



HAL
open science

Étude cellulaire et moléculaire de la germination chez *Medicago truncatula*

Christine Gimeno-Gilles

► **To cite this version:**

Christine Gimeno-Gilles. Étude cellulaire et moléculaire de la germination chez *Medicago truncatula*. Biochimie [q-bio.BM]. Université d'Angers, 2009. Français. NNT: . tel-00460435

HAL Id: tel-00460435

<https://theses.hal.science/tel-00460435>

Submitted on 1 Mar 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.

Étude cellulaire et moléculaire de la germination chez *Medicago truncatula*

Thèse de doctorat

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale

ÉCOLE DOCTORALE VÉGÉTAL-ENVIRONNEMENT-NUTRITION-
AGRO-ALIMENTAIRE-MER

Présentée et soutenue publiquement

le : 27 mai 2009

à : Angers

par : Christine Gimeno-Gilles

Devant le jury ci-dessous :

Abdelhak EL AMRANI	Rapporteur	MCU-HDR	Université de Rennes 1
Marc LAHAYE	Rapporteur	DR2	INRA de Nantes-Angers
Bertrand HIREL	Président du jury	DR1	CNRS- INRA de Versailles

Directeur de thèse : Eric Lelièvre, MCU-HDR, Université d'Angers
Co-encadrant : Anis Limami, PR1, Université d'Angers

UMR 1191, Physiologie Moléculaire des Semences, 16 Bd Lavoisier, 49045 Angers Cedex 01

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Eric Lelièvre et Anis Limami qui ont encadré ce travail. La confiance que j'ai reçue de leur part m'a permis de progresser et d'être formée à la profession de chercheur. Je remercie aussi l'ensemble du personnel de l'UMR Physiologie Moléculaire des Semences, représenté par Olivier Leprince et Anis Limami pour m'avoir accueillie pendant quatre ans. Pour avoir accepté de juger ce travail, je remercie Abdelhak El Amrani, Marc Lahaye et Bertrand Hirel.

Je tiens à remercier également Nathalie Leduc, de l'UMR Sciences Agronomiques Appliquées à l'horticulture pour sa collaboration. Un très grand merci à Marc Lahaye et Fabienne Guillon de l'UMR Biopolymères Interaction Assemblage à INRA, de Nantes pour leur accueil, leur compétence et leur aide précieuse. Toute ma gratitude va également aux personnes qui m'ont aidé ou réalisé pour moi les manipulations : Brigitte Bouchet pour la microscopie, Jacqueline Vigouroux pour les dosages, Bernard Quéméner pour l'HPAEC/MS, Corinne Rondeau et Anne-Marie Brossard pour la RMN.

Merci à toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont aidé dans ce travail. En particulier, je remercie Laure Viau, ressource fondamentale du laboratoire, et Marie-Laure Gervais, pour sa coopération et sa personnalité vivifiante. Je pense également à Bénédicte Alibert, arrivée plus tard, mais soutien capital pour ce qui concerne la culture *in vitro*.

Un très grand merci à ma famille qui représenté un soutien inestimable. Merci à Claudine pour son optimisme à toute épreuve et pour sa participation. A ma mère, je suis extrêmement reconnaissante d'avoir assuré pour nous l'intendance, durant ces mois que j'ai partagés entre la rédaction et le maternage ; ce manuscrit ne serait pas ce qu'il est sans elle. Je remercie aussi mon père qui m'a transmis le goût de la science et de la nature ; il aurait été très heureux que je sois allée au bout des mes idées. Je remercie mes sœurs pour leur soutien inconditionnel et les amis qui sont restés (!). Bien sûr, merci à Raphaël d'avoir été toujours présent, sa foi a été mon deuxième moteur. Enfin, merci à Eva d'avoir tout changé.

Sommaire

Sommaire	2
Remerciements	1
Liste des figures	5
Liste des tableaux	5
Liste des abréviations	6
Introduction générale	8
<hr/>	
1-Contexte socio-économique	9
2-Le modèle <i>Medicago truncatula</i>	10
3-Biologie des semences	12
3.1-Vision globale	12
3.2-La fécondation, la morphogénèse et le développement des enveloppes	14
3.3-La maturation de la graine	17
3.4-La dormance	20
3.5-La phase de quiescence	21
3.6-La germination	22
3.7-La régulation de la maturation, de la dormance et de la germination	24
3.7.1-L'acide abscissique	24
3.7.2-Les gibbérellines	25
3.7.3-Les autres hormones	26
3.7.4-Régulateurs moléculaires	26
4-Contexte scientifique et objectifs de la thèse	28
Première Partie - Germination et réorganisation pariétale	30
<hr/>	
Chapitre 1 – Inhibition de la germination par l'acide abscissique : modulation de l'expression des gènes de restructuration pariétale	30
1-Introduction	31
2-Article publié: ABA-Mediated inhibition of germination is related to the inhibition of genes encoding cell-wall biosynthetic and architecture: modifying enzymes and structural proteins in <i>Medicago truncatula</i> embryo axis	33
3-Conclusion	55
Chapitre 2 – Croissance des cellules de l'axe embryonnaire au cours de la germination : structure et modifications de la paroi	57
1-Introduction	58
2-Matériel et méthodes	61
2.1-Matériel végétal	61
2.2-Extraction de la masse insoluble à l'alcool	61
2.3-Dosage des oses neutres et acides uroniques	62
2.3.1-Hydrolyse à l'acide sulfurique	62
2.3.2-Hydrolyse à l'acide tri-fluoroacétique	62

2.3.3-Dérivation des oses libérés et analyse en CPG	62
2.3.4-Calcul du pourcentage en ose	63
2.3.5-Dosage des acides uroniques par colorimétrie	64
2.4-Détermination des degrés de méthylation et d'acétylation	65
2.4.1-Calcul du degré de méthylation	65
2.4.2-Calcul du degré d'acétylation	66
2.5-Dégradation enzymatique des pectines	67
2.6-Chromatographie échangeuse d'anion haute performance	67
2.7-Spectrométrie de masse MALDI-TOF	68
2.8-Résonnance magnétique nucléaire	68
2.9-Microscopie	68
2.9.1-Inclusion et coupes	69
2.9.2-Marquages des composés pariétaux	69
2.9.2.2-Immunomarquages	69
2.9.2.3-Marquage colorés et fluorescents	71
2.9.2.4-Observation des coupes	72
3-Résultats	73
3.1-Composition en oses pariétaux	73
3.2-Degré de substitution des pectines	75
3.3-Dosages enzymatiques	75
3.4-Empreintes enzymatiques	76
3.5-Spectres RMN	77
3.6-Microscopie	77
3.6.1-Cellulose	79
3.6.2-Callose	79
3.6.3-Composés pectiques	80
3.6.4-Hémicelluloses	83
3.6.5-Protéines pariétales	84
3.6.6-Tests de germination	84
4-Discussion	85
4.1-La germination est corrélée à un dépôt de callose	85
4.2-Modifications des branchements des pectines	87
4.3-Richesse en arabinose des parois des cellules de l'axe embryonnaire	88
4.4-Implication des protéines pariétales	89
4.5-Structuration en fuseaux de cellules	90
Seconde Partie – Étude structurale et fonctionnelle du gène <i>MtSAP1</i>	92
Chapitre 1 – <i>MtSAP1</i> : organisation et expression dans l'axe embryonnaire	92
1-Introduction	93
2-Article soumis: <i>MtSAP1</i> , a stress-associated protein containing A20/AN1 zinc-finger domains, is involved in seed maturation in the model legume <i>Medicago truncatula</i>	94
Abstract	95
Introduction	96
Methods	99
Results	101
Discussion	104
Figures	106
References	147

3-Conclusion	114
Chapitre 2 – Recherche de la fonction de <i>MtSAP1</i> : transgénèse et interaction protéine-protéine en système double-hybride	115
1-Introduction	116
2-Matériel et méthodes	118
2.1-Transgénèse	118
2.1.1-Matériel végétal	118
2.1.2-Clonage	118
2.1.2.1-Construction RNAi	118
2.1.2.2-Construction de surexpression	121
2.1.3-Transformation des agrobactéries	122
2.1.4-Transformation végétale	123
2.1.4.1-Transformation de <i>M. truncatula</i>	123
2.1.4.2-Transformation de <i>N. tabacum</i>	124
2.1.5-Étude de la génération T1	125
2.2-Banque de double hybride bactérien	125
2.2.1-Réalisation de la construction λ CI-MtSAP1	126
2.2.2-Construction de la banque d'ADNc	128
2.2.3-Criblage de la banque d'ADNc	129
2.2.4-Vérification de l'interaction	130
3-Résultats	131
3.1-Transgénèse	131
3.1.1-Transgénèse de <i>Medicago truncatula</i>	131
3.1.2-Transgénèse de <i>Nicotiana tabacum</i>	133
3.2-Double-hybride bactérien	133
4-Discussion	136
4.1-Les plantes transgéniques présentent phénotype sénescence	136
4.2-MtSAP interagit avec DREB, MBF et HR en système double hybride	137
4.3-Hypothèses sur la fonction de <i>MtSAP1</i>	140
4.3.1-Inhibition du signal stress	141
4.3.2-Tolérance à la dessiccation	141
4.3.3-Réponse au stress hypoxique	142
Conclusion générale et perspectives	143
Références bibliographiques	147
Annexes	169

Liste des figures

Figure 1.1 Importations, exportations et balance commerciale des semences en France de 1994 à 2006	9
Figure 1.2 Structure de l'appareil reproducteur chez <i>Medicago truncatula</i>	13
Figure 1.3 Développement embryonnaire chez <i>Arabidopsis</i>	16
Figure 1.4 Schéma de régulation de la maturation, de la dormance et de la germination	27
Figure 2.1 Evolution de la composition de la paroi en fonction du stade de développement	74
Figure 2.2 Evolution des composants libérés de la dégradation enzymatique des pectines	75
Figure 2.3 Spectre MALDI-TOF de la dégradation enzymatique de la MIA	76
Figure 2.4 Spectres du ¹³ C de la MIA des axes embryonnaires de <i>Medicago</i>	78
Figure 2.5 Marquage des parois des cellules d'axes embryonnaires au calcofluor à 5h, 15h et 21h d'imbibition des graines	79
Figure 2.6 Marquage des parois des cellules avec un anticorps spécifique de la callose à 5h, 15h, 21h d'imbibition des graines	80
Figure 2.7 Marquage des parois des cellules avec 2F4, anticorps spécifique des homogalacturonanes non substitués, à 5h, 15h, 21h d'imbibition des graines	81
Figure 2.8 Marquage des parois des cellules avec LM5, un anticorps spécifique des galactanes, à 5h, 15h, 21h d'imbibition des graines	82
Figure 2.9 Marquage des parois des cellules avec LM15, anticorps spécifique des xyloglucanes à 5h, 15h, 21h d'imbibition des graines	83
Figure 3.1 Schéma de clonage	120
Figure 3.2 Schéma du système double reporter du BacterioMatch® II Two-Hybrid System	126
Figure 3.3 Schéma général de la méthode du double-hybride bactérien	128
Figure 3.4 Phénotype observé après transformation	132

Liste des tableaux

Tableau 2.1: Récapitulatif des marquages réalisés sur les coupes d'axes embryonnaires de <i>Medicago truncatula</i>	70
Tableau 2.2 Origine et évolution de la teneur en glucose des parois	74

Tableau 3.1 Nombre de gousses et de graines obtenues pour chaque plant de <i>M. truncatula</i> transformé avec la construction d'extinction	132
Tableau 3.2 Nombre de colonies obtenues après chaque étape de sélection dans le système de double-hybride bactérien	133
Tableau 3.3 Identités des séquences interagissant avec MtSAP1 dans le système de double hybride bactérien	134

Liste des abréviations

µg : Microgramme
 µL : Microlitre
 µm : Micromètre
 µM : Micromolaire
 µs : Microseconde
 AAG : Acide galacturonique
 ABA : Acide abscissique
 ABRE : ABA-responsive element
 ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
 ADN : Acide désoxyribonucléique
 AGP : Arabinogalactane-protéine
 ARN : Acide ribonucléique
 ATP : Adénosine tri-phosphate
 BIA (UMR) : Biopolymères Interactions et Assemblage
 CHS : Chalcone synthase
 CPG : Chromatographie en phase gazeuse
 DEPC : Diethylpyrocarbonate
 DREB : Dehydration Responsive Element Binding Protein
 endoPG : Endopolygalacturonase
 EST : Expressed sequence tag
 g : Gramme ou accélération de la pesanteur (9,81 m.s⁻¹)
 GA : Acide gibberrellique
 Ga : Galactane
 GNIS : Groupement National Interprofessionnel des Semences
 GRP : Glycin-rich protein
 h : Heure
 HG : Homogalacturonane
 HPAEC : Chromatographie haute performance échangeuse d'anions
 HPLC : Chromatographie liquide haute performance
 HR : Hypoxia-Responsive family Protein
 HRGP : Hydroxyprolin-rich glycoprotéine
 HSP : Heat shock protein
 Hz : Hertz
 INRA : Institut national de la Recherche Agronomique
 JAP : Jours après pollinisation
 K : kelvin

Kd : constante d'affinité
KPa : kilopascal
L : Litre
LB : Luria-Broth (milieu de)
LEA : late embryogenesis abundant
M : molaire (concentration)
MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
Mb : Megabase
MBF: Multiple Protein Bridging Factor
mg : Miligramme
MHDP : Métahydroxydiphényl
MIA : Masse insoluble à l'alcool
mL : Mililitre
mm : Milimètre
mM : Milimolaire
mol : Mole
MS : Murashige et Skoog (milieu de)
N : Normale (concentration)
NFkB : Nuclear factor kB
nKat : Nanokatal
nm : Nanomètre
nM : Nanomolaire
PBS : phosphate buffer saline supplemented
PCR : Polymerase chain reaction
PEG : Polyéthylène glycol
PEPC : Phosphoenolpyruvate carboxylase
PME : Pectine méthylesterase
ppm : Part par million
PRP : Prolin-rich protein
PSV : Protein storage vacuole
RG : Rhamnogalacturonane
RMN : Résonance magnétique nucléaire
ROS : Reactive oxygen species
rpm : Rotations par minute
SAP : Stress-Associated protein
sec : Seconde
SPEMAS : Single Pulse Excitation Magic Angle Spinning
SSH : Hybridation suppressive et soustractive
TD : Tolérance à la Dessiccation
TFA : Acide tri-fluoroacétique
TILLING : Targeting Induced Local Lesions in Genomes
TOF: Time of flight
TRIS-HCl : 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol-HCl
U : Unité enzymatique
UV : Ultra-violet
XET : Xyloglucane endotransglycosylase

Introduction Générale

1-Contexte socio-économique

La France est le premier producteur européen de semences, le troisième exportateur mondial et son chiffre d'affaire total s'élevait à environ 2 milliard d'euros en 2005/2006 (source : www.gnis.fr). L'exportation de semences françaises se fait principalement à destination de l'Union Européenne (75%), l'Allemagne étant le principal client. La balance commerciale est positive depuis presque quinze ans et en constante progression (figure 1.1). Les principaux secteurs y contribuant sont le maïs, avec un solde de 157 millions d'euros, suivi des potagères (96 millions), des oléagineux (39 millions) et des betteraves (12 millions).

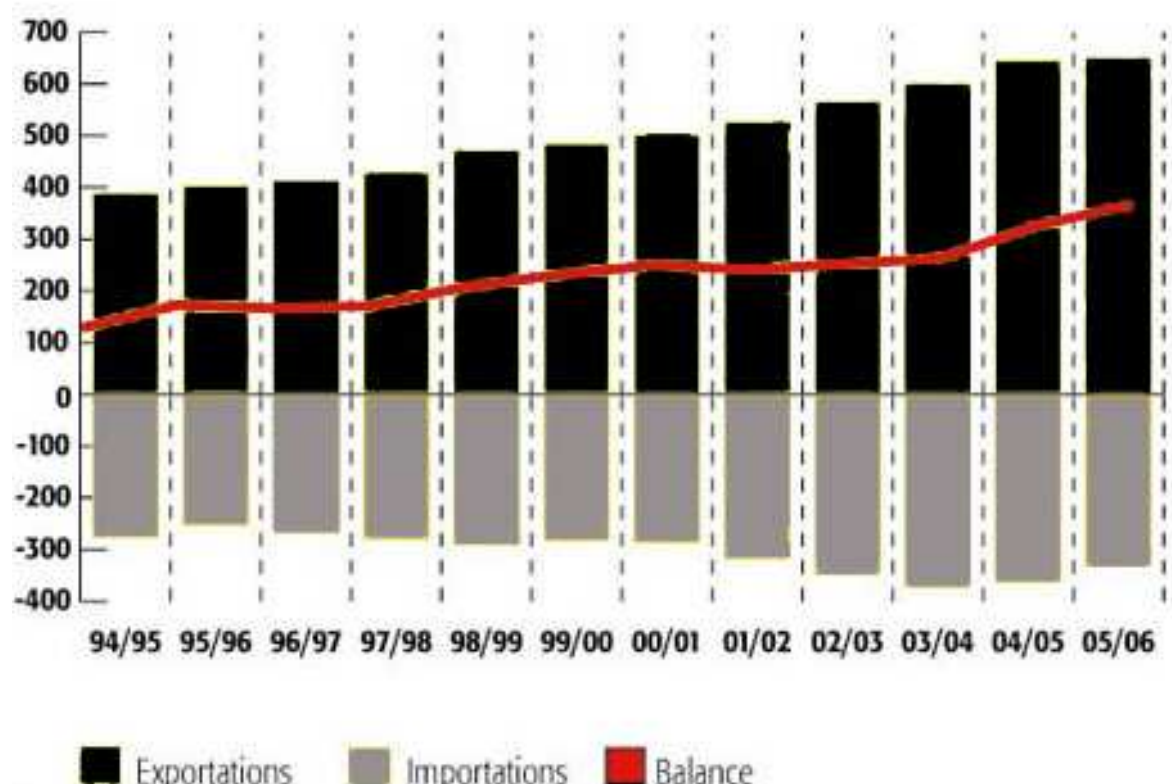


Figure 1.1 : Importations, exportations et balance commerciale des semences en France de 1994 à 2006. Les chiffres sont donnés en millions d'euros. Source : www.gnis.fr

Le pôle de compétitivité « végétal spécialisé » situé en région Pays-de-la-Loire a été reconnu projet à vocation mondiale. La région concentre de nombreuses compétences et acteurs de la filière semence : entreprises privées, instituts de recherche et de formation. L'Unité Mixte de Recherche « Physiologie Moléculaire des Semences » (UMR PMS), situé en Anjou, regroupe l'INRA de Nantes-Angers, l'Université d'Angers et l'Institut National d'Horticulture (INH). L'objectif des recherches qui y sont menées est d'acquérir une

meilleure compréhension de la physiologie des semences en vue d'en améliorer la qualité ; celle-ci se définissant comme la capacité d'une graine à produire une plante saine et vigoureuse. Cette capacité est liée au potentiel de conservation qui correspond à la tolérance à un certain nombre de stress (dessiccation, basses températures, hypoxie), et à la reprise de croissance au cours de la germination. Les plantes étudiées comme modèle sont *Arabidopsis thaliana* et des Légumineuses dont le pois (*Pisum sativum*) et *Medicago truncatula*.

Le travail de recherche présenté ici utilise *Medicago truncatula* en tant que modèle d'étude pour la famille des Légumineuses. Il se focalise sur les événements de germination, c'est-à-dire les processus intervenant à partir de l'imbibition de la graine et conduisant à la percée de la radicule hors des téguments.

2-Le modèle *Medicago truncatula*

La luzerne tronquée (*Medicago truncatula*) est une espèce végétale herbacée des régions méditerranéennes. Elle appartient à la famille botanique des Fabacées, plus couramment nommées Légumineuses ou Papilionacées. Cette famille rassemble environ 650 genres et 20 000 espèces (Doyle and Luckow, 2003). Ces plantes peuvent être des arbres (*ex : cytise*), des arbustes (*genêt*), des lianes (*glycine*) ou des plantes herbacées (*trèfle*). Le regroupement en famille est établi par phylogénie moléculaire basée sur la variabilité de marqueurs chloroplastiques. La proximité génétique induit une morphologie commune. Elle a d'ailleurs été le premier critère de classification des espèces végétales, établi par Linné au XVIII^e siècle. Chez les Légumineuses, l'organe reproducteur est commun à toutes les espèces : la fleur présente une corolle papilionacée et évolue en fruit de type gousse.

Une particularité importante des Légumineuses est leur relation particulière vis-à-vis de l'azote. De manière générale, les plantes utilisent l'azote minéral puisé dans le sol, essentiellement sous forme nitrique (NO₃). En plus de cette source, les légumineuses fixent l'azote gazeux atmosphérique (N₂). Plus exactement, ce sont les bactéries telluriques du genre *Rhizobium*, vivant en symbiose avec la plante qui sont capables de cette fixation. La plante crée un micro-habitat favorable au développement bactérien. Les bactéries sont abritées dans les tissus racinaires, le tout formant des nodosités. Communiquant directement avec les vaisseaux conducteurs, les bactéries reçoivent les éléments carbonés issus de la photosynthèse. Elles fournissent à la plante l'azote réduit sous forme ammoniacale (NH₄), issu de l'activité de l'enzyme nitrogénase. Le fonctionnement de cet enzyme est favorisé par la réduction de la teneur en dioxygène au niveau des nodosités, grâce à la présence de la

leghemoblobine (LegHb), hémoprotéine typique proche de l'hémoglobine, qui fixe le dioxygène. La partie protéique de la LegHb est synthétisée par la plante et l'hème par la bactérie.

Les légumineuses, comme d'autres nombreuses espèces végétales, peuvent s'associer avec des champignons pour former des endomycorhizes. L'ordre concerné est celui des Glomales. Le mycélium développé dans le sol pénètre dans les cellules des racines et se nourrit des éléments carbonés. Pour la plante, l'intérêt de la symbiose réside dans l'augmentation de ses apports en eau et en sels minéraux via le mycélium prolongeant ses racines.

D'un point de vue socio-économique, les Légumineuses occupent une place importante. Les pois, les haricots et les lentilles, par exemple, sont consommés pour leur intérêt nutritionnel, qui consiste notamment en apport protéique. Les oléoprotéagineux tels que l'arachide et le soja sont une source d'huile et de tourteau protéique pour l'industrie agro-alimentaire. La luzerne et le trèfle sont utilisés dans l'alimentation animale comme fourrage. En agriculture, dans un système de rotation de culture, les Légumineuses permettent de fertiliser les sols en azote, limitant les apports d'engrais.

Arabidopsis thaliana, modèle végétal classique, appartient à la famille des Brassicacées. Il est difficilement exploitable comme modèle pour les Légumineuses cultivées car la distance phylogénétique qui sépare les deux familles est trop grande. De plus, il ne présente pas les associations symbiotiques évoquées, il était donc important de disposer d'un modèle spécifique à la famille des Légumineuses. Pour la recherche, l'objectif final est de parvenir à améliorer la qualité (résistance aux parasites, productivité...) des espèces d'intérêt agronomique. Mais les Légumineuses d'intérêt présentent des inconvénients majeurs qui en font de mauvais modèles d'étude. La luzerne (*Medicago sativa*) et l'arachide (*Arachis hypogaea*) sont tetraploïdes, le pois (*Pisum sativum*) possède un génome de taille importante, et celui du soja (*Glycine max*) présente des duplications. D'autres sont allogames, difficiles à transformer où ont un temps de génération long. Enfin, certaines espèces comme le pois chiche (*Cicer arietinum*) ont des particularités biologiques peu adaptés à la culture de grande densité (grosses graines, peu de graines par plant). *Medicago truncatula* s'est imposé comme modèle parmi les Légumineuses. Son temps de génération est court (dix à douze semaines de graine à graine), son volume est peu important et il produit en abondance de petites graines. Les populations sont génétiquement homogènes car la plante est autogame. Le génome est diploïde et de petite taille (environ 450 Mb haploïde).

Le lotier (*Lotus japonicus*), qui présente les mêmes avantages que *Medicago truncatula*, est également étudié en tant que modèle des Légumineuses. Toutefois, *Medicago* est génétiquement plus proche des Légumineuses cultivées en Europe et s'est imposé dans la plupart des laboratoires. Des mutants de TILLING, les séquences génomiques, des banques d'EST sont disponibles publiquement ainsi que leurs outils associés. Un site internet dédié (www.medicago.org) regroupe les informations importantes et l'actualité de la communauté scientifique de *Medicago*. Récemment, un groupe de chercheurs a publié une cartographie de l'expression du génome dans les différents organes de la plante (Benedito et al., 2008).

Dans le genre *Medicago*, l'espèce *truncatula* regroupe de nombreux génotypes différents. Les plus utilisés en laboratoire sont A17, issu du cultivar Jemalong, et R-108, issu de l'ecotype 108-1. Le cultivar Parragio a été utilisé dans les études de germination présentées ici. En effet, malgré la forte homogénéité génétique inhérente à tous les génotypes, celui-ci présente une cinétique de germination beaucoup plus reproductible d'un individu à l'autre. De plus, les taux de germination sont élevés : de l'ordre de 95% après une simple levée de dormance au froid.

3-Biologie des semences

3.1-Vision globale

La graine est un des facteurs de dissémination des espèces végétales. Elle est issue de reproduction sexuée allogame (fécondation croisée entre deux individus) ou autogame (autofécondation). L'individu formé est donc différent de la plante mère. Chez beaucoup d'espèces, la reproduction végétative complète voire supprime la reproduction sexuée. Elle se fait alors à partir de tiges spécialisées (stolons de fraisier, rhizomes de bégonia, tubercules de pomme de terre), ou bien de bulbilles, qui se développent sur les côtés des bulbes (ail, oignon, tulipe...), ou enfin à partir de racines drageonnantes, racine horizontales sur lesquelles se développent des tiges dressées (framboisier, prunellier). En revanche, pour de nombreuses espèces annuelles, la graine est l'unique vecteur de propagation. C'est le cas notamment pour les plantes cultivées que sont le blé, le maïs, le soja... etc.

La graine est constituée de plusieurs types de tissus d'origines différentes : l'embryon, l'albumen et les téguments (figure 1.2a). L'embryon et l'albumen sont issus de la fécondation. L'embryon, qui représente l'élément principal de la graine, est totalement recouvert de l'albumen. Ce dernier constitue, chez les céréales, la zone de stockage des réserves

nécessaires au développement de la plantule avant l'acquisition de l'autotrophie. C'est le cas également pour certaines espèces dicotylédones (graines albuminées, ex : ricin) mais pour les autres, ce sont les cotylédons de l'embryon qui assument ce rôle (graines exalbuminées). A la périphérie de la graine, on retrouve les téguments, enveloppes protectrices plus ou moins résistantes. Elles sont d'origine maternelle et dérivent des tissus de l'ovaire (figure 1.2)

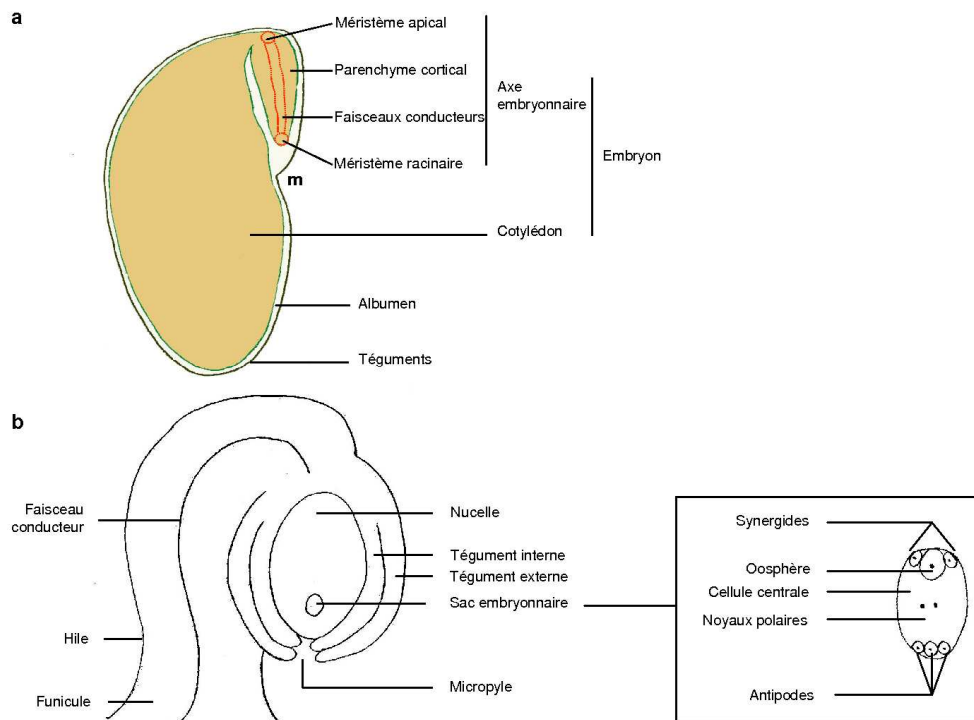


Figure 1.2 : Structure de l'appareil reproducteur chez *Medicago truncatula*. Graine (a) et organe reproducteur femelle (b). m, micropyle

La nature des réserves énergétiques varie selon les espèces. Elles peuvent-être glucidiques (amidon, chez le riz par exemple), lipidiques (colza, tournesol...), protéiques (luzerne), oléo-protéiques (arachide) ou gluco-protéiques (pois). L'intérêt nutritionnel ou industriel des plantes cultivées pour leurs graines réside donc dans leur capacité à produire des substances de réserve. Beaucoup de travaux de recherche ont pour objectif l'amélioration de la qualité et de la quantité de ces réserves. La graine est alors considérée comme un produit final et non comme une *semence*, point de départ crucial dans le développement d'une nouvelle plante.

Les travaux de recherche présentés ici considèrent la graine en tant que semence. La qualité y est donc définie comme la capacité à produire une plante saine et vigoureuse. Ceci implique le développement correct (morphogénèse) de l'embryon et des tissus qui le

nourrissent et le protègent. Les processus inhérents à la biologie de la graine correspondant à la maturation ont également leur importance : mise en place de la tolérance à la dessiccation (TD) et de la (ou des) dormance(s). La TD permet d'assumer une phase de quiescence lors de laquelle l'hydratation et le métabolisme sont extrêmement réduits. Les dormances peuvent revêtir plusieurs aspects qui seront exposées plus en détail par la suite. Pour simplifier, la capacité des graines à germer est faible voire nulle juste après la récolte, cette capacité augmentant avec la durée du stockage ; c'est ce que l'on appelle la dormance primaire. La capacité à produire une nouvelle plante implique également une germination réussie et l'acquisition de l'autotrophie.

Ces processus biologiques représentent des phases de développement dont la durée est très variable selon les espèces. Chez *Medicago*, la morphogénèse dure environ 12 jours et la maturation 24 jours. Les semences deviennent tolérantes à la dessiccation entre 16 et 20 jours après pollinisation (JAP), mais celle-ci commence à partir de 36 JAP alors que les dormances physiologiques et tégumentaires s'installent. Lorsque la gousse est sèche, après environ 40 JAP, elle tombe et les graines poursuivent leur déshydratation pour atteindre une teneur en eau très faible de l'ordre de $0,09 \text{ g d'eau.g}^{-1}$ (Boudet, 2006).

3.2-La fécondation, la morphogénèse et le développement des enveloppes

Chez les plantes à fleurs (angiospermes), la fécondation est double : le pollen porte deux noyaux haploïdes. L'un des noyaux fusionne avec les deux noyaux haploïdes de la cellule centrale du sac embryonnaire (figure 1.2b) pour donner le zygote accessoire triploïde, c'est-à-dire l'albumen. L'autre fusionne avec le noyau haploïde de l'oosphère (figure 1.2b), créant le zygote principal à l'origine de l'embryon. Les deux noyaux mâle sont identiques car ils proviennent de la division mitotique d'une cellule haploïde issue d'un unique événement de méiose. C'est également le cas pour les trois noyaux femelle. Les deux zygotes (albumen et embryon) sont donc génétiquement identiques mais présentent des développements tout à fait différents. Les noyaux de l'albumen se divisent en l'absence de cytokinèse ce qui conduit à la formation d'un syncytium. La cellularisation intervient plus tard par la formation de parois isolant les noyaux les uns des autres, huit jours après pollinisation chez *Medicago*. L'albumen prolifère pour occuper, dans un premier temps, la majeure partie du sac embryonnaire. Son développement est contrôlé par le ratio génomique maternel:paternel 2:1 dont l'importance est expliquée par l'imprinting de certains gènes de type polycomb (PcG). Une étude réalisée *in vitro* indique que le développement de l'albumen est indépendant de

celui de l'embryon (Kranz et al., 1998) mais il n'y a pas de réciprocité. L'embryon principal est dépendant de l'albumen pour son apport en acide aminés (Hirner et al., 1998) et pour le contrôle de son développement (Hong et al., 1996; Opsahl-Ferstad et al., 1997). Chez les Légumineuses, comme chez la plupart des plantes à fleurs, l'albumen est absorbé par l'embryon au cours du développement et est absent des graines matures (Goldberg et al., 1994). Chez *Medicago*, une couche résiduelle est observable entre l'embryon et les téguments.

Les divisions successives à partir de l'oosphère fécondé sont à la base de la morphogénèse. Le zygote est polarisé : la cellule présente une large vacuole à sa base et la majeure partie du cytoplasme se répartit à l'autre extrémité (Mansfield and Briarty, 1991). La première division sépare donc le zygote en deux cellules non symétriques en termes de taille et de densité cytoplasmique (figure 1.3). Chez *Arabidopsis*, la cellule fille apicale subit deux divisions longitudinales puis une division transverse pour aboutir à un embryon à huit cellules (figure 1.3). De manière synchronisée, la cellule fille basale se divise plusieurs fois pour donner le suspenseur et l'hypophyse (Tykarska, 1976, 1979). Au stade huit cellules, quatre régions peuvent être distinguées qui auront des destins différents. La première est composée des quatre cellules les plus apicales qui généreront le méristème apical et la majeure partie des cotylédons (figure 1.3). La seconde est composée des quatre cellules les plus basales issues de la cellule apicale du stade deux cellules. Cette région engendrera l'hypocotyle et la racine et participe à la formation des cotylédons et du méristème racinaire (figure 1.3). La troisième correspond à l'hypophyse évoluera pour donner le centre quiescent du méristème racinaire et les cellules engendrant la coiffe racinaire (figure 1.3). Enfin, la quatrième région correspond au suspenseur qui pousse l'embryon dans le lumen de l'ovule et assure son contact avec les tissus maternels (Tykarska, 1976, 1979). Il dégènera au cours du développement. L'avenir des deux premières cellules est défini par l'asymétrie de la répartition des transcrits issus de la cellule-œuf, notamment les ARNm des gènes *WUSCHEL HOMEBOX2* et *WUSCHEL HOMEBOX8* (*WOX2* et *WOX8*). Ces gènes contrôlent le développement apical (*WOX2*) et basal (*WOX8*) de l'embryon (Haecker et al., 2004).

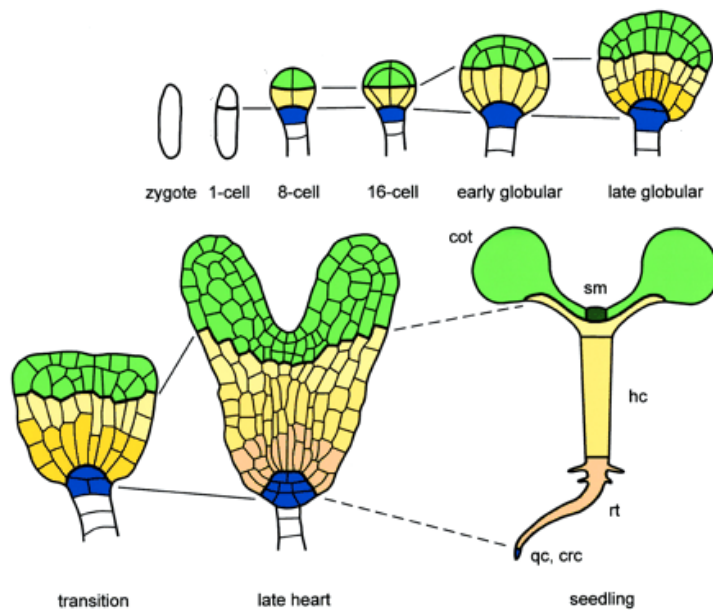


Figure 1.3 : Développement embryonnaire chez Arabidopsis. Modifié d'après (Laux et al., 2004). Les quatre domaines définis à partir du stade 8 cellules sont distingués par des couleurs différentes ; vert : domaine apical, jaune : domaine central, bleu : hypophyse, blanc : suspenseur. sm : méristème apical ; hc : hypocotyle ; rt : racine ; qc : centre quiescent ; crc : coiffe racinaire.

Durant les phases précoces de l'embryogénèse, il existe une forte concentration de CO_2 à l'intérieur des tissus et une faible diffusion de l'oxygène. En effet, les tissus maternels sont peu perméables au gaz et les échanges n'interviennent qu'au niveau du micropyle. La faible concentration d'oxygène limite la respiration et les jeunes embryons produisent alors leur énergie par des processus fermentaires. La création d'un environnement enrichi en CO_2 favoriserait l'activité de division cellulaire (Jitla et al., 1997; Kinsman et al., 1997) et permettrait le recyclage du carbone via l'activité de la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) (Flinn, 1985; Golombek et al., 1999).

L'axe embryonnaire présente une symétrie radiale. Les tissus conducteurs se trouvent au centre et le parenchyme cortical et l'épiderme à la périphérie (fig 1.2a). L'axe embryonnaire possède des tissus méristématiques à chaque extrémité (figure 1.2a) : le méristème apical dont le développement conduira à la formation des parties aériennes, et le méristème racinaire, à l'origine des parties souterraines. L'embryon présente en plus un ou deux cotylédons (un seul chez les monocotylédones, deux chez les dicotylédones) qui sont des organes de ressource énergétique au moment de la germination. Les cotylédons sont reliés à l'axe embryonnaire juste en dessous du méristème apical et l'enserrent (figure 1.2a). Après la phase d'embryogénèse, la graine entre en maturation pour se préparer à subir la phase de quiescence. La croissance de l'embryon reprendra au moment de la germination.

Les téguments de la graine dérivent des tissus de l'ovaire qui entouraient le sac embryonnaire (figure 1.2b). Ils renferment les macrosclérides, épaissements ligneux responsables de la résistance physique des téguments, et des anthocyanines qui colorent la

graine, surtout au niveau du micropyle. Ces pigments pourraient être impliqués dans la régulation du développement des téguments, comme le suggèrent les résultats obtenus de l'étude des mutants *transparent testa* chez *Arabidopsis* (Leon-Kloosterziel et al., 1994).

3.3-La maturation de la graine

Après l'étape de l'embryogénèse survient une étape de maturation de la graine qui correspond à des processus de préparation à la quiescence et à la germination. La maturation débute vers 12 JAP chez *Medicago*. Elle se caractérise par une croissance exercée par extension cellulaire et non plus par prolifération. Les graines verdissent, témoignant de l'accumulation de chlorophylle, les cotylédons subissent une endopolyploïdisation, les substances de réserves sont synthétisées et stockées dans les tissus. La maturation correspond également à l'acquisition du pouvoir germinatif et de la mise en place de la tolérance à la dessiccation. Ces événements ont lieu respectivement vers 14 JAP et 16-20 JAP chez *Medicago* (Boudet et al., 2006).

Les principales protéines de réserve chez les Légumineuses sont la légumine (11S) et la viciline (7S). Elles sont codées par une famille multi-génique qui comprend au moins quarante membres chez le pois (Casey et al., 2001). Elles sont accumulées dans des corps protéiques qui intègrent les vacuoles de stockage protéiques (PSV) originaires du Golgi principalement dans les cotylédons mais aussi dans l'axe embryonnaire chez le maïs, le soja, le pois et le coton (Alekseeva and Kobarskaya, 1979; Tsai, 1979; Alekseeva et al., 1989; Vigil and Fang, 1995, 1995).

L'accumulation de ces protéines est régulée dans l'espace mais aussi dans le temps. Chez *Medicago truncatula*, les transcrits de la viciline apparaissent avant ceux de la légumine A (Abirached-Darmency et al., 2005). L'accumulation d'ARNm est visible dès 12 jours après pollinisation (JAP). A 16 JAP, l'expression des gènes est forte et se répartit de manière hétérogène dans les cotylédons, les cellules adaxiales montrant une plus forte accumulation. Il existe en effet un gradient de différenciation dans les tissus embryonnaires : les cellules cotylédonaires adaxiales, en comparaison avec les cellules abaxiales, sont les premières à ralentir leur prolifération et à entrer en différenciation.

L'accumulation des protéines dans les graines dépend de l'azote disponible. La glutamine et/ou l'asparagine circulant dans le phloème sont métabolisées dans les téguments de la graine (Lanfermeijer et al., 1990; Rochat and Boutin, 1991) et les acides aminés

distribués principalement sous forme glutamine, thréonine et alanine (Lanfermeijer et al., 1990). Les squelettes carbonés sont fournis par l'intervention de la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC). Cette enzyme catalyse la conversion du phosphoenolpyruvate (3 carbonés) en oxaloacétate (4 carbonés) par fixation d' HCO_3^- provenant de la respiration. La PEPC représente une enzyme clé dans la formation des protéines de réserves : ses taux sont directement corrélés avec la quantité de protéines accumulées dans les graines chez le soja (Sigimoto et al., 1989; Smith et al., 1989).

Chez les Légumineuses, l'accumulation d'amidon est transitoire. Chez le pois, les grains d'amidons sont observés dans les cellules des cotylédons et dans les téguments (Abirached-Darmency et al., 2005). Chez *Medicago*, l'amidon apparaît à partir de 8 JAP jusqu'à 14-16 JAP et se limite aux téguments.

La transition entre le stade d'embryogénèse et l'entrée en phase de maturation est marquée par la différenciation de cellules de transfert au niveau du protoderme de l'embryon. Ces cellules sont caractérisées par des invaginations de la membrane plasmique, augmentant ainsi sa surface, et par un enrichissement en transporteurs de nutriments. La formation des cellules de transfert permet un déplacement de la force de puits des tissus maternels vers les tissus embryonnaires. Chez *V. faba*, l'expression du gène *VfSUT1* (Sucrose Transporter) conduit à l'accumulation de saccharose dans les tissus. Chez le pois, la mutation E2748 bloque la formation des cellules de transfert et conduit à une perte de l'identité de l'épiderme. Ceci a pour conséquence des aberrations morphologiques chez l'embryon qui présente alors un développement de type cal (Borisjuk et al., 2002). La fonctionnalité de telles cellules est donc importante pour l'évolution correcte vers la maturation, et se fait via l'accumulation de saccharose dans les tissus embryonnaires. La forte teneur en saccharose est associée au stockage des substances de réserve (Finkelstein and Gibson, 2002) qui joue alors un rôle de signalisation utilisant des voies intrinsèquement liées à celles de l'acide abscissique (ABA). L'ABA inhibe la prolifération cellulaire par induction d'un inhibiteur du cycle cellulaire (cyclin-dépendant kinase inhibitor) (Wang et al., 1998). Le verdissement des embryons observé au moment de la maturation implique une accumulation de chlorophylle. Les organites qui la contiennent sont des plastides qui, contrairement aux chloroplastes des feuilles, ont une faible activité de fixation du carbone. L'oxygène et l'ATP qui sont produits sont directement utilisés pour la respiration et les biosynthèses.

La tolérance à la dessiccation (TD) est définie comme la capacité à survivre après un séchage à l'air (Bewley, 1979; Leopold, 1986). Il permet à un organisme de résister à des

conditions environnementale extrêmes : humidité relative ambiante nulle, température (-270°C à +300°C), vide et radiation ionisantes (Cleggs and Conte, 1980; Mattimore and Battista, 1996). Cette capacité se retrouve chez les spores, le pollen et les graines mais également au niveau de la plante entière chez les espèces dites reviviscentes (ex : *Craterostigma ssp*, *Xerophyta ssp*). Toutes les graines n'ont pas une capacité identique de tolérer la dessiccation. Les graines dites récalcitrantes des climats chauds et humides ne survivent pas à une teneur en eau inférieure à 60% alors que les graines dites orthodoxes (80% des espèces cultivées) résistent aux faibles teneurs en eau et aux basses températures. Des mécanismes de protection sont mis en place dans les tissus des graines au cours de la maturation afin de protéger les structures cellulaires des dommages causés par le retrait de l'eau. Il y a une accumulation de sucres, des composés amphiphiles et de protéines spécifiques : Heat Shock Protein (HSP) et Late Embryogenesis Protein (LEA). Le métabolisme cellulaire est également ajusté pour éviter l'accumulation de composés réactifs de l'oxygène (ou ROS : Reactive Oxygen Species) et d'acétaldéhyde.

L'accumulation de sucres non réducteurs joue plusieurs rôles dans la TD : dans un premier temps, ils ont un rôle d'osmoprotectant, puis permettent la préservation des membranes et des composants macromoléculaires des cellules. Le cytoplasme ayant accumulé ces sucres devient vitreux au moment de la dessiccation. Cet état vitreux est nécessaire à la survie à l'état sec mais ne constitue pas l'évènement déclencheur de la tolérance à la dessiccation (Buitink and Leprince, 2008). Les composés amphiphiles (composés antioxydants, flavonoïdes) sont également fortement accumulés au niveau des phospholipides des membranes au cours de la dessiccation des grains de pollen et des semences (Hoekstra et al., 1997; Golovina et al., 1998; Buitink et al., 2000). Leur propriété serait de maintenir une fluidité membranaire à l'état sec, comme le suggère une étude sur les liposomes (Golovina et al., 1998). Les protéines LEA sont, comme leur nom l'indique, accumulées au cours des phases tardives de la maturation des semences (Dure et al., 1981; Galau et al., 1986). Elles le sont aussi en réponse à divers stress abiotique et à l'ABA (Kermode, 1990; Skriver and Mundy, 1990; Ramanjulu and Bartels, 2002) et chez l'organisme anhydrobiote *Craterostigma plantagineum* (Bartels et al., 1990; Piatkowski et al., 1990). Leur mode d'action n'est pas clairement élucidé mais plusieurs hypothèses ont été émises : séquestration d'ions (Dure, 1993), prévention de l'agrégation des macromolécules (Close, 1996), stabilisation de l'état vitreux créé par l'accumulation des sucres non réducteurs (Wolkers et al., 1999; Buitink et al., 2000) et formation de microfilaments stabilisateurs du cytosquelette (Goyal et al., 2003). La protéine LEAM, accumulée dans les mitochondries, protège les membranes de celle-ci au

cours de la dessiccation des graines (Tollet et al., 2007). Les protéines HSP ont été identifiées chez les graines soumises à un stress thermique (Abernethy et al., 1989). Elles sont accumulées à la fin de la maturation comme les protéines LEA. Leur présence est corrélée à la tolérance à la dessiccation chez les mutants d'*Arabidopsis* *abil-3*, *fus3-3* et *lec1-2* (Wehmeyer and Vierling, 2000). Leur rôle n'est pas non plus élucidé mais elles pourraient jouer un rôle de chaperon moléculaire pour éviter la dénaturation et l'agrégation des protéines. Il a été montré que l'intensité du métabolisme est corrélée à la tolérance à la dessiccation chez des semences de pois et de concombre (Leprince et al., 2000). La limitation du métabolisme pourrait jouer un rôle dans la réduction de la production de ROS. Le métabolisme étant faible, la transition vers un métabolisme fermentaire toxique serait donc évitée.

3.4-La dormance

La dormance est une caractéristique spécifique des graines qui peut se définir comme le blocage de la germination d'une graine intacte et viable malgré des conditions environnementales favorables (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006). Ceci représente une adaptation empêchant la germination spontanée qui pourrait survenir trop précocement. Par exemple, le blocage de la germination de graines d'arbres durant un automne doux évite la mortalité des plantules durant l'hiver trop froid. La dormance peut prendre différents aspects selon les espèces. Baskin et Baskin (1998, 2004) ont proposé un système de classification qui compte cinq classes de dormance : physiologique, morphologique, morphophysique, physique et combinée physiologique/physique.

