1999). The ascorbate system in recalcitrant and orthodox seeds. *Physiologia Plantarum* 105, 193-198.
- Toorop P.E., Barroco M.R., Engler G., Groot S.P.C. et Hilhorst H.W.M.** (2005) Differentially expressed genes associated with dormancy or germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Planta*, 221, 637-647.
- Toroser D., Plaut Z. et Huber S.C.** (2000) Regulation of a plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiol*, 123, 403-411.
- Towbin H., Staehelin T. et Gordon J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76, 4350-4354.
- Townley, R., and Shapiro, L.** (2007). Crystal Structures of the Adenylate Sensor from Fission Yeast AMP-Activated Protein Kinase. *Science* 315, 1726-1729.
- Toyomasu T, Kawaide H, Mitsuhashi W, Inoue Y, Kamiya Y.** (1998) Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiol.* 118,1517–23175.
- Treitel M.A., Kuchin S. et Carlson M.** (1998) Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 18, 6273-6280.
- Tsujimoto Y., Izawa S., et Inoue Y.** (2000) Cooperative regulation of *DOG2*, encoding 2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase, by Snf1 kinase and the high-osmolarity glycerol-

mitogen-activated protein kinase cascade in stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 182, 5121-5126.

Tyler L., Thomas S.G., Hu J., Dill A., Alonso J.M., Ecker J.R. et Sun T.P. (2004) Della proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 135, 1008-1019.

U:

Uno Y., Furihata T., Abe H., Yoshida R., Shinozaki K. et Yamaguchi-Shinozaki K. (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci.*, 97, 11632-11637.

V:

Van Assche J.A., Debucquoy K.L.A et Rommens W.A.F. (2003) Seasonal cycles in the germination capacity of buried seeds of some Leguminosae (*Fabaceae*). *New Phytol*, 158, 315-323.

Van Loon, L.C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103, 753-765.

Van Loon, L.C., and Van Strien, E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55, 85-97.

Van Sandt, V.S.T., Suslov, D., Verbelen, J.-P., and Vissenberg, K. (2007). Xyloglucan Endotransglucosylase Activity Loosens a Plant Cell Wall. *Annals of Botany*, mcm248.

Versele, M., de Winde, J.H., and Thevelein, J.M. (1999). A novel regulator of G protein signalling in yeast, Rgs2, downregulates glucose-activation of the cAMP pathway through direct inhibition of Gpa2. *EMBO J* 18, 5577-5591.

Versele, M., Lemaire, K., and Theveleina, J.M. (2001). Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. *EMBO Rep.* 2, 574-579.

Vertucci C.W. et Farrant J.F. (1995) Acquisition and loss of desiccation tolerance. Dans : Seed Development and Germination. Kigel J. et Galili G. éd. Marcel Dekker, New York, 237-271.

Verwoerd, T.C., Dekker, B.M. and Hoekema, A. (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* 17, 2362.

Viana, R., Towler, M.C., Pan, D.A., Carling, D., Viollet, B., Hardie, D.G., and Sanz, P. (2007). A conserved sequence immediately N-terminal to the Bateman domains in AMP-activated protein kinase gamma subunits is required for the interaction with the beta subunits. *Journal of Biological Chemistry* 282, 16117-16125.

