



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle de MtPM25, une protéine LEA (Late Embryogenesis Abundant), et implication dans la qualité germinative des graines de *Medicago truncatula*

Virginie Boucher

► To cite this version:

Virginie Boucher. Caractérisation fonctionnelle de MtPM25, une protéine LEA (Late Embryogenesis Abundant), et implication dans la qualité germinative des graines de *Medicago truncatula*. Biochimie [q-bio.BM]. Université d'Angers, 2009. Français. NNT: . tel-00476720

HAL Id: tel-00476720

<https://theses.hal.science/tel-00476720>

Submitted on 27 Apr 2010

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

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

**CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE MtPM25, UNE PROTEINE
LEA (Late Embryogenesis Abundant), ET IMPLICATION DANS LA
QUALITE GERMINATIVE DES GRAINES DE *MEDICAGO TRUNCATULA***

THESE DE DOCTORAT

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

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale

ECOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement le 24 Novembre 2009, à Angers

par :

Virginie Boucher

Devant le jury ci-dessous :

James Dat	Professeur, Université d'Angers	Président
Françoise Corbineau	Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris	Rapporteur
Thierry Chardot	Directeur de recherche, INRA, AgroParisTech	Rapporteur
Véronique Gruber	Professeur, Université Denis Diderot, Paris	Examineur

Directeur de thèse : **Olivier Leprince** Professeur, Agrocampus Ouest

Thèse préparée au sein de l'UMR 1191, Physiologie Moléculaire des Semences
(Université d'Angers, Agrocampus Ouest, INRA), 16 Boulevard Lavoisier, 49045 Angers

**CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE MtPM25, UNE PROTEINE
LEA (Late Embryogenesis Abundant), ET IMPLICATION DANS LA
QUALITE GERMINATIVE DES GRAINES DE *MEDICAGO TRUNCATULA***

THESE DE DOCTORAT

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

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale

ECOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement le 24 Novembre 2009, à Angers

par :

Virginie Boucher

Devant le jury ci-dessous :

James Dat	Professeur, Université d'Angers	Président
Françoise Corbineau	Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris	Rapporteur
Thierry Chardot	Directeur de recherche, INRA, AgroParisTech	Rapporteur
Véronique Gruber	Professeur, Université Denis Diderot, Paris	Examineur

Directeur de thèse : **Olivier Leprince** Professeur, Agrocampus Ouest

Thèse préparée au sein de l'UMR 1191, Physiologie Moléculaire des Semences
(Université d'Angers, Agrocampus Ouest, INRA), 16 Boulevard Lavoisier, 49045 Angers

En premier lieu, merci à Françoise Corbineau, Yves Popineau, Véronique Gruber, et James Dat pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Merci à O. Leprince de m'avoir accueilli au laboratoire et pour son encadrement au cours de ces trois ans.

Merci à Julia pour ces précieux conseils scientifiques, et son aide pour certaines manipulations.

Merci également à Catherine pour son aide en biologie moléculaire et sa gentillesse.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire qui ont permis de rendre ces trois ans agréables.

Pascale, la protéomique serait bien triste sans toi, Nicole P., merci pour l'aide apporté pour la

culture des monstropiantes, et surtout merci pour avoir trouver les mots de réconforts à un moment

où j'allais mal, je n'ai pas oublié. Merci Benoit, ô grand maître de la culture de Medicago pour ton

aide dans la maîtrise de la bête. Merci à Patrick pour les bons moments de rigolade, et surtout pour

le poisson d'avril, mes tiroirs en ont gardé des traces chipsesques. Merci à Edith pour sa bonne

humeur, son efficacité hors pair ;) attention je te surveille ! Merci à Nicole C, pour sa grande

disponibilité, sa gentillesse et son merveilleux listing de produit. Merci à Sylvie pour sa sympathie.

Merci à Françoise, David M, Béa, Abdel, Lydie pour les discussions scientifiques ou moins.

Merci à Carolyne pour ses anecdotes rigolotes, les chewing-gum, et non, je ne suis pas gothique !

Une pensée pour ceux de l'université et surtout pour Marie-Laure.

Merci à Cécile Mangavel et Denis Renard, là-bas, à Nantes, pour la découverte de techniques bien sympathiques.