La dormance physiologique est la forme la plus répandue, existant chez les gymnospermes et chez la majorité des angiospermes. Elle concerne également une grande partie des espèces cultivées et dites « de laboratoire » comme *Arabidopsis thaliana*, et *Medicago truncatula*. Les recherches sur la compréhension de la dormance sont donc essentiellement focalisées sur la dormance physiologique. Selon sa profondeur, la dormance peut être distinguée en plusieurs types (profonde, intermédiaire et non profonde) (Baskin and Baskin, 2004). La dormance morphologique n'est pas à proprement parler une dormance car il n'y a pas de réel blocage. Les embryons sont simplement petits et leur développement avant la sortie de la radicule nécessite beaucoup de temps. La dormance morphophysique est une combinaison des deux définitions précédentes. La dormance physique est causée par la structure ou la composition des tissus entourant la graine ou le fruit qui sont imperméables et empêchent l'afflux d'eau. Une détérioration mécanique est nécessaire pour permettre la

germination. Enfin, le dernier type de dormance combine les facteurs physiologiques et physiques.

On distingue deux aspects de la dormance physiologique : primaire ou secondaire. La dormance primaire correspond à l'état des graines fraîchement récoltée et est initié par l'ABA endogène produit par l'embryon au cours de la maturation (Hilhorst, 1995; Kucera et al., 2005). Cet état disparaît progressivement lors du stockage dans des conditions sèches ou alors grâce à des traitements imposés à la graine imbibée : stratification par le froid ou le chaud, lumière (pour les espèces pour lesquelles la lumière représente un facteur stimulant), les gibbérellines et autres hormones, les butenolides (Krock et al., 2002), et l'oxyde nitrique (Bailly et al., 2004; Bethke et al., 2006). La dormance secondaire est observée chez les graines ayant une dormance physiologique non profonde. Elle intervient lorsque les conditions nécessaires à la perte de la dormance primaire ou l'induction de la germination ne sont pas remplies. Cette dormance est levée lorsque les conditions sont remplies mais peut être induite à nouveau (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006).

3.5-La phase de quiescence

La phase de quiescence s'installe progressivement à la fin du processus de maturation et dure tant que la graine n'est pas dans des conditions physiologiques et environnementales qui permettent la germination. La longévité des graines correspond à la durée maximale de la phase de quiescence, la graine perdant sa capacité germinative au-delà de cette durée. Elle dépend de l'espèce considérée mais aussi des conditions de stockage, celles-ci étant optimales à faibles température et hygrométrie. Les conditions de l'environnement qui permettent la germination sont une hydratation et une oxygénation suffisantes et une température correcte (qui dépend de l'espèce considérée). Si ces conditions ne sont pas remplies, la graine ne germe pas et peut entrer en phase de dormance secondaire. La levée de dormance primaire survient spontanément lorsque la graine est restée quiescente. La durée nécessaire pour la levée de dormance dépend des conditions de l'environnement durant la maturation de la graine sur la plante mère mais également des conditions de stockage (Donohue, 2005). La longévité est influencée négativement par des conditions de stockages trop humides. Néanmoins, à l'inverse, des conditions trop sèches conduisent au ralentissement voire à la perte de la levée de dormance chez les semences de *Bromus tectorum* (Bauer et al., 1998) et *Lolium rigidum* (Steadman, 2004). Ceci indique qu'une humidité, même très faible ou dans des zones localisées de la graine (Leubner-Metzger, 2005) serait nécessaire à la levée de

dormance. Ainsi, il a été montré que la transcription était effective dans les graines au stade quiescent chez le tabac (Bove et al., 2005) et l'orge (Leymarie et al., 2007). De plus, le gène de la β -1,3-glucanase, qui aurait un rôle d'affaiblissement des parois des cellules de l'albumen au cours de la germination, est transcrit et traduit à un faible niveau dans les graines de tabac (Leubner-Metzger, 2005). Des protéines s'accumulent également durant cette phase de quiescence. Certaines ont des fonctions métaboliques qui seraient de préparer la graine à la germination (Chibani et al., 2006). Ces protéines peuvent être traduites à partir des ARNm transcrits durant la phase de quiescence ou alors stockés dans la graine depuis la fin de la maturation. Ces ARNs sont très nombreux et ils serviraient de matrice pour une synthèse protéique rapide au moment de la germination. Les plus représentés codent pour des protéines dont la fonction est associée au métabolisme, à la synthèse et à la dégradation des protéines (Nakabayashi et al., 2005). Il faut également noter que l'inhibition de la synthèse protéique par le cycloheximide bloque la germination (Rajjou et al., 2004), démontrant leur importance capitale dans ce processus.

3.6-La germination

Après la phase de quiescence, voire de dormance, et lorsque les conditions de l'environnement sont favorables, le développement de l'embryon reprend. L'axe embryonnaire s'allonge alors dans les deux sens. L'hypocotyle, qui présente un gravitropisme négatif, amène le méristème apical et les cotylédons hors de terre. Les cotylédons fournissent les réserves énergétiques qui sont alors mobilisées pour la croissance. Ils verdissent, signifiant l'acquisition de l'activité photosynthétique avant la mise en place des premières feuilles à partir du méristème apical. La radicule, elle, possède un gravitropisme positif et permet au méristème racinaire de s'enfoncer pour développer des racines. Elle est la première à se développer au cours de la germination chez *Medicago truncatula*.

Entre le stade de graine sèche quiescente et le développement de la plantule existe une phase transitoire qui se termine lorsque la radicule perce les téguments. A ce moment, la graine est considérée comme germée. La germination est donc définie comme la phase transitoire entre le stade graine sèche et l'apparition de la radicule (Bewley and Black, 1994). Elle débute avec l'imbibition des tissus.

Il est possible de suivre cette phase par mesure de la prise d'eau des graines. On distingue alors trois étapes caractéristiques. La première correspond à une imbibition rapide

au cours de laquelle les tissus se réhydratent rapidement. Cette étape est marquée par une forte reprise de l'activité métabolique. Les structures et les enzymes nécessaires à cette reprise d'activité sont supposé avoir résisté à la déshydratation et être présentes dans les graines sèches (Bewley, 1997). La deuxième étape se caractérise par un ralentissement de la prise d'eau et de l'activité respiratoire. C'est à ce stade que se préparent les évènements métaboliques associés à l'allongement de la radicule. L'émergence de la radicule clôt cette deuxième étape et coïncide avec la perte de la tolérance à la dessiccation. La troisième et dernière phase correspond à l'allongement de la radicule, une nouvelle absorption d'eau et une intensification de l'activité respiratoire due à la biogénèse de mitochondries. Cette dernière phase, dite de croissance, amorce la mobilisation des réserves et le développement de la plantule ; elle n'est pas considérée comme faisant partie de la germination au sens strict.

La germination est soumise aux conditions de l'environnement. La présence d'eau est nécessaire pour l'hydratation des tissus et pour la croissance des organes. Néanmoins, si l'eau vient à manquer après l'imbibition, la graine est capable de subir un nouveau processus de déshydratation et d'attendre un prochain afflux d'eau. La capacité germinative reste identique, et lorsque les conditions redeviennent favorables, la croissance est plus rapide et, au sein d'un lot de graines, la germination est plus homogène. Ce phénomène est exploité en agronomie (« amorçage » ou priming) mais présente l'inconvénient d'une diminution de la longévité, surtout si les graines ont été séchées rapidement (Soeda et al., 2005). En revanche, dès que la radicule a percé les téguments, un retour en arrière est impossible et une restriction d'eau conduit à la mort de la plantule (perte de la tolérance à la dessiccation).

La teneur en oxygène est également importante pour la reprise de l'activité métabolique. Même si l'embryon s'est développé dans une atmosphère appauvrie en oxygène, à ce stade, la croissance n'est plus possible dans des conditions hypoxiques. Le riz représente cependant une exception. Cette espèce germe sous l'eau en développant un coléoptile qui émerge à la surface et permet l'apport d'oxygène, les processus fermentaires étant prolongés jusqu'alors (Mageschi and Perata, 2009).

La cinétique de germination est régulée par la température, l'optimum variant d'une espèce à l'autre selon le milieu auquel elle est adaptée. Pour *Medicago truncatula*, cet optimum se situe à 21°C environ. La germination est également influencée par l'éclairement. Selon les espèces, cette influence est le plus souvent positive. La lumière est perçue par la graine au niveau des phytochromes qui sont impliqués dans la modulation des hormones

endogènes GA et ABA (Seo et al., 2009). Chez *Medicago*, la condition optimale est l'obscurité et la lumière diminue la vitesse de germination.

3.7-La régulation de la maturation, de la dormance et de la germination

Ces différents événements sont régulés de manière étroitement liée où les hormones, en particulier l'acide abscissique et les gibbérellines jouent un rôle prépondérant.

3.7.1-L'acide abscissique

L'acide abscissique (ABA) exerce un contrôle sur la maturation de la graine et est responsable de l'induction et du maintien de l'état de dormance primaire (figure 1.4). Les plantes déficientes en ABA ne présentent pas de dormance primaire alors que la sur-expression des gènes de la voie de biosynthèse de cette hormone entraîne un état de dormance plus profond. L'ABA est défini comme un répresseur de la germination (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006). Un apport exogène provoque une inhibition de la germination, bien que le phénotype observé ne corresponde pas à celui de la dormance (Penfield et al., 2004; Chibani et al., 2006; Muller et al., 2006; Carrera et al., 2008). Après la morphogénèse, le contrôle du développement de la graine est dévolu à l'embryon lui-même et non plus à la plante-mère. L'ABA est une molécule à 15 carbones qui dérive des caroténoïdes à 40 carbones. L'enzyme clé de la biosynthèse semble être le NCED (Nine-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase), car l'expression du gène est bien corrélée à la teneur endogène en ABA. Cette enzyme catalyse dans le chloroplaste le clivage des *Cis*-xanthophylles en xanthoxine (15C), la suite de la voie de biosynthèse ayant lieu dans le cytosol (Nambara and Marion-Poll, 2003). Les teneurs en ABA dans les tissus correspondent à un équilibre entre synthèse et catabolisme, les deux processus jouant alors un rôle important dans la réponse à l'environnement et dans le développement. L'inactivation de l'ABA passe par son hydroxylation en 8'hydroxy-ABA puis en acide phaséique avant d'être dégradé. La première hydroxylation est prise en charge par les ABA-8'hydroxylases codées par des gènes de la famille du cytochrome P450 CYP707A (Okamoto et al., 2006).

La perception de l'ABA par les cellules reste encore à élucider. Trois études ont été publiées. La première (Razem et al., 2006), montrait que la protéine FCA (Flowering Time Control Protein A) était un récepteur de l'ABA mais les résultats obtenus ont été contestés (Risk et al., 2008), menant les auteurs à se rétracter (Razem et al., 2008). La même année, une

autre équipe a publié l'étude de la protéine ABAR (ABA-binding protein) (Shen et al., 2006). Cette protéine est la sous-unité H d'une Mg-chélatase (CHLH) qui se lie spécifiquement à l'ABA et active la signalisation au cours de la germination, la croissance de la plantule et la fermeture des stomates. Cependant, les graines déficientes n'ont pas un phénotype d'insensibilité à l'ABA aussi fort que celui qui serait attendu en cas de non-perception (Holdsworth et al., 2008). En 2007, une troisième équipe a montré que la protéine GCR2, ayant des homologies avec la famille des récepteurs couplés aux protéines-G, était un récepteur de l'ABA situé au niveau de la membrane plasmique (Liu et al., 2007). Pourtant, ces résultats ne semblent pas probant pour le cas de la germination (Gao et al., 2007; Johnston et al., 2007; Liu et al., 2007). Ces publications représentent des avancées importantes pour la recherche des récepteurs de l'ABA mais cela n'est pas encore satisfaisant. De plus, ces récepteurs possèdent une très forte affinité pour l'ABA (FCA, $K_d = 19$ nM; GUN5, $K_d = 32$ nM; GRC2, $K_d = 21$ nM) et serait saturés dans des conditions physiologiques normales, ce qui empêcherait l'adaptation à des variations de teneur en ABA en réponse aux conditions de l'environnement (McCourt and Creelman, 2008).

La transduction du signal de l'ABA est modulée par divers facteurs. Des facteurs de transcription (ABI3, ABI4, ABI5) jouent un rôle important mais aussi le métabolisme des ARNs (liaison à la coiffe, miRNA, hélicase ; (Hugouvieux et al., 2001; Yoine et al., 2006; Reyes and Chua, 2007). La dégradation des protéines (RPN10, AIP2, AFP ; (Lopez-Molina et al., 2003; Smalle et al., 2003; Zhang et al., 2005) est également impliquée ainsi que le fonctionnement de phosphatases (ABI1, ABI2, HAB1) et de kinases (SnRK2.2, SnRK2.3). Une autre protéine (ABI8) joue un rôle dans la signalisation de l'ABA (Brocard-Gifford et al., 2004), mais sa fonction exacte est inconnue.

3.7.2-Les gibbérellines

L'acide gibbérellique (GA) est une hormone tout aussi importante que l'ABA dans la biologie des semences ; elle est nécessaire pour l'accomplissement de la germination (figure 1.4) et les mutants déficients en GA sont incapables d'accomplir cette phase de développement. Les gibbérellines sont une famille de 136 diterpènes tetracycliques dont certains seulement sont actifs en tant qu'hormone et varient selon les espèces considérées (Thomas et al., 2005). Ce sont des composés diterpéniques tétracycliques à 19 ou 20 atomes de carbone, formés par quatre unités isoprène. Toutes les gibbérellines dérivent du GA12 formé à partir de l'ent-kaurène. Les enzymes importantes pour la régulation de la teneur en

GA sont des oxydases (GA3ox1 à 4) impliquées en aval dans la voie de biosynthèse du GA actif. GA3ox1 et 2 par exemple, sont importants pour la germination. Ils sont exprimés surtout dans les axes embryonnaires durant la germination chez *Arabidopsis* et leur délétion entraîne une diminution de la capacité germinative (Mitchum et al., 2006).

Le récepteur du GA (GID1 ; GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF1) est une protéine soluble dont la structure est similaire aux lipases sensibles aux hormones (hormone-sensitive lipases HSLs) (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Quand le GA est présent, il se lie à son récepteur et le complexe GID1-GA interagit avec les protéines DELLA (répresseurs du signal GA) qui sont alors dégradées via le complexe SCF^{GID2/SLY1}. Ce complexe ubiquitinye les protéines DELLA qui sont alors dégradées par le protéasome 26S, permettant ainsi la transmission du signal (Hirano et al., 2008).

3.7.3-Les autres hormones

Les brassinostéroïdes ont un effet positif sur la germination mais d'une manière indépendante du GA (Leubner-Metzger, 2001). L'éthylène exerce aussi une action sur la levée de dormance et la germination. Un apport exogène du précurseur de l'éthylène ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) accélère la germination. L'action de l'éthylène se situe au niveau du signal de l'ABA et est antagoniste à celui-ci (Finkelstein et al., 2008). L'auxine semble également jouer un rôle positif dans la germination, alors qu'elle avait longtemps été considérée comme inactive à ce stade de développement. Elle est présente dans l'extrémité de la radicule avant la germination (Liu et al., 2007) et dans l'embryon à la fin de l'embryogénèse (Ni et al., 2001). Les transporteurs de l'auxine sont sur-représentés dans la graine après la levée de dormance en comparaison avec les graines encore dormantes (Carrera et al., 2007).

3.7.4-Régulateurs moléculaires

Les quatre régulateurs moléculaires (facteurs de transcription) majeurs de la phase de maturation de la graine sont FUSCA 3 (FUS3), ABA INSENSITIVE 3 (ABI3), LEAFY COTYLEDONS 1 et 2 (LEC1 et LEC2) (Raz et al., 2001) (figure 1.4). Ils ont été découverts par l'étude des mutants d'*Arabidopsis thaliana* présentant des perturbations dans le programme de maturation des graines. Ces mutants présentent une expression réduite des gènes codant pour les protéines de maturation (Gutierrez et al., 2007) et une dormance moins

profonde, voire une viviparité de certains embryons qui germent directement sur la plante mère sans passer par le stade de quiescence. ABI3, FUS3 et LEC2 sont des facteurs de transcription à domaine B3 (Giraudat et al., 1992; Luerssen et al., 1998; Stone et al., 2001) et LEC1 est la sous-unité HAP3 du facteur de transcription CBF (CCAAT-binding factor, ou NF-Y) (Lotan et al., 1998). Les protéines LECs et FUS3 agissent de manière synergique avec le facteur de transcription ABI3 (To et al., 2006). La protéine LEC1 est nécessaire pour le développement dans les phases d'embryogénèse et son expression suffit pour que des cellules végétatives se différencient en cellules embryonnaires (Lotan et al., 1998). La protéine ABI3 est spécifique des graines et intervient dans la voie de signalisation de l'ABA en interagissant avec les séquences ABRE (ABA Responsive Element) situées dans les régions promotrices des gènes régulés par l'ABA (Busk and Pages, 1998; Himmelbach et al., 2003), expliquant le phénotype insensible à l'ABA des mutants *abi3*. Les protéines LEC 2 et FUS3 sont des facteurs de transcription qui ont pour cible les motifs RY/Sph présents dans les éléments de régulation des gènes codants pour des protéines spécifiques des graines (Suzuki et al., 1997; Monke et al., 2004; Braybrook et al., 2006).

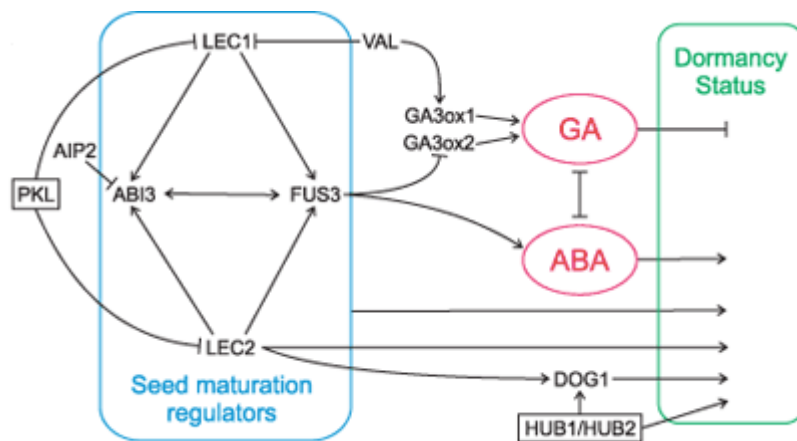


Figure 1.4 : Schéma de régulation de la maturation, de la dormance et de la germination. D'après Holdsworth et al., 2008.

Le système de régulation de la maturation est complexe et fait intervenir les hormones GA et ABA. Ce système est schématisé sur la figure 1.4. De manière ciblée dans les cotylédons, *LEC1* régule *ABI3* et *FUS3* (To et al., 2006), et *LEC2* régule *FUS3* (Kroj et al., 2003). *ABI3* et *FUS3* se régulent mutuellement et présentent des feedbacks positifs sur leur propre expression (To et al., 2006). Il existe une relation entre le système des régulateurs de maturation et les hormones ABA et GA via les protéines *FUS3* et *LEC1* (figure 1.4). La protéine *FUS3* affecte la synthèse des enzymes *GA3ox1* et *GA3ox2*, responsables de la biosynthèse de GA (Curaba et al., 2004). Elle est également responsable d'une augmentation

du taux d'ABA (Gazzarrini et al., 2004). La protéine LEC2 favorise l'expression du gène *AGAMOUS-LIKE15* (*AGL15*) (Braybrook et al., 2006) qui induit directement l'expression de *GA2ox6*, gène codant pour une protéine inactivant le GA (Wang et al., 2004). Le gène *DELAY OF GERMINATION1* (*DOG1*) est une cible de LEC2 (figure 1.4). Ce gène n'a pas de fonction connue mais il joue un rôle crucial dans la dormance, le mutant *dog1* étant complètement non-dormant. La protéine *DOG1* est spécifique des graines et disparaît après l'imbibition (Bentsink et al., 2006).

L'expression des gènes cités ci-dessus est liée à des caractéristiques embryonnaires. Elle doit donc être régulée pour que la germination soit possible. Le gène *PICKLE* (*PKL*) est impliqué dans ce processus de régulation (figure 1.4). Il code pour un facteur de modification de chromatine de type CHD3 dont la fonction serait d'inhiber l'expression des gènes liés aux caractéristiques embryonnaires et agirait de manière dépendant du GA (Ogas et al., 1997; Eshed et al., 1999; Ogas et al., 1999; Rider et al., 2004). De manière générale il a été montré, grâce aux histones déacétylase codées par *HDA6* et *HDA19*, que la modification de la chromatine est un type de contrôle important pour la régulation du développement de la graine (Tanaka et al., 2008). Le gène *PKL* réprime également *PHERES1*, gène de type MADS box exprimé dans l'embryogénèse précoce (Kohler et al., 2003). La famille de facteur de transcription à domaine B3, *VAL* (*VPI/ABI3-LIKE*), est également nécessaire pour la répression du système *ABI3/FUS3/LEC1/LEC2* (figure 1.4) et agirait de manière conjuguée avec *PKL*. Il a été montré que *LEC1* est une cible de répression directe de *VAL* et que les gènes *VAL* régulent positivement la synthèse de l'ABA via l'activation de *GA3ox1* au niveau transcriptionnel (Suzuki et al., 2007).

4-Contexte scientifique et objectifs de la thèse

L'équipe d'accueil au sein du laboratoire de Physiologie Moléculaire des Semences se focalise sur l'étude de la germination chez le modèle *Medicago truncatula*. Une des thématiques de l'équipe est la recherche de facteurs moléculaire du contrôle de la germination. Dans ce but, une banque d'hybridation suppressive et soustractive (SSH, (Diatchenko et al., 1996) avait été conçue. Ce type de banque permet de cloner les ESTs de gènes qui sont exprimés de manière différentielle entre deux conditions. Pour l'étude de la germination, c'est la cinétique de l'expression qui avait été ciblée. L'hypothèse de base était que l'expression des facteurs moléculaires du contrôle de la germination est modifiée avant et après la germination *sensu stricto*, c'est-à-dire entre deux temps encadrant la percée de la

radicule. D'abord, les deux temps sélectionnés étaient 16 h et 23 h (SSH 16-23) après imbibition (Bouton et al., 2005), la germination intervenant en moyenne après 21 heures chez le génotype Parragio. N'ayant généré qu'un faible nombre d'ESTs, un intervalle plus grand a été déterminé : entre 6 heures et 23 heures (SSH 6-23) après le début de l'imbibition des graines. Deux banques ont été construites : l'une contenant les ESTs des gènes surexprimés au cours de la germination et l'autre des gènes sous-exprimés.

Le travail de recherche qui constitue ce manuscrit avait pour but d'exploiter les informations apportées par les banques SSH. Cet objectif a mené à l'approfondissement de deux thématiques qui constituent chacune une partie de ce manuscrit. Dans la première partie, nous verrons l'importance primordiale du remaniement pariétal permettant l'expansion cellulaire, moteur physique de la croissance racinaire. Dans une seconde partie, nous décrirons *MtSAPI*, un gène nouveau chez *Medicago truncatula* dont le rôle dans la biologie des semences sera discuté.

Première partie :

Germination et réorganisation pariétale

Chapitre 1 :

Inhibition de la germination par l'acide abscissique :
modulation de l'expression des gènes de restructuration
pariétale

1-Introduction

La germination est définie comme la phase transitoire entre le stade graine sèche et l'apparition de la radicule (Bewley and Black, 1994). Cette phase nécessite en premier lieu l'imbibition des tissus. Si les conditions physiologiques sont favorables (absence de dormance primaire) ainsi que les conditions environnementales (disponibilité en oxygène, température adéquate), la germination est possible. Il est communément admis que la percée de la radicule est un phénomène dirigé par l'expansion cellulaire uniquement (Bewley, 1997) et non par la prolifération : les cellules radiculaires de la graine non dormante s'allongeraient donc en l'absence d'inhibition par le milieu. Cet aspect physique de la germination est largement négligé en raison de son apparence triviale ; il est donc très mal connu. Néanmoins, des recherches ont été menées afin de connaître l'implication éventuelle du cycle cellulaire dans la percée de la radicule. Les résultats obtenus sont contradictoires. Certaines études montrent que l'activité mitotique n'est pas nécessaire pour la germination (Baiza et al., 1989) et que la synthèse d'ADN est faible durant « l'amorçage » (priming) chez la tomate et le poireau (Coolbear and Grierson, 1979; Bray et al., 1989), alors que d'autres montrent que le cycle cellulaire est initié avant la percée de la radicule (de Castro et al., 2000; Barroco et al., 2005; Masubelele et al., 2005; Gendreau et al., 2008). De plus, chez *Arabidopsis*, l'inhibition du cycle cellulaire retarde la germination et les cyclines-D « précoces » (CYCD1;1 et CYCD4;1) jouent un rôle important dans l'activation de la mitose conduisant à l'élongation de la radicule (Masubelele et al., 2005). L'absence de réponse claire concernant les rôles respectifs du cycle cellulaire et de l'expansion dans la germination de ces espèces interroge sur le cas de *Medicago truncatula*. Il semble que, chez *Medicago*, la mitose ne soit pas requise car les microtubules mitotiques apparaissent après que la radicule s'est allongée de 2-3 mm en dehors des téguments (Faria et al., 2005). Néanmoins et à notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature de description détaillée de l'expansion cellulaire survenant lors de la germination.

La germination est inhibée par l'acide abscissique (ABA). De manière endogène, cette hormone est un facteur clé de la dormance qui maintient le blocage de la germination sous des conditions environnementales favorables. L'apport exogène d'ABA inhibe également la germination. Cette hormone contrôle l'expression de gènes régulant des événements de dormance et de germination comme les facteurs de transcription ABI3, ABI4 et ABI5. Cependant, l'action directe sur les effecteurs de germination n'est pas connue.

Les recherches qui sont présentées dans cet article avaient pour objectif d'améliorer les connaissances des événements de germination de l'espèce *Medicago truncatula*. Elles sont en lien avec les résultats de la banque SSH 6-23 dans laquelle plus de 10% des gènes activés sont liés à la restructuration des parois. Nous avons étudié les aspects de prolifération et d'expansion cellulaire par des méthodes histologiques, chimiques et moléculaires. Le rôle de l'ABA dans l'inhibition de la germination a été étudié et nous suggérons que son action cible directement les enzymes clés impliquées dans le relâchement des structures pariétales conduisant à l'expansion cellulaire.

2-Article publié

SUPPLEMENTAL DATAS

Table 1 bis : list of ESTs of up - regulated genes revealed by SSH approach during germination of *Medicago truncatula*

GenBank Accession number	Medicago truncatula Gene index TC number	Identity of the clone
METABOLISM		
Cell wall		
ES466859	TC96054	Alpha-expansin
ES466855	TC102418	Arabinogalactan protein
EL563657	AW697240	Auxin-induced beta-glucosidase
EL563536	AA660501	beta-1,3-glucanase-like protein
ES466862	TC96721	Beta-Ig-H3 / Fasciclin domain
EL563609	TC100011	Beta-tubulin R2242
ES481863	TC104491	Cellulose synthase
ES466858	TC100994	Expansin precursor
EL563604	AL372750	Extensin-like protein (1)
EL563664	TC94245	Extensin-like protein (2)
EL563549	TC106582	Extensin-like protein (3)
ES466854	TC100493	Extensin-like protein (4)
ES466861	TC95797	F-actin capping protein, alpha subunit
EL563559	TC102515	Male sterility protein
ES408378	TC95684	Mob1-like protein / phocein family
EL563565	TC100262	MtPPRD1
ES466860	AJ501848	Pectin methyl esterase / invertase
EL563643	TC103769	Pectinesterase
EL563674	TC97045	Phosphatidylinositolglycan class N
EL563532	TC94138	Plant lipid transfer (1)
EL563610	TC100736	Plant lipid transfer (3)
EL563654	TC100266	Plant lipid transfer / prolin-rich protein
EL563668	TC93943	Plant lipid transfer 2)
ES466857	TC94949	Root cap protein-like
EL563527	AW687357	T2L5.6 protein [heparanase like, (endoglucosidase)]
EL563516	CX541346	Tubulin / FtsZ protein (1)
ES466856	TC106434	Tubulin / FtsZ protein (2)
EL563544	TC100408	Tubulin / FtsZ protein (3)
EL563500	TC106341	Tubulin beta chain
EL563503	TC106650	UDP-glucose:protein transglucosylase
EL563647	TC103297	weakly similar to <i>Lycopersicon esculentum</i> beta galactosidase
EL563663	TC97248	Beta-galactosidase
EL563606	TC109732	Copper amine oxidase
ES466811	TC95190	L-ascorbate oxidase
Photosynthesis / hem biosynthesis		
EL563529	TC106837	Chlorophyll A-B binding Protein
ES466863	TC93977	Delta-aminolevulinic acid dehydratase
Carbon metabolism		
EL563563	TC109581	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
EL563547	TC101868	Acetate CoA ligase
EL563525	TC101970	Aldehyde dehydrogenase (1)
EL563533	TC100628	Aldehyde dehydrogenase (2)
ES466864	AJ847650	ATP-citrate lyase
EL563579	TC107624	ATP-citrate PRO-S--lyase
EL563605	TC103706	beta furanofructosidase
EL563591	BQ148153	beta-fructo furanosidase precursor acid sucrose-6-phosphate
EL563570	BG589933	Cycloartenol synthase
EL563499	TC100309	Enolase
ES466865	TC100922	Fumarate reductase/succinate dehydrogenase flavoprotein
EL563569	TC102323	Galactinol-Raffinose Galactosyl transferase (stachyose synthase)
EL563592	TC108038	Glucane endo 1,3-beta-D-glucosidase
EL563654	AJ847718	Glucosyltransferase-like
ES466866	TC100986	Glycosyltransferase (1)
EL563628	TC94325	Glycosyltransferase (2)
EL563665	TC101840	Haloacid dehalogenase-like hydrolase
ES466823	TC109111	Hexokinase
EL563614	BF635241	Major facilitator superfamily (MFS)
EL563684	BF003636	Malic oxidoreductase
EL563601	TC107371	Metallo-phosphoesterase
ES466810	TC107056	Nucleotidyltransferase
ES466868	TC96368	Oligosaccharyl transferase
EL563667	TC108526	Phosphatidylserine decarboxylase
ES466870	TC107075	Phosphoenol pyruvate carboxylase (1)
ES466869	TC107910	Phosphoenol pyruvate carboxylase (2)
ES466871	TC108261	Protein of unknown function DUF6 ; Tpt phosphate / phosphoenolpyruvate translocator
EL563685	TC94507	Pyrophosphate-fructose6-phosphate 1-phosphotransferase
EL563573	TC100967	Ribophorin I
EL563623	TC101432	Seed imbibition protein-like raffinose synthase
EL563590	TC100923	Succinate dehydrogenase [ubiquinone]
EL563578	BG582602	Sucrose synthase
ES466873	TC105122	T1B9 .17protein
ES466874	TC94440	TDP-D-glyucose 4,6-dehydratase 3'UTR
ES466875	TC106650	UDP-glucose : protein transglucosylase

Nitrogen metabolism

ES466802	TC106918	Aminotransferase
EL563681	TC101600	Arginase / agmatinase / formiminoglutamase
EL563531	TC100393	Asparagine synthase
EL563537	TC95788	Cysteine protease precursor
ES466804	TC109262	Gamma amino butyrate transaminase subunit isozyme 1
EL563514	TC106796	Glycine cleavage T protein \ aminomethyltransferase
ES466805	TC106598	Methionine synthase, vitamin-B12 independent
EL563621	TC94425	Methylenetetrahydrofolate reductase
EL563618	TC100717	methyltransferase DUF248 (1)
EL563680	TC100609	methyltransferase DUF248 (2)
ES466812	TC95916	Multicopper oxidase (1)
EL563637	TC95107	Multicopper oxidase (2)
EL563656	TC96405	Peroxisomal copper-containing amine oxidase
ES466806	TC106563	S-adenosyl methionine synthetase (1)
ES466807	TC106359	S-adenosyl methionine synthetase (2)
ES466872	TC107480	Serine carboxypeptidase (1)
EL563561	TC101730	Serine carboxypeptidase (2)
EL563645	TC96461	Serine carboxypeptidase (3)
ES466803	AW584600	weakly similar to <i>Arabidopsis thaliana</i> carboxypeptidase

Lipid metabolism

EL563593	BI271776	Esterase / lipase / thioesterase
EL563553	TC111399	Lipolytic enzyme (1)
EL563675	TC100405	Lipolytic enzyme (2)
EL563639	TC102508	Lipolytic enzyme (3)
ES466808	CX519913	Sterol desaturase ; SUR2-type hydroxylase / desaturase
EL563608	TC94053	T8F5.6 protein

Nucleotides binding proteins

ES466809	TC106910	GMPase
----------	----------	--------

Metal binding proteins

EL563701	TC107285	NRAMP
----------	----------	-------

Other

ES466813	TC100788	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase
EL563568	TC107896	Mercuric reductase

REGULATION AND SIGNAL TRANSDUCTION**Kinases / Phosphatases / cell cycle**

EL563545	TC100816	Alfin-1
EL563608	TC95632	Acid phosphatase
ES466819	TC94061	Adenosine kinase
EL563509	TC107206	Uridylate kinase
ES466820	TC94995	CTD kinase alpha
ES466821	TC97701	Cyclase-associated protein
ES466822	TC105800	Cyclin, N-terminal domain
EL563599	TC101179	GHMP kinase
EL563528	CB065448	MAP kinase
ES466824	TC106343	CBL-interacting protein kinase CIPK25
ES466825	TC111223	phosphoprotein phosphatase
ES466826	TC94650	Phragmoplastin
ES466827	TC108282	Protein kinase
EL563543	TC95633	Protein kinase-like protein
ES466828	TC108063	Ser / thr protein kinase (1)
EL563542	TC95208	Ser / thr protein kinase (2)
ES466829	AL378057	Ser / thr protein kinase (3)
ES466830	TC109363	Ser / Thr protein kinase (phototropin)

Signaling / hormone induced proteins

ES466831	TC94467	Annexin
EL563585	TC109198	Armadillo repeat
ES466832	TC102735	Auxin-induced protein
EL563575	TC101037	C2 domain
ES466833	TC107228	Calmodulin-binding region
EL563574	TC107254	AKIN gamma
EL563554	TC98450	CLC-d chloride channel protein
EL563644	AJ501604	Gibberellin regulated protein
ES466834	TC108625	G-protein beta WD-40repeat
EL563603	TC102510	Basic helix-loop-helix factor 1
ES466835	TC109364	PAS domain (phototropin-like)
EL563522	TC102909	RAB,GTP-binding protein
EL563679	TC96524	RHO protein GDP dissociation inhibitor 2

Transcription factors

ES466836	TC95420	PCF-1
ES466837	TC95091	Transcription factor LIM
ES466838	TC107400	Tubby protein, Cyclin-likeF-box
EL563558	AL388289	XAP-5 like (DNA binding, putative transcription factor)
EL563659	TC103853	Zn-finger, RING

Hormones biosynthesis

ES466839	TC106654	ACC oxidase (1)
ES466839	TC102059	ACC oxidase (2)
EL563637	TC107222	Cell elongation protein DIMINUTO
EL563567	TC102360	Cycloartenol synthase
ES466841	TC102857	Hydroxymethylglutaryl-coenzymeA reductase
EL563629	TC100525	Terpene synthase-like

Nuclear proteins

ES466844	AA660530	DNA topoisomerase II
ES466842	TC107983	Histone H2A (1)
EL563640	TC106987	Histone H2A (2)
ES466846	TC94045	Histone H2B
ES466845	TC94727	Histone H3 (1)
ES466843	TC103694	Histone H4 (1)
EL563523	TC95722	Histone H4 (2)
EL563512		Lamin B2

Translation / RNA maturation

ES466867	TC95165	30S ribosomal protein 3
EL563560	TC100531	60S ribosomal protein L6
EL563600	TC94539	60S ribosomal protein L6
EL563532	TC107031	Alanyl-tRNA synthetase
EL563622	none	Chloroplast ribosomal protein S8
EL563535	TC101659	Deoxycytidine deaminase
ES466847	TC106485	Elongation factor1-alpha (1)
EL563538	none	Eukaryotic translation initiation factor
EL563572	TC107175	Polypyrimidine tract-binding protein PTB
EL563548	TC94294	Ribosomal protein L1
EL563513	TC105204	Ribosomal protein L23
EL563691	TC106375	Ribosomal protein L7
EL563615	TC100470	Ribosomal protein S17
ES466876	TC106985	Ribosomal protein S27E
EL563582	AL384964	Ribosomal protein S8
EL563589	TC103605	RNA-binding region RNP-1
EL563613	TC101072	Ubiquitin-specific protease ; queuine tRNA ribosyltransferase

Protein trafficking / folding / turnover

EL563584	TC106404	ADP-ribosylation factor (1)
EL563510	TC100159	ADP-ribosylation factor (2)
EL563673	TC109057	Auxilin-like protein
EL563511	TC94489	Calreticulin
EL563631	TC107901	Calreticulin - nuclear signalisation signal
EL563586	CB891219	Heat shock protein DnaJ
EL563550	TC94880	Hsp70 ; Immunoglobulin-like
EL563671	TC94521	HSP90, endoplasmic homolog precursor
EL563501	TC106674	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyclophilin
EL563620	TC100952	Protease-associated PA; Presenilin signal peptide peptidase
ES466884	TC100841	Protein disulphide isomerase (1)
ES466885	TC106707	Protein disulphide isomerase (2)
EL563518	TC109372	Signal peptidase
EL563539	TC96996	T-complex protein, gamma subunit

Other

ES466886	TC94800	Maternal tudor protein
ES466887	TC95463	Ovary protein induced by treatment with gibberellic acid
EL563566	TC107846	Striated muscle activator-like
ES466818	TC95835	Williams-Beuren syndrome critical region protein 28 isoform A

TRANSPORT**Electrons / cations**

EL563602	TC107069	Blue copper binding protein / Plastocyanin-like
ES466848	TC107742	Cation transporting ATPase
EL563678	TC95168	phytyocyanin like protein
EL563594	TC101492	Cytochrome b5
ES466849	TC100855	Vacuolar ATPase subunit2
EL563676	TC107957	NADH-Ubiquinone oxidoreductase
ES466850	TC94306	H+ transporting ATPase
EL563660	TC107050	V-ATPase subunit H ; Armadillo repeat

H2O

EL563540	TC100308	Aquaporin (1)
EL563516	TC106619	Aquaporin (2)
EL563555	TC100633	MIP (1)
EL563651	TC97494	MIP (2)

Amin compounds

ES466852	TC101309	Aminoacid / polyaminetransporter (1) (auxin influx carrier protein)
ES466853	TC101499	Aminoacid / polyaminetransporter (2)
EL563551	BG648836	Aminoacid / polyaminetransporter (3)
EL563551	TC96564	Cationic amino acid / polyaminetransporter
EL563520	TC101063	Tetrapeptide transporter, OPT1 and isp4 family

others

EL563653		AAA ATPase
EL563652	TC109038	ABC transporter-like protein
EL563509	TC100213	Adenine nucleotide translocator
EL563518	TC96958	Mlo-related protein
EL563651	TC94404	Nonaspanin

PROTECTION**Dehydrins / LEAs /HSPs**

EL563564	TC106660	Dehydrin
EL563612	BF004325	LEA

Defense

EL563632	TC100522	Chalcone-flavanone isomerase
EL563598	TC94417	Early nodulin 12B precursor
EL563630	TC95689	Extracellular dermal glycoprotein
ES466816	TC94210	Haem peroxidase (1)
ES466815	TC106540	Haem peroxidase (2)
ES466817	TC94210	Haem peroxidase (3)
EL563508	TC100225	Lipoxygenase 1
EL563534	TC100175	Lipoxygenase 2
EL563557	TC96127	MtN14 [NODULIN]
EL563596	TC106552	Naringenin-chalcone synthase
EL563571	TC100265	Pathogen-inducible alpha-dioxygenase
EL563633	TC94347	Peroxidase
EL563531	BM815583	Plant disease resistance response protein
EL563628	TC105431	Stress kinase

UNKNOWN**unknown proteins**

EL563583	TC94594	Biotin /lipoyl attachment ; Proline-rich region ; Acetyl-CoA biotincarboxyl carrier
ES481862	TC95576	Brain protein 44-like
EL563556	TC95249	BURP domain
ES466879	TC102633	Cucumis sativus mRNA expressed in cucumber hypocotyls
EL563669	TC106608	Glutamate-rich protein
ES466878	TC110720	Leucine-rich repeat,cysteine-containing subtype
EL563580	TC108721	PL6-like protein
EL563576	TC100703	Prolin-rich protein
EL563503	none	Protein with prolin-rich region
ES466888	TC95616	unknown
EL563587	TC101728	unknown
EL563521	TC106887	unknown
ES466889	TC100639	unknown
EL563524	TC110026	weakly similar to UPIQ9SUD5 (Q9SUD5) Medicago nodulin N21-like protein

unknown sequences

EL563625	TC95622	unknown sequence 08
EL563641	AW584600	unknown sequence 09
EL563627	TC95643	unknown sequence 10
ES466881	none	unknown sequence 12
EL563635	none	unknown sequence 13
EL563648	none	unknown sequence 14
EL563649	none	unknown sequence 15
EL563645	TC110455	unknown sequence 16
EL563515	AJ499930	unknown sequence 17
ES466890	TC109030	unknown sequence 18
ES466882	none	unknown sequence 19
EL563519	TC102597	unknown sequence 22
EL563496	TC107211	unknown sequence 26
EL563595	TC101127	unknown sequence 28
EL563498	TC107813	unknown sequence 34
EL563520	TC104421	unknown sequence 35
ES466891	TC109589	unknown sequence 36
ES466883	TC109781	unknown sequence 37
EL563546	TC101376	unknown sequence 38
EL563607	TC95180	unknown sequence 40
EL563683	TC101491	unknown sequence 41
EL563502	TC102122	unknown sequence 43
EL563611	TC105895	unknown sequence 49
EL563617	TC111632	unknown sequence 52
EL563552	BG646094	unknown sequence 53
EL563658	BF518820	unknown sequence 56
EL563577	TC112119	unknown sequence 57
ES466892	TC98182	unknown sequence 58
ES466893	CX255498	unknown sequence 63
EL563662	AW774040	unknown sequence 65
EL563682	BQ136408	unknown sequence 68
ES466824	TC103980	unknown sequence 70
EL563619	TC109664	unknown sequence 72
ES466894	AL300720	unknown sequence 73
ES466895	TC94995	unknown sequence 74
ES466896	TC96746	unknown sequence 75
ES466897	TC111766	unknown sequence 76
EL563677	TC106790	unknown sequence 77
EL563672	CX530944	unknown sequence 78

Table 1 ter : list of ESTs of DOWN - regulated genes revealed by SSH approach during germination of *Medicago truncatula*

GenBank Accession number	Medicago truncatula Gene index TC number	Identity of the clone
TRANSPORT		
Electrons / cations		
ES408311	TC111114	Thioredoxin type domain
H2O		
EL563523	TC101186	MIP
Amin compounds		
ES408315	TC107834	Aminoacid / polyaminetransporter
METABOLISM		
Cell wall		
ES408378	TC95684	Mob1-like protein / phocein family
ES408368	TC100580	Plant lipid transfer
Photosynthesis / hem biosynthesis		
ES408314	TC106689	Ferrochelataze
Carbon metabolism		
ES408319	TC95041	Glycosyltransferase
Nitrogen metabolism		
ES408306	TC108604	Alternative oxidase
ES408341	TC106560	S-adenosyl methionine synthetase (1)
ES481865	TC106438	S-adenosyl methionine synthetase (2)
Metal binding proteins		
ES408340	TC108260	Plant metallothionein, family 15
Other		
ES408326	TC94332	Oleosin 2
ES408363	TC100185	Oleosin 1
ES408312	TC93954	Pyridoxin biosynthesis proein PDX1
PROTECTION		
Dehydrins / LEAs /HSPs		
ES408343	TC101014	Dehydrin
ES408374	TC106102	Heat shock protein Hsp20 (1)
ES408336	TC100455	Heat shock protein Hsp20 (2)
ES408339	TC100454	Heat shock protein Hsp20 (3)
ES408333	TC108780	Heat shock protein Hsp20 (4)
ES408332	TC100459	Heat shock protein Hsp20 (5)
ES408356	TC97409	Heat shock protein Hsp20 (6)
ES408313	TC102741	LEA
Defense		
ES408328	TC103627	Gamma thionin ; Knottin
ES408365	TC108056	Seed maturation protein GmPM3
ES408342	TC96799	Small hydrophilic plant seed protein
ES408318	TC106802	Stress related protein (1)
ES408338	TC106856	Stress related protein (2)

REGULATION AND SIGNAL TRANSDUCTION**Transcription factors**

ES408351	TC95263	Zn-finger A20-like and AN1-like
ES408317	TC98476	Zn-finger protein

Hormones biosynthesis

ES408375	CX550409	UDP-glucose : flavonoid 7-O-glucosyltransferase
----------	----------	---

Nuclear proteins

ES408316	TC106765	Histone H3 (2)
----------	----------	----------------

Translation / RNA maturation

ES408352	TC94154	Elongation factor, GTP-binding
ES408304	TC106472	Elongation factor1-alpha (2)
ES408305	TC100844	Ribosomal L38e protein
ES408377	TC94793	Ribosomal protein L26
ES408307	TC107883	Ribosomal protein L31e
ES408355	TC106732	Ribosomal protein L32
ES408347	TC106904	Ribosomal protein L36
ES408376	TC93929	Ribosomal protein L37A
ES408370	TC94000	Ribosomal protein L41
ES408330	TC100592	Ribosomal protein S16
ES481864	TC93964	Ribosomal protein S19
ES408350	TC94275	Ribosomal protein S29
ES408329	TC106541	Ribosomal protein S3; Type 2 KH domain
ES408345	TC100140	Ribosomal protein S7
ES408309	TC106665	Soybean 18S ribosomal RNA
ES408331	TC93928	Translation initiation factor SUI1

Protein trafficking / folding / turnover

ES408371	TC94381	Cathepsin N-like cystein proteinase
ES408303	TC110528	Cyclin-likeF-box
ES408373	TC93934	Polyubiquitin
ES408369	TC100153	Protein with ubiquitin domain

Other

ES408370	TC104640	Clock-associated PAS protein ZTL
----------	----------	----------------------------------

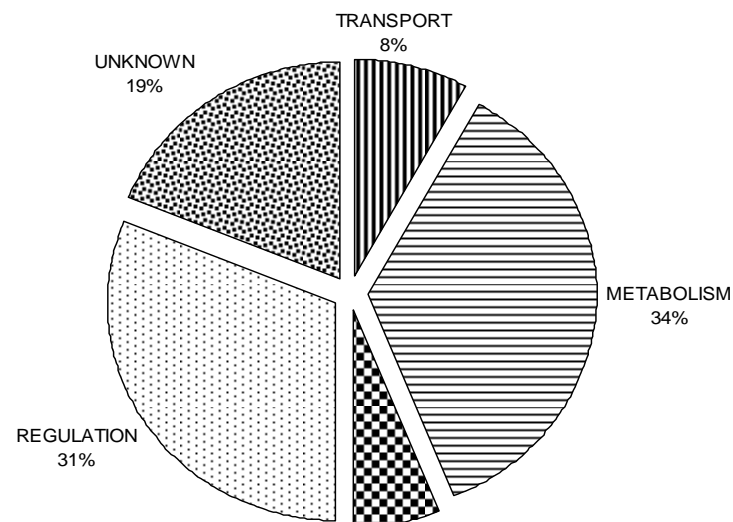
UNKNOWN**unknown proteins**

ES408372	TC100969	Protein of unknown function DUF642
ES408361	TC106535	Translationally controlled tumor protein

unknown sequences

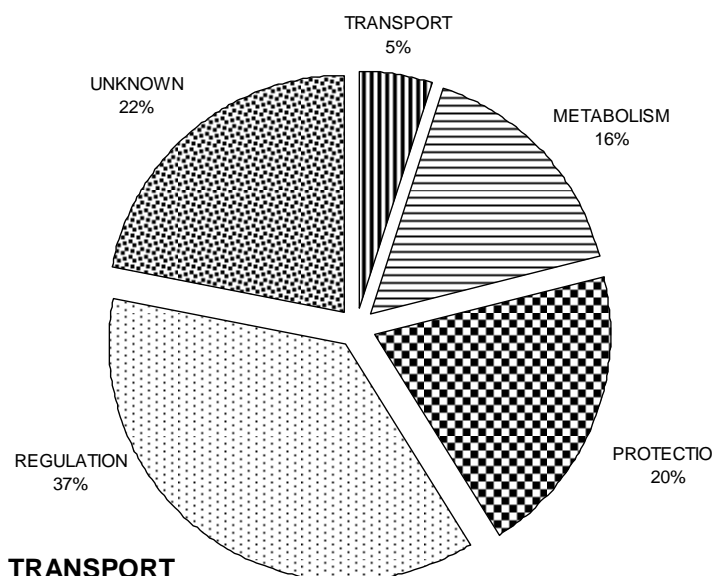
ES408334	TC100958	unknown sequence01
ES408364	none	unknown sequence02
ES408360	none	unknown sequence03
ES408346	none	unknown sequence04
ES408335	none	unknown sequence05
ES408366	TC100356	unknown sequence06
ES408357	TC100523	unknown sequence07
ES408321	TC96390	unknown sequence27
ES408325	TC107982	unknown sequence29
ES408310	TC109865	unknown sequence33
ES408324	TC103725	unknown sequence66
ES408308	TC97876	unknown sequence69
ES408323	none	unknown sequence79

A



TRANSPORT		
Electrons / cations		8
H ₂ O		4
Amin compounds		5
Other		5
	<i>total transport</i>	22
METABOLISM		
Cell wall		34
Photosynthesis / heam biosynthesis		2
Carbon metabolism		36
Nitrogen metabolism		19
Lipid metabolism		6
Nucleotides binding proteins		1
Metal binding proteins		1
Other		2
	<i>total growth/metabolism</i>	101
REGULATION AND SIGNAL TRANSDUCTION		
Kinases / Phosphatases / Cell cycle		18
Signaling / hormone induced proteins		13
Transcription factors		5
Hormone biosynthesis		6
Nuclear proteins		8
Translation / RNA maturation		17
Protein trafficking / folding / turnover		14
Other		4
	<i>total regulation</i>	85
PROTECTION		
Dehydrins / LEAs /HSPs		2
Defense		14
	<i>total protection</i>	16
UNKNOWN		
Unknown proteins		14
Unknown sequences		39
	<i>total unknown</i>	53

Figure 1 A

B**TRANSPORT**

Electrons / cations	1
H ₂ O	1
Amin compounds	1
Other	0
<i>total transport</i>	3

METABOLISM

Cell wall	2
Photosynthesis / heam biosynthesis	1
Carbon metabolism	1
Nitrogen metabolism	3
Lipid metabolism	0
Nucleotides binding proteins	0
Metal binding proteins	1
Other	3
<i>total growth/metabolism</i>	11

REGULATION AND SIGNAL TRANSDUCTION

Kinases / Phosphatases / Cell cycle	0
Signaling / hormone induced proteins	0
Transcription factors	2
Hormone biosynthesis	1
Nuclear proteins	1
Translation / RNA maturation	16
Protein trafficking / folding / turnover	4
Other	1
<i>total regulation</i>	25

PROTECTION

Dehydrins / LEAs /HSPs	8
Defense	5
<i>total protection</i>	13

UNKNOWN

Unknown proteins	2
Unknown sequences	13
<i>total unknown</i>	15

Figure 1 B

3-Conclusion

Dans cet article, nous avons présenté des éléments nouveaux concernant la germination chez la légumineuse modèle *Medicago truncatula*.