- Vicente-Carbajosa J. et Carbonero P.** (2005) Seed maturation: developing an intrusive phase to accomplish a quiescent state. *The International journal of developmental biology* 49(5-6), 645-51
- Vicient, C.M., Bies-Etheve, N., and Delseny, M.** (2000). Changes in gene expression in the leafy cotyledon1 (*lec1*) and *fusca3* (*fus3*) mutants of *Arabidopsis thaliana* L. *Journal of Experimental Botany* 51, 995-1003.
- Vierling E.** (1997) The small heat shock protein in plants are members of an ancient family of heat induced proteins. *Physiol Plant*, 19, 539-547.
- Vijayan, P., Shockey, J., Levesque, C.A., Cook, R.J., and Browse, J.** (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7209-7214.
- Villalobos M.A., Bartels D et Iturriaga G.** (2004) Stress tolerance and glucose insensitive phenotypes in *Arabidopsis* overexpressing the *CpMYB10* transcription factor gene. *Plant Physiol*, 135, 309-324
- Vincent O. et Carlson M.** (1998) Sip4, a Snf1 kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of gluconeogenic genes. *EMBO J*, 17, 7002-7008.
- Vincent O., Townley R., Kuchin S. et Carlson M.** (2001) Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific β subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev*, 15, 1104-1114.
- W :**
- Wade, S.L., Poorey, K., Bekiranov, S., and Auble, D.T.** (2009). The Snf1 kinase and proteasome-associated Rad23 regulate UV-responsive gene expression. *EMBO J* advance online publication.
- Walters, C., Pammenter, N.W., Berjak, P., and Crane, J.** (2001). Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. *Seed Science Research* 11, 135-148.
- Wang M., Heimovaara-Dijkstra S. et Van Duijn B.** (1995) Modulation of germination of embryos isolated from dormant and nondormant barley grains by manipulation of endogenous abscisic acid. *Planta*, 195, 586-592.
- Wang T.L., Domoney C., Cliff L.H., Casey R. et Grusak A.** (2003) Can we improve the nutritional quality of legume seeds ? *Plant Physiol*, 131, 886-891.
- Wang, Z., Wilson, W.A., Fujino, M.A., and Roach, P.J.** (2001). Antagonistic Controls of Autophagy and Glycogen Accumulation by Snf1p, the Yeast Homolog of AMP-Activated Protein Kinase, and the Cyclin-Dependent Kinase Pho85p. *Molecular and Cellular Biology* 21, 5742-5752.
- Wareing P.F. et Saunders P.F.** (1971) **Hormones and dormancy.** *Annu Rev Plant Physiol*, 22, 261-288.
- Watkins, J.T., and Cantliffe, D.J.** (1983). Mechanical Resistance of the Seed Coat and Endosperm During Germination of *Capsicum-Annuum* at Low-Temperature. *Plant Physiology* 72, 146-150.

- Weber H, Borisjuk L, Wobus U** (2005) Molecular physiology of legume seed development. *Annu Rev Plant Biol*, 56, 253-79
- Weber H., Borisjuk L. et Wobus U.** (1997) Sugar import and metabolism during seed development. *Trends Plant Sci*, 2, 169-174.
- Wehmeyer N. et Vierling E.** (2000) The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol*, 122, 1099-1108.
- Wehmeyer N., Hernandez L.D., Finkelstein R.R. et Vierling E.** (1996) Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant physiology*, 112, 747-57.
- Weissbach A., Horecker B.L. et Hurwitz J.** (1956) The enzymatic formation of phosphoglyceric acid from ribulose diphosphate and carbon dioxide. *J Biol Chem*, 218, 795-810.
- Welbaum, G.E., and Bradford, K.J.** (1990). Water Relations of Seed Development and Germination in Muskmelon (*Cucumis melo* L.) : IV. Characteristics of the Perisperm during Seed Development. *PLANT PHYSIOLOGY* 92, 1038-1045.
- Welbaum, G.E., and Bradford, K.J.** (1991). Water Relations of Seed Development and Germination in Muskmelon (*Cucumis melo* L.): VII. Influence of after-ripening and ageing on germination responses to temperature and water potential. *Journal of Experimental Botany* 42, 1137-1145.
- Welbaum, G.E., and Meinzer, F.C.** (1990). Compartmentation of Solutes and Water in Developing Sugarcane Stalk Tissue. *PLANT PHYSIOLOGY* 93, 1147-1153.
- Welbaum, G.E., Muthui, W.J., Wilson, J.H., Grayson, R.L., and Fell, R.D.** (1995). Weakening of muskmelon perisperm envelope tissue 4. *Journal of Experimental Botany* 46, 391-400.
- Wen C-K. et Chang C.** (2002) Arabidopsis *RGL1* encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell*, 14, 87-100.
- Wenzler, H., Mignery, G., Fisher, L., and Park, W.** (1989). Sucrose-regulated expression of a chimeric potato tuber gene in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology* 13, 347-354.
- White C.N. et Rivin C.J.** (2000) Gibberellins and seed development in maize. II. Gibberellin synthesis inhibition enhances abscisic acid signaling in cultured embryos. *Plant Physiol*, 122, 1089-1098.
- White C.N., Proebsting W.M., Hedden P. et Rivin C.J.** (2000) Gibberellins and seed development in maize. I. evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. *Plant Physiol*, 122, 1081-1088.
- Wilson W.A., Hawley S.A., Hardie D.G.** (1996) Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP: ATP ratio. *Curr Biol*, 6, 1426-34.