Enfin, parce qu'ils sont la cerise sur le gâteau, la lumière dans l'obscurité parfois très opaque de la science (et oui !), je dirais même la banane dans le banana split (c'est dire !), je tiens tout

particulièrement à remercier,

au sein du labo :

William, PES, et oui, ton humour et tes connaissances aussi vastes que improbables vont me

manquer ! (ainsi que les anecdotes de ton enfance). Merci pour ton soutien les jours de smiley à

l'envers, merci de me faire rire, ne changes pas.

Céline... Très chère, très formidable et très inégalable impératrice du QTL et de la génétique en

général ;) Chère PEB, j'aurais tant à dire que toute la thèse n'y suffirait pas... Prends garde au

Pigeon killer qui sommeille en chacun de nous et surtout aux blob blobisant, terribles !!! Tu as

toujours été là quand j'en avais besoin, sur la banquise, dévorée par le pingouin zombiesque, j'ai

survécue en partie grâce à toi !!! A qui je vais raconter mes rêves maintenant et surtout qui va être

en mesure de les comprendre ? Vivement le labo de la finitude !

Michaela, PEJ, continue de rêver de moutons électriques et de te trouver au sommet de la courbe

du bonheur, mais attention au four à micro ondes pervers Burtonien ! Merci pour ta gentillesse et ta

disponibilité.

Johann (lire Yohann, pour les non connaisseurs), merci pour toutes les blagues et pour toutes les

œuvres d'art qui embellissent notre bureau, et surtout merci d'être aussi ADORABLE !

Emilie, PET, merci pour ta gentillesse, tu es formidable, ne perds pas ça de vue, n'abandonnes

jamais, dans un an je serais là pour t'acclamer ;)

David L, attention aux plasmides vicieux et autres constructions infernales. Merci pour ta

sympathie et pour ton rire.

Sophie, chère PEF, quand je te disais que tu étais la meilleure ! J'avais encore raison ! Merci pour

tous les bons moments.

Adrien, alias PEL, bon courage et bienvenue à toi dans Dallas, ton univers impitoyable, ne te perds

pas sur le jeu de l'oie.

En dehors du labo :

*Benoît, Ah ! Mon cher ami ! Ca y est le nécronomicon est achevé. Gniark ! Gniark ! Les portes dimensionnelles ne vont pas tarder à laisser sortir l'immondice obscène et je la dominerais et règnerais sur le monde !!!! Shub-Niggurath ! Merci de me comprendre là où les autres sont perdus. Plus qu'un an et toi aussi tu émergeras des sables mouvants engendrés par les champignons vénéneux. . . Courage donc ! Je n'oublierais pas de te dédier ma palme d'or !
Caroline, je n'ai pas été très disponible, mais je ne t'ai pas oublié, merci pour ton soutien sans faille et pour ta gentillesse, merci pour les sorties parisiennes ressourçantes.
Marion, j'espère pouvoir un jour transformé ma grenouille. . . Merci pour tout.
Anne-Sophie, ouaw ! Que de chemin parcouru ! Encore une étape de franchie, mais quand est ce que je rentre dans la vraie vie moi aussi ?*

Je remercie aussi ceux sans qui cette thèse n'aurait pu se faire : Medicago, même si tes gousses acérées mon bien des fois transpercées je te remercie pour toutes les jolies graines à qui j'ai pu faire subir mille tourments pour me venger. E.coli, franchement tu n'as pas fait d'effort avec PM25, mais bon, désolée pour les UV. Ma protéine PM25, même si tu restes encore un peu mystérieuse, tu seras pour toujours ma L'EA préférée. EM6, je ne t'oublie pas non plus, merci d'avoir été un témoin si sympathique. Mes monstropiantes adorées, dommage qu'il est fallu tant de temps pour vous obtenir. Par contre, je ne remercie pas Arabido qui n'a pas été capable d'avoir des insertions au bon endroit.

Je remercie également bien fort ma famille, mes parents et ma grand-mère pour leur soutien tout au long de ces années, pour leur compréhension et leur amour indéfectible, merci aussi à Briséis. Et pour conclure, parce qu'il faut finir par le meilleur (?!?), Dimitri, je te remercie. Crois tu que j'aurais fait mieux que Vincent ? En fait nous ne le saurons jamais car le temps passe, et même si le souvenir reste comme tu aimes à l'écrire, il n'en garde pas moins l'amertume du mot fin, sans la saveur du mot recommencement ce qui m'astreins à enfermer les mots qui me viennent. Alors je citerais simplement Oscar Wilde puisque nous l'aimons tout deux : « Chacun de nous porte en lui le ciel et l'enfer ». Je te remercie pour tout le ciel que tu m'as apporté ; plus que quiconque n'avait pu et ne pourra jamais le faire. Merci aussi pour avoir relue ce manuscrit, merci pour tous tes encouragements.