Par l'application d'un composé chimique, l'oryzaline, sur les graines en imbibition, la mitose a été bloquée dans les axes embryonnaires mais la germination s'est déroulée de manière identique au témoin. Nous en avons conclu que la prolifération cellulaire n'est pas nécessaire à la germination. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de la transcription des gènes codant pour la cyclineB et AuroraB, qui sont des effecteurs de la division cellulaire. Leur pic d'expression est postérieur à la percée de la radicule. L'ensemble de ces résultats montrent que, chez *Medicago*, c'est l'expansion cellulaire qui est à l'origine de l'évènement de germination et non la prolifération cellulaire, comme le suggéraient les résultats obtenus par Faria et al. (2005).

L'allongement cellulaire dans les axes embryonnaires de *Medicago* conduisant à la percée de la radicule a été décrit de manière détaillée. Ce phénomène d'élongation est régulé dans l'espace et dans le temps. Dans l'axe longitudinal, ce sont les cellules les plus centrales qui initient l'expansion. Le mouvement se diffuse ensuite aux cellules voisines de proche en proche, vers l'apex radiculaire d'une part (gradient basipète) et l'hypocotyle d'autre part (gradient acropète). Ces résultats sont en accord avec les observations effectuées sur la croissance des cellules de l'hypocotyle d'*Arabidopsis*. Cette étude a montré que l'élongation des cellules débutait à la base de l'hypocotyle avec un gradient acropète, en particulier lors de la skotomorphogénèse (Gendreau et al., 1997).

L'expansion des cellules nécessite l'affaiblissement des structures pariétales. Sous la pression de la turgescence, les composés pariétaux glissent alors les uns sur les autres tandis que d'autres composants viennent renforcer la structure. Ces aspects ont été étudiés d'un point de vue moléculaire en suivant l'expression de quelques gènes impliqués dans la restructuration de la paroi. Ces gènes codaient pour des enzymes modifiant l'adhésion des composés pariétaux, de protéines architecturales et d'une cellulose synthase. Leur expression a été évaluée en conditions optimales sur l'eau et en présence d'ABA. Tous ont montré une expression croissante au cours de la germination sur l'eau et une forte répression en présence d'ABA. De plus, le retrait de l'ABA et le retour sur l'eau a conduit à la levée d'inhibition de l'expression et à la germination rapide des graines. Lors de l'inhibition de la germination, l'ABA agit donc sur la transcription des gènes codant pour des protéines ayant une action sur

la structure de la paroi. Nous concluons de ces résultats que, au moins en partie, c'est par le biais de l'inhibition de l'élongation cellulaire que l'action de l'ABA s'exerce pour bloquer la germination. Récemment, une équipe a montré que le facteur de transcription *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE (PIL5)* inhibait la germination via les gènes codant pour les enzymes de biosynthèse et de signalisation hormonale, mais aussi via des enzymes de restructurations pariétales : expansines et XETs (Oh et al., 2009). Ceci représente une indication supplémentaire en faveur de l'importance de la restructuration pariétale dans la germination.

Chapitre 2

Croissance des cellules de l'axe embryonnaire au cours de la germination : structure et modifications de la paroi

1-Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que le moteur de la germination, chez *Medicago truncatula*, était l'expansion cellulaire et que le cycle ne reprenait qu'après la percée de la radicule. Les composants pariétaux relâchent alors leur adhésion et de nouveaux composants viennent s'ajouter afin de consolider la structure.

Les parois enferment les cellules végétales et leur offrent un cadre rigide. Il constitue un exosquelette et la pression de turgescence des cellules s'exerçant sur ce support permet la résistance des tissus. On distingue deux types de parois chez les végétaux supérieurs : paroi primaire et paroi secondaire. La paroi primaire est constituée de polysaccharides et de protéines. La paroi secondaire n'existe que dans certains tissus (soutien ou conduction) et vient se plaquer à la face interne de la paroi primaire. Elle est constituée principalement de microfibrilles de cellulose, d'une matrice hémicellulosique et de lignine. Sa flexibilité est nulle et ne permet aucune croissance cellulaire. Pour la suite, nous ne considérerons que la paroi primaire car elle correspond aux parois des cellules en croissance observées dans les axes embryonnaires.

La paroi est fabriquée par chaque cellule qui excrète des constituants dans l'apoplasme. Globalement, il existe trois types de constituants polysaccharidiques : la cellulose, les hémicelluloses et les pectines, auxquels viennent s'ajouter des composants protéiques. L'ensemble des constituants se lient les uns aux autres par des liaisons ioniques et covalentes pour former un enchevêtrement complexe de macromolécules.

La cellulose est le composant de base des parois végétales. Le motif de base répété dans le polymère de cellulose est un dimère de résidus glucose liés en β -1,4, le cellobiose. Ce motif de base est répété pour former une longue chaîne linéaire. Des microfibrilles se constituent par association de 36 chaînes. Elles sont formées à la surface externe de la membrane plasmique au niveau de complexes en rosette de cellulose synthase (CESA) constitués de 6 sous-unités, elles-mêmes composées de 6 enzymes cellulose synthase (Somerville et al., 2004). Les complexes sont guidés par le réseau de microtubules à l'intérieur de la cellule (Paredez et al., 2006) expliquant la structure très organisée des microfibrilles.

Les pectines jouent un rôle important dans la porosité des parois, l'adhésion cellulaire et l'élongation. Ce sont des molécules complexes classifiées en trois types : homogalacturonanes (HG) et rhamnogalacturonanes de type I et II (RGI et RGII). Les HG consistent en une chaîne linéaire d'acide galacturonique comprenant 100 à 200 résidus

(Bonnin et al., 2002). Ils peuvent être estérifiés par le méthanol ou l'acide acétique respectivement sur les carbones 6 et 2/3 (Quemener et al., 2007). Lorsqu'ils ne sont pas méthylés, les HG sont capables de former des gels via des ponts calciques. Cette propriété physique des pectines dépend donc de l'activité des enzymes pectine méthylesterase (PME), qui réalisent la dé-méthylesterification des HG. Les RG I présentent des chaînes de résidus d'acide galacturonique liés en α -1,4 alternées avec des résidus rhamnose liés en α -1,2. Ces résidus portent des chaînes latérales d' α -1,5 arabinanes, de β -1,4 galactanes ou d'arabinogalactanes. Les RG II possèdent une structure plus complexe. Leur squelette est composé de résidus divers en plus de l'acide galacturonique et du rhamnose. Les composants pectiques sont synthétisés dans l'appareil de Golgi et excrétés dans l'apoplasme par le trafic des vésicules golgiennes.

Dans la paroi végétale, les polysaccharides qui ne sont ni cellulosiques, ni pectiques correspondent aux hémicelluloses. Ces polymères possèdent des chaînes plus courtes que la cellulose. Comme les pectines, ils sont formés dans l'appareil de Golgi et excrétés. Les xyloglucanes possèdent un squelette de β -1,4 glucane qui est substitué par le xylose auquel sont liés des résidus galactose et fucose. Les arabinoxylyanes sont plus spécifiques des graminées. Ils possèdent un squelette de β -1,4 xylanes substitués par l'arabinose. Les glucomannanes sont constitués d'une chaîne linéaire de résidus glucose et mannose liés en β -1,4. Ils peuvent être O-acétylés sur les résidus mannose. Au sein de la paroi, les hémicelluloses constituent un réseau avec la cellulose et les composés pectiques.

Les protéines architecturales sont classifiées en trois groupes : les glycin-rich proteins (GRP), les prolin-rich proteins (PRP), et les hydroxyprolin-rich glycoproteins, (HRGP). Les extensines et les arabinogalactanes-protéines (AGPs) sont des HRGPs. Le squelette protéique des extensines comporte des répétitions du tandem (ser-hyp₄) qui sont glycosylées par des chaînes latérales de galactose et d'arabinose (Wilson and Fry, 1986). De manière globale, ces protéines sont impliquées dans le processus de développement des plantes en tant que régulateurs de l'extension de la paroi (Carpita and Gibeau, 1993). Les AGPs sont divisées en deux types selon la structure de leur partie protéique (classique ou non). Chez ces protéines, la partie glycosidique est si développée qu'elle encapsule la partie protéique. Les unités polysaccharidiques qui sont attachées au noyau protéique varient de 30 à 150 résidus (Showalter, 2001). Elles présentent un squelette de β -1,3-galactanes possédant des ramifications de β -1,6-galactanes elles-mêmes substitués par de l'arabinose. Certaines AGPs présentent un ancrage dans la membrane plasmique. Elles semblent jouer un rôle dans un

grand nombre de processus physiologiques. Concernant l'extension cellulaire, il a été montré que l'application réactif de Yariv (agent chimique précipitant les AGPs) sur des racines en croissance perturbe le phénomène (Willats and Knox, 1996; Ding and Zhu, 1997).

La paroi est une structure rigide dont les propriétés physiques doivent nécessairement être modifiées pour permettre l'élongation cellulaire. L'action d'enzymes permet de modifier la réticulation des composants de la paroi. Les xyloglucanes endotransglycosylases (XETs) sont des enzymes capables « d'allonger » les chaînes de xyloglucanes (hémicelluloses) de la paroi. Son action se déroule en deux temps : coupure d'un polymère de xyloglucane puis ligation d'un des fragments avec une autre chaîne de xyloglucane. L'action des expansines n'a pas été clairement démontrée mais il semble que ces enzymes agissent de manière rapide en dissociant les complexes de polysaccharides au niveau des liaisons hydrogène (McQueen-Mason and Cosgrove, 1994; McQueen-Mason and Cosgrove, 1995). Les endo 1,4- β -glucanases, également nommées cellulases, réalisent la dégradation des zones non cristallines de la cellulose (Ohmiya et al., 1995; Ohmiya et al., 2000). L'expansion cellulaire nécessite également la synthèse de nouveaux composés (polysaccharides et protéines architecturales) qui viennent renforcer la structure existante.

De manière générale, les parois subissent des évolutions au cours de la vie de la plante. Ces modifications varient en fonction du stade de développement, et permettent, par exemple, la croissance en longueur des cellules (affaiblissement puis consolidation des parois) ou la stabilisation de leur taille (lignification). Il peut s'agir également de modifications en lien avec la maturation des fruits (affaiblissement des parois, diminution de l'adhésion intercellulaire). Lors de la germination, la structure des parois est nécessairement modifiée. A notre connaissance néanmoins, il n'existe pas de donnée disponible dans la littérature décrivant ces modifications. L'objectif de ce travail était d'apporter de nouvelles informations concernant les modifications pariétales en relation avec le processus de germination chez *Medicago truncatula*.

2-Matériels et méthodes

2.1-Matériel végétal

Pour toutes les manipulations, des graines de *Medicago truncatula* ont été placées dans des boîtes de Pétri en verre de 90 mm de diamètre sur un papier filtre Whatmann imbibé avec 3.5 mL de solution de germination. Cinquante graines environ ont été disposées par boîte. Pour les manipulations de dosage et de microscopie, les graines ont été imbibées dans l'eau ultra-pure et l'ensemble a été entreposé à l'obscurité à 21°C durant 5, 15 ou 21 heures. Le stade 5 h correspond au stade où la graine est totalement imbibée. Le stade 21 h correspond à la graine germée et le stade 15 h a été choisi comme intermédiaire : la racine commence à s'allonger mais n'a pas encore percé les téguments. Pour les manipulations de test de germination, les solutions de germination étaient la 3,4-déhydro-D,L-proline à 0.05 et 1 mM ou le réactif de Yariv [1,3,5-tris (4-β-D-glycopyranosyloxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxybenzene] à 30 μM.

2.2-Extraction de la masse insoluble à l'alcool

Pour les dosages, la masse insoluble à l'alcool (MIA) a été extraite des échantillons. Pour cela, des axes embryonnaires de chaque stade (5, 15 21h) ont été prélevés et immédiatement congelés dans l'azote liquide. Ils ont été lyophilisés puis broyés à sec au broyeur à bille céramique pour obtenir des particules d'un diamètre de 200 μm environ. La poudre ainsi formée a été traitée avec 1 mL d'alcool à 70% durant 20 minutes à 100°C. L'ensemble a été centrifugé durant 10 minutes à 12 000 rpm et à 4°C. Le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé 6 fois avec 1 mL d'éthanol 70% puis 3 fois avec 1 mL d'éthanol 96% avant d'être séché toute la nuit à l'étuve à 40°C. Deux extractions ont été faites à partir de deux lots d'axes embryonnaires (300 ou 600) prélevés de manière indépendante. La MIA correspond à l'échantillon de base sur lequel ont été réalisées toutes les analyses chimiques et enzymatiques.

2.3-Dosage des oses neutres et acides uroniques

Les constituants des polymères pariétaux ont été hydrolysés en monomères par hydrolyse à l'acide sulfurique ou à l'acide tri-fluoroacétique (TFA). Une partie de chaque

type d'hydrolysats a subi une dérivation en composés volatils (Englyst and Cummings, 1988) pour l'identification de la composition en oses neutres par chromatographie en phase gazeuse (CPG). L'autre partie a été analysée par colorimétrie pour évaluer la composition en acides uroniques.

2.3.1-Hydrolyse à l'acide sulfurique

Afin de rendre disponible à l'hydrolyse les polymères de cellulose, les échantillons ont d'abord subi une étape de pré-hydrolyse. Cinq milligrammes d'échantillon a été dispersé dans 125 μL d'acide sulfurique 26N (72%) dans un tube à hydrolyse à vis à l'aide d'une baguette de verre. La pré-hydrolyse a été réalisée durant 30 minutes au bain-marie à 30°C. L'acide sulfurique a été dilué à 2N par ajout d'eau déionisée contenant le standard interne (1.5 mg d'inositol). L'hydrolyse a été effectuée durant 2 heures dans un thermobloc à 100°C. Le tube a été refroidi sous l'eau courante puis centrifugé 10 minutes à 5 000 g. Pour le dosage des oses neutres 1 mL de surnageant a été prélevé et neutralisé avec environ 150 μL d'ammoniaque à 25%. Le reste (environ 500 μL) a été utilisé pour le dosage des acides uroniques.

2.3.2-Hydrolyse à l'acide tri-fluoroacétique

Pour l'hydrolyse à l'acide tri-fluoroacétique (TFA), 5 mg de poudre d'échantillon a été dispersé dans 400 μL d'eau. Ensuite, 100 μL d'inositol à 5 mg/mL et 500 μL de TFA 4N ont été ajoutés. Le mélange a été homogénéisé au vortex avant la réaction d'hydrolyse qui a été effectuée à 121°C dans un thermobloc durant 2 heures. Après refroidissement, le TFA a été évaporé à sec. L'échantillon a été lavé deux fois avec 500 μL d'eau, évaporé à sec après chaque lavage, puis repris dans 1 mL d'eau. La solution a été neutralisée avec une goutte d'ammoniaque à 3M et 500 μL ont été utilisés pour la suite.

2.3.3-Dérivation des oses libérés et analyse en CPG

Pour la dérivation, les monomères d'oses libérés par les hydrolyses acides ont tout d'abord subi une réduction au borohydrure de sodium dans l'ammoniaque. Dans 1 mL d'échantillon neutralisé ont été ajoutés 100 μL de NaBH_4 à 100 mg/mL en solution dans de l'ammoniaque 3N. La solution a été homogénéisée au vortex puis incubée 1 heure à 40°C

dans un bain-marie. Les échantillons ont été refroidis dans la glace. Afin d'oxyder le reste de borohydrure de sodium, 2 x 50 µL d'acide acétique pur ont été ajoutés avec homogénéisation au vortex. Les échantillons ont été refroidis sous un courant d'eau froide avant l'étape d'acétylation. L'acétylation a été effectuée sur la totalité du volume pour les échantillons issus de l'hydrolyse au TFA, et sur 150 µL pour ceux issus de l'hydrolyse à l'acide sulfurique. Dans les tubes ont été ajoutés 2 mL d'anhydride acétique puis 0.2 mL de N-méthylimidazole (catalyseur de la réaction). Les solutions ont été homogénéisées au vortex puis incubées 20 minutes à température ambiante. Aux échantillons ont été ajoutés 5 mL d'eau distillée puis 1.5 mL de dichlorométhane afin d'extraire les acétates d'alditols. Le mélange a été agité vigoureusement au vortex puis décanté. La phase supérieure aqueuse a été retirée puis la phase organique lavée avec 5 mL d'eau distillée. Pour les échantillons ayant subi l'hydrolyse au TFA, le lavage a été effectué deux fois. Après agitation et décantation, la phase organique a été injectée de manière automatisée dans la colonne de CPG. Une solution témoin d'oses neutres (1mg/mL de : rhamnose, fucose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose et inositol) a également été injectée afin d'identifier les oses de l'échantillon en fonction de leur temps de rétention. Le volume qui a été injecté était de 2 µL. Le chromatographe qui a été utilisé (Perkin-Elmer) est équipé d'une colonne capillaire de silice (phase stationnaire) et le gaz porteur qui a été utilisé est l'hydrogène (80 KPa). Pour chacun des lots d'axes embryonnaires, la mesure a été réalisée deux fois pour chaque stade.

2.3.4-Calcul du pourcentage en ose :

La solution témoin d'oses neutres contient tous les oses dosés et l'inositol à des concentrations connues. Elle permet de déterminer les facteurs de réponse en poids (FRP) de chaque ose par rapport à l'inositol, pour lequel FRP = 1. Le FRP se calcule comme suit :

$$FRP_{ose} = \frac{[ose]^T \times Sf-ino^T}{[ino]^T \times Sf-ose^T}$$

$[ose]^T$ et $[ino]^T$ sont respectivement les concentrations en ose et inositol du témoin, $Sf-ino^T$ et $Sf-ose^T$ sont respectivement les mesures de surface des pics en inositol et ose du témoin. Les mesures de surface ont été faites deux fois et le FRP moyen de ces deux mesures a été utilisé pour la suite des calculs.

L'étalon interne inositol ajouté en quantité connue à chaque échantillon dosé permet de quantifier la quantité de chaque ose présent. Le pourcentage en poids de chaque ose est

calculé par rapport aux surfaces des pics d'ose et d'inositol (Sf-ose et Sf-ino) dans l'échantillon et par rapport aux masses d'inositol (M_{ino}) interne et d'échantillon ($M_{éch}$) utilisée pour le dosage :

$$\% \text{ ose} = (M_{ino} \times Sf\text{-ose} \times FRP_{ose} \times CP) / (Sf\text{-ino} \times M_{éch}) \times 100$$

Le FRP est spécifique à chaque ose. CP représente le coefficient de polymérisation. La liaison glycosidique entraînant la perte d'une molécule d'eau, le coefficient de polymérisation corrige la différence de masse molaire qui existe entre les oses libres et les oses polymérisés. Il se calcule comme suit : $CP = M_{ose} - M_{eau} / M_{ose}$ où M représente la masse molaire. Il vaut 0.88 pour les pentoses, 0.9 pour les hexoses.

2.3.5-Dosage des acides uroniques par colorimétrie

Dans un milieu sulfurique à chaud, les oses sont transformés en dérivés furfuriques. Cette réaction s'effectue au sein de l'auto-analyseur (Skalar) sur l'aliquote prélevé après l'hydrolyse à l'acide sulfurique (environ 500 μ L), dilué au 10ème. Les acides uroniques transformés en dérivés furfuriques se condensent avec le *m*-phénylphénol (ou méthahydroxydiphényl, MHDP) pour former un complexe de couleur rose. Le MHDP à 400 mg/L dans de la soude N/8 a été placé sur les chaînes de dosage de l'auto-analyseur (Thibault, 1979). Le signal d'absorption à 530 nm a été mesuré par un photomètre. En parallèle, le signal obtenu avec des solutions standard d'acides uroniques à des concentrations connues (0, 20, 40, 60, 80, 100 μ g/mL) a été mesuré. Une mesure des échantillons sans MHDP mais dans la soude N/8 a également été effectuée afin de corriger l'absorbance due aux colorations brunes qui se produisent parfois dans ces conditions de réaction.

Pour calculer la teneur en acides uroniques dans les échantillons, la hauteur des pics d'absorption (H_{pic}) des solutions standard ont d'abord été mesurés. Ceci a permis de tracer une droite-étalon dont le coefficient directeur (CoeffDE) est calculé. Ensuite, la concentration en acides uroniques (AU) se calcule comme suit :

$$AU (\mu\text{g/mL}) = (H_{pic_{réactif}} - H_{pic_{soudeN/8}}) / \text{CoeffDE}$$

Dans les polymères, c'est la forme anhydro-uronique des acides qui est présente. Le teneur en acide anhydro-uronique (AnAU) dans l'échantillon se calcule comme suit :

$$\text{AnAU (mg/g)} = (\text{AU} \times \text{vol} \times \text{dil} \times \text{coeff_AnAU/AU}) / \text{PE}$$

Vol correspond au volume de solution et dil à la dilution. Le coefficient Coeff_AnAU/AU correspond au rapport des masses molaires des acides anhydro-uroniques (176 g/mol) et des acides uroniques (194 g/mol). Il vaut 0.907. PE correspond à la prise d'essai, c'est-à-dire la masse d'échantillon (en mg).

2.4-Détermination des degrés de méthylation et d'acétylation

Les degrés de méthylation des pectines présentes dans la MIA ont été déterminés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) selon la méthode décrite par (Levigne et al., 2002). Les groupements méthyl et acétyl ont d'abord été saponifiées et les pectines ont été précipitées par le cuivre. Le méthanol et l'acide acétique résultants de cette réaction ont été dosés par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC). L'isopropanol a été utilisé comme standard interne. En parallèle, la quantité d'acides uroniques a été déterminée par colorimétrie à l'auto-analyseur (Skalar), (voir paragraphe précédent).

A 5 mg d'échantillon ont été ajoutés 500 µL de la solution de précipitation contenant également le standard interne. Cette solution se composait de l'ion Cu²⁺ à 1 mg/mL et d'isopropanol à 0.7 mg/mL. Afin d'éviter l'évaporation de l'isopropanol, la solution a été préparée extemporanément et la manipulation réalisée en chambre froide à 4°C. Une solution de NaOH 1N a ensuite été ajoutée puis les tubes incubés 1 heure à 4°C avec agitation fréquente. Les tubes ont été centrifugés 10 minutes à 4°C et 7 400g et les surnageants filtrés sur une cartouche ICH préalablement lavée avec 10 mL d'eau distillée. Les filtrats ont été disposés dans l'échantillonneur de l'appareil pour être injectés automatiquement dans la colonne C18 Varian 3 µm Pursuit (Varian). Un standard externe (acide acétique 0.2 mg/mL, méthanol 0.2mg/mL, isopropanol 0.35 mg/mL) a également subi l'étape de filtration. La phase mobile qui a été utilisée est l'acide sulfurique à 4 mM et l'analyse a été effectuée à 4°C. L'acquisition et le traitement des chromatogrammes HPLC ont été réalisés avec le logiciel Borwin (JMBS developments).

2.4.1-Calcul du degré de méthylation

Le facteur de réponse en poids du méthanol ($FRP_{\text{méthanol}}$) par rapport à l'isopropanol est calculé comme suit à partir des mesures du chromatogramme (Aire) et des masses (M) du standard externe :

$$FRP_{\text{méthanol}} = (Aire_{\text{isopropanol}}/Aire_{\text{méthanol}}) \times (M_{\text{méthanol}}/M_{\text{isopropanol}})$$

La quantité connue d'isopropanol dans l'étalon interne permet de calculer la masse de méthanol ($M_{\text{méthanol}}$) mesurée dans l'échantillon issue de la réaction de saponification des résidus méthylés :

$$M_{\text{méthanol}} \text{ (mg)} = FRP \times (Aire_{\text{methanol}}/Aire_{\text{isopropanol}}) \times M_{\text{isopropanol}}$$

Avec

$$M_{\text{isopropanol}} = 0.7 \text{ (mg/mL)} \times 0.5 \text{ (mL)} = 0.35 \text{ mg}$$

Le degré de méthylation (DM) se calcule comme suit :

$$DM = (M_{\text{méthanol}}/MM_{\text{méthanol}}) \times (MM_{\text{AnAU}}/M_{\text{AnAU}}) \times 100$$

Avec

$$MM_{\text{méthanol}} = 32 \text{ g/mol et } MM_{\text{AnAU}} = 176 \text{ g/mol}$$

M_{AnAU} correspond à la masse d'acide anhydro-uronique dans l'échantillon de départ. Il s'exprime en mg.

2.4.2-Calcul du degré d'acétylation

Le principe du calcul est identique à celui utilisé pour le degré de méthylation. Le FRP de l'acide acétique par rapport à l'isopropanol est calculé comme suit à partir des mesures (Aire) et des masses (M) du standard externe :

$$FRP_{\text{acide acétique}} = (Aire_{\text{isopropanol}}/Aire_{\text{acide acétique}}) \times (M_{\text{acide acétique}}/M_{\text{isopropanol}})$$

La quantité connue d'isopropanol dans l'étalon interne permet de calculer la masse d'acide acétique ($M_{\text{acide acétique}}$) mesurée dans l'échantillon issue de la réaction de saponification des résidus acétylés :

$$M_{\text{acide acétique}} \text{ (mg)} = \text{FRP} \times (\text{Aire}_{\text{acide acétique}} / \text{Aire}_{\text{isopropanol}}) \times M_{\text{isopropanol}}$$

Avec

$$M_{\text{isopropanol}} = 0.7 \text{ (mg/mL)} \times 0.5 \text{ (mL)} = 0.35 \text{ mg}$$

Le degré d'acétylation (DA) se calcule comme suit :

$$\text{DA} = (M_{\text{acide acétique}} / \text{MM}_{\text{acide acétique}}) \times (\text{MM}_{\text{AnAU}} / M_{\text{AnAU}}) \times 100$$

Avec

$$\text{MM}_{\text{acide acétique}} = 60 \text{ g/mol et } \text{MM}_{\text{AnAU}} = 176 \text{ g/mol}$$

2.5-Dégradation enzymatique des pectines

À 5 mg d'échantillon, 977.5 μL de tampon acétate 10 mM pH4 ont été ajoutés puis 1 μL de endo-polygalacturonase (5U), 1.5 μL de endo-1,4- β -D-galactanase (1.4U) et 20 μL d'endo-1,5- α -L-arabinanase (2.8U). L'incubation a été faite à 40°C durant 17 heures sous agitation rotative. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 10 minutes à 12 000 rpm à 20°C. Le surnageant a été prélevé et porté à ébullition 10 minutes, refroidi 1 heure à température ambiante puis passé sur filtre 0.45 μm . Le culot a été lavé 3 fois avec 1 mL d'eau déionisée et centrifugé entre chaque lavage avant de subir une deuxième étape de dégradation. Pour cela, 990 μL d'eau déionisée ont été ajoutés puis 10 μL d'endo-1,4- β -D-glucanase (5.4U). L'incubation et le traitement du produit de réaction a été identique à la première dégradation. Les hydrolysats ont été analysés par chromatographie échangeuse d'anion haute performance (HPAEC) et spectrométrie de masse.

2.6-Chromatographie échangeuse d'anion haute performance

Un aliquote de 25 μL d'échantillon a été injecté dans le système composé d'une colonne d'analyse CarboCap PA-1 (Dionex) thermostatée à 25°C équipée d'une colonne de garde CarboCap PA-1 (Dionex). Durant les 65 minutes de l'analyse, l'élution a été réalisée avec une solution de NaOH à 100 mM et un gradient linéaire de 0 à 170 mM de NaOAc

durant les 30 premières minutes puis 5 minutes à 800 mM NaOAc. La détection a été réalisée avec un détecteur ampérométrique pulsé EC 2000 (Thermo Finnigan) et le logiciel Borwin (JMBS developments) a été utilisé pour collecter et analyser les données.

2.7-Spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les hydrolysats enzymatiques ont été analysés dans un spectromètre (Waters) dont la source d'ionisation était de type laser assistée par matrice (MALDI) couplé à une analyse de temps de vol (TOF), afin de mettre en évidence les empreintes enzymatiques (Lewandrowski et al., 2005). Les résultats obtenus ont subi une analyse statistique pour déterminer les différences quantitatives des empreintes entre les différents échantillons. Une ANOVA a été faite à partir des proportions de chaque pic, calculée comme un pourcentage de la somme totale des voltages. La somme correspond aux pics reconnus sur les spectres.

2.8-Résonnance magnétique nucléaire (RMN)

Les expériences de RMN ont été réalisées sur un spectromètre Bruker DMX-400 opérant à la fréquence du ^{13}C à 100.62 MHz et équipé d'une sonde CP/MAS à double résonance H/X 4 mm. Afin d'observer uniquement les carbones des zones les plus mobiles, c'est-à-dire les branchements des pectines et hémicelluloses, ainsi que les substitutions des glycoprotéines, la séquence d'impulsion SPEMAS (Single Pulse Excitation Magic Angle Spinning) a été utilisée (Rondeau-Mouro et al., 2003). La vitesse de rotation à l'angle magique a été fixée à 7 000 Hz. Chaque expérience a été enregistrée à température ambiante ($294 \pm 1\text{K}$). Les échantillons ont été préalablement réhydratés à 75% dans l'eau lourde D_2O . Les expériences étaient composées d'une seule impulsion à 90° de 4 μs et d'un temps de recyclage de 1 sec. Le nombre d'incrémentes a été de 28 672. Un découplage proton (WALTZ16) a été appliqué durant toute la séquence. Les spectres ont été référencés en déplacements chimiques en enregistrant le spectre de la glycine dont le carbonyle résonne à 176.03 ppm.

2.9-Microscopie

Afin de vérifier par une autre méthode les résultats obtenus par les mesures physico-chimiques et enzymatiques, les parois des axes embryonnaires ont été visualisées en microscopie avec coloration et immunomarquage de certains constituants.

2.9.1-Inclusion et coupes

Les axes embryonnaires de *Medicago* ont été prélevés à 5, 15 et 21 heures après imbibition des graines. Ils ont été coupés en trois dans le sens longitudinal. La partie centrale a été conservée et plongée durant 4 heures dans une solution contenant 2.5% de glutaraldehyde dans du tampon phosphate à 0.1 M pH 7.2 afin de fixer les tissus. Les échantillons ont été rincés dans le tampon puis dans l'eau distillée avant de subir l'étape de déshydratation. Cette étape s'effectue par des bains successifs dans l'éthanol à 30, 50, 70, 85, 95 et 100%. Les échantillons déshydratés ont été inclus dans la résine LR White (London Resin Company) en procédant par des gradients de concentration éthanol/LR White v/v : 80/20, 60/40, 40/60, 20, 80, puis LR White pur. Les échantillons ont été inclus dans des capsules de gélatine puis polymérisés 2 jours à 5°C en présence d'un catalyseur.

Des coupes longitudinales semi-fines d'une épaisseur de 1 µm ont été réalisées de façon à observer tous les tissus : épiderme, parenchyme cortical et faisceaux pro-vasculaires. L'ultra-microtome qui a été utilisé est le MICROM MT-7000 équipé avec un couteau de diamant dédié à l'histologie. Les coupes ont été récupérées sur l'eau, prélevées à l'aide d'un anneau de plastique puis déposées sur des lames à puits multiples préalablement traitées au Vectabond (Vector Labs). Le traitement favorise la fixation des coupes et évite leur perte au cours des étapes d'immunomarquage. Les lames ont été disposées sur une plaque chauffante afin de sécher les coupes.

2.9.2-Marquages des composés pariétaux

L'ensemble des marquages qui ont été effectués sur récapitulés sur le tableau 2.1. Deux échantillons par stade de développement ont été marqués avec, pour chacun, un témoin non marqué.

2.9.2.1-Immunomarquages

Le tableau 2.1 précise les immunomarquages qui ont été effectués : nom et spécificité des anticorps primaires, les tampons dans lesquels ils ont été dilués et le degré de dilution.

Avant le marquage, les sites ont préalablement été saturés par une solution de lait en poudre demi écrémé à 3% dilué dans le tampon PBS à 20 mM. Pour les échantillons destinés à être marqués avec l'anticorps 2F4, c'est le tampon Ca/Na TRIS (20 mM TRIS-HCl, Ph 8.2 ; CaCl₂ 0.5 mM ; NaCl 150 mM) qui a été utilisé pour la saturation. La saturation a été effectuée durant 30 minutes à température ambiante dans une chambre humide avec 50 µL de solution. Celle-ci a ensuite été retirée par aspiration. Le marquage avec l'anticorps primaire spécifique a été effectué avec 50 µL d'anticorps dilué, durant 1 heure à température ambiante et en chambre humide. Les échantillons ont été rincés 6 fois 5 minutes dans le tampon de dilution de l'anticorps. L'anticorps secondaire, produit chez la chèvre et dirigé contre l'organisme de production de l'anticorps primaire (souris ou rat), et marqué à l'Alexa fluor 488, a été dilué au 100^e dans le même tampon que l'anticorps primaire ; 50 µL ont été appliqués sur les échantillons durant 1 heure à température ambiante, en chambre humide et à l'obscurité. Les échantillons ont été rincés 2 fois 5 minutes dans le tampon de dilution puis 4 fois 5 minutes à l'eau distillée.

marquage/ anticorps I	épitope	tampon de dilution	dilution	référence
Cellulose				
Calcofluor	o	Eau	0,01%	–
Pectines				
2F4	HG non esterifié	TRIS / lait 1 % / Tw 0,05 %	5e	Liners et al., 1989 ; 1992
LM6	6 résidus d'1-5 α L arabinanes	PBS / lait 1 % / Tw 0,05 %	10e	Willats et al., 1998
LM5	5 résidus d'1-4 β D galactanes	PBS / lait 1 % / Tw 0,05 %	10e	Jones et al., 1997
Anti-RG	?	PBS / lait 1 % / Tw 0,05 %	1/2	–
Hémicelluloses				
LM15	motif XXXG	PBS / lait 1 % / Tw 0,05 %	10e	Marcus et al., 2008
Callose				
Anti-callose	segments linéaire de 1-3 β glucanes	PBS / lait 1 % / Tw 0,05 %	1/2	Meikle et al., 1991
Protéines				
MtPPRD	?	PBS / lait 1 % / Tw 0,05 %	100e	Bouton et al., 2005
Réactif de Yariv	o	NaCl 0,15 M	2 mg/mL	Yariv et al., 1967
LM2	GlcA liés en β	PBS / lait 1 % / Tw 0,05 %	10e	Smallwood et al., 1996 ; Yates et al., 1996
LM1	?	PBS / lait 1 % / Tw 0,05 %	10e	Smallwood et al., 1995

Tableau 2.1 : Récapitulatif des marquages réalisés sur les coupes d'axes embryonnaires de *Medicago truncatula*. GlcA : acide galacturonique ; Tw : tween20. Pour les anticorps reconnaissant les rhamnogalacturonanes, MtPPRD et LM1, l'épitope n'est pas connu.

Pour le marquage avec le 2F4, une partie des échantillons a été préalablement traitée avec 50 μ L de NaOH N/20 pH 12.5 durant 30 minutes à 4°C en chambre humide. Avant l'étape de saturation, les échantillons ont été rincés 6 fois 5 minutes à l'eau distillée. Ce traitement avait pour but de desestérifier les homogalacturonanes. L'anticorps 2F4 reconnaissant les zones d'homogalacturonanes non estérifiées, le traitement à la soude représente un témoin : la différence de marquage entre les deux essais (désesterifié ou non) permet d'évaluer la quantité d'estérification (méthylations et acétylations) des homogalacturonanes.

Pour le marquage avec LM6, une partie des échantillons a été préalablement traitée à l'arabinofuranosidase. Cette enzyme dégrade les résidus d'arabinofuranose constituant les ramifications des RGI. Dans le cas d'une absence de marquage avec l'anticorps LM6, le débranchement des pectines par l'action de l'arabinofuranosidase permet d'augmenter le marquage. En effet, l'anticorps reconnaît spécifiquement une séquence de 6 résidus consécutifs linéaires. Cet épitope peut être absent lorsque les arabinanes sont très branchés. L'arabinofuranosidase (Megazyme) a été diluée à 2U/mL dans du tampon acétate 0.05 M pH 4.5. Les coupes ont été incubées durant 2 h à 37°C en chambre humide. Elles ont ensuite été rincées 3 fois 5 minutes dans le tampon acétate puis 6 fois 5 minutes dans l'eau distillée.

Pour le marquage avec LM15, une partie des échantillons a été traitée à la pectine méthylesterase (PME) et à l'endopolygalacturonase (endoPG). Le but de ce traitement est de dégrader les composés pectiques qui masquent les xyloglucanes (Marcus et al., 2008) afin d'accéder plus facilement au site de reconnaissance de l'anticorps. La PME (1 mg/L) a été dialysée durant 20 h à 4°C dans un tampon phosphate 50 mM pH4 et l'endoPG (250 nKat) a été diluée au 20^{ième}. Les coupes ont été incubées pendant 2 h à 37°C en chambre humide avec le mélange d'enzyme v:v 1:1. Elles ont ensuite été rincées 3 fois 5 minutes dans le tampon phosphate puis 6 fois 5 minutes dans l'eau distillée.

Les témoins correspondaient à l'absence d'anticorps primaire. Les échantillons témoins ont été immergés dans le tampon de dilution et ont subi les autres étapes de la même façon que les échantillons marqués. La qualité de l'anticorps a été vérifiée en parallèle sur des échantillons connus.

2.9.2.2-Marquage colorés et fluorescents

Pour le marquage de la cellulose, la coupe a été submergée durant 5 minutes avec 50 μ L de solution de calcofluor à 0.01% en solution dans l'eau. La solution a été aspirée et l'échantillon a été rincé 2 fois 2 minutes à l'eau distillée puis séché à l'air libre. Les arabinogalactanes protéines (AGP) ont été précipitées au réactif de Yariv. Deux milligrammes de poudre commerciale ont été dispersés dans 1 mL de NaCl à 0.15 M, et 50 μ L de solution ont été utilisés pour immerger chaque échantillon durant 1 heure à température ambiante et en chambre humide. Les témoins correspondaient à l'absence de traitement, les échantillons étant observés tels quels.

2.9.2.3-Observation des coupes

Les échantillons ont été montés entre lame et lamelle dans de l'eau distillée puis observés au microscope photonique à fluorescence (LEICA DMDR) équipé d'une caméra Nikon DS-IKM et d'une platine motorisée Marzhauser en X-Y gérées par le logiciel NIS (Nikon). Les coupes marquées avec le réactif de Yariv ont été observées à la lumière blanche. Pour l'observation des coupes marquées à l'Alexa fluor 488, la lumière d'excitation du fluorochrome a été sélectionnée par un filtre à bande passante BP 450-490 nm. L'émission a été récupérée par un filtre long pass LP > 515 nm. Pour les coupes marquées au calcofluor, l'excitation a été réalisée dans l'UV (BP 340-380 nm) et l'émission a été récupérée par un filtre long pass LP > 425 nm. Pour chaque marquage, le temps d'acquisition des images a été ajusté en fonction de l'échantillon (5, 15 ou 21 h) présentant le signal le plus important, à la limite de la saturation, ce qui permet d'évaluer la différence de marquage entre les différents traitements.

3-Résultats

3.1-Composition en oses pariétaux

L'évolution de la composition des parois des cellules de l'axe embryonnaire de *Medicago truncatula* a été évaluée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) après hydrolyse acide à trois stades de développement : 5, 15 et 21 heures après imbibition de la graine. La masse insoluble à l'alcool (MIA), qui représente les polysaccharides pariétaux et autres composants cellulaires insolubles dans l'alcool, a été extraite à partir de la matière sèche lyophilisée. L'hydrolyse à l'acide sulfurique a été précédée d'un traitement permettant la dégradation de la cellulose. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 2.1. Pour chaque stade, la masse insoluble à l'alcool représentait la majeure partie (environ 60%) de la matière sèche, cette proportion n'évoluant pas entre 5 et 21 heures après imbibition (données non présentées).

Le poids total des oses pariétaux représente une faible proportion de la masse insoluble à l'alcool (fig 2.1a). Cette valeur évolue très peu entre 5 h et 15 h après imbibition (de 15 à 16%) mais augmente légèrement après 21h (23%).

Parmi les oses quantifiés, la répartition de certains composés ne change presque pas (fig 2.1b). Ceci concerne le xylose (~ 8%), le rhamnose (~ 2%) et le fucose (<0.5%). La teneur en acide galacturonique n'évolue pas non plus au cours du temps mais est plus importante, de l'ordre de 15%. La teneur en galactose augmente (5 à 9%). La forte déviation standard observée à 21h pour le dosage du mannose ne permet pas d'interpréter la modification. Les oses majoritaires sont le glucose et l'arabinose. La teneur de glucose augmente de 29 à 36% au cours du temps alors que celle de l'arabinose tend à diminuer (34 à 23%).

Le traitement à l'acide tri-fluoroacétique (TFA) dégrade tous les polymères pariétaux à l'exception de la cellulose. La teneur en résidus glucose ne tient alors pas compte du glucose cellulosique. En revanche, l'hydrolyse à l'acide sulfurique précédée d'une pré-hydrolyse à l'acide sulfurique concentré permet de rendre accessible la cellulose à la dégradation. Dans ce cas, la teneur en résidus glucose intègre le glucose cellulosique. La différence observée entre les deux traitements renseigne sur la proportion spécifique de la cellulose. Dans les axes embryonnaires de *Medicago truncatula*, par rapport aux oses totaux, la proportion de glucose cellulosique diminue au profit de glucose non cellulosique (tableau 1.1).

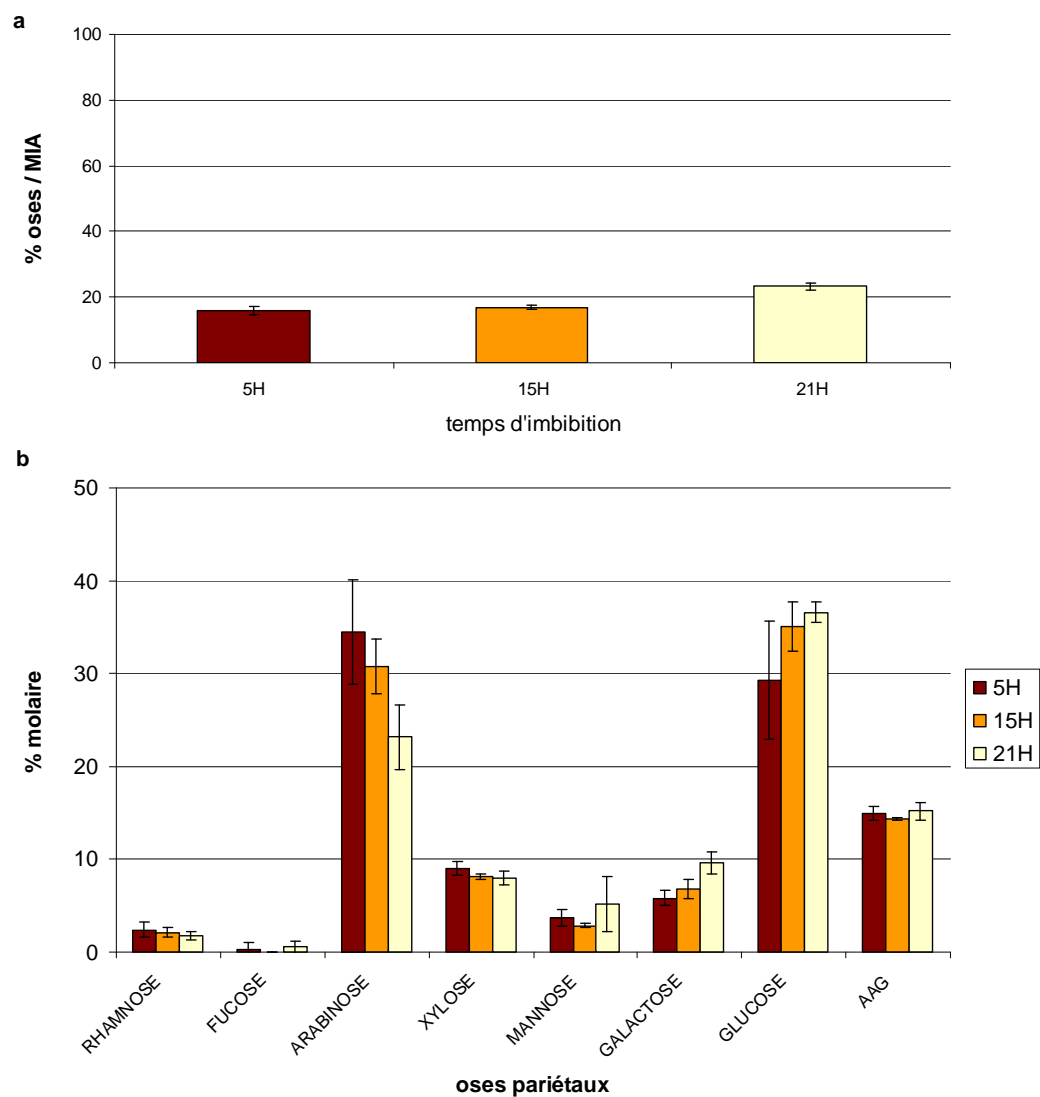


Figure 2.1 : Evolution de la composition de la paroi en fonction du stade de développement. (a) Evolution du pourcentage en poids d'oses pariétaux dans la MIA. (b) Evolution de la répartition des oses pariétaux en pourcentage molaire. Les résultats correspondent aux dosages effectués après hydrolyse à l'acide sulfurique avec pré-hydrolyse. MIA : masse insoluble à l'alcool ; AAG : acide galacturonique. Déviation standard : n = 4

	glucose total	glucose cellulosique	glucose non cellulosique
5 h	29%	18%	11%
15 h	35%	13%	22%
21 h	37%	11%	26%

Tableau 2.2 : Origine et évolution de la teneur en glucose des parois. Les données sont exprimées en pourcentage molaire par rapport aux oses totaux de la MIA.