Wingler, A., Fritzius, T., Wiemken, A., Boller, T., and Aeschbacher, R.A. (2000). Trehalose Induces the ADP-Glucose Pyrophosphorylase Gene, *ApL3*, and Starch Synthesis in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY* 124, 105-114.

Winston, G.W. (1990). Physiochemical basis for free radical formation in cells: production and defences. In *Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms*, R.G. Alscher and J.R. Cumming, eds (New York: Wiley-Liss), pp. 57–86.

Wobus U. et Weber H. (1999) Seeds maturation : genetic programmes and control signals. *Curr Opin Plant Biol*, 2, 33-38.

Woods A., Cheung P.C.F., Smith F.C., Davison M.D., Scott J., Beri R.K. et Carling D. (1996) Characterization of AMP-activated protein kinase β and γ subunits. *J Biol Chem*, 271, 10282-10290.

Woods A., Johnstone S.R., Dickerson K., Leiper F.C., Fryer L.G.D., Neumann D., Schlattner U., Wallimann T., Carlson M. et Carling D. (2003) LKB1 in the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol*, 13, 2004-2008.

Woods A., Munday M.R., Scott J., Yang X., Carlson M. et Carling D. (1994) Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *J Biol Chem*, 269, 19509-15.

Wu C-T., Leubner-Metzger G., Meins F. Jr. et Bradford K.J. (2001) Class I -1,3-glucanase and chitinase are expressed in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiol*, 126, 1299-1313.

X :

Xiao L. et Koster K.L. (2001) Desiccation tolerance of protoplasts isolated from pea embryos. *J Exp Bot*, 52, 2105-2114.

Xiao, W.Y., Sheen, J., and Jang, J.C. (2000). The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Molecular Biology* 44, 451-461.

Y :

Yadav, U.C.S., Ramana, K.V., Awasthi, Y.C., and Srivastava, S.K. (2008). Glutathione level regulates HNE-induced genotoxicity in human erythroleukemia cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 227, 257-264.

Yaguchi S. et Tsurugi K. (2003) Gts1p activates *SNF1*-dependent derepression of *HSP104* and *TPS1* in the stationary phase of yeast growth. *J Biol Chem*, 278, 29760-29768.

Yamaguchi S. et Kamiya K. (2002) Gibberellins and light-stimulated seed germination. *J Plant Growth Regul*, 20, 369-373.

Yamaguchi S. et Kamiya Y. (2002) Gibberellins and light-stimulated seed germination. *J Plant Growth Regul*, 20, 369-376.

Yamaguchi S., Kamiya Y. et Sun T-P. (2001) Distinct cell-specific expression patterns of early and late gibberellin biosynthetic genes during Arabidopsis seed germination. *Plant J*, 28, 443-453.

- Yamauchi Y., Ogawa M., Kuwahara A., Hanada A., Kamiya Y. et Yamaguchi S.** (2004) Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell*, 16, 376-378.
- Yang X., Albert-Hubbard E.J. et Carlson M.** (1992) A protein kinase substrate identified by two hybrid system. *Science*, 257, 680-682.
- Yang X., Jiang R. et Carlson M.** (1994) A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex. *EMBO J*, 13, 5878-86.
- Yang, Q., Chen, Z.Z., Zhou, X.F., Yin, H.B., Li, X., Xin, X.F., Hong, X.H., Zhu, J.K., and Gong, Z.Z.** (2009). Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) Genes Increases Salt Tolerance in Transgenic Arabidopsis. *Molecular Plant* 2, 22-31.
- Yokoyama, R., Hirose, T., Fujii, N., Aspuria, E.T., Kato, A., and Uchimiya, H.** (1994). The rolC promoter of Agrobacterium rhizogenes Ri plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants. *Molecular and General Genetics MGG* 244, 15-22.
- Yoshida R., Hobo T., Ichimura K., Mizoguchi T., Takahashi F., Aronso J., Ecker J.R. et Shinozaki K.** (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, 43, 1473-1483.
- Yoshida R., Umezawa T., Mizoguchi T., Takahashi R., Takahashi F. et Shinozaki K.** (2006) The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 281, 5310-5318.
- Young, E.T., Dombek, K.M., Tachibana, C., and Ideker, T.** (2003). Multiple Pathways Are Co-regulated by the Protein Kinase Snf1 and the Transcription Factors Adr1 and Cat8. *Journal of Biological Chemistry* 278, 26146-26158.
- Young, L.H., Li, J., Baron, S.J., and Russell, R.R.** (2005). AMP-activated protein kinase: a key stress signaling pathway in the heart. *Trends Cardiovasc Med.* 15, 110-118.
- Z:**
- Zhang Y, Primavesi LF, Jhurrea D, Andralojc PJ, Mitchell RA, Powers SJ, Schluemann H, Delatte T, Wingler A, Paul MJ.** (2009) Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol.* 149(4), 1860-71
- Zhang Y., Shewry P.R., Jones H., Barcelo P., Lazzeri P.A. et Halford N.G.** (2001) Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence cause abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley. *Plant J*, 28, 431-441.
- Zhang, X., Garretton, V., and Chua, N.-H.** (2005). The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes & Development* 19, 1532-1543.
- Zhou M., Lin B.Z., Coughlin S., Vallega G. et Pilch P.F.** (2000) UCP-3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia, and AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279, 622-629.