*Merci à tout ceux que j'ai oublié, et il y en a forcément, mais on s'embrasse on n'oublie tout. . .
Ouais, spécial dédicace à William, ok, bon le répertoire n'est pas le même, mais on fait avec ce qu'on a !*

Sommaire

Liste des figures.....	5
Liste des tableaux.....	6
Liste des abréviations.....	7

Introduction Bibliographique.....9

1. Développement de la graine.....	11
1.1 Acquisition de la tolérance à la dessiccation.....	14
1.2 Longévité des graines.....	15
1.3 La dormance.....	18
2. La tolérance à la dessiccation.....	19
2.1 Généralités.....	20
2.2 Impact de la dessiccation sur la cellule.....	21
2.2.1 Impact sur les membranes.....	21
2.2.2 Impact sur les protéines.....	21
2.2.3 Impact sur le métabolisme, et augmentation du stress oxydant.....	22
2.2.4 Impact sur l'ADN.....	23
2.3 Mécanismes impliqués dans la tolérance à la dessiccation.....	25
2.3.1 Les systèmes antioxydant.....	25
2.3.2 Les sucres non réducteurs.....	26
2.3.2.1 L'hypothèse de remplacement de l'eau.....	26
2.3.2.2 Formation de l'état vitreux.....	27
2.3.3 Les protéines HSP (Heat Shock Protein).....	28
3. Les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant).....	31
3.1 Origine des protéines LEA.....	31
3.2 Caractéristiques et classification des protéines LEA.....	33
3.3 Le groupe 5.....	35
3.3.1 Descriptions des membres du groupe 5.....	37
3.3.2 Particularités du groupe 5.....	37
3.4 Caractéristiques physico-chimiques des protéines LEA.....	39
3.5 Localisation cellulaire des protéines LEA.....	41
3.6 Régulation transcriptionnelle des protéines LEA.....	42
3.7 Implications des protéines LEA dans la tolérance aux stress abiotiques....	42
3.7.1 Rôle fonctionnel des protéines LEA : approches de génétique inverse	45
3.7.2 Rôle fonctionnel des protéines LEA : approches in vitro.....	47
3.7.2.1 Protection des protéines.....	47
3.7.2.2 Protection membranaire.....	48
3.7.2.3 Séquestration d'ions.....	49
3.7.2.4 Implication des protéines LEA dans la formation des états vitreux	51
.....	51
4. <i>Medicago truncatula</i>, un bon modèle d'étude de la physiologie des légumineuses	53
.....	53
5. PM25 et origine de ce travail.....	55

Thématique du laboratoire et objectifs de la thèse.....59

Partie 1 : PM25, une LGA atypique, spécifique de la graine et localisée dans le noyau.....63

INTRODUCTION.....65

RESULTATS.....67

1.1. PM25, une protéine hydrophobe largement désordonnée à l'état natif et stable à la chaleur.....67

1.1.1 Détermination de l'hydrophobicité de PM25.....67

1.1.2 PM25, une protéine majoritairement non structurée en solution.....69

1.1.3 PM25 est stable à la chaleur dans une solution complexe de protéines.....75

1.2 Etude de l'expression de PM25 au cours de la germination et de la croissance post-germinative en conditions optimales et pénalisantes.....77