3.2-Degré de substitution des pectines

Les degrés de substitution des pectines correspondent au rapport molaire en pourcentage entre les masses d'acides uronique et de méthanol, d'une part (degré de méthylation) et d'acide acétique, d'autre part (degré d'acétylation) libéré de la MIA par saponification. Ils ont été mesurés pour chaque stade d'imbibition des graines. Les degrés de substitution augmentent avec le temps mais certains sont supérieurs à 100% (données non présentées). Ceci est aberrant si l'on considère que seules les pectines sont substituées. Ces résultats signifient que d'autres composants de la MIA sont estérifiés.

3.3-Dosages enzymatiques

La MIA a été soumise à un traitement enzymatique qui dégrade les composants pectiques. L'hydrolysat a été analysé par chromatographie échangeuse d'anion haute performance (HPAEC). Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 2.2. Une quantité importante d'arabinose a été libérée des pectines. Elle est plutôt stable au cours de la germination. Les quantités de galactose et de galactobiose augmentent au cours du temps alors que l'acide galacturonique reste stable. L'arabinose, le galactose et le galactobiose correspondent aux chaînes d'arabinanes, de galactanes et d'arabinogalactanes qui sont greffées sur le RGI. Le squelette d'acide galacturonique évoluant peu, les modifications observées des pectines se font donc essentiellement au niveau des ramifications de galactanes.

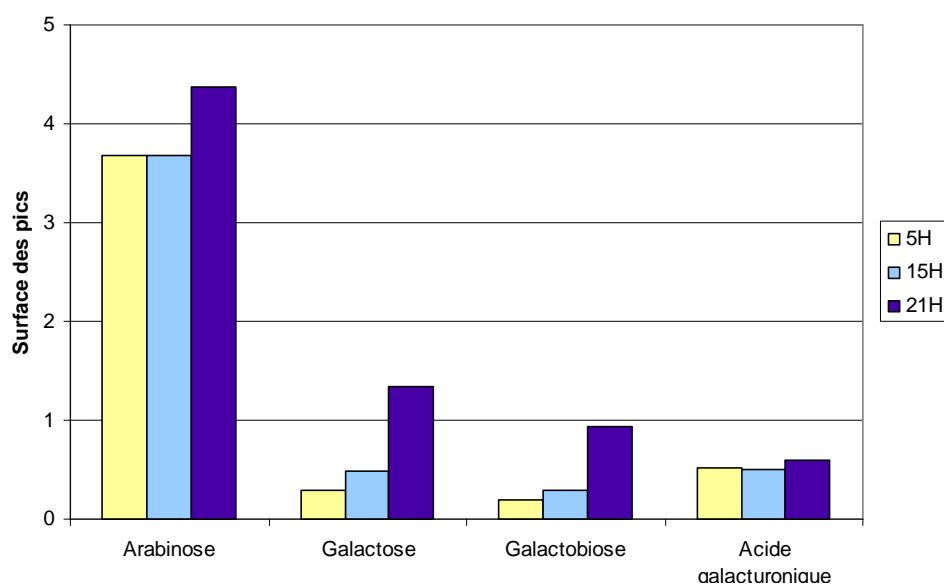


Figure 2.2 : Evolution des composants libérés de la dégradation enzymatique des pectines. Les abscisses correspondent à la surface des pics observés en HPAEC.

3.4-Empreintes enzymatiques

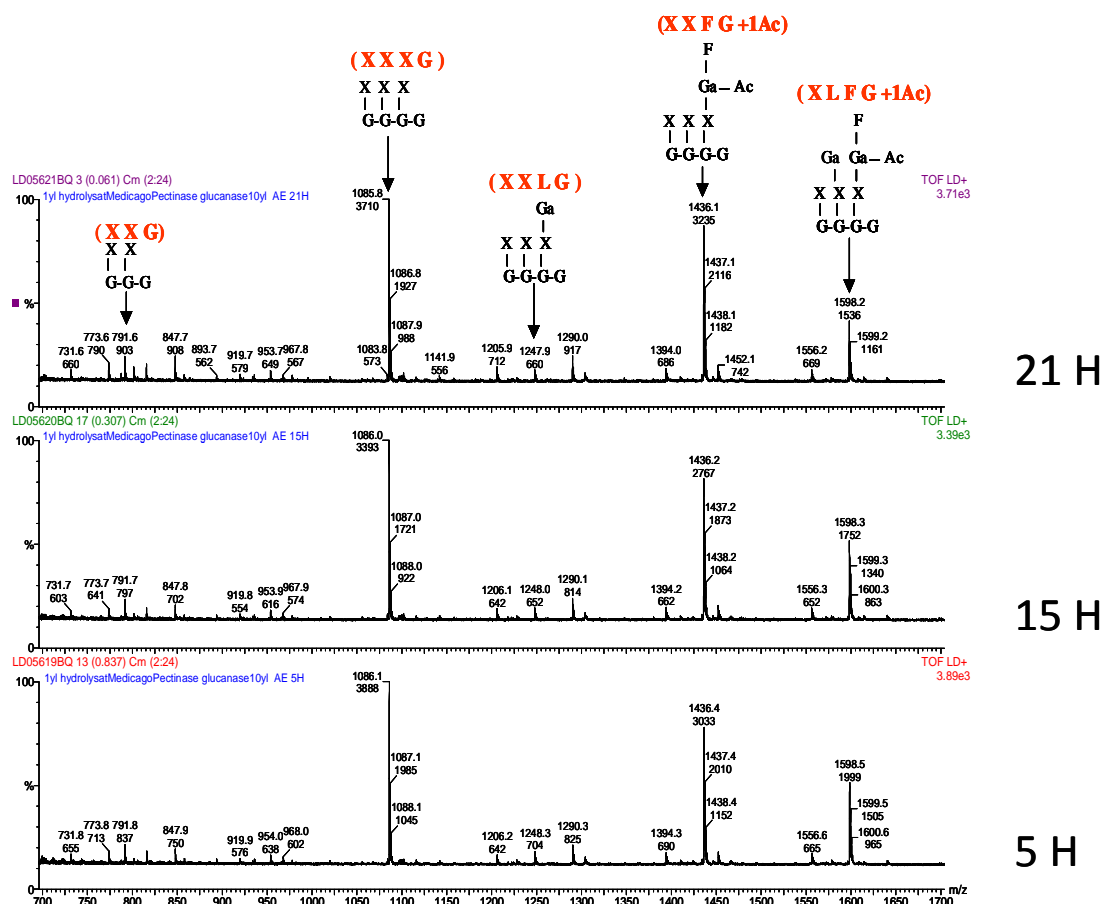


Figure 2.3 : Spectre MALDI-TOF de la dégradation enzymatique de la MIA. Les annotations en rouge correspondent aux noms des motifs. Les annotations en noir en dessous correspondent à la structure des motifs. Ac : acétylation, F : fucose, G : glucose, Ga : galactose, X : xylose.

La MIA a subi une dégradation libérant des motifs de xyloglucanes caractéristiques. Les hydrolysats ont été analysés par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Cette analyse permet de mettre en évidence les différents motifs de xyloglucanes présents dans les parois selon le stade de développement. L'analyse ANOVA réalisée sur les pourcentages des pics permet d'évaluer s'il existe, entre les stades, une représentation significativement différente des motifs. L'analyse montre que les xyloglucanes sont très peu modifiés au cours de la germination. Tous les motifs présents au stade 5 h le sont également à 15 et 21 h, et il n'apparaît pas de nouveau motif. A l'exception de XLFG+1Ac, tous les motifs ont une représentation stable au cours du temps. Le motif XLFG+1Ac correspond à un squelette de 4 résidus glucose dont trois sont substitués par du xylose. Deux de ces résidus xylose sont eux-mêmes substitués par du galactose. Enfin, un de ces résidus galactose porte une substitution par le fucose et est acétylé (fig 2.3). Ce motif est statistiquement moins représenté au stade 21h par rapport aux stades 5 et 15h.

3.5-Spectres RMN

La MIA a été analysée par la technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) du ^{13}C . Les spectres obtenus sont présentés sur la figure 2.4.

La série de signaux entre 20 et 40 ppm correspond à des carbones issus de protéines et aux alkyles mobiles provenant des membranes qui n'ont pas été éliminées (fig 2.4a). La MIA est très riche en composés protéiques, expliquant la faible teneur en poids d'oses totaux observée dans les dosages par CPG (fig 2.1a). Les signaux observés pourraient correspondre à différents types d'arabinoses, selon les données de la littérature. Le premier pourrait être un résidu (désigné par E sur la figure 2.4b) lié en α -1,3 sur une chaîne de β -1,2-arabinane elle-même attachée à une hydroxyproline provenant d'une extensine (Akiyama et al., 1980). Le second (désigné par t) correspondrait à un arabinofuranoside terminal sur des pectines ou des AGPs (Cartier et al., 1987; Saulnier et al., 1988). Enfin, un troisième pourrait correspondre avec les signaux des carbones de l'arabinose lié en α -1,5 (désignés par P) (Rondeau-Mouro et al., 2003). Les signaux obtenus pour des ose constituant probablement des β -1,4-galactanes (Rondeau-Mouro et al., 2003), sont également observés (fig 2.4b). L'aspect du spectre change avec le stade de développement : les polymères pariétaux sont modifiés au niveau des zones libres, c'est-à-dire en particulier les branchements des pectines.

3.6-Microscopie

Afin de visualiser et confirmer les précédents résultats obtenus, des coupes longitudinales d'axes embryonnaires de *Medicago truncatula* ont été effectuées. Les coupes ont été visualisées avant les marquages ce qui a permis de détecter une hétérogénéité dans les échantillons. Les coupes effectuées sur le stade 5h présentaient un aspect très plissé associé à une difficulté d'étalement sur l'eau. Ce phénomène semblait lié à une hydratation plus faible des tissus par rapport aux autres stades. Il était également observé au stade 15h mais uniquement au niveau de la zone de plus faible croissance. La partie de l'axe embryonnaire s'étant déjà allongée présentait une hydratation satisfaisante ainsi que les coupes effectuées au stade 21h. Au niveau des tissus, les faisceaux de cellules préalablement décrits (voir l'article dans le chapitre 1) ont également été observés (voir figures 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 et 2.9)

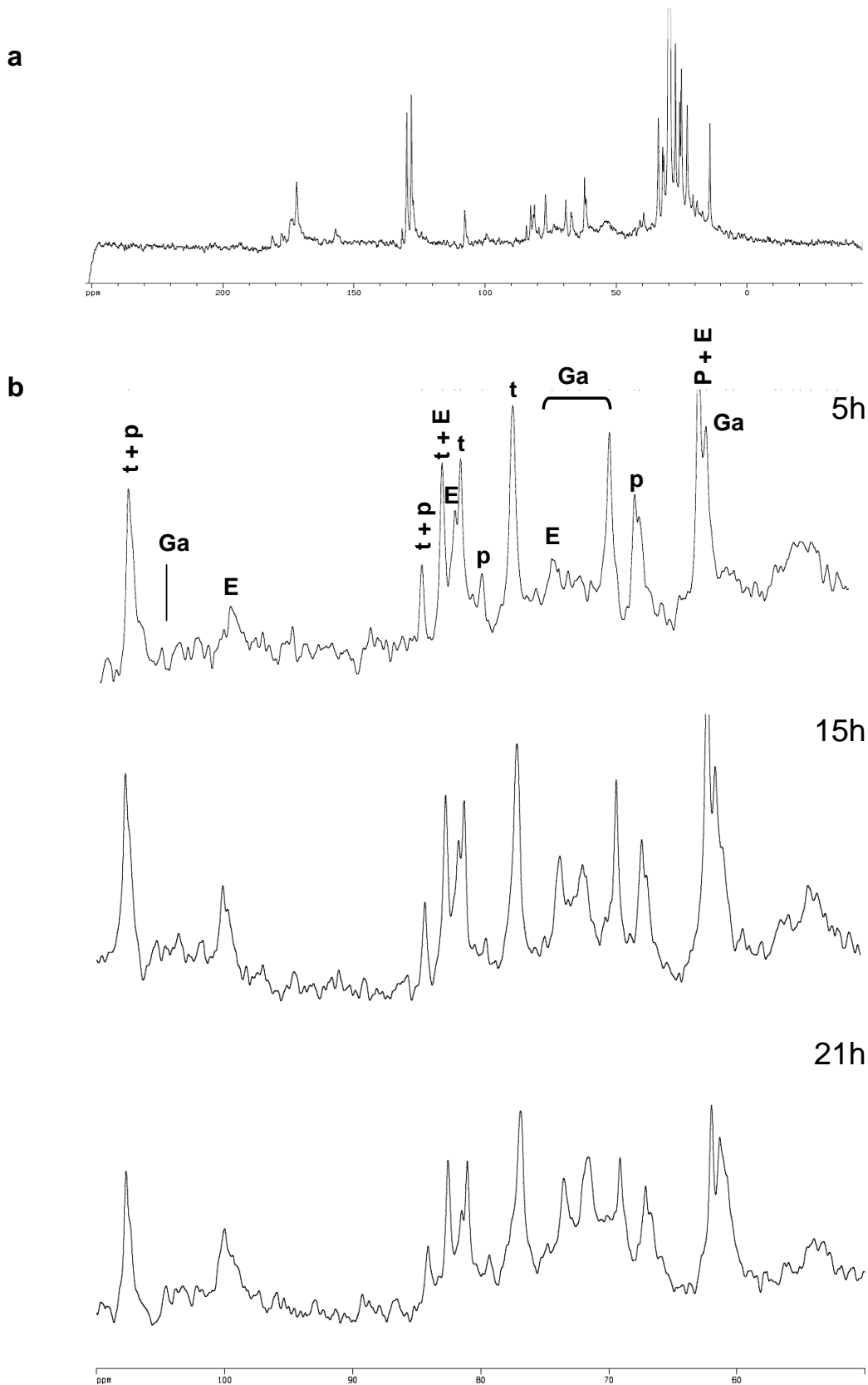


Figure 2.4 : Spectres du ^{13}C de la MIA des axes embryonnaires de Medicago. A : Spectre complet au stade 5h. B : Spectre correspondant aux oses pariétaux aux stades 5, 15 et 21 heures après imbibition des graines. t : signal attribué au résidu arabinose terminal de pectine ou d'AGP. p : signal attribué aux résidus arabinose pectiques liés en α -1,5, E : signal attribué au résidu arabinose terminal d'extensine, Ga : signal attribué aux β -1,4-galactanes. (Akiyama et al., 1980 Cartier et al., 1987; Rondeau-Mouro et al., 2003, Saulnier et al., 1988.)

3.6.1-Cellulose

La cellulose est un polymère constitué uniquement de résidus glucose liés en β -1,4. La répartition de la cellulose et les modifications éventuelles de cette répartition au cours du temps ont été évaluées par coloration des coupes au calcofluor. Les images obtenues sont représentées sur la figure 2.5. Le marquage est observé à tous les stades de développement. Il est le plus faible à 5h d'imbibition et le plus intense à 21h. Sa répartition est hétérogène et dessine une structure en fuseau préalablement décrite. Les parois cellulaires transversales (par rapport à l'axe de l'allongement) ne sont pas marquées au calcofluor, contrairement aux parois longitudinales. Néanmoins, au niveau de l'extrémité des fuseaux, l'intensité de marquage est comparable à celle des parois longitudinales. L'ensemble des parois n'est pas marqué, le dépôt de cellulose se concentre sur la façade interne des parois par rapport aux cellules et apparaît épaissi à plusieurs endroits de la coupe.

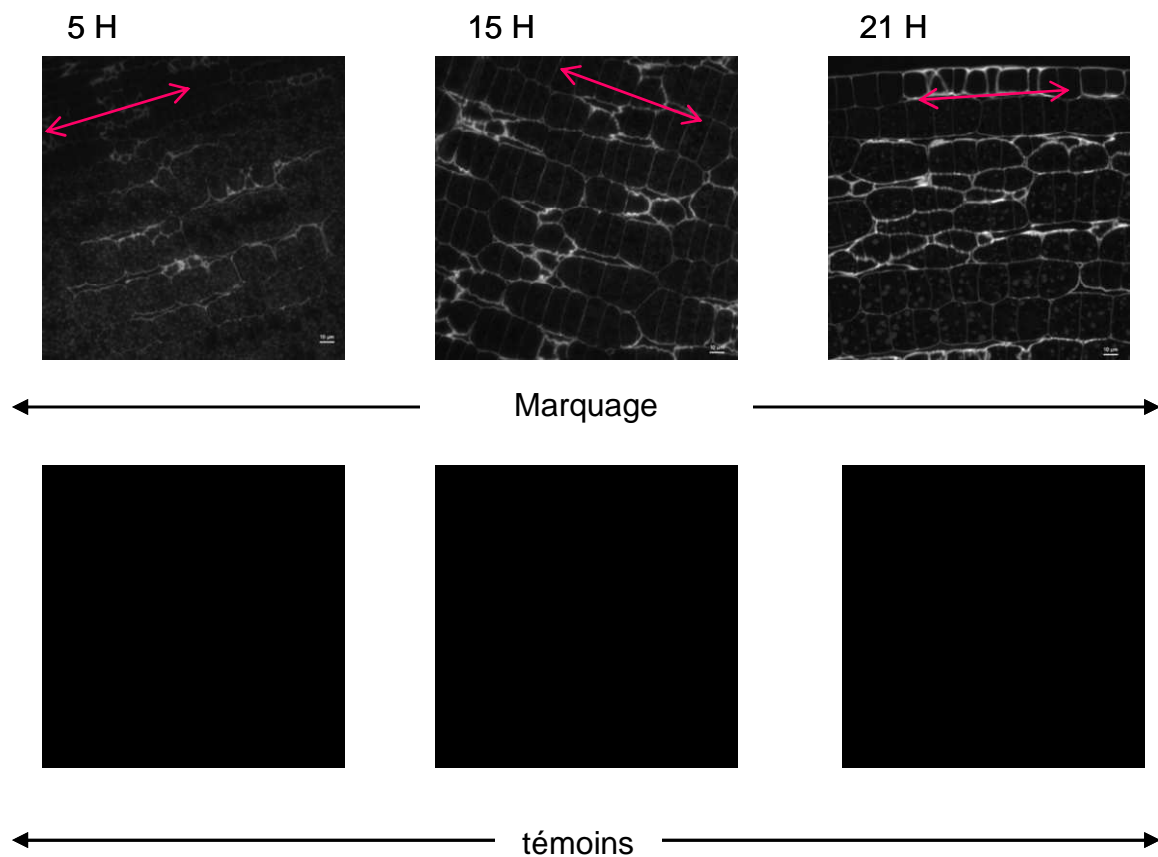


Figure 2.5 : Marquage des parois des cellules d'axes embryonnaires au calcofluor à 5h, 15h et 21h d'imbibition des graines. La flèche indique la direction de la croissance de l'axe embryonnaire. L'échelle présentée correspond à 10 μ m.

3.6.2-Callose

La callose est un polymère constitué de résidus glucose liés en β -1,3. Pour évaluer sa répartition dans les parois et son évolution, les coupes ont été marquées par un anticorps spécifique de la callose (fig 2.6) (Meikle et al., 1991). Le marquage est totalement absent des coupes à 5h et 15h après imbibition mais est présent sur l'échantillon à 21 heures. Le marquage est discontinu, hétérogène et ne concerne que certaines parois longitudinales et aucune paroi transversale. Comme pour le marquage au calcolfluor, les structures en fuseaux sont distinguables mais de manière beaucoup plus discrète. Le marquage concerne l'ensemble de l'épaisseur de la paroi.

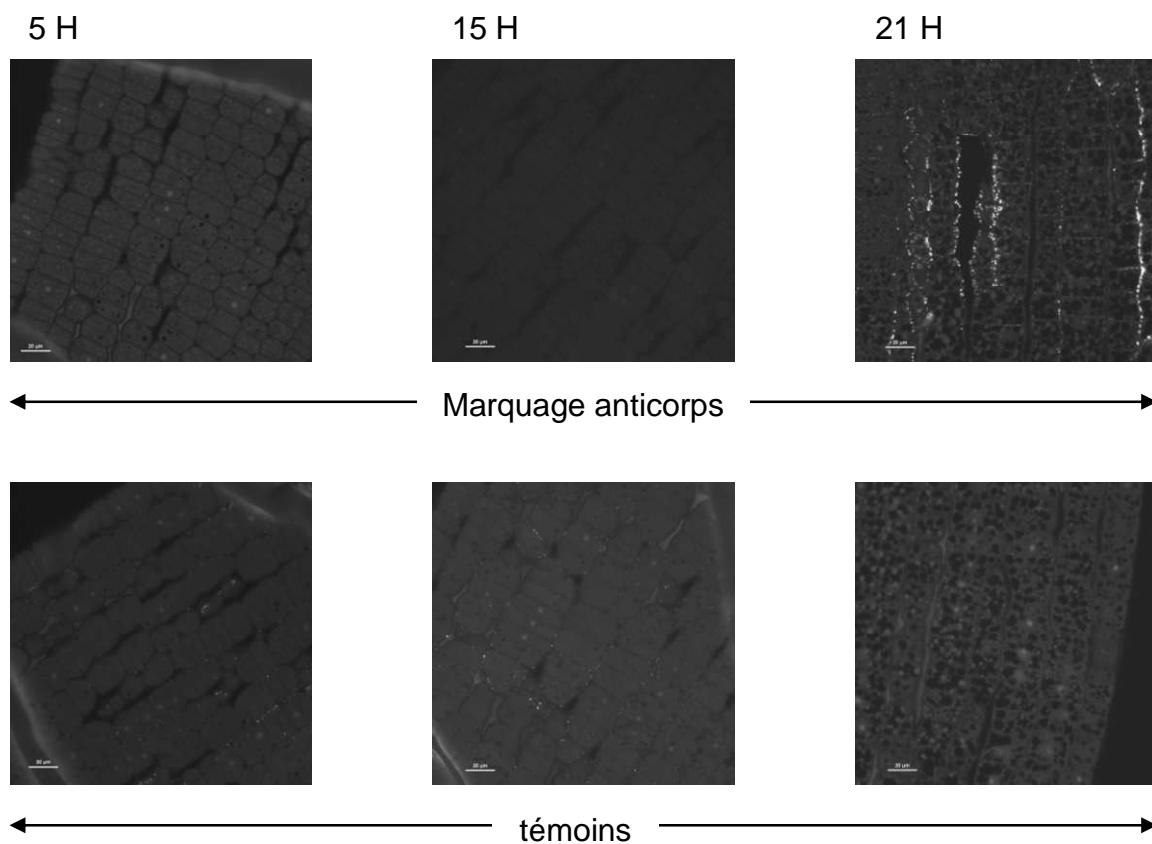


Figure 2.6 : Marquage des parois des cellules avec un anticorps spécifique de la callose à 5h, 15h, 21h d'imbibition des graines. Les témoins correspondent à l'absence d'hybridation avec l'anticorps primaire. L'échelle présentée correspond à 20 μ m.

3.6.3-Composés pectiques

Parmi les composés pectiques, les homogalacturonanes (HG), les rhamnogalacturonanes (RG) et les galactanes (Ga) ont été marqués afin d'observer d'éventuelles modifications de ces composés dans les parois.

Les HG ont été marqués avec l'anticorps 2F4 qui reconnaît spécifiquement les chaînes non estérifiées (Liners et al., 1989; Liners et al., 1992). Une partie des échantillons ont été traités à la soude afin de desestérifier les pectines avant l'hybridation par l'anticorps primaire. Les résultats sont présentés sur la figure 2.7.

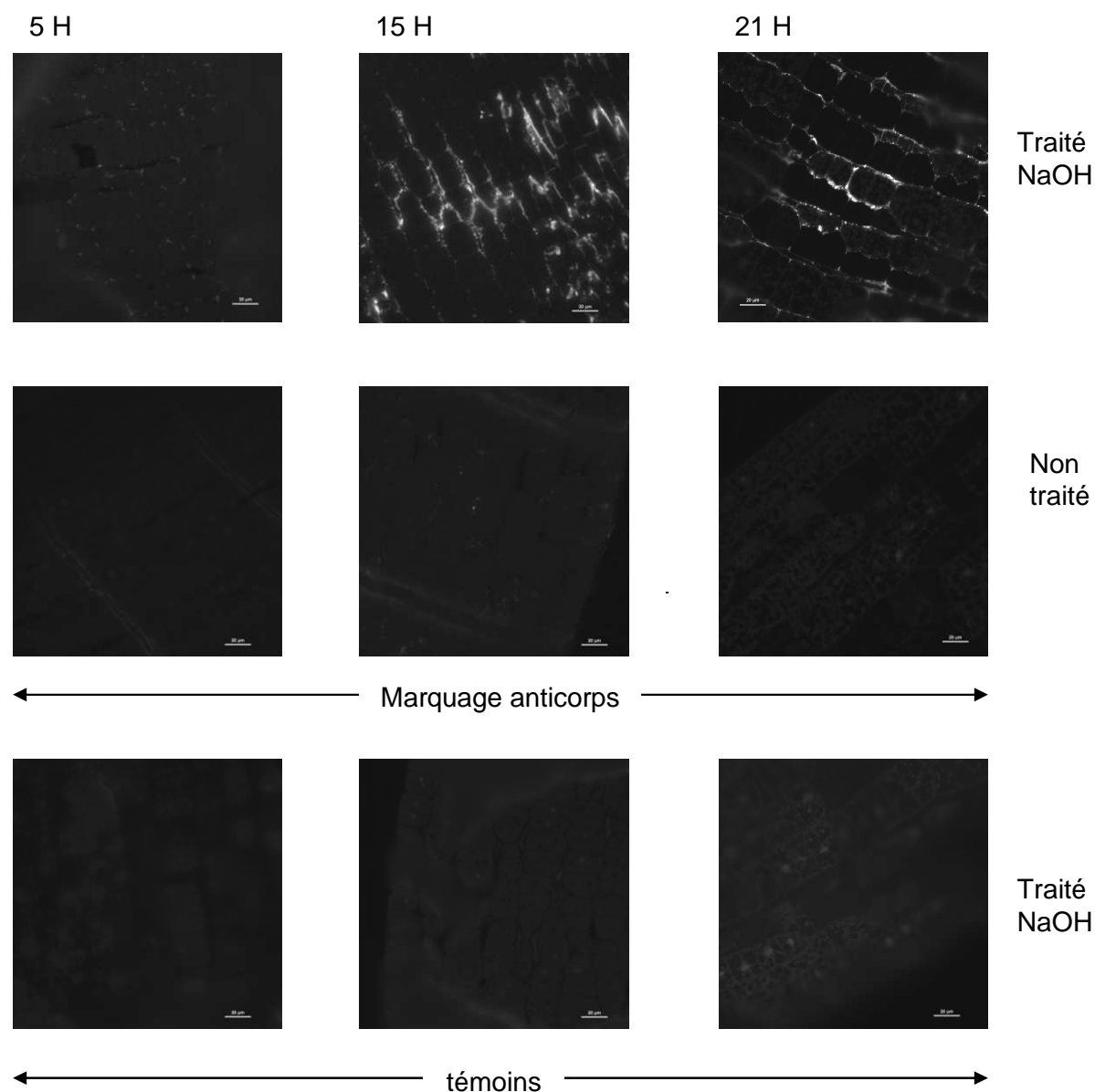


Figure 2.7 : Marquage des parois des cellules avec 2F4, anticorps spécifique des homogalacturonanes non substitués, à 5h, 15h, 21h d'imbibition des graines. Les échantillons ont été traités ou non à la soude NaOH. Les témoins ont subi le traitement et correspondent à l'absence d'hybridation avec l'anticorps primaire. L'échelle présentée correspond à 20 µm.

En l'absence de desestérification, le marquage n'est pas visible sur les coupes, ce qui suggère que les pectines sont très substituées. A seulement 5 heures après imbibition, le traitement à la soude ne suffit pas pour permettre l'hybridation des anticorps.

Le marquage des HG avec l'anticorps 2F4 concerne principalement les parois longitudinales. Il est aussi particulièrement intense au niveau de l'extrémité des fuseaux mais absent des parois des cellules transversales.

Les galactanes, ramifications des RG, ont été hybridées avec l'anticorps LM5 (Jones et al., 1997). Les images obtenues sont présentées sur la figure 2.8.

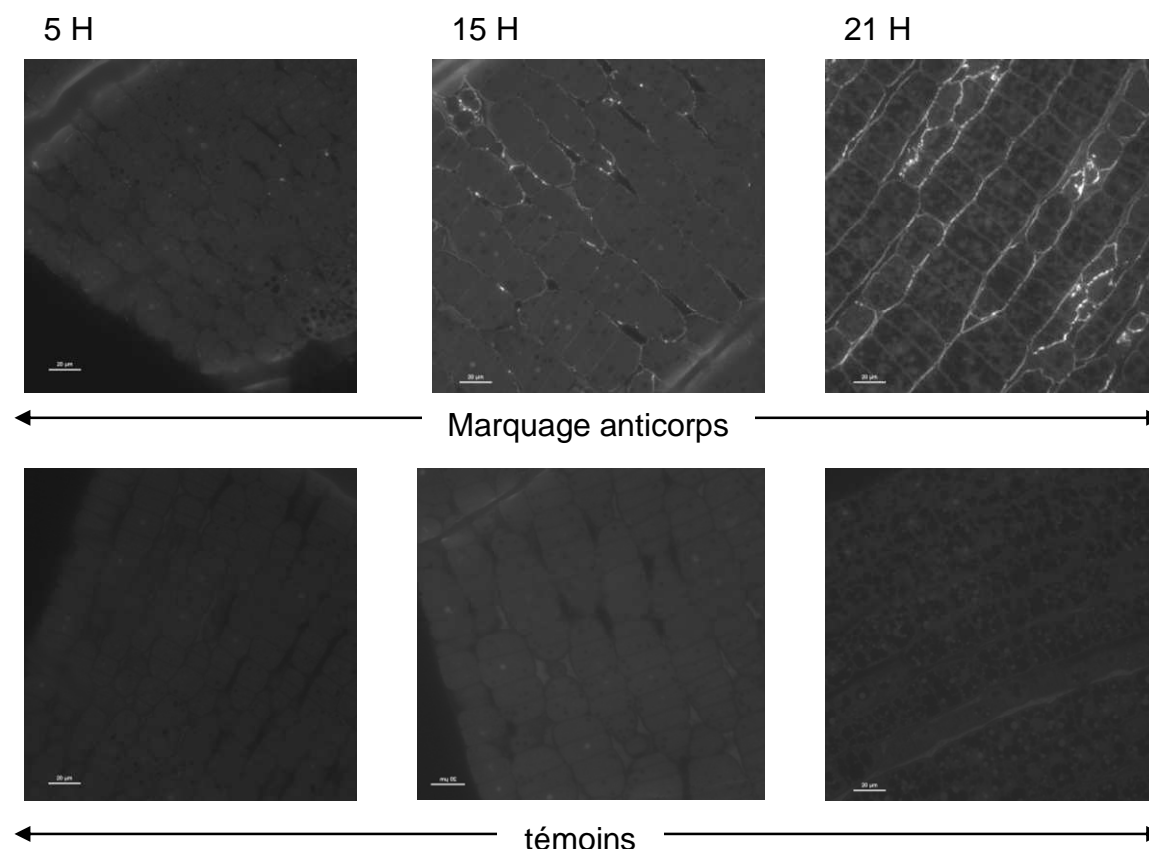


Figure 2.8 : Marquage des parois des cellules avec LM5, un anticorps spécifique des galactanes, à 5h, 15h, 21h d'imbibition des graines. Les témoins correspondent à l'absence d'hybridation avec l'anticorps primaire. L'échelle présentée correspond à 20 µm.

Avec l'anticorps LM5, le marquage n'est pas visible après 5 heures d'imbibition des graines. Il apparaît après 15 heures et est plus important après 21 heures. Comme les précédents marquages présentés, il ne concerne que les parois longitudinales et dessine les fuseaux de cellules. Comme pour la cellulose, sa répartition se fait plutôt sur la face interne de la paroi.

Un anticorps spécifique des RGs, produit au laboratoire Biopolymères Interactions et Assemblage (BIA) à l'INRA de Nantes, a également été utilisé afin de marquer ces composants pariétaux. Aucune fluorescence n'a pu être observée. Les décorations d'arabinanes des RGs et des AGPs ont été marquées avec l'anticorps LM6 (Willats et al., 1998). Certains échantillons ont été préalablement traités à l'arabinofuranosidase afin de

débrancher les pectines pour permettre à l'anticorps d'accéder à son épitope. Dans aucun des cas une fluorescence n'a été observée.

3.6.4-Hémicelluloses

Le marquage des hémicellulose, et plus spécifiquement du motif XXXG des xyloglucanes, a été réalisé avec l'anticorps LM15 (Marcus et al., 2008). Au préalable, certains échantillons avaient été traités à la pectine méthylesterase (PME) et à l'endopolygalacturonase (endoPG). Ce traitement avait pour but de dégrader les pectines afin d'augmenter l'accessibilité des sites de fixation de l'anticorps. Les images sont présentées sur la figure 2.9.

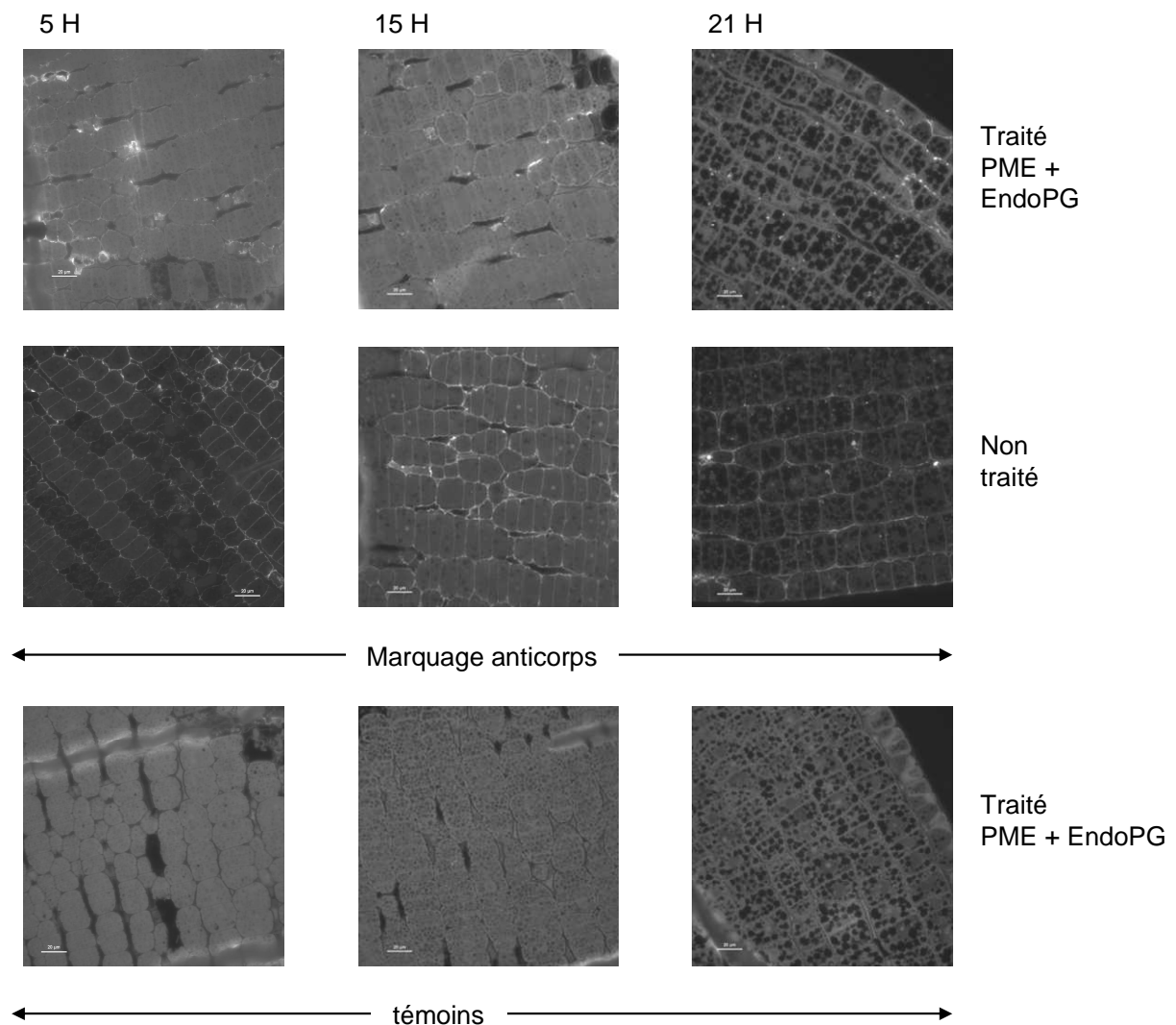


Figure 2.9 : Marquage des parois des cellules avec LM15, anticorps spécifique des xyloglucanes à 5h, 15h, 21h d'imbibition des graines. Les échantillons ont été traités ou non à la PME et endoPG. Les témoins ont subi le traitement et correspondent à l'absence d'hybridation avec l'anticorps primaire. L'échelle présentée correspond à 20 µm. PME : pectine méthylesterase ; endoPG : endopolygalacturonase

La qualité du marquage est meilleure dans le cas où les coupes n'ont pas subi de traitement enzymatique. Le marquage est observable à tous les stades et il n'y a pas de différence nette entre les différents échantillons. Contrairement aux autres marquages, il concerne toutes les parois, c'est-à-dire aussi bien les parois longitudinales que les parois transversales.

3.6.5-Protéines pariétales

Les extensines et les arabinogalactane protéines (AGPs) ont été marquées avec les anticorps LM1 et LM2 respectivement (Smallwood et al., 1995; Smallwood et al., 1996; Yates et al., 1996). La protéine MtPPRD de *Medicago* (Bouton et al., 2005) a été marquée avec un anticorps spécifique. Les coupes ont également été traitées avec le réactif de Yariv afin de précipiter les AGP (Yariv et al., 1967). Aucun marquage ni coloration n'a pu être observé avec ces méthodes.

3.6.6-Tests de germination

Les résultats des marquages des AGPs et des extensines n'ayant pas été concluants, nous avons testé l'effet de deux inhibiteurs potentiels du fonctionnement de ces glycoprotéines. La 3,4-déhydro-D,L-proline est un inhibiteur de l'hydroxylation de la proline dans les protéines et altère la formation des HRGP (Cooper and Varner, 1983). Ajouté à la solution de culture de protoplastes de tabac, il empêche la formation de parois normales (Cooper et al., 1994). Les graines de *Medicago* ont été imbibées avec une solution de 3,4-déhydro-D,L-proline à la concentration de 50 μ M (Cooper et al., 1994) et 1 mM. Aucun effet n'a été observé sur la germination et la croissance des racines. Le réactif de Yariv est un phényl glycoside qui interagit spécifiquement avec les AGPs (Yariv et al., 1967). Les graines de *Medicago* imbibées dans une solution de réactif de Yariv à 30 μ M. Elles n'ont présenté aucune altération de croissance par rapport au témoin et le développement des racines avait atteint 25 mm à la fin de l'expérimentation.

4-Discussion

Les résultats qui ont été obtenus apportent des éléments nouveaux sur la structure et l'évolution des parois des cellules de l'axe embryonnaire de *Medicago truncatula* en croissance. Ils correspondent aux caractéristiques et modifications qui sont en relation avec la germination.

Des analyses physico-chimiques et enzymatiques ont été effectuées sur la masse insoluble à l'alcool (MIA) extraite à partir de la matière sèche lyophilisée. Dans les axes embryonnaires de *Medicago*, la MIA représente la majeure partie de la matière sèche. Les polysaccharides pariétaux ne représentent qu'une faible proportion (15% à 21%) de la MIA. En comparaison, la MIA de micro-cals d'*Arabidopsis* contient elle aussi une proportion peu importante (30%) de polysaccharides (Leboeuf et al., 2004; Leboeuf et al., 2005). En revanche, la MIA extraite de péricarpe de tomate contient environ 70% de sucres totaux (Guillon et al., 2008). La MIA présente une richesse très importante en protéines qui représentent probablement la majeure partie. Les spectres RMN montrent effectivement des signaux importants dans la zone 20-40 ppm qui correspond notamment aux protéines. Ces protéines proviennent des corps protéiques situés dans le cytoplasme des cellules de l'axe qui sont visibles en microscopie. Ces corps protéiques correspondent à un stockage local de protéines de réserve énergétique. En effet, les réserves protéiques sont principalement localisées dans les cotylédons mais une partie est stockée dans l'axe embryonnaire. Cette partie est utilisée pour la croissance de l'axe avant la mobilisation des réserves cotylédonaires (Tiedemann et al., 2000). L'utilisation des protéines des corps cytoplasmiques pour le métabolisme explique en partie la progression des oses pariétaux dans la MIA. La synthèse de nouveaux polymères pariétaux par la cellule explique également cette progression.

4.1-La germination est corrélée à un dépôt de callose

Le dosage des constituants pariétaux a montré que les parois des cellules présentent une richesse importante en arabinose et glucose. Ces deux oses sont largement majoritaires et représentent à eux seuls environ 60% des oses pariétaux.

La quantité de glucose libéré par hydrolyse acide augmente au cours du temps et la source la plus évidente de glucose est la cellulose. Cependant, l'origine cellulosique tend à diminuer au cours du temps au profit d'une autre origine (tableau 2.2). Cette diminution ne semble néanmoins pas liée à une dégradation car l'intensité de marquage des coupes au

calcofluor augmente avec le stade de développement. Il faut également noter qu'une cellulose synthase est surexprimée au cours de la germination (cf chapitre 1). Ceci indique que la synthèse de cellulose est active durant les étapes précoces de la germination mais que l'activité de synthèse d'une autre source de glucose l'est également. L'amidon étant absent des axes embryonnaires, la callose correspond probablement à cette origine alternative. Le marquage de la callose avec un anticorps spécifique a montré que le marquage fluorescent apparaissait au stade 21h après imbibition des graines. L'évènement de germination est donc corrélé avec la synthèse de callose.

La callose est un polymère de glucose lié en β -1,3. Elle représente une caractéristique primaire dans le sens où elle est le premier polysaccharide formé lors de la cytokinèse, qui sert de support au dépôt des autres polysaccharides. Elle est secrétée rapidement en réponse à l'attaque de pathogènes ou en cas de blessure. La callose est surtout considérée comme imperméabilisant et colmatant. Dans le tube pollinique en croissance, la callose forme des bouchons qui segmentent le tube ; elle est également présente dans les parois longitudinales. Son rôle mécanique a été étudié chez *Lilium orientalis* et *Solanum chacoense* (Parre and Geitmann, 2005). Les résultats obtenus montrent que c'est le dépôt de callose qui supporte les forces exercées sur la paroi du tube pollinique par la pression de turgescence interne. La callose limite le gonflement radial et permet à la pression de s'exercer sur le dôme du tube pollinique, seule partie subissant l'extension cellulaire (Derkesen, 1996; Geitmann and Cresti, 1998; Hepler et al., 2001). Des résultats similaires ont été obtenus avec des mutants d'*Arabidopsis thaliana* pour une enzyme de callose synthase. Bien que sa croissance ne soit pas affectée, le volume cytoplasmique du tube pollinique chez le mutant est vingt fois plus important en absence de callose ; ceci est un désavantage durant les dernières étapes de la croissance (Nishikawa et al., 2005). Dans les coupes d'axes embryonnaires de *Medicago truncatula*, la callose n'est observable que sur les parois longitudinales des cellules. Contrairement aux autres polymères, elle n'est pas présente à l'extrémité des structures en fuseaux. A l'instar de son rôle dans la croissance des tubes polliniques, le dépôt de callose dans les parois situées dans l'axe de croissance pourrait jouer un rôle de renfort, canalisant la pression de turgescence vers les extrémités afin de diriger l'expansion. La fluorescence obtenue par immunomarquage n'étant pas de très bonne qualité, un marquage au bleu d'aniline pourrait être envisagé afin de mieux observer la répartition du dépôt de callose. Au cours de la germination chez *Medicago*, la transcription d'un gène codant pour une protéine de type β -1,3-glucanase est activée. Ceci semble contradictoire avec les résultats obtenus. Il

est alors possible que le gène soit activé pour remanier ou éliminer la callose après que la germination a eu lieu.

4.2-Modifications des branchements des pectines

La teneur en acide galacturonique, résidu formant le squelette des composés pectiques, est de l'ordre de 15% ce qui est comparable à la proportion observée dans les parois de cellules de péricarpe de tomate (Guillon et al., 2008). Entre les trois stades étudiés, la teneur en acide galacturonique est stable. Ceci indique qu'il n'y a pas de synthèse de pectines corrélée avec l'évènement de germination. Ces résultats ont été confirmés par le marquage des coupes avec l'anticorps 2F4 qui reconnaît spécifiquement une séquence non estérifiée des homogalacturonanes. En l'absence de desestérification à la soude, la fluorescence n'est visible sur aucune des coupes. L'épitope reconnu par 2F4 serait donc absent des parois ce qui suggère que les pectines sont très substituées. Nous avons tenté d'évaluer le degré de substitution par la technique décrite par Levigne et al. (2002). Les résultats obtenus ne sont pas exploitables car les degrés de substitutions sont supérieurs à 100% dans certains cas. La méthode n'est donc pas appropriée à ce type d'échantillon. Dans la MIA, des composants autres que les pectines présentent acétyl- et méthyl-estérifications : il pourrait s'agir des hémicelluloses, acides nucléiques et surtout protéines.

Les rhamnogalacturonanes de type I (RGI) sont substitués par des chaînes d'arabinanes, de galactanes ou d'arabinogalactanes. Dans les échantillons analysés, la proportion de galactose augmente au cours du temps. Ceci a été observé par analyse en CPG après hydrolyse acide mais également après dégradation enzymatique des composés pectiques. Ce résultat a aussi été visualisé en microscopie par marquage des coupes avec LM5, anticorps qui reconnaît une chaîne de 5 résidus consécutifs de D-galactose liés en β -1,4 (Jones et al., 1997). La fluorescence obtenue après marquage des coupes avec l'anticorps LM5 augmente avec le stade de développement. En RMN, les zones correspondant aux atomes de carbone du galactose présentent des modifications avec apparition de pics, ce qui suggère l'augmentation du nombre de ces carbones. L'ensemble des résultats suggèrent que les chaînes latérales des RGI sont enrichies par des résidus galactose. La germination est donc liée à une modification des chaînes latérales des RGI concernées par les résidus galactanes. Dans les racines de plantules de carotte et d'*Arabidopsis*, la modification des ramifications des pectines est corrélée avec la mise en place du processus d'élongation (Willats et al., 1999; McCartney et al., 2003). Chez les plantules d'*Arabidopsis*, le marquage des parois avec

l'anticorps LM5 n'est visible qu'à partir de la zone racinaire située à 300 μm au dessus du méristème et, dans le parenchyme cortical, persiste jusqu'à 900 μm (McCartney et al., 2003). La zone ainsi marquée par la présence de l'épitope de LM5 est une zone dite de transition, où les cellules terminent leur divisions et accélèrent leur expansion (Baluska et al., 1996; Beemster and Baskin, 1998). L'épitope reconnu par LM5 est donc transitoirement représenté avant la phase d'élongation majeure des cellules. La disparition de l'épitope de LM5 est donc corrélée avec l'élongation maximale. Dans les axes embryonnaires de *Medicago truncatula*, l'apparition du marquage est corrélée avec le début de l'élongation. Ces résultats ne sont pas contradictoires car, 21 h après imbibition, les cellules n'ont pas encore atteint leur élongation maximale. Le rôle de ces chaînes dans l'élongation n'est pas connu mais les auteurs suggèrent un lien avec les AGPs (McCartney et al., 2003). Willats et al. (1999) proposent que les chaînes latérales des RGI jouent un rôle dans l'alignement des homogalacturonanes et dans la porosité de la paroi. Selon eux, la présence de ces chaînes contribuerait à moduler l'action d'enzymes de restructuration comme les polygalacturonases, les extensines et les XETs.