Références

Zhou, L., Jang, J.-c., Jones, T.L., and Sheen, J. (1998). Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 10294-10299.

Zlatanova J.S., Ivanov P.V., Stoilov L.M., Chimshirova K.V. et Stanchev B.S. (1987) DNA repair precedes replicative synthesis during early germination in maize. *Plant Mol Biol*, 10, 139-144.

Zuk M., Skala J., Biernat J., Szopa J. (2003) Repression of six 14-3-3 protein isoforms resulting in the activation of nitrate and carbon fixation key enzymes from transgenic potato plants. *Plant science* 165, 731-741

La Sucrose non-fermenting Related Kinase (SnRK1), en interaction avec ses deux sous unités : β et γ (SNF4), est un important régulateur du métabolisme et des réponses aux stress chez les plantes. Le but de cette thèse est d'étudier le rôle de MtSNF4b, une sous unité γ spécifique des graines de *Medicago truncatula*, pendant l'imbibition en relation avec la germination. Une analyse physiologique de la germination des graines RNAi *MtSNF4b* au cours de la post maturation à sec montre que les graines n'exprimant pas MtSNF4b perdent leur dormance plus rapidement que les graines de type sauvage. Une analyse transcriptomique comparative entre des embryons RNAi *MtSNF4b* et types sauvages montre que la plupart des gènes sont réprimés dans les graines RNAi *MtSNF4b* et sont liés au stress biotiques. Ces gènes codent des pathogenesis related protéines de type PR-10, des chitinases ou des facteurs de transcription de type *WRKY* et des enzymes impliquées dans le métabolisme secondaire, notamment les voies métaboliques des phénylpropanoïdes et des isoflavonoïdes pour la biosynthèse de la médicarpine. Cependant, aucune différence dans la sensibilité des semences imbibées de type sauvage et RNAi *MtSNF4b* à deux souches de *Xanthomonas* par l'analyse de dynamiques de tailles des populations bactériennes n'a pu être mise en évidence. Des résultats préliminaires d'une étude de double hybride mettent en évidence plusieurs candidats potentiellement impliqués dans la régulation de ces gènes. La protéine MtSNF4b semble connecter la post maturation à sec avec les mécanismes de défenses dans les graines dormantes de *Medicago truncatula*.

Role of MtSNF4b protein in after ripening of *Medicago truncatula* Seeds.

The sucrose nonfermenting-related kinase (SnRK1) together with its two regulatory subunits, β et γ (SNF4), is an important regulator of plant metabolism and stress responses. The aim of this thesis is to study the role of MtSNF4b, a seed-specific γ subunit in *Medicago truncatula* during imbibition and germination. A physiological analysis of seed germination of RNAi *MtSNF4b* lines during after-ripening demonstrates that seeds that do not express MtSNF4b show faster dormancy release. A comparative transcriptomic analysis between wild type and RNAi *MtSNF4b* seeds shows that most of the differentially expressed genes are repressed in the RNAi seeds and are linked to biotic stress. Genes code pathogenesis-related proteins (PR10), chitinases, WRKY transcription factors and enzymes involved in phenylpropanoïd and isoflavonoïd metabolic pathways leading to medicarpin biosynthesis. However, no difference in the sensitivity to *Xanthomonas* strains, based on dynamic analysis of the bacterial populations was detected between wild type or RNAi *MtSNF4b* seeds. Preliminary results of a double hybrid analysis reveal several putative candidates that might be implicated in the regulation of these genes. MtSNF4b appears to connect the expression of constitutive gene expression of defense responses to after-ripening in dormant seeds of *M. truncatula*.

Mots clefs :

Dormance, germination, sucres, SnRK1, *Xanthomonas*