4.3-Richesse en arabinose des parois des cellules de l'axe embryonnaire

L'arabinose, second ose majeur dans nos échantillons, correspond à l'autre résidu constituant les ramifications des RGI. Le dosage par CPG après hydrolyse acide montre que la proportion globale d'arabinose tend à diminuer avec la progression de la germination. Cependant, les dosages effectués après hydrolyse enzymatique des pectines indiquent que la teneur en arabinose qui en est issu est stable au cours du temps. Il existe donc une autre source d'arabinose au sein des parois qui est modifiée en relation avec la germination. Afin de visualiser l'arabinose pectique, nous avons tenté de mettre en évidence les α -1,5-arabinanes grâce à l'utilisation de l'anticorps LM6 sur les coupes histologiques. Aucune fluorescence n'a pu être observée. Nous avons supposé que les pectines présentaient peut-être un degré de branchement tel que les sites de fixation de l'anticorps (6 résidus d' α -1,5-arabinane ; (Willats et al., 1998) n'étaient pas accessibles. Afin de débrancher les pectines et permettre le marquage, les coupes ont été traitées à l'arabinofuranosidase mais sans succès. Les dosages chimiques et enzymatiques assurent pourtant de la présence d'arabinanes sur les pectines. Une telle différence d'observation entre les dosages chimiques et les observations microscopiques avait déjà été observée pour la tomate au stade jeune (F. Guillon, communication personnelle). En comparaison avec le galactose, qui est facilement marqué sur les coupes, l'arabinose est environ six fois plus abondant. L'absence de marquage n'est alors pas liée à

une abondance relative faible. L'hypothèse la plus vraisemblable tient dans la structure des chaînes latérales des pectines. Elles sont probablement très ramifiées avec peu de séquences de 6 résidus consécutifs d'arabinoses liées en α -1,5.

4.4-Implication des protéines pariétales

Les protéines pariétales comme les extensines et les AGPs sont substituées par l'arabinose. L'arabinose pectique étant constant au cours de la germination, la diminution globale d'arabinose observée entre 5h et 21h après imbibition des graines est probablement causée par une perte d'arabinose d'origine glycoprotéique. Les échantillons ont été analysés par la résonance magnétique nucléaire du ^{13}C . Les conditions utilisées pour l'expérimentation permettent de visualiser préférentiellement les carbones des zones mobiles comme les chaînes latérales des pectines et les substitutions des protéines qui ne sont pas engagées dans des liaisons fortes. L'analyse des spectres et l'attribution des signaux par homologie de déplacement chimique ont été effectuées d'après les données de la littérature. Les spectres permettent de visualiser une origine abondante d'arabinose non pectique et de confirmer l'hypothèse émise d'après les données obtenues par dosage.

Les extensines et les AGPs ont été marquées avec des anticorps spécifiques afin de visualiser un changement de ces constituants au cours du temps. MtPPRD, protéine pariétale de fonction inconnue mise en évidence au laboratoire (Bouton et al., 2005), a également été marquée par un anticorps spécifique. La fluorescence n'a pu être observée sur aucune des coupes. Le réactif de Yariv, permettant de précipiter les AGPs (Yariv et al., 1967), a été testé sur les coupes mais sans succès. Malgré l'absence de marquage, ces résultats ne permettent pas de dire que les protéines testées sont absentes des parois. Il est possible que la préparation ou la nature de l'échantillon soit en cause : solubilisation partielle, perte de l'antigénicité lors de la fixation chimique, accessibilité de l'épitope.

Dans les axes embryonnaires de *Medicago truncatula*, des gènes codant pour une AGP (TC102418), une protéine comprenant un domaine fasciclin (TC96721), et quatre types d'extensines (TC94245, TC106582, TC100493, AL372750) sont surexprimés au cours de la germination (voir le chapitre 1, supplemental datas). Pour tester l'implication des protéines pariétales de type HRGP des test de germination ont été effectués en présence de 3,4-déhydro-D,L-proline. Cette molécule inhibe la conversion de la proline en hydroxyproline et son action empêche la formation normale de parois (Cooper and Varner, 1983; Cooper et al., 1994). Les

résultats ont montré que cette molécule n'exerçait pas d'effet sur la germination des graines de *Medicago truncatula*. Ces résultats suggèrent que la synthèse de HRGP ne représente pas une étape clé dans le mécanisme d'élongation cellulaire lié à la germination chez cette espèce. Ces protéines pourraient néanmoins jouer un rôle important, leur néo-synthèse n'étant alors pas nécessaire. D'autres tests ont été réalisés avec le réactif de Yariv. Cette molécule, se liant aux AGPs, limite l'élongation cellulaire de racines de plantules d'*Arabidopsis* (Willats and Knox, 1996). Cependant, ces auteurs avaient noté que le réactif de Yariv n'exerçait pas d'effet sur la cinétique de germination. De fait, des résultats similaires ont été observés : le réactif de Yariv n'influence pas la germination chez *Medicago*. Mais à la différence d'*Arabidopsis*, la croissance racinaire n'a pas non plus été affectée par la molécule. L'expansion cellulaire responsable de la percée de la radicule n'est donc pas affectée par le réactif. A la lumière de ces résultats, il semble que les AGPs ne participent pas d'une manière déterminante sur le processus de germination. Cependant, il faut noter que certaines AGPs sont plus pauvres en hydroxyproline, peu glycosylées et ne réagissent pas au réactif de Yariv (Showalter, 2001).

4.5-Structuration en fuseaux de cellules

Les observations qui ont été faites des tissus de l'axe embryonnaire en croissance ont révélé l'importance possible des structures en fuseaux de cellules décrites au chapitre 1. Ces structures correspondent à des empilements, dans la direction de l'allongement, de cellules très petites, séparées entre elles par des parois fines. Les parois « externes », longitudinales et à l'extrémité des fuseaux sont plus épaisses. Les marquages réalisés ont montré la réalité structurelle de ces fuseaux. Les parois fines « internes » ne sont marquées que par l'anticorps LM15 spécifique des xyloglucanes. Le marquage est constant au cours du temps ce qui est en accord avec les résultats de l'étude des empreintes enzymatiques des xyloglucanes. Celle-ci révèle en effet que, pour la majorité des motifs dont XXXG reconnu par LM15, il n'y a pas de modification d'abondance au cours de la germination. Seul le motif XLFG-1Ac était significativement réduit après 21 heures en comparaison avec les deux premiers stades. Dans ces parois fines, la présence de callose, comme premier polysaccharides mis en place durant la cytokinèse, était attendue. Cependant, le marquage par l'anticorps a montré que la callose n'entrait pas dans la composition de ces parois. Les marquages effectués n'ont pas permis de connaître la composition de ces parois. Néanmoins, leur structure est probablement très différente des parois longitudinales.

Les marquages ont révélé que les parois épaisses externes semblant entourer les cellules possèdent une continuité structurelle. De manière classique, elles sont constituées de cellulose, de pectines et de xyloglucanes. L'originalité réside dans le fait qu'elles entourent, non pas une, mais un empilement de cellules qui pourraient provenir des divisions successives d'une même cellule-mère. La continuité structurelle de ces parois pourrait en faire l'unité d'élongation de l'axe embryonnaire chez *Medicago*. La croissance se réaliserait donc de manière globale sur plusieurs cellules à la fois plutôt que sur une seule. Il est possible que cette structure ne soit pas spécifique à l'embryon. Une publication portant sur la croissance de la racine de *Medicago truncatula* présente des images de coupes de racines où ces structures sont visibles. Néanmoins, elles n'ont pas été décrites comme telles par les auteurs (Holmes et al., 2008). Il est possible qu'elles résultent du fonctionnement du méristème racinaire de *Medicago* qui est de type « ouvert » c'est à dire que les différents tissus sont issus des mêmes cellules, totalement indifférenciées. Au contraire, les méristèmes racinaires « fermés » comme celui d'*Arabidopsis*, sont constitués de cellules méristématiques déjà dédiées à l'élaboration de tel ou tel tissu (parenchyme cortical, cordons pré-vasculaires, coiffe).

En résumé, les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence certaines caractéristiques et modifications de la structure des parois des cellules de l'axe embryonnaire de *Medicago truncatula* au cours de la germination. Ces parois sont particulièrement riches en arabinose dont la proportion diminue au cours du temps. L'origine pectique de cet arabinose est importante mais stable, et les chaînes latérales qu'il constitue sont telles que l'épitope de l'anticorps LM6 est inaccessible malgré le traitement à l'arabinofuranosidase. Des glycoprotéines pariétales participent probablement à la richesse en arabinose. Leur présence et leur action sur la germination n'ont cependant pas pu être mises en évidence. Les parois de l'axe de *Medicago* contiennent aussi une richesse importante en glucose. L'origine cellulosique de ce glucose diminue avec le temps ce qui signifie que le glucose est incorporé dans un autre type de polymère : la callose. Par homologie avec la fonction de ce polymère dans l'élongation des tubes polliniques (Parre and Geitmann, 2005), nous proposons que la callose représente une structure de renfort permettant à la pression de turgescence de s'exercer dans la direction de la croissance, c'est-à-dire vers l'apex radulaire. Dans ce système, les fuseaux de cellules, plutôt que les cellules considérées de manière isolée, correspondraient à l'unité d'élongation cellulaire.

Seconde partie :

Étude structurale et fonctionnelle du gène MtSAP1

Chapitre 1

MtSAP1 : organisation et expression dans l'axe embryonnaire

1-Introduction

Depuis quelques années, la physiologie de la graine et la germination sont étudiées par des stratégies à grande échelle : génomique et protéomique (par exemple chez *Medicago* : (Gallardo et al., 2003; Buitink et al., 2006; Gallardo et al., 2007; Pang et al., 2008; Verdier et al., 2008). Ces études apportent des informations importantes sur la régulation du génome liée au phénomène étudié et devraient aboutir à l'étude fonctionnelle de gènes intéressants. La stratégie de banque SSH qui a été présentée dans les sections précédentes avait cet objectif.

Le gène *MtSAP1* (*Medicago truncatula* Stress-Associated Protein) a été découvert grâce à la banque SSH. L'ensemble des gènes a été testé pour leur réponse à divers stress hormonaux et environnementaux : acide abscissique, acide gibbérellique, ACC (précurseur de l'éthylène), lumière et hypoxie. Les tests ont été effectués en utilisant des réseaux de moyenne densité, plus connus sous le nom de « puces à ADN » (données non présentées). Le gène *MtSAP1* s'est révélé fortement surexprimé par les conditions ABA. L'ABA inhibant très fortement la germination, nous avons émis l'hypothèse que *MtSAP1* jouerait un rôle dans le contrôle de la germination et plus spécifiquement, en inhibant le mécanisme. La structure prédite de la protéine pour laquelle code *MtSAP1*, qui contient deux domaines de type zinc-finger (« doigts de zinc »), indique un rôle de contrôle (facteur de transcription ou interaction protéine-protéine). Les domaines Zinc-finger sont abondants chez les eucaryotes supérieurs mais ont été d'abord identifiés sur le facteur de transcription TFIIIA dans les ovocytes de *Xenopus* (Miller et al., 1985). Ces protéines possèdent la capacité de se lier à un ou plusieurs atomes de zinc avec les résidus Cys-Cys-His-His ou Cys-Cys-His-Cys pour former une structure particulière en « clé de sol » ou « doigt ». Cette structure est responsable de leur capacité à lier les acides nucléiques, ADN et ARN, mais également les protéines.

Dans ce chapitre seront présentés les résultats obtenus de l'étude systématique de *MtSAP1*. Cette étude correspond à la description de la structure du gène et de son expression dans la graine en réponse à différents facteurs. L'expression de la protéine correspondante a également été évaluée. Ces résultats ont fait l'objet d'un article soumis.

2-Article soumis

Running title : Stress - Associated Protein expressed in *Medicago truncatula* during seed maturation

MtSAPI*, a Stress-Associated Protein containing A20/AN1 zing-finger domains, is involved in seed maturation in the model legume *Medicago truncatula

Christine Gimeno-Gilles, Marie-Laure Gervais, Elisabeth Planchet, Anis Limami and Eric Lelievre.

University of Angers, UMR PMS 1191 Physiologie Moléculaire des Semences, 2 Bd Lavoisier, Angers 49045 cedex France

Author for correspondence : Eric Lelievre

Phone : +33 2 41 73 53 83

Email : eric.lelievre@univ-angers.fr

Abstract

MtSAP1 (*Medicago truncatula* Stress Associated Protein 1) was revealed as a down-regulated gene by a suppressive subtractive hybridization between two mRNA populations of embryo axes harvested before and after radicle emergence. *MtSAP1* expression increased during the acquisition of tolerance to desiccation, reached its maximum in the dry seed and decreased dramatically during the first hours of imbibition. Abiotic stresses (saline, cold and hypoxia), ABA or desiccation treatments induced the *MtSAP1* expression in embryo axis, while mild drought stress did not affect significantly its expression. This profile of expression along with the presence of anaerobic response elements and ABRE sequences in the up-stream region of the gene is consistent with a role of *MtSAP1* in the tolerance of low oxygen availability during late stages of seed maturation and desiccation. The *MtSAP1* protein has been shown to be accumulated in embryo axis preferentially under ABA treatment, desiccation, hypoxia and cold. *MtSAP1* is the first gene encoding a SAP with A20 and AN1 zinc-finger domains characterized in *Medicago truncatula*. *MtSAP1* protein shares 62 and 54% homology with *OsiSAP8* and *AtSAP7* respectively with, however, a strong homology in the A20 and AN1 conserved domains.

Key words : A20/AN1 zinc finger domain protein, Abiotic stress, desiccation, germination, *Medicago truncatula*, seed maturation.

Introduction

Seed maturation is an important phase of seed development. According to several plant models, this process can be divided into two stages, morphogenesis and maturation. Seed maturation begins when developing embryos cease their cell division, and start growing by cell enlargement and accumulating storage reserves. Maturation ends with a desiccation phase after which the embryo enters into a quiescent state, thereby permitting its maintenance and survival under a range of environmental conditions. In maturing seeds, the embryo is challenged by two adverse conditions that are the low oxygen availability and the desiccation of the tissues. Several genes regulated by the phytohormone abscisic acid (ABA) are induced in the embryo, besides to those required for the synthesis of storage reserves they include those involved in the acquisition of desiccation tolerance.

In most vegetative tissues, ABA mediates several aspects of physiological responses to environmental challenges such as drought, salt, hypoxia, cold stress and pathogen attacks (Gutierrez et al., 2007). Four main groups of cis-acting sequences are known to be induced by ABA: ABA-responsive elements (ABRE), the functionally equivalent CE3 (coupling element)-like sequences, the RY/Sph elements and the recognition sequences for MYB- and MYC-class transcription factors (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Nakashima et al., 2009). ABRE and RY elements are bound by proteins containing basic leucine zipper domains and B3 domain proteins respectively (McCourt, 1999; Eckardt, 2002).

Anaerobically induced genes are often characterized by the presence of anaerobic response elements in their promoter regions. The tolerance to low oxygen availability in plants includes the induction of the so called 'anaerobic' polypeptides (Sachs et al., 1996). The best characterized anaerobic polypeptides are enzymes involved in metabolic pathways related to oxidative catabolism of sugars (glycolysis, ethanol and lactic fermentation) and carbon skeleton storage as amino acids (alanine fermentation).

Stress Associated Protein (SAP) gene families were characterized by the presence of A20/AN1 domain in their putative encoded protein. The A20 zinc-finger domain was first identified in a TNF- α inducible protein in human cells and is characterized by multiple Cys₂/Cys₂ finger motifs. Human A20 protein is an inhibitor of cell death that polyubiquitinylates the mediator protein RIP, targeting for its degradation, and that inhibits NF- κ B activation (Wertz et al., 2004). The AN1 domain was first identified in the C-terminus

of the ubiquitin-like protein coded by the *Xenopus Laevis* animal hemisphere 1 (AN1) maternal RNA (Linnen et al., 1993). This domain is a zinc finger-type domain and is usually found associated with the A20 zinc-finger domain. The AN1-type zinc finger contains six conserved cysteines and two histidines that could potentially coordinate two zinc atoms (Linnen et al., 1993). The role of the A20/AN1 proteins has been well studied in animal immune systems. The human ZNF216, which has the A20 zinc-finger at the C-terminus and the AN1 zinc-finger at the N-terminus, regulates the NF- κ B activation pathway. ZNF216 interacts with A20 protein and is an I κ B kinase gamma-interacting inhibitor of NF- κ B activation (Huang et al., 2004). Human AWP1 protein has been shown to be a strong NF- κ B inhibitor (Diatchenko et al., 2005) and to interact with a serine/threonine protein kinase PRK1, a lipid-activated serine/threonine kinase of the protein kinase C super-family (Duan et al., 2000).

In plants, very little information is known about A20/AN1 proteins. The *indica* rice OsiSAP1 was the first plant protein identified as a zinc-finger protein. Recently, Vij & Tyagi (2008), when screening public databases, have conducted a survey A20/AN1 zinc-finger protein across diverse organisms with a special emphasis on plants (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Sorghum bicolor* and *Vitis vinifera*). All the species contain between one to nineteen A20/AN1 proteins. From *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* genomes, respectively 18 and 14 genes code for SAP, and most of them encode proteins with A20/AN1 domains. A member of SAP gene family from rice OsiSAP1 (*Oryza sativa* Stress-Related Protein 1) has been shown to be induced in rice seedlings in response to environmental challenges and ABA treatment, and to confer abiotic stress tolerance to transgenic tobacco over-expressing the gene (Mukhopadhyay et al., 2004; Vij and Tyagi, 2006). Recently, the over-expression of OsiSAP8 has been shown to confer tolerance to salt, drought and cold stress (Kanneganti and Gupta, 2008). These Authors demonstrated that A20 and AN1 type zinc-finger domain from this protein interact with each other but only A20 interacts with itself in a yeast two-hybrid system. According to them, an OsiSAP8 gene product might act in the early phase of signal transduction pathway with a stress response. The mechanism by which stress tolerance is conferred is still unknown.

Our strategy for improving knowledge of important and vital events of germination was based on a suppressive subtractive hybridization (SSH) transcriptomic analysis of embryo axis for the identification of genes involved in germination completion. The subtraction was carried out between two mRNA populations extracted at two imbibition stages, 6 hours that is the end

of the phase of passive and massive uptake of water and 23 hours that is 2 hours after germination completion characterized by radicle protrusion. While in our previous studies (see Bouton et al., 2005, Gimeno-Gilles et al., 2009), our attention was focused on up-regulated genes (between 23h and 6h) with the attempt to unravel their involvement in the control and the completion of germination process. In the present work, our attention was focused on a down-regulated gene that belongs to the family of genes encoding Stress Associated Proteins. This candidate was chosen because very few is known on the role of this family of genes in plants and to our knowledge this is the first study dedicated to a SAP protein in seeds. We put forward the hypothesis that the protein encoded by this gene might play a role in the maturation of *Medicago truncatula* seeds in relation with a stress caused by events which are specific to this stage of development, either the desiccation or the low oxygen environment. The aim of this work was to contribute to unravel this role.

In the present work *MtSAP1* was cloned, sequenced and characterized in maturing and germinating seed. The protein contains the A20/AN1 domain and shares a large homology with the rice OsiSAP8 and AtSAP7 (*Arabidopsis thaliana* Stress-Related Protein 7). *MtSAP1* was strongly induced at the end of seed maturation during the acquisition of tolerance to desiccation. The maximum of expression was reached in the dry seed. *MtSAP1* expression was re-induced and the protein accumulation was observed in the embryo axis during germination by ABA treatment, desiccation and two abiotic stresses hypoxia and cold (4°C).

Methods

Plant material and experimental treatments

Seeds of *Medicago truncatula* cv Parragio were germinated in 9 cm diameter Petri dishes on Whatman paper soaked with 3.5 mL solution with ultra-pure water (control) or with different hormonal solutions : gibberellic acid (GA; 100 μ M), 1-aminocyclopropan carboxylic acid (ACC; 100 μ M) to mimic ethylen treatment and abscisic acid (ABA; 10 - 100 μ M) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France).

For abiotic stresses, seeds were germinated for 48 h on water. Afterwards, seedlings were subjected to various treatments: saline stress (NaCl, 200 mM), drought stress mimicked by mild polyethylene glycol treatment (PEG 6000, -0.25 MPa), dehydration stress (PEG was adjusted to concentration for an osmotic pressure of -3 MPa), and water (control). For hypoxia condition, seeds were immersed with ultra-pure water in hermetically closed polypropylene flask. All experiments were made in darkness and maintained at 20°C, except for cold stress where embryo axis were placed at 4°C. After various imbibition times, embryo axis were collected and immediately frozen in liquid nitrogen.

Cloning of *MtSAP1*

Reverse library of suppressive and subtractive hybridization between 6 and 23 hours after *Medicago truncatula* cv Parragio seed imbibitions, revealed full-length *MtSAP1* cDNA. The library was constructed using a Clontech PCR-select cDNA subtraction Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Finally, *MtSAP1* was cloned in pGEMT vector (Promega, Madison, Wisconsin, USA) flanked by a sequence of nested primers, and propagated in a TOP10 *E. coli* strain (Invitrogen, Breda, The Netherlands).

in Silico analysis

MtSAP1 cDNA sequence and *Medicago truncatula* homologues were found using TGIP BLAST software available online (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/Blast/index.cgi>) and browsing genomic data from Information System revealed genomic sequences and chromosome locations. Cis-acting elements in the upstream region were discovered using the PLACE database (Higo et al., 1999). A deduced protein structure was compared to known proteins with BLAST tool from the ExPASy website.

RNA isolation and reverse transcription

For total RNA isolation, frozen embryos were crushed with a mortar and pestle. The powder was treated with a TriReagent® (Ambion, Austin, TX, USA) following the manufacturer's instructions. cDNAs were obtained by retrotranscription of 2 µg of total RNA using 200 units of RT-MMLV (Invitrogen, Breda, The Netherlands) 2 µg of random primer (Invitrogen) in the presence of 40 units of a Recombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, WI, USA). Reaction occurred for one hour at 37°C in total volume of 50 µL.

Real-time quantitative PCR

Reactions took place on the light cycler ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). Each reaction was performed with a 3 µL of a 1:2 (v/v) dilution of the first cDNA strands using a SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), following the manufacturer's instructions, with 200 nM of each primer in a total reaction of 25 µL. The reaction was incubated for 2 min at 50°C and 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 58°C. The specificity of the PCR amplification procedure was checked with a heat-dissociation protocol (from 65°C to 95°C) after the final cycle of PCR. Each measure was carried out with at least two biological repeats using a duplicated PCR reaction for determining Ct values. mRNA amounts were calculated in copy number, referring to a standard curve made from MtSAP1 qPCR amplicon cloned in plasmid vector.

Protein extraction and SAP1 protein detection by SDS-PAGE and immunoblotting

To raise a specific antibody directed against *Medicago truncatula* SAP1 protein, the specific peptide VSPEVPENPISNESC was used to immunize rabbits. Antibodies were affinity-purified (GenScript, Piscataway, NJ, USA). Soluble proteins were extracted from frozen material in Tris-HCl buffer (25 mM, pH 7.6) with 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA. After denaturation, equal amounts of protein (30 µg) were separated on an SDS-polyacrylamide gel [14% (v/W) polyacrilamide]. The proteins were then electrophoretically transferred onto PVDF membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After incubation with anti-SAP1 antibody (1/2000), the complexes were detected using peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (1/4000) (Sigma). The reaction was visualized using the ECL reagent (Amersham, Les Ullis, France) according to the manufacturer's instructions.

Results

Cloning of *MtSAP1* and *in silico* analysis

A SSH library was constructed from embryo axis between two early steps of *Medicago truncatula* seed germination (6 and 23 hours after imbibition). Sequencing was performed on 900 clones, and sequence analysis and comparison revealed 355 unique ESTs. Among them, 68 ESTs were down-regulated between 6 and 23 hours. The MtSAP1 (TC95263) full-length sequence was cloned (Gimeno-Gilles et al., 2009). The genomic sequence of MtSAP1 (UniProtKB/TrEMBL entry A2Q3D5) is located on chromosome 7. The coding sequence of MtSAP1 (Figure 1a) is intronless but there are two introns of 1137 and 92 bp in the 5'UTR region.

The protein sequence is 172 aa with a predicted molecular mass of 18.8 Kda and contains two zinc-finger domains (ZnF), A20 and AN1. These domains are found alone or together in eight other putative proteins of *Medicago truncatula*. Sequence alignment is shown in Figure 2a. ZnF A20 and AN1 domains are found together in numerous other proteins in plants and mammals such as human ZnF216 and AWP1 proteins, sharing 46% and 47% homology with MtSAP1 respectively, and showing identities in the ZnF domains (Figure 2b). The MtSAP1 protein sequence shares 62% homology with rice OsiSAP8 and 54% homology with AtSAP7, and presents a strong homology in the domain sequences with these proteins (Figure 2c). It also shares homology with virtually translated ESTs of the *Lotus japonicus* (TC14575, 87%) and soya bean (TC205260, 75%), with identical ZnF domains (Figure 2c). The upstream region (2.5 Kb) of the MtSAP1 gene was used to search the database for regulatory motif using PLACE database. Anaerobic-responsive elements and ABRE involved in abiotic stress responsive gene expression were identified (Figure 1b), indicating their association with stress inducible expression of MtSAP1.

MtSAP1* gene expression in embryo axis during maturation, germination and post-germination of *Medicago truncatula

The expression of *MtSAP1* in embryo axis was investigated by real RT-PCR during seed development, germination and post germination growth (Figure 3). During seed development, gene transcription exhibited a low level during the first 20 days after pollination (DAP). A strong increase in MtSAP1 expression was observed after 28 and 35 DAP that rised to 4.10^6 copy numbers when desiccation was complete in the dry seed. Five hours after imbibition, amounts of mRNA decreased to 2.10^6 copies and picked up a low background expression

after 25 hours and remained constant even after 96h. These data show that *MtSAP1* expression kinetics is correlated with progressive tissue dehydration occurring in the last 10 days of seed development.

MtSAP1 gene expression highly induced by desiccation

Gene expression stimulation in the late embryo development could be a response to abiotic stress caused by desiccation. To test this hypothesis, desiccation was induced after 15 hours of water seed imbibition with high concentration of polyethylene glycol (PEG, -3MPa). This specific treatment has already been shown to induce stress in tissues (Buitink et al. 2006). In comparison with the control, *MtSAP1* is over-expressed approximately 6 fold higher in desiccation conditions, reaching $3 \cdot 10^6$ copy numbers per μg of total RNA (Figure 4). These data seems to confirm the involvement of *MtSAP1* in the acquisition of desiccation tolerance at the end of seed maturation.

Induction of MtSAP1 expression by ABA during seed imbibition

In order to test *MtSAP1* hormone responsiveness, seeds were imbibed with ABA (100 μM), gibberrellic acid (GA; 100 μM) and ethylene precursor 1-AminoCyclopropane-1-Carboxylic acid (ACC; 100 μM). GA and ACC promote germination. After 50 hours of imbibition, in comparison with the water condition, *Medicago truncatula* germination rates and radicle length were greater in GA and ACC treatments (data not shown). On the contrary, germination was inhibited in presence of ABA: the rate was reduced by half and radicles failed to elongate more than 2 mm (data not shown). The results in Figure 5 show that neither GA nor ACC stimulated *MtSAP1* expression during germination, while it was strongly over-expressed in 100 μM ABA conditions - approximately 6/8 fold higher in comparison with water. The ABA dose sensitivity of *MtSAP1* was checked out by applying various concentrations (5 μM to 100 μM) of the hormone in the germination medium. *MtSAP1* gene expression was strongly induced at one and the same time by low ABA-concentration, but also by high concentration of ABA, showing that the induction of *MtSAP1* gene expression was dependent on the presence of ABA but in a dose-independent way (data not shown).

Involvement of MtSAP1 in abiotic stress response

In order to test *MtSAP1* abiotic stress-responsiveness and validate *in silico* analysis of the upstream region, seedlings were submitted to various stress conditions : osmotic stress (NaCl 200 mM), drought stress mimicked by mild PEG treatment (-0.25 MPa), cold (4°C) and

hypoxia (Ricoult, Cliquet & Limami 2005; Ricoult et al. 2006). Water condition was used as a control. All these treated embryo axis were unequivocal stressed. Indeed, proline and alanine accumulation, commonly used as indicators of mild drought stress and hypoxia respectively, has been observed in these stressed tissues (data not shown ; (Limami et al., 2008).

Expression analysis showed that MtSAP1 gene was not sensitive to drought stress while a drastic osmotic stress (NaCl, 200 mM) induced a two fold increase of the gene expression, similarly to the cold condition (Figure 6). The only abiotic stress that showed a very significant effect on the gene expression was hypoxia, under which *MtSAP1* level of expression was 5 fold higher than in the control (Figure 6).

Expression of MtSAP1 protein in embryo axis using specific antibody

To study the expression of SAP1 protein in the plant cell, an antibody was raised against a specific peptide. This peptide (VSPEVPENPISNESC) is highly specific for SAP1 and reduces the probability to cross match with another members of SAP in the legume *Medicago Truncatula*. The amount of SAP1 proteins was monitored by immuno-blotting after protein separation by SDS-PAGE in embryo axis. In agreement with gene expression data, the amount of SAP1 protein was largely induced by cold, hypoxia and desiccation treatments in comparison to water condition, whereas drought stress (PEG, -0.25MPa) failed to induce accumulation of MtSAP1 protein (Figure 7). It is worth noting that ABA treatment (at a low concentration, 10 μ M) induced in a very strong way MtSAP1 protein amount. Unexpected, MtSAP1 protein was not accumulated under saline conditions.

Discussion

Unlike the A20 / AN1 zinc-finger proteins in humans and other model animal systems, very little information is available on such proteins in plants. In the animal systems, these proteins play an important role in regulating the immune response, inflammatory responses and anti-apoptosis (Huang et al., 2004; Wertz et al., 2004).

In the present work, a transcriptomic approach on the model legume *Medicago truncatula* allowed us to isolate the first gene coding for an A20/AN1 zinc-finger stress associated protein expressed in an embryo during its maturation phase. *MtSAP1* is strongly induced at the end of seed maturation during the acquisition of tolerance to desiccation with its maximum of expression in the dry seed. Most of zinc finger domain proteins act as transcriptional factors, however *in silico* analysis of *MtSAP1* gene product did not predict any potential nuclear localization signal. *MtSAP1* might not be a transcription factor alternatively with its zinc finger domain, it may be involved in protein-protein interaction.

In order to learn more about the role of *MtSAP1* in the maturing embryo, we put forward the hypotheses that the expression of the gene might be regulated by ABA and that the protein might play a role in relation to the tolerance of either desiccation or low oxygen stress, two adverse conditions encountered in the maturing seed. These hypotheses were based on, i) the expression profiling during maturation, ii) the presence of ABRE and 'anaerobic response' elements in the promoter sequence of *MtSAP1* and iii) the literature in which recent works on rice and Arabidopsis showed the involvement of members of the family of the A20/AN1 zinc finger proteins in abiotic stress (Vij and Tyagi, 2006). *OsiSAP1* and *OsiSAP8* have been shown to be induced in rice seedlings in response to various abiotic stresses and ABA treatment, and to confer tolerance to salt, drought and cold stress to transgenic tobacco over-expressing the gene (Mukhopadhyay et al., 2004; Kanneganti and Gupta, 2008).

Several evidences are in favor of our hypotheses. The induction of the *MtSAP1* expression and the protein accumulation by ABA treatment of germinating embryo axis showed that *MtSAP1* is up-regulated by ABA at both transcriptional and post-transcriptional levels.

The involvement of *MtSAP1* in the tolerance of the embryo to desiccation is supported by the induction of the expression of *MtSAP1* accompanied by the accumulation of the protein in germinating embryo axis submitted to desiccation treatment (PEG, -3 MPa). The regulation of *MtSAP1* by desiccation seemed specific to this situation of extreme dehydration of the tissues because neither the messengers nor the protein accumulated in germinating embryo axis submitted to drought stress (PEG, -0.25 MPa). It is worth to note that although *MtSAP1* is

responsive to ABA and shares more than 50% homology with genes encoding SAP with A20/AN1 domains expressed in Arabidopsis and rice, it is not sensitive to drought stress. This difference suggests that the *SAP* isogene expressed in embryos and embryo axis of *Medicago truncatula* is not regulated by the same signaling mechanisms as the isogenes expressed in Arabidopsis and rice vegetative tissues.

The involvement of MtSAP1 in the tolerance of low oxygen availability in the seeds during late stages of maturation is supported by the induction of the expression of *MtSAP1* accompanied by the accumulation of the protein in germinating embryo axis submitted to submergence treatment. Gas exchanges are considerably reduced in seeds because of their cutinized cell layers and low stomatal frequency on pods. Concomitantly with seed desiccation, tissues lose their green color and photosynthetic activity, leading to a very low oxygen content in the dry seeds (Rolletschek et al., 2002).

The regulation of MtSAP1 by two other abiotic stresses, osmotic stress and cold was checked out in germinating embryo axes. Genes encoding SAP proteins were shown to be responsive to cold and osmotic stress in Arabidopsis and rice. Similarly *MtSAP1* was found to be responsive to cold treatment. The expression of the gene as well as the accumulation of the protein were boosted in embryo axes submitted to low temperature (4°C). The responsiveness to osmotic stress was not obvious, a treatment of the embryo axes by a very high concentration of NaCl (200 mM) was needed for the induction of the gene expression that was not accompanied by the protein accumulation.

In conclusion, a gene encoding a protein of the family of ‘Stress Associated Proteins’ was isolated in *Medicago truncatula* embryos. The natural profile of expression of this gene in maturing embryos and the induction of the gene expression and the protein accumulation in embryo axes under experimental conditions showed that the synthesis of the protein MtSAP1 is regulated at the transcriptional and post – transcriptional levels by ABA and that the protein is very likely involved in the process of the tolerance of the maturing embryo to either desiccation, hypoxia or cold stress.

The question that needs to be addressed now is what is the physiological relevance of the responsiveness of *MtSAP1* to a such variety of abiotic stresses. Our suggestion is that *MtSAP1* is responsive to a secondary stress related to all these stresses, namely the oxidative stress. In a recent study, more details about a member of SAP family in *Arabidopsis Thaliana*, SAP12 were published. The authors suggest that SAP12 acts as a redox sensor, transmitting redox information to other components of the cell (Stroher et al., 2009).

Figures

A - Coding sequence :

```

ATGGAGTCGCACGATGAGATGGGATGCCAGGCACCAGAACGTCCAATTCTGTG
CGTTAATAATTGTGGTTTCTTCGGAAGGGAAGCTACCATGAACATGTGTTCCAAG
TGTTACAAGGACACACTGCTGAAGCAGGAGCAGGAAAACTTGTTGCGACGTCA
GTTGAAAACATCGTGAATGGCAATTCCAGCAGCAATGGAAAGCTGGCTGTGACC
GCAAGTGCTGTTGATGCACGAGTTGAAAGTGTGGAGCTCAATACAGTGTCTCCC
GAGGTTCCAGAAAATCCAATCTCTAATGAGAGTGTGGAGATGAAAGCCAAGACT
GGTCCCAGCAGATGCGCTACTTGCCGGAAACGTGTTGGATTAAGTGGTTTCAGC
TGCAAATGTGGCAACCTCTTTTGCTCAATGCATCGCTATTCTGATAAACACGATT
GCCCTTTTGATTATAGAAGTGTGGTCAGAAGGCCATAGCTGAATCCAACCCAG
TAATTAAGGCGGATAAACTCGATAAAATCTAG
  
```

B - Protein sequence :

```

                                A20 domain
MESHDEMGCQAPERPILCVNNCGFFGREATMNMCSKCYKDTLLKQEQEKLVATSV
ENIVNGNSSSNGKLAVTASAVDVRVESVELNTVSPEVPENPISNESVEMKAKTGPS
RCATCRKRVGLTGFSCKCGNLFCSMHRYSDKHDCPFDYRTAGQKAIAESNPVIKAD
KLDKI
                                AN1 domain
  
```

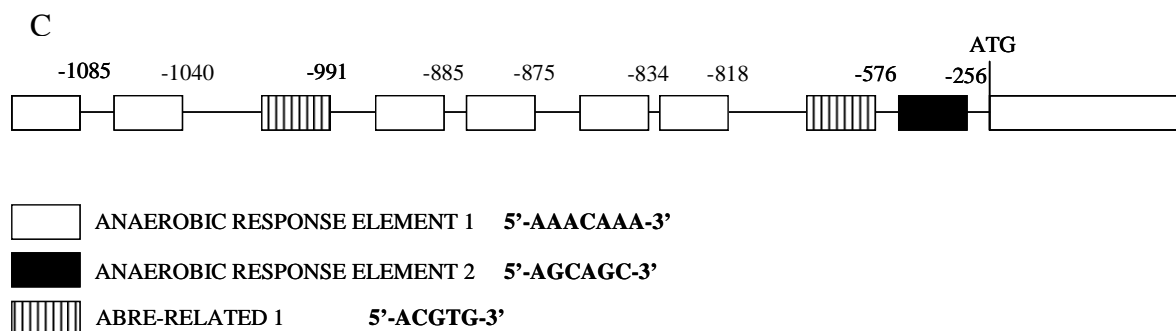


Figure 1 : Coding sequence (a) and deduced protein sequence (b) of MtSAP1. Shadowed amino acids represent zinc-finger A20 and AN1 domains. Amino acids implicated in the interaction with zinc atoms are represented in black boxes. Upstream region of the MtSAP1 gene exhibited anaerobic response element sequences and ABRE-related sequences (c).

Figure 2a

```

VIRT_106320 -----
VIRT_106386 -----
VIRT_98456 -----
VIRT_105307 -----
MtSAP1 -----
VIRT_107045 SLSQQFVFPFRRFSLSSITFPPTLLSSFFLFLFPLPYLFFLNFLNDSFSSFRIRIFSET 60
VIRT_100747 -----
VIRT_95298 -----MAQRTENEETEFKVVSET-- 18
VIRT_100163 -----SLSPIYLSHLISSLYTTTSLNNSQI 26

VIRT_106320 ----MD-HDQTGCEAAPEGPMLCINNCGFFGSAATMN-----MCSKCHKDMMLKQ 45
VIRT_106386 ----ME-PEGPILCINNCGFFGSAATMN-----MCSKCHKDMMLKQ 45
VIRT_98456 ----MDSHDKTGCQT-PKLPILCVNNCGFFGRAATMN-----MCSKCYKDTQLMQ 45
VIRT_105307 ----MDSHDETGCQT-PELPILCVNNCGFFGRAATMN-----MCSKCYKDTQF-- 43
MtSAP1 ----MESHDEMGQA-PERPILCVNNCGFFGREATMN-----MCSKCYKDTLLKQ 45
VIRT_107045 TDLSPSMAEEHRCET-PEGHRLCANNCGFFGSSATMN-----LCISKYRDIHLKE 109
VIRT_100747 -----MAEEHRCQA-AQ--RLCANNCGFFGSPAMQD-----LCISKYRDLQMK 41
VIRT_95298 -----LQ-----TTTTINLCIKKCGVVGNPSTNN-----MCQNCF--TASTT 54
VIRT_100163 LNLNLFLOPHQPNQKNSFISRRKKALKMAHKITKKEETEFQVPETITPPCINPTQTTT 86
          : .. *

VIRT_106320 EQATLAASSIGNIMN--GSSSSSGIEPAITAN---VEISVDP-----VEPKI 87
VIRT_106386 EQAQLAASSLGNIMN---GSTSNTKEPVTATSVDIPAISVEPKTASVDIPAISVEPET 102
VIRT_98456 EQEKLAAASVENLVS---GGSM--KQVVTDGA---VNVQIEN-----VEVKT 84
VIRT_105307 -----
MtSAP1 EQEKLVAATVENIIVN---GNSSSNGKLAVTASA---VDV RVES-----VELNT 87
VIRT_107045 EQEAKTKSTIETALS-----SASASTAVVVAAS---PVAEIES-----LPQPQ 149
VIRT_100747 QRSSSAKLVLNQTLIPQQSNSSSLDTGI IHPSS---TSPSVMI-----VSSST 86
VIRT_95298 TLPPSSSRSVRSP-----KRSRQESSSSS-----EEE-- 81
VIRT_100163 TPTTTTTTTTLEPSR---FFEDKSSKARSATSS-----FSQKR 121

VIRT_106320 ISAEPLVASGSEESLEKKPKDGPKRCSNCNKRVLGTGFNCRGNYLCVHRYSDKHDCPF 147
VIRT_106386 ISKPFLFGSGSEESDDPKPKDGPKRCSNCNKRVLGTGFNCRGNYLCVHRYSDKHDCPF 162
VIRT_98456 VSAEISGSSSENLETWKVKTGPSRCATCRKRVLGTGFNCRGNYLCVHRYSDKHDCPF 144
VIRT_105307 -----DAGTGKN----- 50
MtSAP1 VSPEVPENPISNESVEMKAKTGPSRCATCRKRVLGTGFNCRGNYLCVHRYSDKHDCPF 147
VIRT_107045 PPALTVPSIVPEASDNSSGPVQSNRCGTCTCRRTGLTGFNCRGNYLCVHRYSDKHDCPF 209
VIRT_100747 P-TVELVAAAAGPSEAEPPKVGPNRCGTCTCRRTGLTGFNCRGNYLCVHRYSDKHDCPF 145
VIRT_95298 ---VSRCSGCRKRVLGTGFNCRGNYLCVHRYSDKHDCPF 138
VIRT_100163 SHPSNDSNVQPQTSSAEAKRAVNRCSGCRKRVLGTGFNCRGNYLCVHRYSDKHDCPF 181

VIRT_106320 DYRTAGRDAIAKANPVVKAEKLDKI 172
VIRT_106386 DYRTSARDIAKANPVVKAEKLDKI 187
VIRT_98456 DYQSVGRDAIAKSNPVKADKDKF 169
VIRT_105307 -----
MtSAP1 DYRTAGOKAIAESNPVIKADKLDKI 172
VIRT_107045 DFKAVGREEIAKANPVKADKLRRI 234
VIRT_100747 DFKGMGREEIKKANPVVKEKLNKI 170
VIRT_95298 DYKKVGREEIAARENPVIRAIAKIVKV 163
VIRT_100163 DYKAAGRESTIARENPVVKAIAKIVKL 206

```

Figure 2b

```

HsAWP1      MAQETNH---SQVPMLCSTCGGFYGNPRTNGMCSVCYKEHLQRQN      56
HsZNF216    MAQETNQ---TPGPMLCSTCGGFYGNPRTNGMCSVCYKEHLQRQONS-GRMSPMGTASG 55
MtSAP1      MESHDEMGCAAPERPILCVNNCGFFGREATMNMCSKCYKDTLLKQEQE----- 48
* . . : . . * : * * . . * : * : . * . * * * * : * : * : . .

HsAWP1      S---LSESLPVQCTDGSVPEAQSA LDSTSSSMQPSVSNQSL LSESVASSQLDSTSVDKA 113
HsZNF216    SNSPTSDSASVQRADTSLN NCEGAAGSTSEKSRNPVVAALPVTQQMTEMSISREDKITTP 115
MtSAP1      -----KLVATSVENIVNG-NSSSNGKLAVTASAVDVRVESVELNTVSPPEVPEN- 95
          : . . * : : . . * : * . . . : : . . .

HsAWP1      VPET-EDVQASVSDTAQQPSEEQS--KSLEKPKQKKNRCFMCRKKVGLTGFECRCGNVYC 170
HsZNF216    KTEVSEPVVVTQPSVSPSQPSTSQSEKAPELPKPKKNRCFMCRKKVGLTGFDCRCGNLFC 175
MtSAP1      -----PISNES---VEMKAKTGPSRCATCRKRKRVGLTGFSCRCGNLFC 134
          * . : * . . * . * * * * * : * : * : * : * : * : *

HsAWP1      GVHRYSDVHNCSPYNYKADA A EKIRKENPVVVEGKIQKI 208
HsZNF216    GLHRYSDKHNCSPYDYKAEA A EKIRKENPVVVAEKIQRI 213
MtSAP1      SMHRYSDKHDCPFDYRTAGQKAI A ESNPVIKADKLDKI 172
          . : * * * * * * : * : * : * : . * : . * * * : . : * : * : *

```

Figure 2c

```

VIRT_GmTC205260  MEPHDETG-CQAPERPILCINNC GFFGRAATMNMCSKCYKDMLLKQEQDKFAASSVENIV 59
VIRT_LjTC14575  MESHDETG-CQAPERPILCVNNCGFFGRAATMNMCSKCYKDMLLKQEQDKLAATSVENIV 59
MtSAP1          MESHDEMG- PERPILCVNNCGFFGREATMNMCSKCYKDTLLKQEQE 59
OsSAP8          ME-HKETG-CQQDEGPILCINNC GFFGSAATMNMCSKCHKEMIMKQEQAKLAASSIDSIV 58
AtSAP7          MGSEENNSTSFPETEPKLCDNCGFFGSPSNMNLCSKCYRSLRAEEDQTAVAKAAVKNSL 60
* . . : . . * * * * * : * : * : * : * : * : * . . : . . :

VIRT_GmTC205260  NGSSNNGKQAVATGAVAVQVEAVEV KIVCAQSS--VDSSSGDSLEMKAKTGPS-RCATC 116
VIRT_LjTC14575  NSCSNNGKQAITADAVNVRVEPEV KAVTAQIS--ADSSSGESLEVKAKTGPS-RCGTC 116
MtSAP1          NGSSSNGKLAVTASAVDVRVESVELNTVSPPEVP--ENPISNESVEMKAKTGPS-RCATC 116
OsSAP8          NGGDS--GKEPIIAGHAEVAVAVQVEV KTLVAQPAE IAGPSEGVTVNPKGREGEPN-RCSTC 115
AtSAP7          KLPSCS-IIAPGQKHPLEIKPAHLETVVVTAEPSSVPVAEQDEAEPSRPVRRPNNRCFSC 119
          : . . : . . * : * : * : * : * : * : * : * : * . . * : * : *

VIRT_GmTC205260  RKRVLGTGFSCKCGNLF CAMHRYSDKHDCPFDYRTVQDAIAKANPIIKADKLDKI 172
VIRT_LjTC14575  RKRVLGTGFSCKCGNLF CAMHRYSDKHDCPFDYRTVQDAIAKANPVIKADKLDKI 172
MtSAP1          RKRVLGTGFSCKCGNLFCSMHRYSDKHDCPFDYRTAGQKAI A ESNPVIKADKLDKI 172
OsSAP8          RKRVLGTGFNCRCGNLYCAMHRYSDKHDCPFDYRTAA 171
AtSAP7          NKKVGVGMGFKCKCGSTFCGSHRYPEKHECSPDFKVEGRDAIAKANPLVKADKVQRI 175
          . : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

```

Figure 2 : Protein sequence alignments of MtSAP1 with the eight other *Medicago truncatula* proteins containing A20 and/or AN1 zinc-finger domains (a), with human A20/AN1 proteins AWP1 and ZNF216 (b), and with A20/AN1 proteins from various plant species (c). Shadowed amino acids represent zinc-finger A20 and AN1 domains. Amino acids implicated in the interaction with zinc atoms are represented in black boxes. VIRT_106320 : deduced amino acid sequence of *Medicago truncatula* TC106320 ; VIRT_GmTC205260 : deduced amino acid sequence of *Glycine max* TC205260 ; VIRT_LjTC14575 : deduced amino acid sequence of *Lotus japonicus* TC14575.

Figure 3

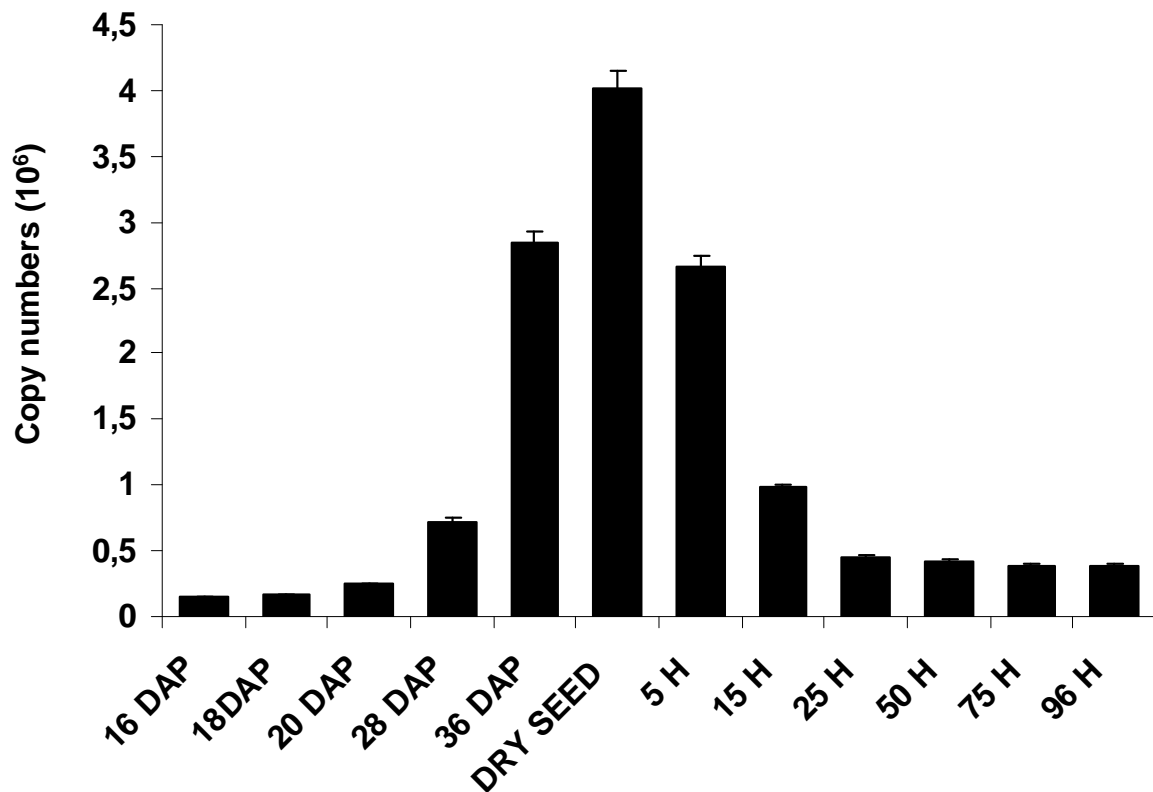


Figure 3 : Expression profile of MtSAP1 in seeds and in embryo axis during maturation and germination. MtSAP1 expression was determined by quantitative real time RT-PCR. Each measure was carried out with at least two biological repeats using a duplicated PCR reaction for determining Ct values. Data are means \pm SD of three replicates.

Figure 4

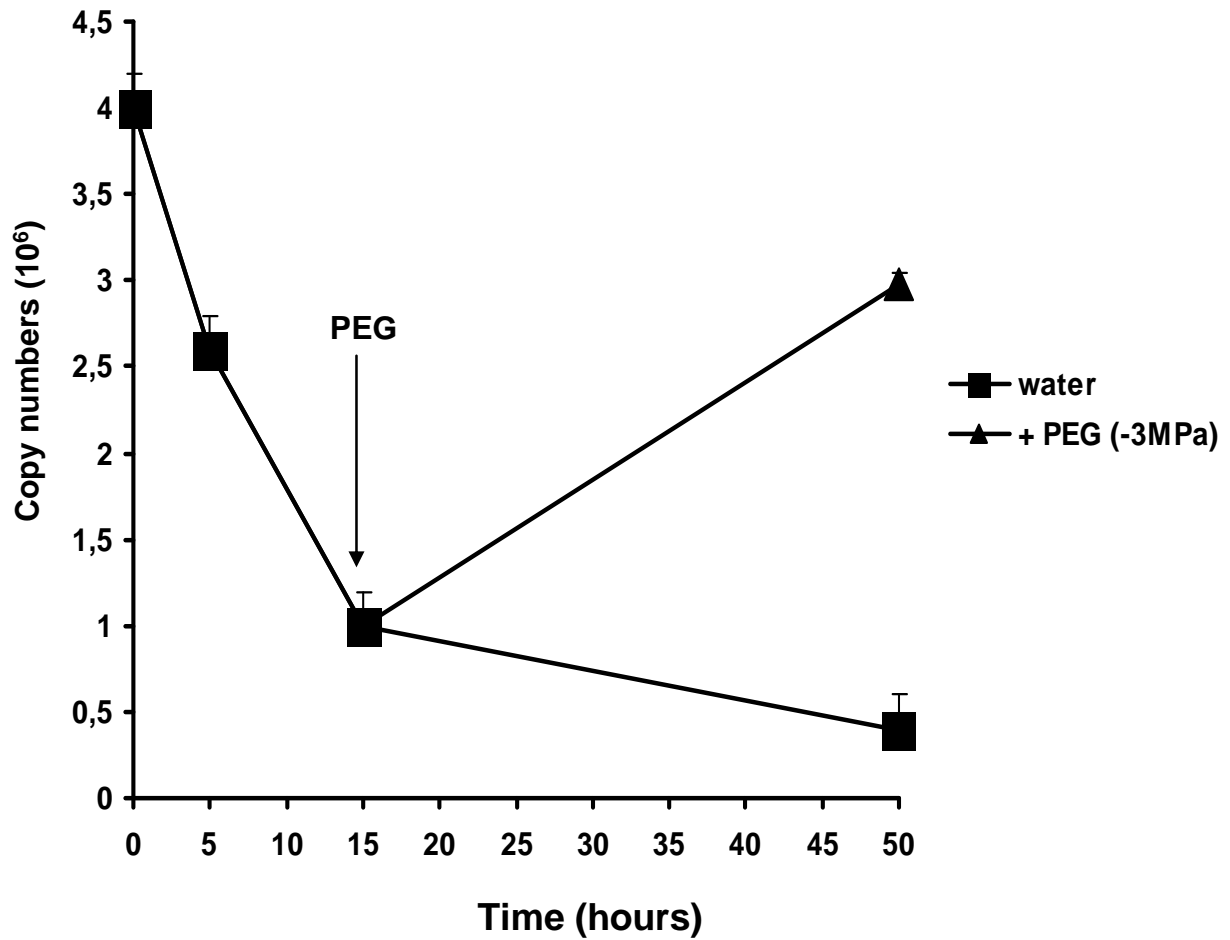


Figure 4 : Effect of a dehydration inducer (PEG) on MtSAP1 expression in embryo axis. Transcript copy numbers are monitored in dry seed and at different times after imbibition. PEG (-3 MPa) was added after 15h of imbibition in order to re-induce desiccation. Data are means \pm SD of three replicates.

Figure 5

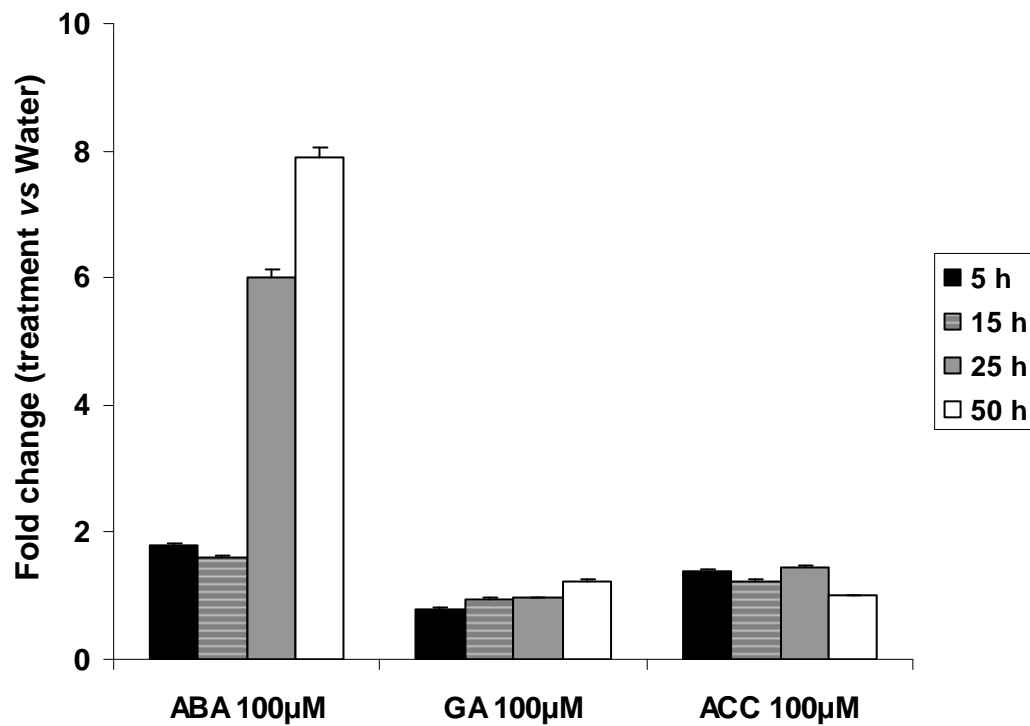


Figure 5 : Effects of various hormonal treatments on MtSAP1 expression during germination. The MtSAP1 gene expression was represented as a ratio, comparing hormonal treatments (gibberellic acid (GA 100 μM), 1-aminocyclopropan carboxylic acid (ACC; 100 μM) and abscisic acid (ABA; 100 μM)) versus control condition (water). Data are means \pm SD of three replicates.

Figure 6

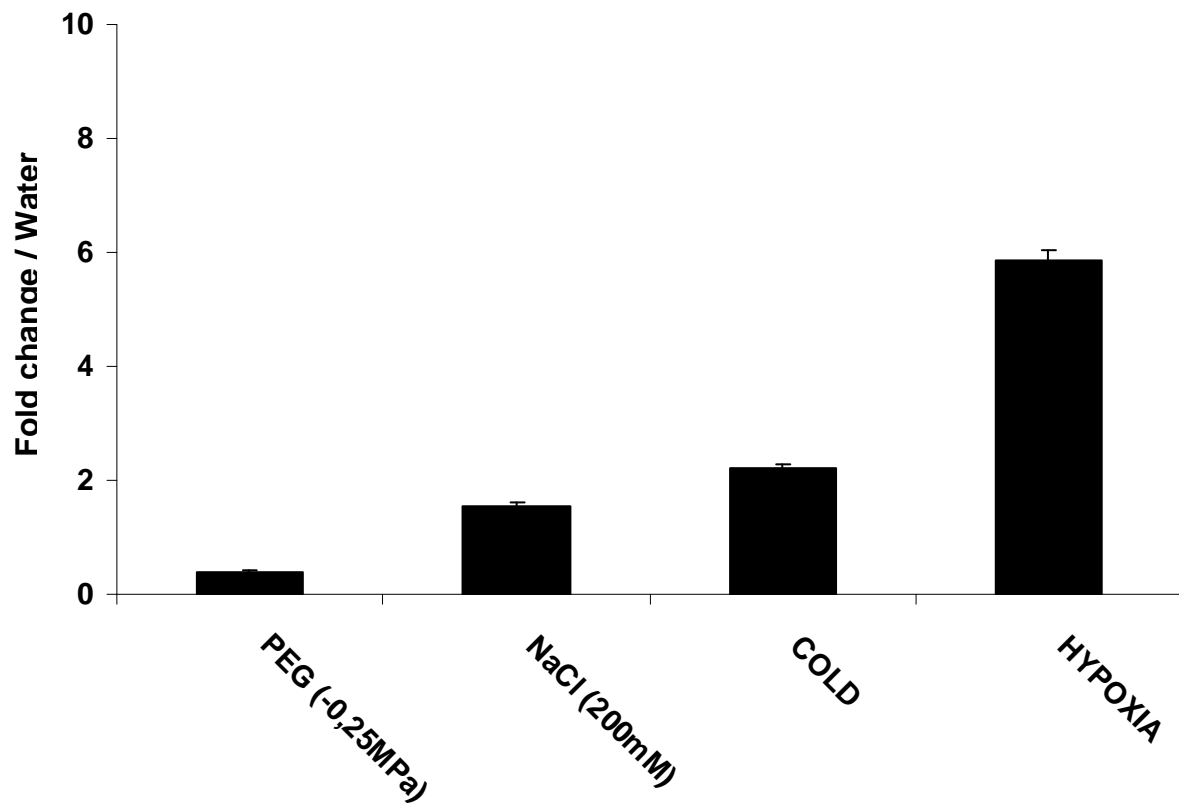


Figure 6: Effects of different abiotic stress conditions on MtSAP1 expression in embryos axis. Seedlings were grown under drought stress (PEG -0.25 MPa), salt stress (NaCl, 200 mM), cold stress and hypoxia. MtSAP1 was expressed in ratio in comparison with control (water). Data are means \pm SD of three replicates.

Figure 7

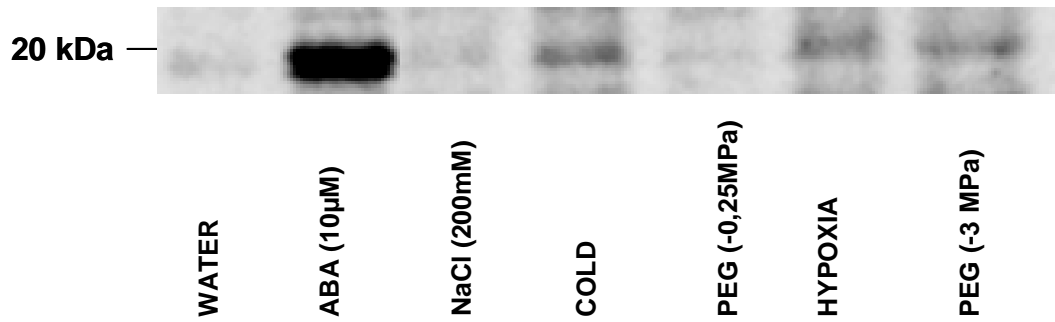


Figure 7: SAP1 protein determined in embryo axes of *Medicago Truncatula* seedlings by immunoblotting. Seeds were germinated on water in Petri dishes for 48h on ABA (10 µM) or in water before being transferred to abiotic stress (salt, cold, dehydration, hypoxia and desiccation) for 24h. The data are representative examples out of two independent experiments.

3-Conclusion

Ce chapitre présentait l'étude structurale et l'expression de *MtSAPI*, gène nouveau chez *Medicago truncatula*, dans les axes embryonnaires de la graine.

Le gène de *Medicago MtSAPI* a été baptisé d'après son homologie avec le gène *osiSAPI* (*Oryza sativa* sous-espèce *Indica*, Stress-Associated Protein1) découvert chez le riz (Mukhopadhyay et al., 2004). Il possède deux domaines de type zinc-finger : A20 dans la région N-terminale et AN1 dans la région C-terminale. Très peu d'études ont été réalisées chez ce type de gène chez les plantes et se focalisent sur le riz et *Arabidopsis* (Jin et al., 2007; Huang et al., 2008; Vij and Tyagi, 2008). Leur mode d'action est inconnue mais les auteurs s'accordent à dire qu'ils sont impliqués dans la réponse aux stress abiotiques.

MtSAPI présente une homologie forte avec les gènes du riz et d'*Arabidopsis* ainsi qu'avec les gènes humains et murins ZNF216 et AWP1. La région 5' non codante a révélé la présence de séquences de régulation de type ANAEROBIC RESPONSE ELEMENT et ABRE-related, qui correspondent à la modulation de l'expression via l'hypoxie et l'ABA respectivement. Les tests effectués ont montré que les transcrits du gène et la protéine étaient effectivement accumulés en réponse à ces conditions.

Dans la graine, l'expression du gène augmente au début de la phase de dessiccation et atteint son maximum dans la graine sèche. En conditions normales sur l'eau, le nombre de transcrits diminue au cours de la germination pour atteindre un niveau faible au moment de la percée de la radicule. L'ABA, qui inhibe la germination, stimule l'expression du gène et l'accumulation de la protéine alors que l'ACC et le GA, hormones favorisant la germination, n'ont pas d'effet. *MtSAPI* est surexprimé en présence d'ABA et dans des conditions hypoxiques mais également en cas de déshydratation de la graine préalablement imbibée.

Nous avons émis l'hypothèse que *MtSAPI* exercerait un contrôle dans la physiologie de la germination. L'ensemble des résultats obtenus suggèrent que *MtSAPI* possède plutôt un rôle dans les tissus embryonnaires durant la déshydratation et la survie à l'état sec, peut-être pour la résistance à la faible oxygénation. Le rôle précis de ce gène demeure inconnu. Le chapitre suivant présente l'étude fonctionnelle qui a été réalisée sur *MtSAPI*.

Chapitre 2

Recherche de la fonction de *MtSAP1* : transgénèse et interaction protéine-protéine en système double-hybride

2.1-Introduction

Nous avons vu dans le chapitre précédent que le gène *MtSAP1* code pour une protéine possédant deux domaines d'interaction de type « doigt de zinc » A20 et AN1.

Le domaine A20 a été nommé d'après la protéine mammalienne A20 qui présente sept domaines en doigt de zinc identiques (domaines A20). Le rôle de la protéine A20 et des autres protéines présentant des domaines identiques est bien documenté chez les mammifères. Chez les plantes, peu de travaux ont été publiés. Elles concernent les gènes *SAP* chez le riz et leurs homologues chez *Arabidopsis* (Mukhopadhyay et al., 2004; Vij and Tyagi, 2006; Huang et al., 2008; Kanneganti and Gupta, 2008; Vij and Tyagi, 2008). Les gènes *SAP* du riz sont associés à la réponse à des stress abiotiques. La surexpression de *osiSAP1* dans des tabac transgéniques confère une résistance accrue aux stress hydrique, salins et froid (Mukhopadhyay et al., 2004). La surexpression de *osSAP8* chez le tabac et le riz, ainsi que de *ZFP177* (un autre gène du riz du type A20/AN1) chez le tabac a donné des résultats similaires (Huang et al., 2008; Kanneganti and Gupta, 2008).

Le gène *MtSAP1* est fortement induit dans les axes embryonnaires de graines de *Medicago truncatula* après 28 JAP, ce qui correspond à la fin du stade de remplissage, avant le début de la dessiccation. Lorsque les graines sont imbibées, le nombre de transcrits diminue fortement. Dans les axes embryonnaires de graines imbibées, l'expression du gène *MtSAP1* est induite *de novo* par le traitement à l'acide abscissique et par les conditions hypoxiques, les autres stress n'ayant que peu d'effet. Néanmoins, une déshydratation totale de la graine pré-imbibée réactive l'expression du gène. La fonction exacte des protéines *SAP* n'est pas connue. La structure en doigts de zinc suppose une liaison probable à l'ADN. Cependant, aucune protéine *SAP* ne possède de domaine de signalisation nucléaire. De fait, *ZFP177* et *osiSAP8* se sont révélées cytoplasmiques (Huang et al., 2008; Kanneganti and Gupta, 2008). Leur mode d'action se fait alors très probablement via une interaction protéine-protéine, comme c'est le cas pour *ZNF216* et *AWP1*.

L'étude des phénotypes associés à la surexpression ou à l'altération des gènes est une étape importante de l'étude fonctionnelle. La surexpression d'un gène se fait en général par transformation de l'espèce considérée avec une construction dans laquelle le gène est cloné derrière un promoteur fort, constitutif ou non, le plus souvent le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (p35S). L'altération du gène peut être observée chez des mutants. Il est également possible de provoquer l'altération par ARN interférence (RNAi). Cette technique, qui est utilisée depuis une dizaine d'années, tire profit d'un système naturel

(microARN) impliqué dans la régulation de l'expression des gènes et la lutte contre les virus. Dans ce système, un ARN double brin correspondant à la séquence cible est pris en charge par une enzyme de type RNase-II appelée Dicer (« éminceuse ») qui clive l'ARN double brin en fragments de 21 ou 24 nucléotides. L'un des brins de 21 nucléotides est chargé dans le complexe AGO-RISC (RNA-Induced Silencing Complexes dont la protéine ARGONAUTE est le composant majeur). Le complexe est guidé puis se fixe sur l'ARN cible complémentaire qui est dégradé. Les ARNs cibles ne peuvent donc pas être traduits en protéines. L'autre fragment généré par l'enzyme Dicer, quant à lui, est responsable de la méthylation de l'ADN et des histones au niveau du gène codant, conduisant à l'inhibition de la transcription (Brodersen and Voinnet, 2006). L'extinction du gène a donc lieu à deux niveaux : transcriptionnel et post-transcriptionnel. En transgénèse, pour générer un ARN double brin correspondant au gène, la stratégie couramment utilisée est le clonage en répétition inversées de la séquence cible, séparées par un intron. Lorsque la construction est transcrite dans les cellules, l'ARN s'apparie au niveau des séquences identiques et l'intron forme une boucle. Cette structure est appelée hairpin RNA (ARN « en épingle à cheveux »).

Pour accéder à la fonction de la protéine, une autre stratégie possible est la recherche de partenaires d'interaction de la protéine pour laquelle il code. La méthode du double hybride a d'abord été mise au point chez *Saccharomyces cerevisiae* (Fields and Song, 1989) et utilise les propriétés de la protéine GAL4, facteur de transcription des gènes impliqués dans le métabolisme du galactose. Elle est également disponible dans un système bactérien, plus simple à manipuler.

L'objectif du travail présenté dans les sections suivantes était d'approfondir les connaissances du gène *MtSAP1*. Dans ce but, nous avons réalisé des constructions de surexpression et d'extinction du gène par RNAi qui ont servi pour transformer des plants de tabac et de *M. truncatula*. Nous avons également criblé une banque d'ADNc d'axes embryonnaires de graines sèches par la méthode de double hybride bactérien afin de mettre en évidence des partenaires d'interaction pour la protéine MtSAP1.

2-Matériel et Méthodes

2.1-Transgénèse

2.1.1-Matériel végétal

Les manipulations de transformation ont été réalisées sur l'espèce *Medicago truncatula* et *Nicotiana tabacum*. Pour *Medicago truncatula* le génotype Jemalong (J5) a été choisi pour sa capacité de régénération plus grande que Parragio, génotype servant aux études de germination. C'est le cultivar Xanthi qui a été utilisé pour *Nicotiana tabacum*.

2.1.2-Clonage

2.1.2.1-Construction RNAi

Le clonage de la construction RNAi a été effectué en insérant, de part et d'autre de l'intron CHS du vecteur pFGC5941, la séquence codante complète de *MtSAP1*. Les deux copies de la séquence sont en ordre 5'-3' inversé l'une par rapport à l'autre (fig 3.1A), permettant la formation d'une structure double-brin à la base du principe d'extinction par ARN interférence (RNAi) (Waterhouse et al., 1998). L'insertion des deux copies a été faite grâce aux extrémités cohésives de l'ADN obtenues par restriction.

La matrice ADN qui a été utilisée est un plasmide porteur de la séquence complète de *MtSAP1*. Le plasmide provient d'un clone de la banque soustractive SSH 6-23. La matrice (50 ng) a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces 1 et 2 ou 3 et 4 (voir annexe 3 et fig 3.1A), définies sur les extrémités de la séquence codante. Chacune comportait une extension correspondant à la séquence d'un site de restriction différent (amorce 1 : XbaI, amorce 2 : PacI, amorce 3 : AscI, amorce 4 : XhoI). Le programme utilisé est le suivant : 3 minutes à 94°C ; 35 fois (30 sec à 94°C, 45 sec à 60°C, 45 sec à 72°C) ; 10 minutes à 72°C. La qualité de l'amplification a été vérifiée sur gel d'agarose 1,5% et la quantité d'ADN dosée par spectrophotométrie (NanoDrop 2000c). Les produits de l'amplification ont été intégrés dans le vecteur pGemT easy (Promega) et la souche JM109 de la bactérie *E. coli* a été transformée par choc thermique avec le produit de la ligation en suivant les instructions du fabricant. Quatre colonies blanches positives, ayant *a priori* intégré le plasmide, ont été piquées sur les boîtes. Elles ont été testées par PCR pour l'insertion en utilisant les amorces 1 et 2 et le

programme décrit précédemment. Un clone positif en PCR a été retenu et remis en culture toute la nuit dans 5 mL de milieu LB liquide supplémenté avec 50 mg/L d'ampicilline. Le plasmide contenant la séquence amplifiée a été préparée à partir de la culture liquide en utilisant le kit E.Z.N.A.® Bacterial DNA Isolation (Omega Bio-Tek) puis dosée au spectromètre. L'insertion des versions « sens » et « antisens » de la séquence de *MtSAP1* dans le vecteur binaire pFGC5941 a été réalisée en deux étapes.

Première étape : clonage « antisens »

La première étape a consisté à intégrer la séquence de *MtSAP1* dite « antisens » (fig 3.1A) au niveau des sites de restriction des enzymes *AscI* et *XhoI* du vecteur pFGC5941. La linéarisation du vecteur et la libération de l'insert par digestion ont été réalisées en deux fois. Pour la première digestion, 1.6 µg de plasmides (pFGC5941 et pGemTeasy contenant l'insert) ont été digérés par l'enzyme *AscI* dans un volume final de 20 µL chacun durant 2 heures à 37°C. Les produits de réaction ont été purifiés sur colonne Qiaquick (Qiagen) et repris dans 30 µL d'eau ultrapure. La totalité des volumes de reprise ont été utilisés pour la seconde réaction de digestion par l'enzyme *XhoI* dans un volume final de 40 µL durant 2 heures à 37°C. Le produit de digestion du vecteur pFGC5941 a été purifié sur colonne Qiaquick. Le produit de digestion de l'insert a été déposé sur gel d'agarose 1% et l'insert a été séparé du vecteur par électrophorèse. La bande de gel contenant l'insert a été découpée et l'insert purifié en utilisant le kit d'extraction de gel Qiaquick (Qiagen). Les échantillons ont été concentrés par précipitation dans 1 volume d'éthanol 96% en présence d'acétate de sodium à 150 mM toute la nuit à 4°C puis repris dans 5 µL d'eau ultrapure. Les quantités de vecteur linéaire et d'insert ont été évaluées par spectrophotométrie. L'insertion de la séquence de *MtSAP1* dans le vecteur pFGC5941 a été réalisée en utilisant en rapport molaire insert/vecteur de 5 en présence de T4 DNA ligase dans un volume réactionnel de 10 µL durant 72 heures à 16°C. La souche DH5α de *E. coli* a été transformée par choc thermique avec la totalité du volume réactionnel. Les colonies ont été sélectionnées sur milieu LB gélosé supplémenté avec 50 mg/L de kanamycine. Parmi les 30 colonies, dix ont été retenues et mises en culture toute la nuit à 37°C dans 5 mL de milieu LB liquide supplémenté avec 50 mg/L de kanamycine. Les plasmides de ces dix colonies ont été purifiés à partir des cultures avec le kit E.Z.N.A.® Bacterial DNA Isolation (Omega Bio-Tek). L'insertion de la séquence de *MtSAP1* a été vérifiée par amplification PCR des plasmides en utilisant les amorces spécifiques de l'insert et

le programme décrit précédemment. Un des plasmides contenant l'insert a servi de matrice pour la seconde étape du clonage.

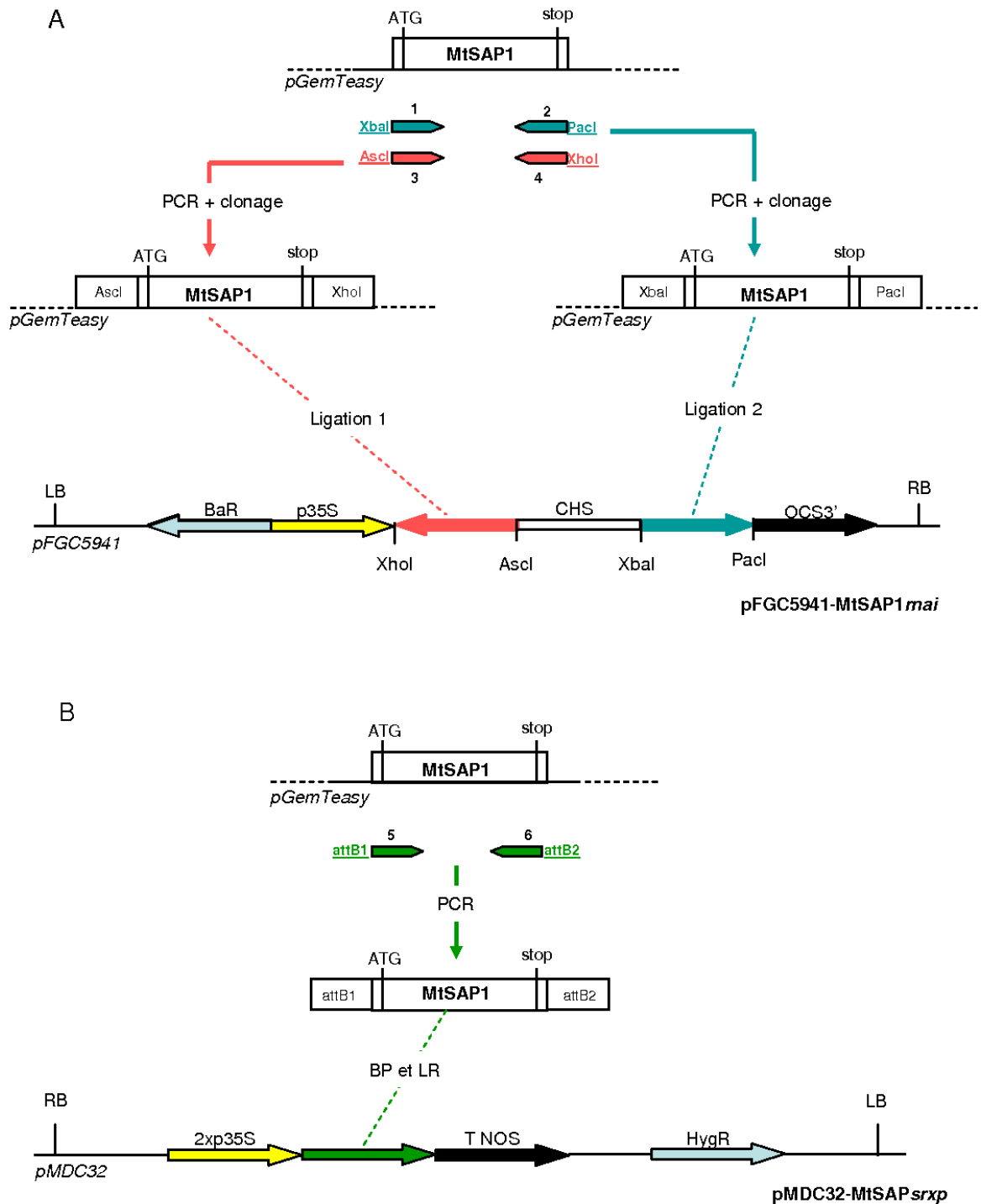


Figure 3.1 Schéma de clonage. (a) Construction pFGC5941-MtSAP mai et (b) pMDC32-MtSAP1 $srxp$ (B). BaR : résistance au Basta ; (2x)p35S : (2x) promoteur 35S ; CHS : intron CHS ; OCS 3' : terminateur de l'octopine synthase ; T NOS ; terminateur de la nopaline synthase ; HygR : résistance à l'hygromycine ; LB : left border (bordure gauche) ; RB (right border (bordure droite))

Seconde étape : clonage « sens »

La seconde étape a consisté à intégrer la séquence de *MtSAPI* dite « sens » (fig 3.1A) au niveau des sites de restriction des enzymes PacI et XbaI du vecteur pFGC5941 contenant déjà la version « antisens » de *MtSAPI*. La linéarisation du vecteur et la libération de l'insert ont, là aussi, été réalisées en deux étapes. Pour la préparation du vecteur, le procédé utilisé est identique au précédent. Pour la préparation de l'insert, des modifications ont été apportées. Tout d'abord, pour limiter les pertes, le produit de la première digestion par AscI n'a pas été purifié. La première enzyme a toutefois été dénaturée à 65°C durant 10 minutes avant la seconde digestion. L'insert n'a pas été séparé du vecteur pGemTeasy et le produit de la seconde digestion a été purifié avec 1 volume de phénol/chloroforme. La phase aqueuse a été lavée avec 1 volume de chloroforme/alcool isoamylique puis précipité dans 1 volume d'éthanol 96% en présence de 150 mM d'acétate de sodium toute la nuit à -20°C. L'insertion de la séquence « sens » de *MtSAPI* a été effectuée en mettant en présence, avec la T4 DNA ligase, le vecteur linéaire contenant la version « antisens » et le produit de digestion XbaI/pacI purifié en respectant un rapport molaire insert/vecteur de 5. La réaction a été réalisée dans un volume de 10 µL durant 72 heures à 16°C. La souche DH5α de *E. coli* a été transformée par choc thermique avec la totalité du volume réactionnel. Les colonies ont été sélectionnées sur milieu LB gélosé supplémenté avec 50 mg/L de kanamycine. Parmi les 438 colonies, vingt ont été retenues et mises en culture toute la nuit à 37°C dans 5 mL de milieu LB liquide supplémenté avec 50 mg/L de kanamycine. Les plasmides de ces vingt colonies ont été purifiés à partir des cultures avec le kit E.Z.N.A.® Bacterial DNA Isolation (Omega Bio-Tek). Les 20 colonies ont été criblées pour l'insertion de la séquence de *MtSAPI* par digestion de 1 µL de plasmide avec l'enzyme HindIII dans un volume final de 10 µL durant 1 heure à 37°C. Lorsque l'insertion avait effectivement eu lieu, la taille attendue du fragment digéré était plus importante, ce qui a permis de retenir un clone. L'insertion dans le plasmide des deux versions « sens » et « antisens » de *MtSAPI* a été vérifiée d'abord par PCR en utilisant les amorces 2 et 4 spécifiques des séquences les plus externes (fig 3.1A) et le programme décrit précédemment. Une deuxième vérification a été effectuée puis par digestion en utilisant les enzymes combinées XhoI+AscI et XbaI+PacI (fragments clonés) et XhoI+PacI (retrait des deux fragments plus l'intron CHS).

2.1.2.2-Construction de surexpression

La construction de surexpression de *MtSAP1* a été obtenue par clonage de la séquence codante complète dans le vecteur pMDC32. Contrairement à la première construction, le clonage a été réalisé grâce à la technologie Gateway®.

La matrice ADN qui a été utilisée est la même que pour la première construction. La séquence codante de *MtSAP1* a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces 5 et 6, spécifiques des extrémités de la séquence, et comportant des extensions *attB* (fig 3.1B et annexe 3). Ces extensions permettent la recombinaison homologue à la base de la technologie Gateway. Le programme qui a été utilisé est le suivant : 2 minutes à 94°C ; 25 fois (30 s à 94°C, 45 s à 62°C, 30 s à 72°C) ; 10 minutes à 72°C. Les amplicons ont été purifiés sur colonne Qiaquick et dosés au spectrophotomètre. Pour la première réaction de clonage (réaction BP), 100 ng de produit de PCR et 150 ng de plasmide pDONR207 ont été utilisés. Le mélange a été incubé 1 heure à 25°C, puis l'enzyme a été inactivée par ajout de protéinase K durant 10 minutes à 37°C. Une aliquote de 2 µL de produit de la réaction BP a servi pour transformer la souche DH5α de *E. coli* par choc thermique. Les bactéries ont été étalées sur un milieu LB gélosé supplémenté avec 20 mg/L de gentamycine. Quatre colonies ont été piquées et testées par PCR en utilisant les amorces 5 et 6 et le programme correspondant. Un des clones a été mis en culture dans 5 mL de LB liquide supplémenté avec 20 mg/L de gentamycine durant toute la nuit à 37°C. L'ADN plasmidique de ce clone a été préparé avec le kit E.Z.N.A.® Bacterial DNA Isolation (Omega Bio-Tek) et la quantité évaluée par spectrométrie. Pour la seconde réaction de clonage (réaction LR), 160 ng de produit de PCR et 600 ng de plasmide pMDC32 ont été utilisés. Les conditions d'incubation et de transformation bactérienne sont identiques à celles de la réaction BP, hormis l'antibiotique de sélection (ici : kanamycine, 50 mg/L). La vérification par PCR de l'insertion du fragment dans le vecteur était également identique.

2.1.3-Transformation des agrobactéries

Des bactéries compétentes de la souche EHA105 d'*Agrobacterium tumefaciens* ont été transformées avec les deux constructions pFGC5941-MtSAP1*rnai* et pMDC32-MtSAP1*srex*p. Un microgramme de chaque plasmide a été mis en présence des bactéries durant 5 minutes dans la glace en tube de culture de 14 mL. Les tubes ont ensuite été plongés 5 minutes dans l'azote liquide puis 5 minutes à 37°C. Les bactéries ont été incubées 2 heures à 28°C et à 100 rpm dans 1 mL de milieu LB liquide. Elles ont ensuite été étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB gélosé supplémenté avec 50 mg/L de kanamycine puis

incubées à 30°C durant 72 heures. Quatre colonies ont été piquées et testées par PCR en utilisant les amorces 2 et 4 pour le plasmide pFGC5941-MtSAP1*rnai* et 5 et 6 pour le plasmide pMDC32-MtSAP1*srexp*, en suivant les programmes correspondants aux couples d'amorces. Pour chaque plasmide, une colonie positive a été retenue pour la transformation végétale.

2.1.4-Transformation végétale

2.1.4.1-Transformation de *M. truncatula*

Le protocole utilisé a été adapté des travaux de Hélène Javot et Maria J. Harrison (*Medicago truncatula* HandBook, Mars 2007). La technique de transformation est basée sur l'organogénèse, c'est-à-dire le développement de bourgeons à partir d'une ou plusieurs cellules de cal qui est obtenu à partir des tissus du méristème apical des axes embryonnaires.

Afin d'homogénéiser la germination, un lot de graines de *M. truncatula* cv Jemalong (J5) ont été pré-hydratées durant 5 heures à 21°C dans de l'eau distillée puis séchées à l'air libre durant 72 heures (« amorçage »). Elles ont ensuite été décontaminées 3 minutes dans l'hypochlorite de sodium à 3% puis rincées 8 fois à l'eau stérile et placées sur milieu M1 (voir annexe 1) à 22°C et à l'obscurité. Après 3 jours, les plantules ont été placées à la lumière (photopériode 16/8) dans les mêmes conditions de température durant 2 jours.

En parallèle, les deux clones d'*Agrobacterium* portant les constructions pFGC5941-MtSAP1*rnai* et pMDC32-MtSAP1*srexp* ont été placées en pré-culture dans 2 mL de LB liquide supplémenté avec 50 mg/L de kanamycine et 25 mg/L de rifampicine à 30°C à 100 rpm durant une nuit. Chaque pré-culture a servi à ensemercer 2 x 25 mL de LB liquide supplémenté avec 50 mg/L kanamycine et 25mg/L de rifampicine. Les cultures ont ensuite été placées à 30°C et 150 rpm jusqu'à obtenir 0.3 de densité optique à 600 nm. Les bactéries ont été culottées par centrifugation à 4 000 rpm durant 10 minutes et reprises dans 2 x 20 mL de milieu M2a liquide (voir annexe 1). Ces solutions ont été utilisées pour l'infection des explants.

Les plantules destinées à la transformation ont été placées dans la solution de M2a liquide contenant les agrobactéries porteuses des plasmides pFGC5941-MtSAP1*rnai* et pMDC32-MtSAP1*srexp* puis disséquées. La dissection a consisté à inciser la plantule dans le plan sagittal de manière à séparer les deux cotylédons et sectionner le méristème apical. La racine et la majeure partie des cotylédons ont été retirées et les explants ont été placés sur le

milieu M2a gélosé (voir annexe 1) à 23°C en conditions lumineuses durant 3 jours. Ceci permet la colonisation des tissus par les bactéries et l'insertion des constructions dans le génome de végétal. Après cela, les explants ont été rincés à l'eau stérile et égouttés sur du papier Whatman stérile et placés sur le milieu de régénération M2r (voir annexe 1) supplémenté avec 400 mg/L d'Augmentin (amoxicilline/acide clavulanique 1g/200mg). Les explants ont été transférés sur un milieu de régénération neuf tous les 10 jours environ jusqu'à ce que les bourgeons soient bien développés. Les bourgeons ont été excisés du reste de l'explant et placés sur le milieu de culture M3 (voir annexe 1) qui permet la sélection des tissus végétaux effectivement transformés et la croissance des tiges. La construction MtSAP1*rna*i confère à la plante la résistance à la phosphinotricine (Basta) et la construction MtSAP1*srex*p la résistance à l'hygromycine. Les concentrations utilisées étaient de 1 g/L pour la phosphinotricine et de 15 mg/L pour l'hygromycine. Afin d'éviter la prolifération d'agrobactéries résiduelles, la pression de sélection a été maintenue dans le milieu avec 400 mg/L d'Augmentin. Lorsque les tiges ont été bien développées (au moins 2 cm) les explants ont été placés sur un milieu d'enracinement M4 (voir annexe 1) supplémenté avec 400 mg/L d'Augmentin mais sans sélection végétale pour favoriser la croissance. Lorsque les racines ont été suffisamment développées pour subvenir à la nutrition hydrique et minérale, les plants ont été acclimatés.

Afin d'éviter la prolifération de champignons sur des éventuels résidus de milieu de culture, les racines ont été soigneusement lavées après leur retrait du milieu M4. Les plants ont été mis en pot dans du terreau humidifié et l'ensemble a été placé en mini-serre dans les chambres de culture. Ceci garantit une forte humidité ambiante dans les premiers jours d'acclimatation. Après trois jours, les mini-serres ont été progressivement ouvertes puis retirées. La culture en chambre climatique des plantes transformées a duré environ 3 mois jusqu'à la fin du cycle vital.

2.1.4.2-Transformation de *N. tabacum*

La préparation du clone d'Agrobacterium portant la construction pMDC32-MtSAP1*srex*p a été faite de la même manière que pour la transformation de Medicago (pré-culture et culture). Après culottage, les bactéries ont été reprises dans du milieu de co-culture (voir annexe 2).

Les feuilles des tabacs propagés en culture *in vitro* sur du milieu MS ont été excisées. Elles ont été découpées en fragments d'environ 5 mm de côté en présence des agrobactéries

en solution dans le milieu de co-culture. Une manipulation témoin a été réalisée en découpant les feuilles dans du milieu de co-culture sans bactérie. L'ensemble a été placé en boîte de Pétri à l'obscurité à 90 rpm et 22°C durant 72 heures. Les fragments de feuilles ont ensuite été lavés dans l'eau stérile. L'excédent de liquide a été absorbé sur du papier Whatman stérile avant de placer les fragments sur le milieu de sélection (voir annexe 2) contenant 10, 20, 35 ou 50 mg/L d'hygromycine. Les explants ont été transférés sur du milieu neuf tous les dix jours environ. Lorsque les bourgeons ont été suffisamment développés, ils ont été séparés des cals et cultivés à part. Les plantules ont été acclimatées lorsque leurs racines ont été bien développées. Le protocole d'acclimatation et de culture des plants transgéniques a été identique à celui utilisé pour *Medicago*.

2.1.5-Étude de la génération T1

Les gousses des plants de *Medicago* transformés ont été récoltées à leur maturité mais avant déhiscence afin de repérer leur provenance (plante-mère) et stockées à l'air libre durant 4 mois. Les gousses ont été décortiquées à la main afin d'isoler les graines. Pour l'étude de la masse, 10 pesées ont été effectuées avec 5 graines prises au hasard dans le lot de la génération T1. Des pesées identiques ont été effectuées avec les graines du lot sauvage (J5) comme témoin. A la date de rédaction de ce manuscrit, les plants de tabac étaient toujours en culture et les capsules en cours de récolte.

2.2-Banque de double hybride bactérien

Pour le double hybride bactérien, le kit BacterioMatch® II Two-Hybrid System Library Construction (Stratagene) a été utilisé. Ce kit a été développé et affiné d'après les travaux de Dove, Joung, Hochschild et Pabo (Dove et al., 1997; Dove and Hochschild, 1998; Joung et al., 2000). Il permet de détecter des interactions protéine-protéine grâce à l'activation transcriptionnelle d'un gène qui complémente une mutation métabolique. La protéine d'intérêt (ici MtSAP1) est fusionnée à une protéine du bactériophage lambda (λ cI) (fig 3.2). La cible (l'ADNc de la banque) est fusionnée au domaine N-terminal de la sous-unité α de l'ARNpolymérase (fig 3.2). Via le domaine de fixation à l'ADN de la protéine λ cI, la protéine fusion λ Ci-MtSAP1 se fixe sur l'opérateur λ qui se trouve en amont du gène rapporteur *HIS3* (fig 3.2). Lorsque la cible interagit avec MtSAP1, L'ARN polymérase est recrutée, stabilisée sur le promoteur et active la transcription du gène rapporteur (fig 3.2). En aval du gène *HIS3*,

le gène *aadA* permet une sélection complémentaire en conférant la résistance à la streptomycine. Le gène *HIS3* code pour une protéine de la voie de biosynthèse de l'histidine et complète la mutation *hisB* de la souche rapporteuse utilisée. En absence d'interaction, le gène *HIS3* est transcrit à un faible niveau, permettant la croissance de la souche sur un milieu minimum en absence d'histidine. Le 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole) est un inhibiteur compétitif du produit du gène *HIS3*. Sur un milieu minimum sans histidine contenant du 3-AT, la souche rapporteuse mutante est incapable de pousser. Lorsqu'il y a interaction protéine-protéine entre MtSAP1 et la cible, le gène *HIS3* est transcrit et la biosynthèse de l'histidine est possible. Les bactéries peuvent alors vivre et se multiplier.

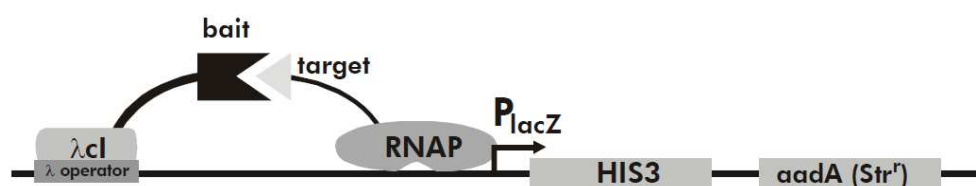


Figure 3.2 : Schéma du système double reporter du BacterioMatch® II Two-Hybrid System. Bait (appât) représente MtSAP1 et Target (cible) l'ADNc de la banque.

Un schéma général du clonage et du criblage de la banque de double-hybride est représenté sur la figure 3.3. Pour faciliter la lecture, les étapes du protocole ne seront pas décrites de manière détaillée. Pour de plus amples informations, le protocole est disponible en ligne (www.stratagene.com/manuals/200414.pdf).

2.2.1-Réalisation de la construction λ cl-MtSAP1

La totalité de la séquence codante de *MtSAP1* a été amplifiée par PCR. Les amorces utilisées (7 et 8 voir annexe 3) ont été dessinées pour que le cadre de lecture de *MtSAP1* soit en phase avec celle de λ cl. Elles comportaient des extensions qui permettent l'insertion dans le vecteur pBT au niveau des sites de restriction XhoI et NotI. La matrice ADN qui a été utilisée est la même que pour les étapes de clonage décrites précédemment. Le programme qui a été suivi est le suivant : 5 fois (30 sec à 94°C, 30 sec à 55°C, 30 sec à 72°C) ; 30 fois (30 sec à 94°C, 30 sec à 62°C, 30 sec à 72°C) ; 10 minutes à 72°C. L'amplification a été vérifiée sur un gel d'agarose à 1% et l'amplicon purifié sur colonne Qiaquick (Qiagen). Un microlitre de produit de PCR a été utilisé pour l'intégration dans le vecteur pGemTeasy (Promega) selon le protocole établi par le fabricant. La souche JM109 de *E. coli* a été transformée par choc

thermique avec le produit de la ligation. Une aliquote de 200 μ L a été étalé sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB gélosé supplémenté avec 100 mg/L d'ampicilline, 40 μ g/mL d'Xgal et 0.1 mM d'IPTG. Les bactéries ont été incubées une nuit à 37°C. Cinq colonies blanches positives, ayant *a priori* intégré le plasmide ont été piquées sur la boîte. Elles ont été testées par PCR pour l'insertion en utilisant les amorces 7 et 8 et le programme suivant : 25 fois (30 s à 94°C, 30 s à 62°C, 30 s à 72°C) ; 10 minutes à 72°C . Un clone positif en PCR a été retenu et remis en culture toute la nuit dans 5 mL de milieu LB liquide supplémenté avec 50 mg/L d'ampicilline. Le plasmide contenant la séquence amplifiée a été préparée à partir de la culture liquide en utilisant le kit E.Z.N.A.® Bacterial DNA Isolation (Omega Bio-Tek) puis dosée au spectrophotomètre.

En parallèle, le plasmide pBT vide a été préparé à partir de culture de la souche XL1-blue de *E. coli*. La souche a été placée dans 10 mL de milieu LB liquide supplémenté avec 25 mg/L de chloramphénicol et 50 mg/L de kanamycine. Le plasmide pBT étant présent en faible nombre de copies dans les bactéries, le protocole du kit E.Z.N.A.® Bacterial DNA Isolation (Omega Bio-Tek) a été adapté en doublant les volumes des trois premiers tampons. Le plasmide purifié a été dosé au spectrophotomètre.

Le plasmide (3 μ g) a été digéré par les enzymes XhoI et NotI simultanément durant 3 heures à 37°C dans un volume final de 20 μ L. L'insert représentant la séquence de *MtSAP1* a été purifiée sur un gel d'agarose à 1% en utilisant le kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) puis dosé au spectromètre. Conformément au protocole, 2 μ g de plasmide pBT ont été digérés par XhoI et NotI dans un volume final de 50 μ L durant 3 heures à 37°C. Le fragment de *MtSAP1* a été inséré dans le vecteur pBT. La construction a été amplifiée dans la souche de bactérie XL1-blue puis vérifiée par PCR. Elle a été utilisée pour transformer la souche rapporteuse et l'expression correcte de la protéine fusion a été vérifiée par western blotting en utilisant un anticorps spécifique de λ C1.

Pour que le criblage des cibles soit possible, l'absence d'activation du gène *HIS3* par l'intégration de la séquence de *MtSAP1* (auto-activation) a dû être vérifiée. Pour cela, une souche bactérienne spécifique dite « de validation » a été co-transformée avec le plasmide pBT contenant *MtSAP1* et le plasmide pTRG vide. Le plasmide pTRG est destiné à l'intégration des cibles du criblage. Après la co-transformation, un nombre limité (inférieur à 0.1%) de bactéries devait être capable de croître sur un milieu minimum supplémenté avec le 3-AT.

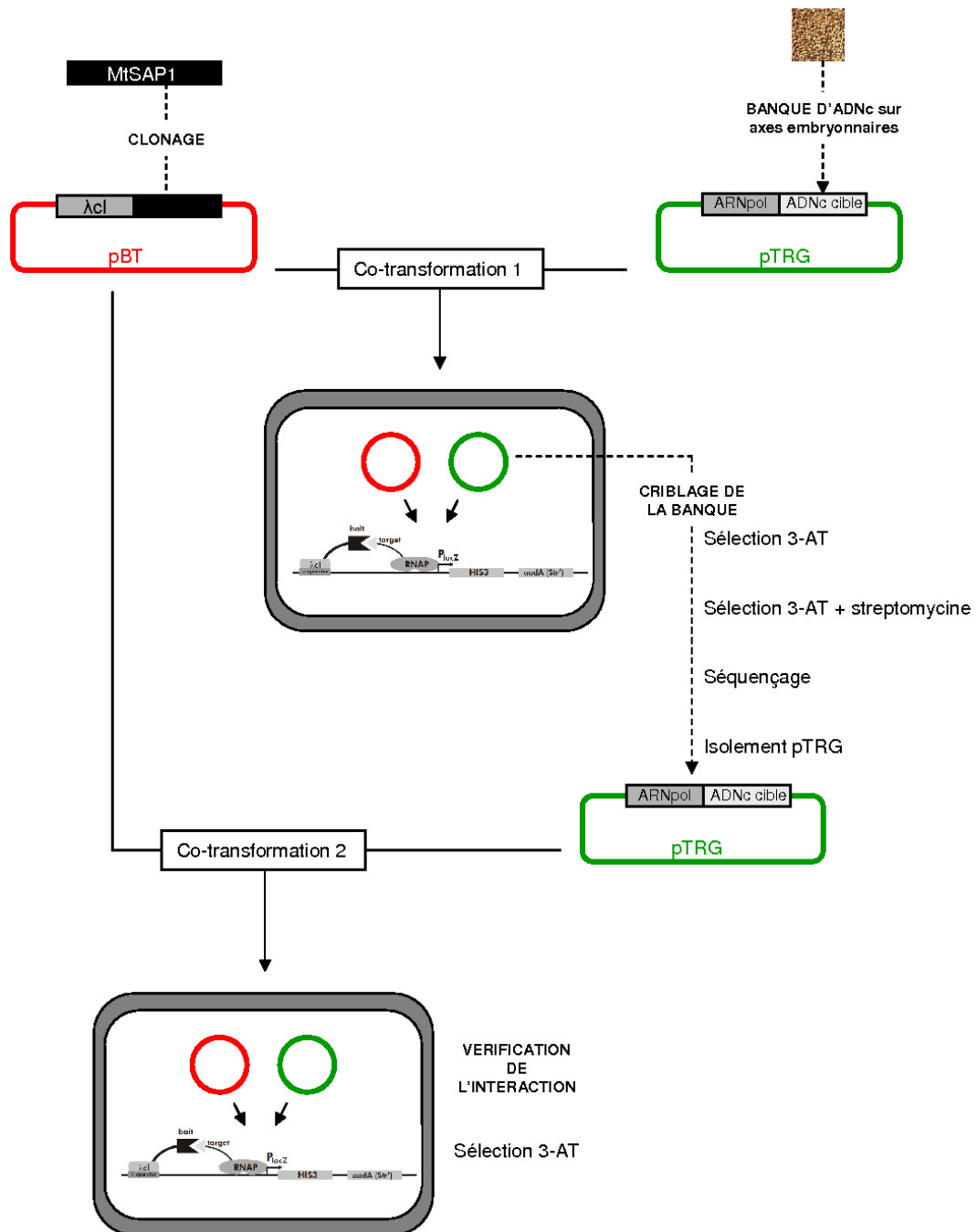


Figure 3.3 : Schéma général de la méthode du double-hybride bactérien. Les sections indiquées en majuscules correspondent aux étapes détaillées dans le texte

2.2.2-Construction de la banque d'ADNc

Les ARNm qui ont été utilisés provenaient des axes embryonnaires de graines de *Medicago truncatula* durant la phase de quiescence (graines sèches). Ce stade a été choisi car il correspond à l'accumulation maximale des transcrits de *MtSAP1*. Trois cent graines sèches du génotype Parragio ont été disséquées et les axes embryonnaires ont été isolés des

cotylédons, des enveloppes et de l'albumen. Les axes embryonnaires ont été broyés au mortier dans l'azote liquide et les ARN totaux ont été isolés au Tri Reagent® (Ambion) en suivant les indications du fabricant. Les ARNm ont été purifiés à partir des ARN totaux grâce au kit PolyAtract® mRNA Isolation System III (Promega). Les ARNm ont été précipités dans un volume d'isopropanol en présence de 150 mM d'acétate de sodium toute une nuit à -20°C, puis culottés par centrifugation à 4°C et 14 000 rpm. Le culot obtenu a été lavé à l'éthanol 75%, puis séché et repris dans un volume de 8 µL d'eau ultrapure traitée au DEPC (diethylpyrocarbonate). Avant la rétro-transcription, les ARNm ont été dénaturés 3 minutes à 70°C. L'amorce qui a été utilisée est un fragment poly(dT) qui s'apparie à la queue polyadénylée des ARNm et qui présente une extension correspondant à la séquence du site de restriction XhoI. Le premier brin synthétisé est méthylé grâce à l'intégration de 5-methyl dCTP. Après la synthèse du second brin (non méthylé), et le remplissage des extrémités cohésives, des adaptateurs comportant le site de restriction de l'enzyme EcoRI ont été ajoutés. L'ADNc a ensuite été digéré par l'enzyme XhoI ; l'état hémiméthylé de l'ADNc le protégeant de l'action de l'enzyme au niveau d'éventuels sites de restriction de XhoI. Les ADNc ont ensuite été passés sur une colonne de Sépharose® afin de séparer les fragments en fonction de leur taille. Les plus grands ont été conservés et intégrés dans le vecteur pTRG. Après l'intégration, les plasmides ont été amplifiés dans des bactéries de la souche XL1-blue. Ils ont ensuite été préparés à partir de 30 mL de bactéries récoltées sur les boîtes de Pétri en utilisant le kit E.Z.N.A.® Plasmid Maxiprep.

2.2.3-Criblage de la banque d'ADNc

Les bactéries rapporteuses ont été co-transformées avec le plasmide pBT-MtSAP1 et un des plasmides cibles (qui portent les ADNc représentant la population d'ARNm présents dans la graine sèche) (fig 3.3). Le protocole de Statagene a été modifié à cette étape en raison des mauvais résultats observés lors d'une précédente manipulation. Après la co-transformation, au lieu d'être étalées directement sur le milieu sélectif, les bactéries ont été sélectionnées sur un milieu riche (LB) contenant de la tetracycline et du chloramphénicol. Ces antibiotiques sélectionnent les bactéries portant les deux plasmides : le pBT (résistance au chloramphénicol) et le pTRG (résistance à la tetracycline). Toutes les colonies ayant poussé ont été repiquées sur un milieu minimum supplémenté avec 5 mM de 3-AT (fig 3.3). Les colonies positives, correspondant à une interaction, ont été repiquées et passées sur un

deuxième milieu supplémenté avec le 3-AT et la streptomycine (fig 3.3). Après cette deuxième étape de sélection, les plasmides des colonies positives ont été séquencés (fig 3.3).

2.2.4-Vérification de l'interaction

Pour les clones portant des séquences intéressantes sur le plan physiologique, l'interaction entre la protéine MtSAP1 et la protéine cible a été vérifiée. Ceci a été réalisé en transformant à nouveau des bactéries rapporteuses (fig 3.3). Pour isoler le plasmide pTRG contenant la cible, les colonies positives (portant les deux plasmides pBT+MtSAP1 et pTRG+cible) ont été mises en culture liquide dans un milieu contenant uniquement la tetracycline. Ces conditions maintiennent la pression de sélection sur les bactéries pour qu'elles conservent le plasmide pTRG et permettent la perte du plasmide pBT. Les plasmides ont été préparés en utilisant le kit E.Z.N.A.® Bacterial DNA Isolation. La perte effective de pBT a été vérifiée en transformant à nouveau la souche XL1-blue. Les colonies sélectionnées sur la tetracycline ont été repiquées sur un milieu supplémenté avec du chloramphénicol pour vérifier leur sensibilité à cet antibiotique et donc la perte effective du plasmide pBT. A partir de ces colonies, les plasmides ont été purifiés (fig 3.3) et ont été utilisés pour une nouvelle co-transformation (fig 3.3). Les colonies ont été sélectionnées sur un milieu supplémenté avec le 3-AT (fig 3.3).

3-Résultats

3.1-Transgénèse

3.1.1-Transgénèse de *Medicago truncatula*

Des plants de *Medicago truncatula* ont été transformés génétiquement avec deux types distincts de constructions : pFGC5941MtSAP1*rnai* et pMDC32MtSAP1*srxp*. L'insertion dans le génome de la construction pFGC5941MtSAP1*rnai* (extinction du gène *MtSAP1*) donne lieu à l'expression constitutive, sous le contrôle du promoteur 35S d'un hpRNA spécifique de la séquence du gène. Dans les plantes transformées, les transcrits du gène *MtSAP1* et la protéine correspondante sont donc absents. La construction pMDC32MtSAP1*srxp* (surexpression du gène *MtSAP1*) donne lieu à l'expression constitutive, sous le contrôle d'un double promoteur 35S de la séquence codante de *MtSAP1*. Les plantes transformées synthétisent alors de manière constitutive la protéine MtSAP1.

Il faut noter que l'expression constitutive et l'extinction du gène MtSAP1 n'est effective qu'*a priori*. En effet, s'agissant de la génération T0 obtenue par organogénèse, le risque d'individu mosaïque n'est pas nul. Les tests d'expression du gène n'ont pas été effectués sur ces individus. Les descriptions qui seront faites par la suite sont donc à prendre sous réserve que l'expression constitutive /extinction est effective.

Pour chacun des deux types de construction, 150 plantules ont été disséquées en 300 explants. Pour la manipulation d'extinction, 13 plantules issues d'explants différents ont été acclimatés et 7 ont accompli leur cycle vital avec floraison, fructification et production de graines. Pour la manipulation de surexpression, aucune plante n'a pu être régénérée. Au stade de la sélection, l'effet de l'hygromycine a été très important. Les bourgeons qui se sont développés présentaient une couleur vert pâle, de très petites feuilles blanchissant aux extrémités et des entre-nœuds réduits. La plupart ont nécrosé favorisant la prolifération des agrobacteries malgré l'augmentation de la concentration en Augmentin (jusqu'à 800 mg/L). Au stade de régénération, une plantule a formé des entre-nœuds réduits et des bourgeons qui tombaient rapidement avant de devenir vitreuse puis nécrotique.

Les 7 plantes transformées avec la construction d'extinction de *MtSAP1* présentaient un phénotype particulier qui a été observé de façon précoce après l'acclimatation en chambre

de culture. Les feuilles jaunissaient et tombaient très rapidement après l'acquisition de leur taille définitive. Les bourgeons axillaires ont rapidement séché et les tiges présentaient une lignification précoce. Le bourgeon apical et le développement des racines n'ont pas été affectés. Les plantes avaient un aspect global étioilé avec des rameaux portant des feuilles sénescentes sur la longueur et vertes à l'extrémité. Le cycle vital n'a pas été raccourci : les plantes ont vécu trois mois environ. La floraison n'a pas été affectée mais le nombre de fleurs a été limité car le dessèchement des bourgeons axillaires a conduit à une croissance végétative très faible. Pour la majorité, le développement des gousses s'est effectué de manière identique aux plantes sauvages. Au total, 40 gousses ont été récoltées qui contenaient en tout 237 graines (tab 3.1).

plante n°	1	2	3	4	5	6	7	TOTAL
nombre de gousses	3	4	8	1	5	10	9	40
nombre de graines	8	10	45	5	36	81	52	237

Tableau 3.1 : Nombre de gousses et de graines obtenues pour chaque plant de *M. truncatula* transformé avec la construction d'extinction.

Les gousses récoltées sur les plants transgéniques étaient plus petites, plus aplaties et présentaient des piquants moins volumineux que les gousses sauvages (fig 3.4a). La majorité (97%) des graines qu'elles contenaient étaient également plus petites et plus aplaties (fig 3.4b). Enfin, la mesure de la masse d'un lot de 5 graines de la génération T1 a révélé que les graines issues des plantes transformées avaient une masse moyenne 60% moins importante que dans le cas du témoin (fig 3.4c).

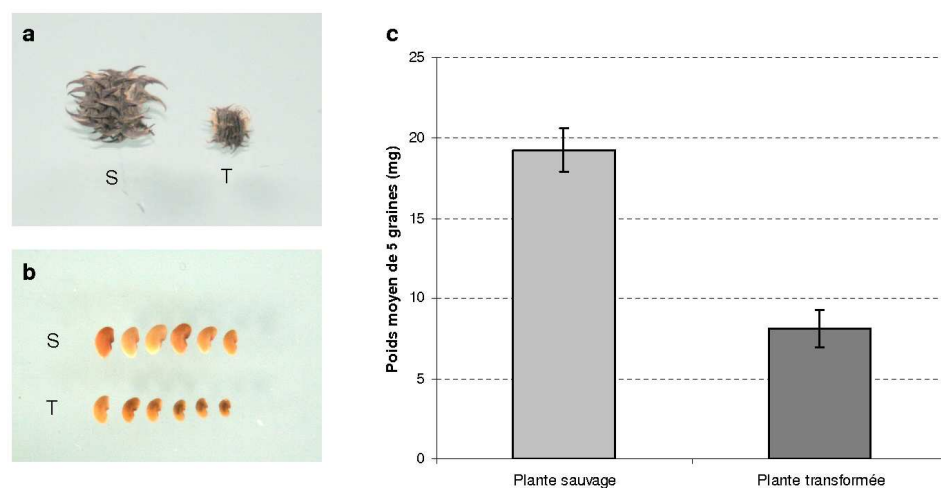


Figure 3.4 : Phénotype observé après transformation. (a) phénotype des gousses des plantes T0. (b) Phénotype des graines de la génération T1. (c) Différence de la masse de 5 graines entre le lot sauvage et le lot transformé. S : sauvage ; T : transformé. Déviation standard : n=10

3.1.2-Transgénèse de *Nicotiana tabacum*

La transformation de *Medicago truncatula* avec la construction pMDC32-MtSAP1*srxp* ayant échoué à plusieurs reprises, la transformation de plants de tabacs a été mise en œuvre. Le tabac est une espèce qui se prête aisément à la transformation génétique via *Agrobacterium tumefaciens* et sa régénération est rapide.

Les explants ont été préparés à partir de feuilles découpées en 240 fragments. Au cours de la phase de sélection, l'effet de l'hygromycine a, dans ce cas également, été très fort puisque 84% des explants ont été perdus. Ceci a été observé de manière homogène dans les quatre concentrations : cet effet n'est donc pas dose-dépendant. Finalement, 5 plantes transformées ont été acclimatées. Elles ont accompli la totalité de leur cycle vital avec floraison et production de graines. Leur phénotype était identique à celui des plants témoin non transformés.

3.2-Double-hybride bactérien

L'objectif du criblage de la banque d'ADNc de graines sèches par la méthode du double-hybride bactérien était de rechercher les cibles d'interaction de la protéine MtSAP1.

Sélection	Nombre de colonies	Tableau 3.2 : Nombre de colonies obtenues après chaque étape de sélection dans le système de double-hybride bactérien
Présence des deux plasmides	900	
Interaction : Transcription du gène <i>His3</i>	260	
Interaction : Transcription du gène <i>His3</i> et du gène de la résistance à la streptomycine	60 dont 43 séquences uniques	

Le tableau 3.2 résume les différentes étapes de sélection qui ont été effectuées et le nombre de colonies obtenues. Après l'étape de co-transformation, les bactéries ont été sélectionnées sur un milieu supplémenté avec les antibiotiques correspondant aux résistances conférées par les deux vecteurs. Neuf cents colonies ont poussé sur ce milieu et ont subi une deuxième étape de sélection par repiquage sur un milieu minimum supplémenté avec du 3-AT. Cette étape a permis de sélectionner 260 colonies positives, c'est-à-dire dont le gène *HIS3* est transcrit. La troisième étape de sélection (3-AT + streptomycine) a permis de retenir 60

clones. Ceux-ci ont tous été séquencés et correspondent à 43 séquences uniques qui sont présentées dans le tableau 3.3.

Les séquences ont été regroupées en 7 types selon leur fonction probable : cycle cellulaire (1 séquence), interaction protéine-protéine (3), métabolisme (8), process des protéines (8), réponse aux stress (8), stockage des réserves (4) ou fonction inconnue (11). Parmi ces séquences, nous avons choisi MBF (Multiple Protein Bridging Factor, TC101718, interaction protéine-protéine), DREB (Dehydration Responsive Element Binding Protein, TC95896, réponse aux stress), et HR (Hypoxia-Responsive family Protein, TC108106, réponse aux stress) pour poursuivre l'étude de l'interaction. Le choix de ces gènes a été motivé par leur fonction potentielle ou leur profil. L'interaction entre MtSAP1 et ces cibles dans le système double-hybride a été validé par la deuxième étape de co-transformation.

TC medicago	proteine déduite	fonction
TC106430	Putative DNA replication complex GINS protein PSF2	cycle cellulaire
TC95263	MtSAP1	interaction protéine-protéine
TC101718	Multiprotein Bridging Factor	interaction protéine-protéine
TC96103	Putative RING zinc finger protein	interaction protéine-protéine
TC104432	Aldolase-like reductase	métabolisme
TC109371	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	métabolisme
TC106518	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cytosolic	métabolisme
TC107246	Heterotrophic ferredoxin 2	métabolisme
TC94486	Omega-6 fatty acid desaturase	métabolisme
TC95599	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	métabolisme
TC107375	ribose-5-phosphate isomerase	métabolisme
TC106384	S-adenosyl methionine synthetase	métabolisme
TC100531	60 S ribosomal protein L 6	process des protéines
TC94313	60S ribosomal protein L19-1	process des protéines
TC107013	alpha NAC-like protein	process des protéines
TC106485	Elongation factor 1-alpha	process des protéines
TC94697	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	process des protéines
TC107685	Glutathione S-transferase GST 25	process des protéines
TC107079	Proteasome subunit beta type 2-1	process des protéines
TC106520	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 12	process des protéines
TC95896	Dehydration Responsive Element Binding Protein (DREB)	réponse aux stress
TC101014	Dehydrin	réponse aux stress
TC105834	Desiccation protective protein LEA 5	réponse aux stress
TC100455	HSP 20	réponse aux stress
TC100454	HSP 20	réponse aux stress
TC108106	Hypoxia-Responsive family protein	réponse aux stress
TC107774	PAP fibrillin	réponse aux stress
TC107158	PM25 homologue	réponse aux stress
TC100256	Conglutin	stockage des réserves
TC100252	Legumin A	stockage des réserves
TC100253	Legumin K	stockage des réserves
TC94332	Oleosin 3	stockage des réserves
BE941896	unknown	inconnue
BF521545	unknown - HYP 1 protein	inconnue
BQ122815	unknown - flagelliform silk protein	inconnue
TC101128	Uncharacterized protein	inconnue
TC107009	Uncharacterized protein	inconnue
TC108306	Uncharacterized protein	inconnue
TC108406	Uncharacterized protein	inconnue
TC109750	Little protein 1	inconnue
TC94279	Uncharacterized protein	inconnue
TC95781	Separation anxiety protein-like	inconnue
TC96359	Uncharacterized protein	inconnue

Tableau 3.3 : Identités des séquences interagissant avec MtSAP1 dans le système de double hybride bactérien.

4-Discussion

4.1-Les plantes transgéniques présentent un phénotype sénescence

Afin d'étudier la fonction du gène *MtSAPI* chez *Medicago truncatula*, nous avons régénéré des transformants génétiques dans lesquels le gène a été éteint ou surexprimé. Ceci a été effectué chez les espèces *Medicago truncatula* et *Nicotiana tabacum*.

Les résultats obtenus indiquent que l'extinction du gène *MtSAPI* exerce un effet sur le développement de l'appareil végétatif, des gousses et des graines. Les facteurs qui influencent la taille et le poids des graines chez les légumineuses sont le nombre de cellules cotylédonaire et les ressources en carbone et azote qui soutiennent l'accumulation des réserves (Munier-Jolain et al., 2008). Le nombre de cellules cotylédonaire est une conséquence de l'intensité de l'activité mitotique au cours des phases précoces de l'embryogénèse. Celle-ci est soumise à un contrôle strictement maternel (Weber et al., 2005) par la contrainte physique et/ou nutritionnelle exercée par les téguments. Les ressources en carbone et azote étaient probablement très réduites dans les plantes transgéniques. Les feuilles ayant une faible durée de vie, les assimilats photosynthétiques et la fourniture énergétique devaient être limités. Ceci explique le faible remplissage, probablement en cause dans la réduction de la masse des graines. L'effet de l'extinction de *MtSAPI* sur le volume et la masse des graines est donc, sans doute, une conséquence de l'effet qu'il exerce au sein de l'organisme maternel, et non dans l'embryon lui-même. Les informations concernant l'effet de l'extinction de *MtSAPI* sur le développement de la graine seront apportées par les tests de germination. Ceux-ci n'ont pas encore été effectués à la date de la rédaction de ce manuscrit. En effet, la dormance primaire influence la cinétique de germination et pourrait fausser les résultats des tests si elle n'est pas levée. Les graines seront donc stockées à 4°C durant plusieurs semaines avant de commencer les essais.

L'extinction du gène *MtSAPI* crée des conditions internes qui conduisent à une sénescence précoce de la plante. La sénescence est une réponse intégrée à des facteurs internes et externes. Les facteurs externes correspondent à tout stress biotique et abiotique. Les facteurs internes correspondent aux hormones cytokinines, éthylène, acide abscissique, jasmonates et acide salicylique. Toutes ont une action positive sur la sénescence sauf les cytokinines. Dans la littérature sont décrits des mutants ou transformants ayant un phénotype proche de celui observé chez les plants de *Medicago* dont le gène *MtSAPI* est éteint. Les mutants *old1* (onset of leaf death) présentent une sénescence précoce des feuilles et une

sensibilité accrue au traitement éthylène (Jing et al., 2002). Ceci est associée à un dérèglement de la balance redox, les cellules étant dans un état de stress oxydatif important (Jing et al., 2008). Le gène *OLD1* serait un régulateur négatif du signal éthylène. Le gène *osDOS* (*oryza sativa* Delay of the Onset of Senescence), qui code pour une protéine de type zinc-finger CCCH localisée dans le noyau, est un régulateur négatif du signal hormonal chez le riz. Son extinction par ARN interférence conduit à une sénescence précoce (Kong et al., 2006).

Les plants de tabac surexprimant le gène *MtSAP1* ne présentent pas de phénotype apparent. Chez *Nicotiana tabacum*, l'expression constitutive du gène *MtSAP1* n'engendre pas de dysfonctionnement nuisant au développement correct de la plante. Les études publiées montrent que les gènes de la famille SAP surexprimés chez le tabac n'occasionnaient pas de modification majeure du développement : les tabacs modifiés se montraient plus résistants que les témoins lors de stress hydrique, froid et salin (Mukhopadhyay et al., 2004; Kanneganti and Gupta, 2008) mais présentaient un aspect moins vigoureux dans des conditions normales (Mukhopadhyay et al., 2004). Il sera intéressant de tester les individus T1 surexprimant le gène *MtSAP1* pour leur résistance à ces types de stress.

4.2- MtSAP interagit avec DREB, MBF et HR en système double hybride

La protéine déduite de la séquence nucléique de *MtSAP1* comporte deux domaines de type zinc-finger (ou « doigts de zinc ») A20 et AN1. La présence de ces domaines implique que la protéine possède des interactions avec d'autres protéines, voire avec des acides nucléiques. Afin de mettre en évidence ces interactions et de trouver les partenaires de *MtSAP1*, nous avons mis en œuvre le criblage d'une banque de double hybride bactérien. Le système bactérien a été favorisé par rapport au système levure en raison de sa facilité de mise en œuvre et sa rapidité de criblage. Il faut noter également que le système bactérien occasionne moins de faux positifs. Néanmoins, il existe des différences au niveau des modifications post-traductionnelle entre les cellules procaryotes et eucaryotes, et l'interaction protéine-protéine peut s'en trouver affectée.

Le criblage de la banque a mis en évidence 43 gènes de *Medicago truncatula* susceptibles d'interagir avec *MtSAP1*. Ces gènes ont été classés selon sept types de fonction : cycle cellulaire, interaction protéine-protéine, métabolisme, process des protéines, réponse aux stress, stockage des réserves ou fonction inconnue.

Dans la classe « interaction protéine-protéine » se trouve *MtSAP1* et une autre protéine zinc-finger de type RING. Il a été montré par un système double hybride que les

domaines A20 et AN1 de la protéine osiSAP8 interagissent entre eux (Kanneganti et Gupta, 2008). Le domaine A20 interagit avec lui-même de manière plus forte qu'avec le domaine AN1, ce dernier n'interagissant pas avec lui-même. Avec la protéine ZNF216 humaine, des résultats similaires avaient été obtenus en co-immunoprécipitation (Huang et al., 2004). Ces mêmes auteurs ont également observé la formation d'homodimères de ZNF216. La présence de MtSAP1 n'est donc pas surprenante et témoigne de l'efficacité du système choisi. L'interaction de la protéine avec elle-même se fait probablement via une interaction A20/A20 ou A20/AN1.

Dans la classe « interaction protéine-protéine », se trouve également la protéine MBF (Multiprotein Bridging Factor). Elle a été sélectionnée comme candidat intéressant et la validation de son interaction avec MtSAP1 par une autre méthode (pull-down assay) est en cours. La protéine MBF appartient au groupe des coactivateurs de transcription qui jouent un rôle important dans la transcription chez les cellules eucaryotes. Elle a été mise en évidence d'abord chez la drosophile (Li et al., 1994). Dans ce modèle les protéines MBF1 et MBF2 forment un pont entre le facteur de transcription qui se lie sur l'ADN au niveau de sa boîte de régulation, et la TBP (TATA-box Binding Protein) qui se lie à la TATA-box. Il a été montré par la suite que MBF1 fonctionne en tant que recruteur de la TBP lorsqu'un facteur de transcription est lié à sa boîte de régulation (Takemaru et al., 1998). Chez les plantes, ce type de protéine a d'abord observé chez la tomate où il est activé dans le fruit en maturation et en réponse à l'éthylène (Zegzouti et al., 1999). Chez les tubercules de pomme de terre, il est activé par l'attaque fongique, les blessures, le traitement par l'acide salicylique (SA), un précurseur de l'éthylène (Godoy et al., 2001), et en réponse au stress oxydatif (Arce et al., 2006). Chez le tabac et Arabidopsis, cette protéine est activée par un effet combiné du stress hydrique et d'un choc thermique (Rizhsky et al., 2002; Rizhsky et al., 2004). L'expression constitutive de *MBF1c* chez Arabidopsis augmente sa résistance à des stress abiotiques en relation avec l'éthylène (Suzuki et al., 2005; Kim et al., 2007). Ce gène est impliqué dans la thermotolérance chez Arabidopsis et contrôle les signaux tréhalose, SA et éthylène (Suzuki et al., 2008). Très récemment, l'expression d'une protéine chimère inhibant la fonctionnalité transcriptionnelle de MBF1 a montré que cette protéine contrôle le cycle et l'expansion cellulaire des feuilles chez Arabidopsis (Tojo et al., 2009). Chez Medicago, ce gène est exprimé dans les axes embryonnaires de graines sèches. Il est intéressant de noter que chez le retam (*Retama raetam*, légumineuse saharienne) l'accumulation de ce type de protéine a lieu au cours de la maturation des graines (Pnueli et al., 2002).

Dans la classe « réponse aux stress » deux protéines ont retenu notre attention : les protéines DREB (Dehydration Responsive Element Binding Protein) et HR (Hypoxia-Responsive protein). Comme MBF, l'interaction de ces deux protéines avec MtSAP1 est en cours de validation par pull-down assay. DREB est une protéine non caractérisée chez *Medicago truncatula* et correspond à la séquence déduite de l'EST TC129893 de *Medicago*. Cette protéine contient un domaine AP2/ERF entre les acides aminés 42 et 100. Historiquement, ces domaines ont été nommés d'après les protéines ERE binding Factor (ERF) et APETALA2 (AP2). Les protéines ERF sont des facteurs de transcription qui se lient au motif AGCCGCC (boîte GCC) de l'élément de régulation ERE (Ethylene Responsive Element) (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995; Fujimoto et al., 2000) impliqué dans la régulation des gènes via l'hormone éthylène. La protéine AP2 est aussi un facteur de transcription et joue un rôle dans la différenciation des organes floraux et le développement des téguments chez *Arabidopsis* (Weigel, 1995). Ces deux protéines possèdent en commun le domaine AP2/ERF d'une soixante d'acide aminés qui est suffisant pour la liaison à la boîte GC (Hao et al., 1998). Ce domaine est spécifique au règne végétal, très conservé, et définit une super-famille de facteurs de transcription impliqués dans la croissance, le développement et la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Alonso et al., 2003; Nakano et al., 2006). Cette super-famille a été divisée en deux sous-groupes selon le nombre de domaines AP2/ERF qu'elles contiennent : un seul (sous-famille ERF) ou deux (sous-famille AP2). Chez *Medicago*, des facteurs de transcription AP2/ERF de la sous-famille ERF ont été décrits : WXP1 et 2, SOMATIC EMBRYO RELATED FACTOR1 (MtSERF1), ERF Required for Nodulation (ERN) et EFD (pour ethylene response factor required for nodule differentiation). WXP1 et 2 sont impliqués dans l'accumulation de cire dans la cuticule des feuilles et la résistance aux conditions de sécheresse (Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2007). Le gène *MtSERF* est induit par l'éthylène. Il a été mis en évidence chez le génotype Jemalong 2HA, connu pour son aptitude à l'embryogénèse somatique. *MtSERF1* est impliqué dans l'embryogénèse somatique mais est également exprimé dans les embryons zygotiques (Mantiri et al., 2008). La protéine ERN1 est nécessaire pour l'induction des gènes des facteurs NOD. Une mutation des gènes bloque l'initiation et le développement des cordons d'infection et empêche l'invasion des nodules par les bactéries symbiotiques (Middleton et al., 2007). Une nouvelle boîte de régulation de type GCC, la NF-box (pour Nod Factor responsive), a été identifiée chez *Medicago truncatula* et correspond à l'élément de liaison des protéines ERN1, 2 et 3 (Andrianakaja et al., 2007). Enfin, la protéine EFD a été mise en évidence dans des

travaux sur la nodulation. Il est impliqué dans la différenciation des nodules probablement via l'inhibition de la signalisation par les cytokinines (Vernie et al., 2008).

La protéine HR (séquence en acides aminés déduits de la séquence nucléique) possède un domaine conservé chez certaines protéines induites par le stress hypoxique. Néanmoins, aucune étude n'a été publiée concernant cette protéine. L'intérêt que nous lui portons est lié à son caractère inductible par l'hypoxie qui renforce l'hypothèse d'une interaction avec MtSAP1, lui-même fortement induit par cette condition. Leur interaction pourrait jouer un rôle dans les tissus de la graine afin de répondre aux conditions de faible oxygénation qui y règnent.

4.3-Hypothèses sur la fonction de *MtSAP1*

Chez les mammifères, la protéine A20 est un acteur important de la régulation de l'activation du facteur de transcription Nuclear Factor κ B (NF κ B). Les deux domaines A20 et AN1 sont présents dans les protéines ZNF216 et AWP1 qui inhibent l'activation de NF κ B (Duan et al., 2000; Huang et al., 2004; Diatchenko et al., 2005). NF κ B régule la réponse immunitaire inflammatoire et la mort cellulaire en activant la transcription de gènes de prolifération et anti-apoptose (Karin and Ben-Neriah, 2000; Baldwin, 2001; Ghosh and Karin, 2002; Karin and Lin, 2002). La forme majeure de NF κ B est un hétérodimère constitué d'une unité de liaison à l'ADN et d'une unité de transactivation. Dans sa forme inactivée, il est associé avec la protéine I κ B et retenu dans le cytoplasme. Sous l'influence de stimuli d'activation de NF κ B, I κ B est phosphorylée puis dégradée. Ceci a pour conséquence la libération du facteur de transcription qui rejoint le noyau pour activer la transcription des gènes cibles (Karin and Ben-Neriah, 2000; Baldwin, 2001; Ghosh and Karin, 2002; Karin and Lin, 2002). Le contrôle de la signalisation d'activation de NF κ B est réalisé au niveau du complexe de phosphorylation IKK et plus particulièrement par la sous-unité non-catalytique IKK γ (Yamaoka et al., 1998). La protéine ZNF216 interagit avec IKK γ , A20, et d'autres protéines impliquées dans la régulation de l'activation de NF κ B (RIP et TRAF6). De plus, elle inhibe l'activation de NF κ B donc la réponse inflammatoire et la prolifération cellulaire (Huang et al., 2004). La protéine AWP1 (Associated With PRK1) interagit avec la sérine/thréonine protéine kinase PRK1 (Duan et al., 2000), famille de protéines impliquées dans la régulation de NF κ B, et est un inhibiteur de l'activation de NF κ B (Diatchenko et al., 2005). La recherche de fonction des protéines A20/AN1 et de partenaires d'interaction ne

peut pas se faire par homologie de séquence car, chez les plantes, il n'existe pas d'homologue des protéines de régulation de NFκB.

4.3.1-Inhibition du signal stress

Dans les protéines A20/AN1 comme *MtSAP1*, le domaine AN1 interagit avec le domaine A20, ce dernier interagissant également avec lui-même. Ceci a été montré par système double-hybride dans la levure avec les domaines de osiSAP8 (Kanneganti and Gupta, 2008). Les mêmes résultats ont été obtenus par co-immunoprécipitation avec les domaines de ZNF216 (Huang et al., 2004). Les auteurs ont également observé que ZNF216 pouvait s'homodimériser mais aussi former des hétérodimères avec la protéine A20. Chez les mammifères, ils proposent le modèle suivant : la protéine ZNF216 existerait dans le cytosol sous forme inactivée par une interaction interne. Sous l'influence de stimulation, les deux domaines se dissocieraient pour permettre aux domaines A20 ou AN1 d'interagir avec d'autres protéines. En l'occurrence, les protéines A20, IKKγ, RIP (domaine A20) et TRAF6 (AN1). La protéine A20 inhibe l'activation de NFκB en dirigeant les protéines qui l'activent vers le protéasome (Wertz et al., 2004; Lee et al., 2006; Penengo et al., 2006). Chez les plantes, Vij et Tyagi proposent que les protéines SAP agissent de manière similaire (Vij and Tyagi, 2006). Ainsi, elles inhiberaient la signalisation du stress en dirigeant les protéines clés vers le protéasome. Cette hypothèse est cohérente avec les résultats que nous avons obtenus avec les lignées transgéniques où le gène *MtSAP1* est éteint. En effet, si la protéine *MtSAP1* joue un rôle de régulateur négatif du signal, celui-ci pourrait être transmis de manière continue en l'absence de stress. Les stress biotiques et abiotiques causent des dommages et accélèrent la sénescence des plantes. Une signalisation non régulée pourrait être à l'origine du phénotype que nous avons observé chez les plants de *Medicago* transformés. *MtSAP1* pourrait être un régulateur négatif du signal éthylène ou d'une autre hormone favorisant la sénescence. Le phénotype de nos plants transgénique pourrait résulter d'un stress oxydatif incontrôlé, comme dans le cas de l'inactivation du gène *osDOS*. Nous savons que le gène *MtSAP1* est fortement induit par l'ABA dont l'action est de temporiser la mort cellulaire en limitant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Dans cette logique, il est possible que la protéine *MtSAP1* réduise la production de ROS.

4.3.2-Tolérance à la dessiccation

Le gène *MtSAP1* est fortement induit au début de la dessiccation des graines. Des mécanismes sont mis en place pour permettre aux tissus de tolérer la forte restriction en eau : accumulation de sucre non réducteurs, de composés amphiphiles, de protéine LEA et HSP. Une étude de transcriptomique a été menée au sein du laboratoire afin de mettre en évidence des gènes de régulation de la tolérance à la dessiccation (Buitink et al., 2006). Elle a été faite en utilisant les puces à ADN dédiées à *Medicago Mt16kOLI1* et en comparant deux types de gènes exprimés dans la graine. Plus précisément, il s'agissait de gènes exprimés à la fois au cours de l'acquisition de la tolérance à la dessiccation, mais aussi en condition de ré-induction de cette tolérance. Le gène *MtSAP1* ne figure pas parmi les gènes mis en évidence. Nous avons vu que son expression présente un pic au cours de la maturation des graines à partir de 28 DAP et en conditions de déshydratation. Pour l'expérience décrite, les axes embryonnaires ont été prélevés plus tôt (20 DAP), ce qui explique son absence. La transcription du gène DREB est stimulé à la fois au cours de la maturation et de la réinduction de la tolérance à la dessiccation. Il interagit avec le gène *MtSAP1* qui est activé au moment où la dessiccation commence. Il est possible que, dans les semences, son rôle soit en relation avec la tolérance à la dessiccation : il pourrait être activé au niveau transcriptionnel par des signaux de stress hydrique et participer par le biais d'un contact avec des protéines préexistantes comme DREB.

4.3.3-Réponse au stress hypoxique

Le gène *MtSAP1* possède des boîtes de régulation transcriptionnelle de type ANAEROBIC RESPONSE ELEMENT et sa réponse à l'hypoxie a été confirmée expérimentalement. Durant le développement des graines, les tissus vivent dans des conditions pauvres en oxygène dues à la faible perméabilité aux gaz des tissus maternel. Cette hypoxie est en partie compensée par les chloroplastes dont la fonction dans les semences est essentiellement la production d'oxygène et non l'assimilation du carbone. A la fin de la maturation, la chlorophylle est dégradée et la dessiccation commence, diminuant le taux d'oxygène libre dans les tissus. Ceci intervient également lorsque les graines sont déshydratées dans le PEG. L'activation concomitante du gène *MtSAP1* et la présence de boîtes de régulation ANAEROBIC RESPONSE ELEMENT laisse à penser qu'il est impliqué dans la réponse au stress hypoxique dans les semences. Cette hypothèse est renforcée par l'interaction de *MtSAP1* avec la protéine HR qui possède un domaine conservé entre les protéines réagissant au stress hypoxique.

Conclusion générale et perspectives

Dans ce travail, nous avons étudié deux aspects très différents de la germination dont les points de départ étaient identiques. Il correspondait aux résultats d'une banque d'hybridation suppressive et soustractive réalisée au cours de la germination chez *Medicago truncatula*. D'abord, nous avons constaté que la banque contenait de nombreux gènes associés avec la restructuration de la paroi. Cet aspect de la germination étant mal connu, nous avons, d'une part, testé l'expression des gènes en relation avec la croissance racinaire et, d'autre part, étudié la structure et les modifications pariétales des cellules concernées par la croissance. Ensuite, nous avons constaté qu'un gène de la banque, *MtSAP1*, présentait une expression et une structure intéressantes, faisant de lui un potentiel régulateur de la physiologie de la graine. Nous avons étudié ce gène d'un point de vue structurel et fonctionnel.

Chez *Arabidopsis thaliana*, le dogme du moteur physique de la germination a été remis en question. Il s'est avéré en effet que le cycle cellulaire participe de manière fondamentale dans ce processus. Dans le travail présenté ici, nous avons donc vérifié les participations de l'élongation et du cycle cellulaires. Chez la plante modèle *Medicago truncatula*, c'est bien l'expansion cellulaire qui mène la germination. Afin de mieux connaître cet événement, des observations microscopiques de coupes d'axes embryonnaires de graines en germination ont été effectuées. Nous avons vu que l'expansion cellulaire n'est pas uniforme à un temps donné. Elle débute dans la zone médiane (par rapport à l'axe de symétrie) et se diffuse de proche en proche avec un gradient à la fois acropète et basipète. L'unité d'élongation à la base de la croissance racinaire pourrait être représentée non pas par la cellule mais par des faisceaux de cellules. Ces structures de cellules empilées existent à l'apex des racines en croissance chez *Medicago* et pourraient résulter du fonctionnement du méristème racinaire. Elles possèdent une continuité au niveau de la structure pariétale. La composition des parois des cellules dans l'axe embryonnaire a été évaluée par plusieurs méthodes. Elle se caractérise notamment par une grande richesse en arabinose et en glucose. Bien que nous n'ayons pas pu la mettre en évidence par immunomarquage, l'origine pectique de l'arabinose est certaine. Il existe cependant d'autres sources d'arabinose qui sont les extensines et les AGPs. Leur fonction dans la germination est possible mais n'a pas été démontrée. Le glucose présent dans les parois correspond à la cellulose mais également à la callose. Le dépôt de ce polymère n'est pas habituel dans des parois primaires déjà formées en l'absence de stress biotique et représente une caractéristique primitive de la semence. Par homologie avec sa fonction dans le tube pollinique, nous supposons qu'il joue un rôle de

renfort des structures pariétales pour canaliser la pression de turgescence dans la direction de la croissance. Ceci se ferait pendant que les autres polymères pariétaux, déjà en place, glissent les uns sur les autres pour permettre l'extension de la cellule. Cet affaiblissement des structures se fait grâce à l'action d'enzymes codées par des gènes qui sont activés au cours de la germination. D'autres enzymes fonctionnent afin de synthétiser de nouveaux constituants pariétaux pour pallier l'affaiblissement lié à la croissance de la cellule. Dans ce travail, nous montrons que les gènes codant pour ces enzymes sont réprimés par l'action de l'acide abscissique, inhibiteur de germination. Nous suggérons que l'action inhibitrice de l'ABA sur la germination s'exerce via le contrôle des gènes liés à la restructuration de la paroi.

Ce travail offre des perspectives afin d'une meilleure compréhension des aspects cellulaires liés à la germination. Par exemple, le rôle du dépôt de callose lors de la germination pourrait être investigué. Une étude histologique des axes embryonnaires de graines germées avec une solution contenant de la lyticase (enzyme dégradant la callose) pourrait être réalisée. Il serait également intéressant de déterminer le rôle joué par les protéines architecturales et les enzymes telles que les XETs et expansines. Il serait possible, dans un premier temps, de réaliser des immunodots afin d'observer une évolution qualitative des protéines présentes dans les axes embryonnaires.

Le gène *MtSAPI* code pour une protéine présentant deux domaines de régulation de type zinc-finger, A20 et AN1. Les protéines A20/AN1 existe chez les mammifères en lien avec la régulation de NFκB. Elles existent aussi chez les plantes mais ont fait l'objet d'un nombre limité de publications. *MtSAPI* présente des homologies importantes avec les gènes végétaux et animaux. Son expression est corrélée avec la fin de la maturation de la graine, plus exactement au moment où commence la dessiccation des tissus. Il présente des éléments de régulation de type ABRE-related et ANAEROBIC RESPONSE ELEMENT dans sa région 5', et son expression est effectivement stimulée par l'ABA et les conditions hypoxiques. Les plants de *Medicago* transformés où *MtSAPI* est éteint présentent un phénotype de sénescence précoce. Par homologie avec la fonction des protéines A20/AN1 chez les mammifères, *MtSAPI* pourrait être un inhibiteur de signal stress comme l'ont suggéré Vij et Tyagi (2006) pour les gènes SAP chez le riz. La protéine agirait sur les signaux hormonaux comme l'éthylène et/ou sur la production d'espèces réactives de l'oxygène. L'expression du gène augmente au début de la dessiccation des graines. Elle interagit avec la protéine DREB dans un système double hybride et la protéine DREB est corrélée avec la tolérance à la dessiccation (Buitink et al., 2006). Un rôle pour la protéine dans ce phénomène est à considérer. La

dessiccation des graines conduit à une réduction de la teneur en oxygène dans les tissus. MtSAP1 interagit avec la protéine HR, spécifique de la réponse à l'hypoxie. Il est possible que ce soit l'hypoxie induite par la dessiccation qui soit en cause dans l'augmentation de l'expression du gène. Dans ce cas, la protéine MtSAP1 pourrait aussi exercer un rôle dans la réponse au stress hypoxique dans la graine.

La suite évidente de ce travail est l'étude de la génération T1 des plantes transgéniques de *Medicago* et de tabac. Des tests de germinations et les études de phénotype devraient être effectués en parallèle de vérifications concernant : l'insertion du transgène, l'extinction/surexpression effective du gène *MtSAP1*, et la spécificité de l'extinction. L'interaction avec les protéines MBF, DREB et HR devraient être confirmées *in vitro* par pull-down assay puis *in vivo* en utilisant, par exemple, la bi-complémentation de fluorescence (BiFC). L'accumulation de la protéine MtSAP1 pourrait être localisée par immunomarquage sur coupes histologiques. Les résultats devraient permettre de mieux comprendre la fonction de *MtSAP1* dans la physiologie de la graine.

Références bibliographiques

- Abernethy RH, Thiel DS, Petersen NS, Helm K** (1989) Thermotolerance Is Developmentally Dependent in Germinating Wheat Seed. *Plant Physiol* **89**: 569-576
- Abirached-Darmency M, Abdel-gawwad MR, Conejero G, Verdeil JL, Thompson R** (2005) In situ expression of two storage protein genes in relation to histodifferentiation at mid-embryogenesis in *Medicago truncatula* and *Pisum sativum* seeds. *J Exp Bot* **56**: 2019-2028
- Akiyama Y, Mori M, Kato K** (1980) ¹³C-NMR analysis of hydroxy-proline arabinosides from *Nicotiana tabacum*. *Agric biol chem* **44**: 2487-2489
- Alekseeva MW, Kobarskaya NB** (1979) Comparative investigations of proteins from aleurone grain of embryonic axis and cotyledon of pea and soybean. *Fisiologia rastenii* **25**
- Alekseeva MW, Phoung Lien TT, Charalambous N, Jikotovskaya V** (1989) Specificity of subunit composition of storage proteins in embryonic axes and cotyledons of pea seeds. *Fisiologia rastenii* **36**
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadriab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657
- Andriankaja A, Boisson-Dernier A, Frances L, Sauviac L, Jauneau A, Barker DG, de Carvalho-Niebel F** (2007) AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor dependent Mt ENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *Plant Cell* **19**: 2866-2885
- Arce DP, Tonon C, Zanetti ME, Godoy AV, Hirose S, Casalongue CA** (2006) The potato transcriptional co-activator StMBF1 is up-regulated in response to oxidative stress and interacts with the TATA-box binding protein. *J Biochem Mol Biol* **39**: 355-360
- Bailly C, Leymarie J, Lehner A, Rousseau S, Come D, Corbineau F** (2004) Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. *J Exp Bot* **55**: 475-483
- Baiza AM, Vazquezramos JM, Deimenez ES** (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J Plant Physiol* **135**: 416-421
- Baldwin AS, Jr.** (2001) Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* **107**: 3-6

- Baluska F, Volkmann D, Barlow PW** (1996) Specialized zones of development in roots: view from the cellular level. *Plant Physiol* **112**: 3-4
- Barroco RM, Van Poucke K, Bergervoet JH, De Veylder L, Groot SP, Inze D, Engler G** (2005) The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development. *Plant Physiol* **137**: 127-140
- Bartels D, Schneider K, Terstappen G, Piatkowski D, Salamini F** (1990) Molecular cloning of abscisic acid-modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Planta* **181**: 27-34
- Baskin JM, Baskin CC** (2004) A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* **14**: 1-16
- Bauer M, Meyer S, Allen P** (1998) A simulation model to predict seed dormancy loss in the field for *Bromus tectorum* L. *J. Exp. Bot.* **49**: 1235-1244
- Beemster GT, Baskin TI** (1998) Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **116**: 1515-1526
- Benedito VA, Torres-Jerez I, Murray JD, Andriankaja A, Allen S, Kakar K, Wandrey M, Verdier J, Zuber H, Ott T, Moreau S, Niebel A, Frickey T, Weiller G, He J, Dai X, Zhao PX, Tang Y, Udvardi MK** (2008) A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* **55**: 504-513
- Bentsink L, Jowett J, Hanhart CJ, Koornneef M** (2006) Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 17042-17047
- Bethke PC, Libourel IG, Jones RL** (2006) Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **57**: 517-526
- Bewley JD** (1979) Biological aspects of desiccation tolerance. *Annu Rev Plant Physiol* **30**: 195-238
- Bewley JD** (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* **9**: 1055-1066
- Bewley JD, Black M** (1994) *Seeds : Physiology of development and germination*. Plenum Press, New-York
- Borisjuk L, Wang TL, Rolletschek H, Wobus U, Weber H** (2002) A pea seed mutant affected in the differentiation of the embryonic epidermis is impaired in embryo growth and seed maturation. *Development* **129**: 1595-1607

- Boudet J** (2006) Identification et caractérisation fonctionnelle de protéines stables à la chaleur en relation avec la tolérance à la dessiccation dans les graines de *Medicago truncatula* au cours de la germination. UFR Sciences, Angers
- Boudet J, Buitink J, Hoekstra FA, Rogniaux H, Larre C, Satour P, 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
- Bouton S, Viau L, Lelievre E, Limami AM** (2005) A gene encoding a protein with a proline-rich domain (MtPPRD1), revealed by suppressive subtractive hybridization (SSH), is specifically expressed in the *Medicago truncatula* embryo axis during germination. *J Exp Bot* **56**: 825-832
- Bove J, Lucas P, Godin B, Oge L, Jullien M, Grappin P** (2005) Gene expression analysis by cDNA-AFLP highlights a set of new signaling networks and translational control during seed dormancy breaking in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol Biol* **57**: 593-612
- Bray CM, Davison PA, Ashraf M, Taylor RM** (1989) Biochemical Changes During Osmopriming of Leek Seeds. *Ann Bot* **63**: 185-193
- 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 U S A* **103**: 3468-3473
- Brocard-Gifford I, Lynch TJ, Garcia ME, Malhotra B, Finkelstein RR** (2004) The *Arabidopsis thaliana* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE8 encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth. *Plant Cell* **16**: 406-421
- Brodersen P, Voinnet O** (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* **22**: 268-280
- Buitink J, Leger JJ, Guisle I, Vu BL, Wulleme S, Lamirault G, Le Bars A, Le Meur N, Becker A, Kuster H, 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, Leprince O** (2008) Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *C R Biol* **331**: 788-795
- Buitink J, Leprince O, Hemminga MA, Hoekstra FA** (2000) Molecular mobility in the cytoplasm: an approach to describe and predict lifespan of dry germplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2385-2390

- Buitink J, Leprince O, Hoekstra FA** (2000) Dehydration-induced redistribution of amphiphilic molecules between cytoplasm and lipids is associated with desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol* **124**: 1413-1426
- Busk PK, Pages M** (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol* **37**: 425-435
- Carpita NC, Gibeaut DM** (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* **3**: 1-30
- 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* **53**: 214-224
- 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**: 1669-1679
- Cartier N, Chambat G, Joseleau JP** (1987) An arabinogalactan from the culture medium of *Rubus fruticosus* cells in suspension. *Carbohydr Res* **168**: 275-283
- Casey R, Christou P, Domoney C, Hedley C, Hitchin E, Parker M, Stoger E, Wang T, Zasiura C** (2001) Expression of legumin and vicilin genes in pea mutants and the production of legumin in transgenic plants. *Nahrung* **45**: 385-387
- Chibani K, Ali-Rachedi S, Job C, Job D, Jullien M, Grappin P** (2006) Proteomic analysis of seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **142**: 1493-1510
- Cleggs JS, Conte F** (1980) A review of the cellulose and developmental biology of *Artemia*, Vol 2. Universa Press, Wetteren, Belgium,
- Close TJ** (1996) Dehydrins : emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration pro-heat-shock protein. *Physiol Plant* **97**: 795-803
- Coolbear P, Grierson D** (1979) Studies on the Changes in the Major Nucleic Acid Components of Tomato Seeds (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Resulting from Osmotic Presowing Treatment. *J. Exp. Bot.* **30**: 1153-1162
- Cooper JB, Heuser JE, Varner JE** (1994) 3,4-Dehydroproline inhibits cell wall assembly and cell division in tobacco protoplasts. *Plant Physiol* **104**: 747-752
- Cooper JB, Varner JE** (1983) Selective Inhibition of Proline Hydroxylation by 3,4-Dehydroproline. *Plant Physiol* **73**: 324-328

- Curaba J, Moritz T, Blervaque R, Parcy F, Raz V, Herzog M, Vachon G** (2004) AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in Arabidopsis. *Plant Physiol* **136**: 3660-3669
- de Castro RD, van Lammeren AA, Groot SP, Bino RJ, Hilhorst HW** (2000) Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. *Plant Physiol* **122**: 327-336
- Derkesen J** (1996) Pollen tubes: a model system for plant cell growth. *Bot Acta* **109**: 341-345
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD** (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6025-6030
- Diatchenko L, Romanov S, Malinina I, Clarke J, Tchivilev I, Li X, Makarov SS** (2005) Identification of novel mediators of NF-kappaB through genome-wide survey of monocyte adherence-induced genes. *J Leukoc Biol* **78**: 1366-1377
- Ding L, Zhu JK** (1997) A role for arabinogalactan-proteins in root epidermal cell expansion. *Planta* **203**: 289-294
- Donohue K** (2005) Seeds and seasons: interpreting germination timing in the field. *Seed Science Research* **15**: 175-187
- Dove SL, 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
- Dove SL, Joung JK, Hochschild A** (1997) Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts. *Nature* **386**: 627-630
- Doyle JJ, Luckow MA** (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* **131**: 900-910
- Duan W, Sun B, Li TW, Tan BJ, Lee MK, Teo TS** (2000) Cloning and characterization of AWP1, a novel protein that associates with serine/threonine kinase PRK1 in vivo. *Gene* **256**: 113-121
- Dure L, 3rd** (1993) A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J* **3**: 363-369
- Dure L, 3rd, Greenway SC, Galau GA** (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry* **20**: 4162-4168

- Eckardt NA** (2002) Alternative splicing and the control of flowering time. *Plant Cell* **14**: 743-747
- Englyst HN, Cummings JH** (1988) Improved method for measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. *J Assoc Off Anal Chem* **71**: 808-814
- Eshed Y, Baum SF, Bowman JL** (1999) Distinct mechanisms promote polarity establishment in carpels of *Arabidopsis*. *Cell* **99**: 199-209
- Faria JM, Buitink J, van Lammeren AA, Hilhorst HW** (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, Song O** (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G** (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol* **171**: 501-523
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C** (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 387-415
- Finkelstein RR, Gibson SI** (2002) ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Curr Opin Plant Biol* **5**: 26-32
- Flinn AM** (1985) Carbon dioxide fixation in developing seeds. . Butterworths, London
- Fujimoto SY, Ohta M, Usui A, Shinshi H, Ohme-Takagi M** (2000) Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* **12**: 393-404
- Galau GA, Hugues DW, Dure L** (1986) Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (LEA) mRNAs. *Plant Mol Biol* **7**
- Gallardo K, Firnhaber C, Zuber H, Hericher D, Belghazi M, Henry C, Kuster H, 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
- Gallardo K, Le Signor C, Vandekerckhove J, Thompson RD, 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

- Gao Y, Zeng Q, Guo J, Cheng J, Ellis BE, Chen JG** (2007) Genetic characterization reveals no role for the reported ABA receptor, GCR2, in ABA control of seed germination and early seedling development in Arabidopsis. *Plant J* **52**: 1001-1013
- Gazzarrini S, Tsuchiya Y, Lumba S, Okamoto M, McCourt P** (2004) The transcription factor FUSCA3 controls developmental timing in Arabidopsis through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Dev Cell* **7**: 373-385
- Geitmann A, Cresti M** (1998) Ca²⁺ channels controls the rapid expansions in pulsating growth of *Petunia hybrida* pollen tubes. *J Plant Physiol* **152**: 439-447
- Gendreau E, Romaniello S, Barad S, Leymarie J, Benech-Arnold R, Corbineau F** (2008) Regulation of cell cycle activity in the embryo of barley seeds during germination as related to grain hydration. *J Exp Bot* **59**: 203-212
- Gendreau E, Traas J, Desnos T, Grandjean O, Caboche M, Hofte H** (1997) Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **114**: 295-305
- Ghosh S, Karin M** (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109** Suppl: S81-96
- Gimeno-Gilles C, Lelievre E, Viau L, Malik-Ghulam M, Ricoult C, Niebel A, Leduc N, Limami AM** (2009) ABA-Mediated Inhibition of Germination Is Related to the Inhibition of Genes Encoding Cell-Wall Biosynthetic and Architecture: Modifying Enzymes and Structural Proteins in *Medicago truncatula* Embryo Axis. *Mol Plant* **2**: 108-119
- Giraudat J, Hauge BM, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman HM** (1992) Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* **4**: 1251-1261
- Godoy AV, Zanetti ME, San Segundo B, Casalongue CA** (2001) Identification of a putative *Solanum tuberosum* transcriptional coactivator up-regulated in potato tubers by *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* infection and wounding. *Physiol Plant* **112**: 217-222
- Goldberg RB, G.D. P, R. Y** (1994) Plant embryogenesis : zygote to seed. *Science* **266**: 605-614
- Golombek S, Heim U, Horstmann C, Wobus U, Weber H** (1999) Phosphoenolpyruvate carboxylase in developing seeds of *Vicia faba* L.: gene expression and metabolic regulation. *Planta* **208**: 66-72
- Golovina EA, Hoekstra FA, Hemminga MA** (1998) Drying increases intracellular partitioning of amphiphilic substances into the lipid phase. Impact On membrane permeability and significance for desiccation tolerance. *Plant Physiol* **118**: 975-986
- Goyal K, Tisi L, Basran A, Browne J, Burnell A, Zurdo J, Tunnacliffe A** (2003) Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an anhydrobiotic nematode protein. *J Biol Chem* **278**: 12977-12984

- Guillon F, Philippe S, Bouchet B, Devaux MF, Frasse P, Jones B, Bouzayen M, Lahaye M** (2008) Down-regulation of an Auxin Response Factor in the tomato induces modification of fine pectin structure and tissue architecture. *J Exp Bot* **59**: 273-288
- Gutierrez L, Van Wuytswinkel O, Castelain M, Bellini C** (2007) Combined networks regulating seed maturation. *Trends Plant Sci* **12**: 294-300
- Haecker A, Gross-Hardt R, Geiges B, Sarkar A, Breuninger H, Herrmann M, Laux T** (2004) Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **131**: 657-668
- Hao D, Ohme-Takagi M, Sarai A** (1998) Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. *J Biol Chem* **273**: 26857-26861
- Hepler PK, Vidali L, Cheung AY** (2001) Polarized cell growth in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **17**: 159-187
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T** (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* **27**: 297-300
- Hilhorst HWM** (1995) A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research* **5**: 61-73
- Himmelbach A, Yang Y, Grill E** (2003) Relay and control of abscisic acid signaling. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 470-479
- Hirano K, Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M** (2008) GID1-mediated gibberellin signaling in plants. *Trends Plant Sci* **13**: 192-199
- Hirner B, Fischer WN, Rentsch D, Kwart M, Frommer WB** (1998) Developmental control of H⁺/amino acid permease gene expression during seed development of *Arabidopsis*. *Plant J* **14**: 535-544
- Hoekstra FA, Wolkers WF, Buitink J, Golovina AG, Crowe JH, Crowe LM** (1997) Membrane stabilization in the dry state - possible role of phospholipids composition and sucrose content. *Comp Biochem Physiol* **117**: 335-341
- Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJ** (2008) Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol* **179**: 33-54
- Holmes P, Goffard N, Weiller GF, Rolfe BG, Imin N** (2008) Transcriptional profiling of *Medicago truncatula* meristematic root cells. *BMC Plant Biol* **8**: 21
- Hong SK, Kitano H, Satoh H, Nagato Y** (1996) How is embryo size genetically regulated in rice? *Development* **122**: 2051-2058

- Huang J, Teng L, Li L, Liu T, Li L, Chen D, Xu LG, Zhai Z, Shu HB** (2004) ZNF216 Is an A20-like and IkappaB kinase gamma-interacting inhibitor of NFkappaB activation. *J Biol Chem* **279**: 16847-16853
- Huang J, Wang MM, Jiang Y, Bao YM, Huang X, Sun H, Xu DQ, Lan HX, Zhang HS** (2008) Expression analysis of rice A20/AN1-type zinc finger genes and characterization of ZFP177 that contributes to temperature stress tolerance. *Gene* **420**: 135-144
- Hugouvieux V, Kwak JM, Schroeder JI** (2001) An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Cell* **106**: 477-487
- Jin Y, Wang M, Fu J, Xuan N, Zhu Y, Lian Y, Jia Z, Zheng J, Wang G** (2007) Phylogenetic and expression analysis of ZnF-AN1 genes in plants. *Genomics* **90**: 265-275
- Jing HC, Hebel R, Oeljeklaus S, Sitek B, Stuhler K, Meyer HE, Sturre MJ, Hille J, Warscheid B, Dijkwel PP** (2008) Early leaf senescence is associated with an altered cellular redox balance in Arabidopsis cpr5/old1 mutants. *Plant Biol (Stuttg)* **10 Suppl 1**: 85-98
- Jing HC, Sturre MJ, Hille J, Dijkwel PP** (2002) Arabidopsis onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence. *Plant J* **32**: 51-63
- Jitla DS, Rogers GS, Seneweera SP, Basra AS, Oldfield RJ, Conroy JP** (1997) Accelerated Early Growth of Rice at Elevated CO₂ (Is It Related to Developmental Changes in the Shoot Apex?). *Plant Physiol* **115**: 15-22
- Johnston CA, Temple BR, Chen JG, Gao Y, Moriyama EN, Jones AM, Siderovski DP, Willard FS** (2007) Comment on "A G protein coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid". *Science* **318**: 914; author reply 914
- Jones L, Seymour GB, Knox JP** (1997) Localization of Pectic Galactan in Tomato Cell Walls Using a Monoclonal Antibody Specific to (1->4)-[beta]-D-Galactan. *Plant Physiol* **113**: 1405-1412
- Joung JK, Ramm EI, Pabo CO** (2000) A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7382-7387
- Kanneganti V, Gupta AK** (2008) Overexpression of OsiSAP8, a member of stress associated protein (SAP) gene family of rice confers tolerance to salt, drought and cold stress in transgenic tobacco and rice. *Plant Mol Biol* **66**: 445-462
- Karin M, Ben-Neriah Y** (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* **18**: 621-663

- Karin M, Lin A** (2002) NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**: 221-227
- Kermode AR** (1990) Regulatory mechanism involved in the transition from seed development to germination. *SRG Crit Rev Plant Sci* **80**: 280-288
- Kim MJ, Lim GH, Kim ES, Ko CB, Yang KY, Jeong JA, Lee MC, Kim CS** (2007) Abiotic and biotic stress tolerance in Arabidopsis overexpressing the multiprotein bridging factor 1a (MBF1a) transcriptional coactivator gene. *Biochem Biophys Res Commun* **354**: 440-446
- Kinsman EA, Lewis C, Davies MS, Young JE, Francis D, Vilhar B, Ougham HJ** (1997) Elevated CO₂ stimulates cells to divide in grass meristems. a differential effect in two natural populations of *Dactylis glomerata*. *Plant, Cell and Environment* **20**: 1309-1316
- Kohler C, Hennig L, Spillane C, Pien S, Gruissem W, Grossniklaus U** (2003) The Polycomb-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene PHERES1. *Genes Dev* **17**: 1540-1553
- Kong Z, Li M, Yang W, Xu W, Xue Y** (2006) A novel nuclear-localized CCCH-type zinc finger protein, OsDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice. *Plant Physiol* **141**: 1376-1388
- Kranz E, von Wiegen P, Quader H, Lorz H** (1998) Endosperm development after fusion of isolated, single maize sperm and central cells in vitro. *Plant Cell* **10**: 511-524
- Krock B, Schmidt S, Hertweck C, Baldwin IT** (2002) Vegetation-derived abscisic acid and four terpenes enforce dormancy in seeds of the post-fire annual, *Nicotiana attenuata*. *Seed Science Research* **12**: 239-252
- Kroj T, Savino G, Valon C, Giraudat J, Parcy F** (2003) Regulation of storage protein gene expression in Arabidopsis. *Development* **130**: 6065-6073
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G** (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* **15**: 281-307
- Lanfermeijer FC, Koerselman-Kooij JW, Borstlap AC** (1990) Changing kinetics of l-valine uptake by immature pea cotyledons during development: an unsaturable pathway is supplemented by a saturable system. *Planta* **181**: 576-582
- Laux T, Wurschum T, Breuninger H** (2004) Genetic regulation of embryonic pattern formation. *Plant Cell* **16 Suppl**: S190-202
- Leboeuf E, Guillon F, Thoiron S, Lahaye M** (2005) Biochemical and immunohistochemical analysis of pectic polysaccharides in the cell walls of Arabidopsis mutant QUASIMODO 1 suspension-cultured cells: implications for cell adhesion. *J Exp Bot* **56**: 3171-3182

- Leboeuf E, Thoiron S, Lahaye M** (2004) Physico-chemical characteristics of cell walls from *Arabidopsis thaliana* microcalli showing different adhesion strengths. *J Exp Bot* **55**: 2087-2097
- Lee S, Tsai YC, Mattera R, Smith WJ, Kostelansky MS, Weissman AM, Bonifacino JS, Hurley JH** (2006) Structural basis for ubiquitin recognition and autoubiquitination by Rabex-5. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 264-271
- Leon-Kloosterziel KM, Keijzer CJ, Koornneef M** (1994) A Seed Shape Mutant of *Arabidopsis* That Is Affected in Integument Development. *Plant Cell* **6**: 385-392
- Leopold AC** (1986) *Membranes, metabolism, and dry organism*. Cornell University Press, Ithaca, New-York: 17-21
- Leprince O, Harren FJ, Buitink J, Alberda M, Hoekstra FA** (2000) Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. *Plant Physiol* **122**: 597-608
- Leubner-Metzger G** (2001) Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. *Planta* **213**: 758-763
- 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 J* **41**: 133-145
- Levigne S, Thomas M, Ralet M-C, Quéméner B, Thibault J-F** (2002) Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards. *Food Hydrocoll* **16**: 547-550
- Lewandrowski U, Resemann A, Sickmann A** (2005) Laser-induced dissociation/high-energy collision-induced dissociation fragmentation using MALDI-TOF/TOF-MS instrumentation for the analysis of neutral and acidic oligosaccharides. *Anal Chem* **77**: 3274-3283
- Leymarie J, Bruneaux E, Gibot-Leclerc S, Corbineau F** (2007) Identification of transcripts potentially involved in barley seed germination and dormancy using cDNA-AFLP. *J Exp Bot* **58**: 425-437
- Li FQ, Ueda H, Hirose S** (1994) Mediators of activation of fushi tarazu gene transcription by BmFTZ-F1. *Mol Cell Biol* **14**: 3013-3021
- Limami AM, Glevarec G, Ricoult C, Cliquet J-B, Planchet E** (2008) Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young *Medicago truncatula* seedlings under hypoxic stress. *J. Exp. Bot.* **59**: 2325-2335

- Liners F, Letesson JJ, Didembourg C, Van Cutsem P** (1989) Monoclonal Antibodies against Pectin: Recognition of a Conformation Induced by Calcium. *Plant Physiol* **91**: 1419-1424
- Liners F, Thibault JF, Van Cutsem P** (1992) Influence of the Degree of Polymerization of Oligogalacturonates and of Esterification Pattern of Pectin on Their Recognition by Monoclonal Antibodies. *Plant Physiol* **99**: 1099-1104
- Linnen JM, Bailey CP, Weeks DL** (1993) Two related localized mRNAs from *Xenopus laevis* encode ubiquitin-like fusion proteins. *Gene* **128**: 181-188
- Liu PP, Montgomery TA, Fahlgren N, Kasschau KD, Nonogaki H, Carrington JC** (2007) Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *Plant J* **52**: 133-146
- Liu X, Yue Y, Li B, Nie Y, Li W, Wu WH, Ma L** (2007) A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* **315**: 1712-1716
- Lopez-Molina L, Mongrand S, Kinoshita N, Chua NH** (2003) AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. *Genes Dev* **17**: 410-418
- Lotan T, Ohto M, Yee KM, West MA, Lo R, Kwong RW, Yamagishi K, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (1998) Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* **93**: 1195-1205
- Luerssen H, Kirik V, Herrmann P, Misera S** (1998) FUSCA3 encodes a protein with a conserved VP1/AB13-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **15**: 755-764
- Magneschi L, Perata P** (2009) Rice germination and seedling growth in the absence of oxygen. *Ann Bot (Lond)* **103**: 181-196
- Mansfield SG, Briarty LG** (1991) Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Can. J. Bot.* **69**: 461-476
- Mantiri FR, Kurdyukov S, Lohar DP, Sharopova N, Saeed NA, Wang XD, Vandenbosch KA, Rose RJ** (2008) The transcription factor MtSERF1 of the ERF subfamily identified by transcriptional profiling is required for somatic embryogenesis induced by auxin plus cytokinin in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **146**: 1622-1636
- Marcus SE, Verhertbruggen Y, Herve C, Ordaz-Ortiz JJ, Farkas V, Pedersen HL, Willats WG, Knox JP** (2008) Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biol* **8**: 60

- Masubelele NH, Dewitte W, Menges M, Maughan S, Collins C, Huntley R, Nieuwland J, Scofield S, Murray JA** (2005) D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 15694-15699
- Mattimore V, Battista JR** (1996) Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J Bacteriol* **178**: 633-637
- McCartney L, Steele-King CG, Jordan E, Knox JP** (2003) Cell wall pectic (1-->4)-beta-d-galactan marks the acceleration of cell elongation in the Arabidopsis seedling root meristem. *Plant J* **33**: 447-454
- McCourt P** (1999) Genetic Analysis of Hormone Signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 219-243
- McCourt P, Creelman R** (2008) The ABA receptors -- we report you decide. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 474-478
- McQueen-Mason S, Cosgrove DJ** (1994) Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 6574-6578
- McQueen-Mason SJ, Cosgrove DJ** (1995) Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol* **107**: 87-100
- Meikle PJ, Ng KF, Johnson E, Hoogenraad NJ, Stone BA** (1991) The beta-glucan synthase from *Lolium multiflorum*. Detergent solubilization, purification using monoclonal antibodies, and photoaffinity labeling with a novel photoreactive pyrimidine analogue of uridine 5'-diphosphoglucose. *J Biol Chem* **266**: 22569-22581
- Middleton PH, Jakab J, Penmetsa RV, Starker CG, Doll J, Kalo P, Prabhu R, Marsh JF, Mitra RM, Kereszt A, Dudas B, VandenBosch K, Long SR, Cook DR, Kiss GB, Oldroyd GE** (2007) An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *Plant Cell* **19**: 1221-1234
- Miller J, McLachlan AD, Klug A** (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *EMBO J* **4**: 1609-1614
- Mitchum MG, Yamaguchi S, Hanada A, Kuwahara A, Yoshioka Y, Kato T, Tabata S, Kamiya Y, Sun TP** (2006) Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in Arabidopsis development. *Plant J* **45**: 804-818
- Monke G, Altschmied L, Tewes A, Reidt W, Mock HP, Baumlein H, Conrad U** (2004) Seed-specific transcription factors ABI3 and FUS3: molecular interaction with DNA. *Planta* **219**: 158-166

- Mukhopadhyay A, Vij S, Tyagi AK** (2004) Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6309-6314
- Muller K, Tintelnot S, 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 Cell Physiol* **47**: 864-877
- Munier-Jolain N, Larmure A, Salon C** (2008) Determinism of carbon and nitrogen reserve accumulation in legume seeds. *C R Biol* **331**: 780-787
- Nakabayashi K, Okamoto M, Koshiba 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
- Nakano T, Nishiuchi T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H** (2006) Studies on transcriptional regulation of endogenous genes by ERF2 transcription factor in tobacco cells. *Plant Cell Physiol* **47**: 554-558
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K** (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiol* **149**: 88-95
- Nambara E, Marion-Poll A** (2003) ABA action and interactions in seeds. *Trends Plant Sci* **8**: 213-217
- Ni DA, Wang LJ, Ding CH, Xu ZH** (2001) Auxin distribution and transport during embryogenesis and seed germination of *Arabidopsis*. *Cell Res* **11**: 273-278
- Nishikawa S, Zinkl GM, Swanson RJ, Maruyama D, Preuss D** (2005) Callose (beta-1,3 glucan) is essential for *Arabidopsis* pollen wall patterning, but not tube growth. *BMC Plant Biol* **5**: 22
- Ogas J, Cheng JC, Sung ZR, Somerville C** (1997) Cellular differentiation regulated by gibberellin in the *Arabidopsis thaliana* pickle mutant. *Science* **277**: 91-94
- Ogas J, Kaufmann S, Henderson J, Somerville C** (1999) PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13839-13844
- Oh E, Kang H, Yamaguchi S, Park J, Lee D, Kamiya Y, Choi G** (2009) Genome-Wide Analysis of Genes Targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during Seed Germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell*
- Ohme-Takagi M, Shinshi H** (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* **7**: 173-182

- Ohmiya Y, Samejima M, Shiroishi M, Amano Y, Kanda T, Sakai F, Hayashi T** (2000) Evidence that endo-1,4-beta-glucanases act on cellulose in suspension-cultured poplar cells. *Plant J* **24**: 147-158
- Ohmiya Y, Takeda T, Nakamura S, Sakai F, Hayashi T** (1995) Purification and properties of wall-bound endo-1, 4-beta-glucanase from suspension-cultured poplar cells. *Plant Cell Physiol* **36**: 607-614
- Okamoto M, Kuwahara A, Seo M, Kushiro T, Asami T, Hirai N, Kamiya Y, Koshiba T, Nambara E** (2006) CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in Arabidopsis. *Plant Physiol* **141**: 97-107
- Opsahl-Ferstad HG, Le Deunff E, Dumas C, Rogowsky PM** (1997) ZmEsr, a novel endosperm-specific gene expressed in a restricted region around the maize embryo. *Plant J* **12**: 235-246
- Pang Y, Peel GJ, Sharma SB, Tang Y, Dixon RA** (2008) A transcript profiling approach reveals an epicatechin-specific glucosyltransferase expressed in the seed coat of *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 14210-14215
- Paredes AR, Somerville CR, Ehrhardt DW** (2006) Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* **312**: 1491-1495
- Parre E, Geitmann A** (2005) More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes. *Plant Physiol* **137**: 274-286
- Penengo L, Mapelli M, Murachelli AG, Confalonieri S, Magri L, Musacchio A, Di Fiore PP, Polo S, Schneider TR** (2006) Crystal structure of the ubiquitin binding domains of rabex-5 reveals two modes of interaction with ubiquitin. *Cell* **124**: 1183-1195
- Penfield S, Rylott EL, Gilday AD, Graham S, Larson TR, Graham IA** (2004) Reserve mobilization in the Arabidopsis endosperm fuels hypocotyl elongation in the dark, is independent of abscisic acid, and requires PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE1. *Plant Cell* **16**: 2705-2718
- Piatkowski D, Schneider K, Salamini F, Bartels D** (1990) Characterization of Five Abscisic Acid-Responsive cDNA Clones Isolated from the Desiccation-Tolerant Plant *Cratogeomys plantagineum* and Their Relationship to Other Water-Stress Genes. *Plant Physiol* **94**: 1682-1688
- Pnueli L, Hallak-Herr E, Rozenberg M, Cohen M, Goloubinoff P, Kaplan A, Mittler R** (2002) Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *Plant J* **31**: 319-330

- Quemener B, Bertrand D, Marty I, Causse M, Lahaye M** (2007) Fast data preprocessing for chromatographic fingerprints of tomato cell wall polysaccharides using chemometric methods. *J Chromatogr A* **1141**: 41-49
- Rajjou L, Gallardo K, Debeaujon I, Vandekerckhove J, Job C, 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 Physiol* **134**: 1598-1613
- Ramanjulu S, Bartels D** (2002) Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ* **25**: 141-151
- Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD** (2006) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* **439**: 290-294
- Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD** (2008) Retraction. The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* **456**: 824
- Reyes JL, Chua NH** (2007) ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *Plant J* **49**: 592-606
- Rider SD, Jr., Hemm MR, Hostetler HA, Li HC, Chapple C, Ogas J** (2004) Metabolic profiling of the Arabidopsis pkl mutant reveals selective derepression of embryonic traits. *Planta* **219**: 489-499
- Risk JM, Macknight RC, Day CL** (2008) FCA does not bind abscisic acid. *Nature* **456**: E5-6
- Rizhsky L, Liang H, Mittler R** (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol* **130**: 1143-1151
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R** (2004) When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol* **134**: 1683-1696
- Rochat C, Boutin JP** (1991) Metabolism of phloem-borne amino acids in maternal tissues of fruit of nodulated or nitrate fed pea plants (*Pisum sativum* L.). *Journal of Experimental Botany* **42**: 207-214
- Rolletschek H, Borisjuk L, Koschorreck M, Wobus U, Weber H** (2002) Legume embryos develop in a hypoxic environment. *J Exp Bot* **53**: 1099-1107
- Rondeau-Mouro C, Crepeau MJ, Lahaye M** (2003) Application of CP-MAS and liquid-like solid-state NMR experiments for the study of the ripening-associated cell wall changes in tomato. *Int J Biol Macromol* **31**: 235-244

- Sachs MM, Subbaiah CC, Saab IN** (1996) Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. *J. Exp. Bot.* **47**: 1-15
- Saulnier L, Brillouet JM, Joseleau JP** (1988) Structural studies of pectic substances from the pulp of grape berries. *Carbohydr Res* **182**: 63-78
- Seo M, Nambara E, Choi G, Yamaguchi S** (2009) Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Mol Biol* **69**: 463-472
- Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z, Shang Y, Wang XL, Peng CC, Yu XC, Zhu SY, Fan RC, Xu YH, Zhang DP** (2006) The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* **443**: 823-826
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* **58**: 221-227
- Showalter AM** (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Mol Life Sci* **58**: 1399-1417
- Sigimoto T, Tanaka K, Monma M, Kawamura Y, Saio K** (1989) Phosphoenolpyruvate carboxylase level in soybean seed highly correlate to its content of protein and lipid. *Agric biol chem* **53**: 885-887
- Skriver K, Mundy J** (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* **2**: 503-512
- Smalle J, Kurepa J, Yang P, Emborg TJ, Babiychuk E, Kushnir S, Vierstra RD** (2003) The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in Arabidopsis growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**: 965-980
- Smallwood M, Martin H, Knox JP** (1995) An epitope of rice threonine- and hydroxyproline-rich glycoprotein is common to cell wall and hydrophobic plasma-membrane glycoproteins. *Planta* **196**: 510-522
- Smallwood M, Yates EA, Willats WGT, Martin H, Knox JP** (1996) Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. *Planta* **198**: 452-459
- Smith AJ, Rinne RW, Seif RD** (1989) Phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase Involvement in protein and oil biosynthesis during Soybean seed development. *Crop Sci* **23**
- Soeda Y, Konings MC, Vorst O, van Houwelingen AM, Stoopen GM, Maliepaard CA, Kodde J, Bino RJ, Groot SP, van der Geest AH** (2005) Gene expression programs during Brassica oleracea seed maturation, osmopriming, and germination are

- indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. *Plant Physiol* **137**: 354-368
- Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredez A, Persson S, Raab T, Vorwerk S, Youngs H** (2004) Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* **306**: 2206-2211
- Steadman KJ** (2004) Dormancy release during hydrated storage in *Lolium rigidum* seeds is dependent on temperature, light quality, and hydration status. *J Exp Bot* **55**: 929-937
- Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (2001) LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11806-11811
- Stroher E, Wang X-J, Roloff N, Klein P, Husemann A, Dietz K-J** (2009) Redox-Dependent Regulation of the Stress-Induced Zinc-Finger Protein SAP12 in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **2**: 357-367
- Suzuki A, Suzuki T, Tanabe F, Toki S, Washida H, Wu CY, Takaiwa F** (1997) Cloning and expression of five myb-related genes from rice seed. *Gene* **198**: 393-398
- Suzuki M, Wang HH, McCarty DR** (2007) Repression of the LEAFY COTYLEDON 1/B3 regulatory network in plant embryo development by VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3 genes. *Plant Physiol* **143**: 902-911
- Suzuki N, Bajad S, Shuman J, Shulaev V, Mittler R** (2008) The transcriptional co-activator MBF1c is a key regulator of thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **283**: 9269-9275
- Suzuki N, Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Mittler R** (2005) Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator multiprotein bridging factor 1c. *Plant Physiol* **139**: 1313-1322
- Takemaru K, Harashima S, Ueda H, Hirose S** (1998) Yeast coactivator MBF1 mediates GCN4-dependent transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **18**: 4971-4976
- Tanaka M, Kikuchi A, Kamada H** (2008) The *Arabidopsis* histone deacetylases HDA6 and HDA19 contribute to the repression of embryonic properties after germination. *Plant Physiol* **146**: 149-161
- Thibault JF** (1979) Automatisation du dosage des substances pectiques par la méthode au méta-hydroxyphényl. *Lebensm. -Wiss. u. -technol.* **12**: 247-251
- Thomas SG, Rieu I, Steber CM** (2005) Gibberellin metabolism and signaling. *Vitam Horm* **72**: 289-338

- Tiedemann J, Neubohn B, Muntz K** (2000) Different functions of vicilin and legumin are reflected in the histopattern of globulin mobilization during germination of vetch (*Vicia sativa* L.). *Planta* **211**: 1-12
- To A, Valon C, Savino G, Guillemot J, Devic M, Giraudat J, Parcy F** (2006) A Network of Local and Redundant Gene Regulation Governs Arabidopsis Seed Maturation. *Plant Cell* **18**: 1642-1651
- Tojo T, Tsuda K, Yoshizumi T, Ikeda A, Yamaguchi J, Matsui M, Yamazaki K** (2009) Arabidopsis MBF1s control leaf cell cycle and its expansion. *Plant Cell Physiol* **50**: 254-264
- Tolte D, Jaquinod M, Mangavel C, Passirani C, Saulnier P, Manon S, Teysier E, Payet N, Avelange-Macherel MH, Macherel D** (2007) Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. *Plant Cell* **19**: 1580-1589
- Tsai CY** (1979) Tissue-specific zein synthesis in maize kernel. *Biochem Genet* **17**: 1109-1119
- Tykarska T** (1976) Rape embryogenesis. I. The proembryo development. *Acta Soc Bot Poloniae* **45**: 3-16
- Tykarska T** (1979) Rape embryogenesis. II. Development of embryo proper. *Acta Soc Bot Poloniae* **48**: 391-421
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow TY, Hsing YI, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M** (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**: 693-698
- Verdier J, Kakar K, Gallardo K, Le Signor C, Aubert G, Schlereth A, Town CD, Udvardi MK, Thompson RD** (2008) Gene expression profiling of *M. truncatula* transcription factors identifies putative regulators of grain legume seed filling. *Plant Mol Biol* **67**: 567-580
- Vernie T, Moreau S, de Billy F, Plet J, Combier JP, Rogers C, Oldroyd G, Frugier F, Niebel A, Gamas P** (2008) EFD Is an ERF transcription factor involved in the control of nodule number and differentiation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **20**: 2696-2713
- Vigil EL, Fang TK** (1995a) Comparative biochemical and morphological changes in imbibed cotton seed hypocotyls and radicles in situ and in vitro. Protein breakdown and elongation growth. *Seed Science Research* **5**: 41-51
- Vigil EL, Fang TK** (1995b) Protease activities and elongation growth of excised cotton seed axes during the first 24 hours of imbibition. *Seed Science Research* **5**: 201-207

- Vij S, Tyagi AK** (2006) Genome-wide analysis of the stress associated protein (SAP) gene family containing A20/AN1 zinc-finger(s) in rice and their phylogenetic relationship with Arabidopsis. *Mol Genet Genomics* **276**: 565-575
- Vij S, Tyagi AK** (2008) A20/AN1 zinc-finger domain-containing proteins in plants and animals represent common elements in stress response. *Funct Integr Genomics* **8**: 301-307
- Wang H, Caruso LV, Downie AB, Perry SE** (2004) The embryo MADS domain protein AGAMOUS-Like 15 directly regulates expression of a gene encoding an enzyme involved in gibberellin metabolism. *Plant Cell* **16**: 1206-1219
- Wang H, Qi Q, Schorr P, Cutler AJ, Crosby WL, Fowke LC** (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from Arabidopsis thaliana interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J* **15**: 501-510
- Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB** (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13959-13964
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U** (2005) Molecular physiology of legume seed development. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 253-279
- Wehmeyer N, 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
- Weigel D** (1995) The APETALA2 domain is related to a novel type of DNA binding domain. *Plant Cell* **7**: 388-389
- Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone DL, Ma A, Koonin EV, Dixit VM** (2004) De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* **430**: 694-699
- Willats WG, Knox JP** (1996) A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of beta-glucosyl Yariv reagent with seedlings of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **9**: 919-925
- Willats WG, Marcus SE, Knox JP** (1998) Generation of monoclonal antibody specific to (1->5)-alpha-L-arabinan. *Carbohydr Res* **308**: 149-152
- Willats WG, Steele-King CG, Marcus SE, Knox JP** (1999) Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell proliferation and cell differentiation. *Plant J* **20**: 619-628

- Wilson LG, Fry JC** (1986) Extensin : a major cell wall glycoprotein. *Plant, Cell and Environment* **9**: 239-260
- Wolkers WF, Tetteroo FA, Alberda M, Hoekstra FA** (1999) Changed properties of the cytoplasmic matrix associated with desiccation tolerance of dried carrot somatic embryos. An In situ fourier transform infrared spectroscopic study. *Plant Physiol* **120**: 153-164
- Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, Agou F, Kirk HE, Kay RJ, Israel A** (1998) Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* **93**: 1231-1240
- Yariv JH, Lis H, Katchalski E** (1967) Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo-dyes. *Biochem journal* **105**: 10-20
- Yates EA, Valdor J-F, Haslam SM, Morris HR, Dell A, Mackie W, Knox JP** (1996) Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* **6**: 131-139
- Yoine M, Nishii T, Nakamura K** (2006) Arabidopsis UPF1 RNA helicase for nonsense-mediated mRNA decay is involved in seed size control and is essential for growth. *Plant Cell Physiol* **47**: 572-580
- Zegzouti H, Jones B, Frasse P, Marty C, Maitre B, Latch A, Pech JC, Bouzayen M** (1999) Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. *Plant J* **18**: 589-600
- Zhang JY, Broeckling CD, Blancaflor EB, Sledge MK, Sumner LW, Wang ZY** (2005) Overexpression of WXP1, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant J* **42**: 689-707
- Zhang JY, Broeckling CD, Sumner LW, Wang ZY** (2007) Heterologous expression of two *Medicago truncatula* putative ERF transcription factor genes, WXP1 and WXP2, in *Arabidopsis* led to increased leaf wax accumulation and improved drought tolerance, but differential response in freezing tolerance. *Plant Mol Biol* **64**: 265-278
- Zhang X, Garreton V, Chua NH** (2005) The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes Dev* **19**: 1532-1543

Annexes

ANNEXE 1 : MILIEUX DE CULTURE POUR LA TRANSFORMATION DE M. TRUNCATULA

Milieu M1 (pour 1 L) :

Sels PDM 100 x	10 ml
CaCl ₂	0.2 g
Saccharose	10 g
Agar	7.5 g
Fer+vitamines PDM 100x	10 ml
BAP 10 mM	0.5 ml

pH 5.8

Milieu M3 (pour 1 L) :

Sels PDM 100 x	10 ml
CaCl ₂	0.2 g
Saccharose	20 g
MES 0.5 M	6 ml
Agar	7.5 g
Fer+vitamines PDM 100x	10 ml
NAA 10 mM	50 µl

pH 5.8

Milieu M2A (pour 1 L) :

Sels PDM 100 x	10 ml
CaCl ₂	0.2 g
Saccharose	10 g
MES 0.5 M	6 ml
Agar (pour le milieu solide)	7.5 g
Fer+vitamines PDM 100x	10 ml
BAP 10 mM	1.5 ml
NAA 10 mM	50 µl

pH 5.8

Milieu M4 (pour 1 L) :

Sels PDM 100 x	10 ml
CaCl ₂	0.2 g
Saccharose	10 g
MES 0.5 M	6 ml
Phytigel	3 g
Fer+vitamines PDM 100x	10 ml
AIB 10 mM	250 µl

pH 6.5

Milieu M2R (pour 1 L):

Sels PDM 100 x	10 ml
CaCl ₂	0.2 g
Saccharose	20 g
MES 0.5 M	6 ml
Agar	7.5 g
Fer+vitamines PDM 100x	10 ml
BAP 10mM	1.5 ml
NAA 10 mM	50 µl

pH 5.8

Fer+vitamines PDM 100X (pour 1 L) :

FeSO ₄ 7H ₂ O	1.5 g
Na ₂ EDTA	2 g
Acide nicotinique	0.5 g
Pyridoxine-HCl	0.05 g
Thiamine- HCl	0.5 g
Myo-inositol	100 g

Sels PDM 100X (pour 400 mL) :

KNO ₃	100 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	12 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	16 g
MnSO ₄ H ₂ O	0.4 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.04 g
H ₃ BO ₃	0.2 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.008 g
KI	0.04 g
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.004 g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.004 g

ANNEXE 2 : MILIEUX DE CULTURE POUR LA TRANSFORMATION DE N. TABACUM
 (Adapté d'après le protocole de Marie-Christine Chupeau, INRA de Versailles)

Milieu de co-culture (pour 1 L)	
Macro+micro+vitamines MSG	500 ml
Saccharose	20 g
AIA	0.5 mg
BAP	1 mg

Milieu de sélection (pour 1 L)	
Macro+micro+vitamines MSG	500 ml
Saccharose	10 g
MES	0.7 g
Adénosine	100 mg
AIA	0.5 mg
BAP	1 mg
Agar	7.5 g
pH	5.8

Macro+Microéléments+vitamines MSG :	
<u>Macro et microéléments (pour 1 L)</u> (d'après Murashige et Skoog, 1962):	
NH ₄ NO ₃	1650 mg
KNO ₃	1900 mg
CaCl ₂ H ₂ O	440 mg
MgSO ₄ 7 H ₂ O	370 mg
KH ₂ PO ₄	170 mg
H ₃ BO ₃	6,2 mg
MnSO ₄ 4 H ₂ O	22,3 mg
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	8,6 mg
KI	0,83 mg
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25 mg
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,025 mg
CoCl ₂ 6 H ₂ O	0,025 mg
FeSO ₄ 7 H ₂ O	2780 mg
Na ₂ EDTA	3730 mg
 <u>Vitamines (Pour 1 L)</u> (D'après Gamborg et al., 1968) :	
Myo-inositol	100 mg
Acide nicotinique	1 mg
Pyridoxine-HCl	1 mg
Thiamine-HCl	10 mg

ANNEXE 3 : AMORCES POUR LA PCR

Amorce 1 :

TCTAGATAGAGTAATGGAGTCGCACGAT

Amorce 2 :

TTAATTAATAACCCCTTCGTTTAGTGCATG

Amorce 3 :

GGCGCGCCTAGAGTAATGGAGTCGCACGAT

Amorce 4 :

CTCGAGAATTAACCCCTTCGTTTAGTGCATG

Amorce 5 :

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTYTAGAGTAATGGAGTCGCACG

Amorce 6 :

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTYAATTAACCCCTTCGTTTAGTGCATG

Amorce 7 :

TTTGCGGCCGCAATGGAGTCGCACGATGAG

Amorce 8 :

AACCCCTCGAGGTTTAGTGCATGGCTAGATT

La germination est un processus en continuité avec la fécondation, l'embryogénèse et la maturation de la graine. Il débute avec l'imbibition mais est soumis à des contrôles internes et externes : balance hormonale qui régule les acteurs de la germination et conditions environnementales. Ce travail apporte des informations sur la germination des semences de *Medicago truncatula*. Chez cette espèce, la germination résulte uniquement de la croissance cellulaire par élongation. La restructuration des parois joue un rôle clé et serait la cible de l'acide abscissique (ABA). Elle correspond à la modification de la composition en oses et à l'évolution des structures internes à l'échelle des polymères ; notamment, l'apparition de callose et des changements au niveau des ramifications des pectines. Les parois sont riches en arabinose, présentent une hétérogénéité tissulaire, et délimitent des structures en fuseaux dans l'axe embryonnaire. Le gène *MtSAP1* a été étudié au niveau structural et fonctionnel. Il code pour une protéine possédant les domaines A20 et AN1. Chez les mammifères ses homologues régulent les processus inflammatoire et la mort cellulaire. Chez le riz, les protéines A20/AN1 joueraient un rôle dans la transmission du signal de stress. Le travail effectué ici montre que *MtSAP1* s'exprime dans l'axe embryonnaire dans la semence en fin de maturation. Son expression chute durant la germination et il est fortement induit par l'ABA et par l'hypoxie. Des interactions existent entre *MtSAP1* et des protéines liées au développement et aux stress. Son rôle pourrait s'exercer au niveau de la transmission du signal stress lié à la dessiccation et le faible taux d'oxygène.

Cellular and molecular study of the germination of *Medicago truncatula*

Seed germination is a physiological process continuous with fecundation, embryogenesis and maturation. It starts with imbibition and is under internal and external controls. Environmental conditions represent the external control. Internal control depends on hormone balance that regulates germination actors. This work provides new clues about seed germination and more specifically about those of *Medicago truncatula*. This specie has its germination driven only by cellular expansion. Cell wall restructuration plays a key role and could be the target of abscisic acid. It corresponds to the modifications of osidic compounds and to the internal structure evolution at the scale of wall polymers, in particular callose deposition and pectin branching modification. Cell walls are very rich in arabinose, heterogenic in tissues and define spindles of cells in embryo axis. Structural and functional studies have been investigated for a gene implicated in seed physiology. *MtSAP1* codes for a protein with two zinc-finger domains A20 and AN1. In mammals, *MtSAP1* homologues regulate inflammatory process and cell death regulation. In rice, SAP (Stress-Associated Protein) genes could be implicated in stress signal transduction. The work done with *Medicago truncatula* shows that *MtSAP1* is expressed in embryo axis during last maturation events. Its expression falls down during germination and is strongly induced by abscisic acid and hypoxia. In bacterial two-hybrid system, some interactions happen with protein implicated in development and stress. *MtSAP1* function could be exerted at the stress signal transduction level related with desiccation which induces weak oxygen availability.

Étude cellulaire et moléculaire de la germination chez *Medicago truncatula*