1.2.1 Expression de PM25 au cours de l'imbibition.....77

1.2.2 Expression de PM25 en conditions osmotiques pénalisantes.....79

1.3 Localisation cellulaire et tissulaire de PM25.....81

1.3.1 Localisation cellulaire de PM25.....81

1.3.2 Localisation tissulaire de PM25.....83

DISCUSSION.....85

Partie 2 : Caractérisation fonctionnelle de PM25
.....89

INTRODUCTION.....91

RESULTATS.....95

2.1 Effet de PM25 sur la protection de l'ADN et la survie bactérienne lors de stress
.....95

2.1.1 Effet de PM25 sur la conformation de l'ADN.....95

2.1.2 Protection contre les UV.....95

2.1.3 Protection contre la dessiccation.....97

2.2 Effet de PM25 sur la protection enzymatique.....99

2.2.1 Tests de protection de la citrate synthase.....99

2.2.1.1 Effet de PM25 sur la protection de la citrate synthase pendant le chauffage.....103

2.2.1.2 Effet de PM25 sur la protection de la citrate synthase pendant le séchage
.....105

2.2.2 Tests de protection de la lactate déshydrogénase.....105

2.2.2.1 Effet de PM25 sur la protection de la lactate déshydrogénase pendant la congélation.....105

2.2.2.2 Effet de PM25 sur la protection de la lactate déshydrogénase pendant le séchage.....	105
2.3 Effet de PM25 sur la prévention de l'agrégation protéique.....	107
2.3.1 Effet de PM25 sur l'agrégation engendrée par la congélation.....	109
2.4 Effet de PM25 sur la dissolution des agrégats.....	111
2.4.1 Effet de PM25 sur la dissolution des agrégats après congélation.....	111
2.4.2 Effet de PM25 sur la dissolution d'agrégats après des cycles de congélation multiples.....	113
2.4.3 Effet de PM25 sur l'agrégation engendrée par le séchage.....	113
2.4.4 Effet de PM25 sur l'agrégation engendrée par une dialyse à différents pH : mesure spectrophotométrique.....	115
2.4.5 Effet de PM25 sur la protection de la citrate synthase après le chauffage...	115
2.4.6 Effet de PM25 sur la protection de la lactate déshydrogénase après la congélation.....	119
2.5 Mesure et visualisation des agrégats.....	121

DISCUSSION.....	123
------------------------	------------

<i>Partie 3. Analyses physiologiques de mutants d'insertion tnt1 de M.truncatula pour le gène PM25.....</i>	<i>129</i>
---	------------

INTRODUCTION.....	131
--------------------------	------------

RESULTATS.....	135
-----------------------	------------

3.1 Vérification des mutations et sélection de lignées homozygotes.....	135
---	-----

3.2 Phénotypage physiologique des mutants pm25.....	137
---	-----

3.2.1 Effet de PM25 sur la tolérance à la dessiccation.....	137
---	-----

3.2.2 Effet de PM25 sur la dormance.....	139
--	-----

3.2.3 Impact de PM25 au cours du vieillissement accéléré.....	143
---	-----

3.2.4 Implication de PM25 dans la tolérance aux stress osmotique et salins.....	145
---	-----

3.2.5 Impact de l'absence de PM25 sur la masse des graines.....	145
---	-----

3.3 Phénotypage biochimique.....	147
----------------------------------	-----

3.3.1 Mesure des teneurs en eau.....	147
--------------------------------------	-----

3.3.2 Teneur en protéines de réserves.....	149
--	-----

3.3.3 Teneur en sucres solubles.....	149
--------------------------------------	-----

3.4 Etude de l'expression des homologues de PM25 au cours de la maturation et de la germination en conditions optimales et pénalisantes.....	155
--	-----

3.4.1 Expression des homologues de PM25 au cours de la maturation.....	155
--	-----

3.4.2 Expression des homologues de PM25 au cours de la germination.....	159
---	-----

3.4.3 Expression des homologues de PM25 au cours de stress osmotique et salins...	159
---	-----

DISCUSSION.....	163
------------------------	------------

<i>Conclusions et perspectives.....</i>	169
<i>Procédures Expérimentales.....</i>	177
<i>Références bibliographiques.....</i>	196
<i>Annexes.....</i>	212

Liste des figures

Figure 1 : Schéma simplifié d'une graine de légumineuse.....	12
Figure 2 : Schéma général décrivant les phases du développement de la graine en fonction des variations de poids frais (fw), sec (dw) et de la teneur en eau (wc) au cours de le phase d'embryogenèse (I), de remplissage (II) et de dessiccation (III) des graines orthodoxes.	12
Figure 3 : Schéma des principaux paramètres influençant la longévité de la graine.....	16
Figure 4 : Schéma des principales voies de détoxification des ROS (Reactive oxygen species).....	24
Figure 5 : Comparaison de la charge en fonction de l'hydrophobicité prédites à parti de la séquence protéines LEA chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
Figure 6 : Diversité des légumineuses.....	52
Figure 7 : Plante de <i>Medicago truncatula</i>	52
Figure 8 : Evolution du niveau de PM25 en corrélation avec la tolérance à la dessiccation.....	54
Figure 9 : Isotherme de sorption de l'eau de PM25, EM6 et du lysozyme.....	56
Figure 10 : Alignement de séquences protéiques homologues de PM25.....	58
Figure 1.1 : Distribution cumulée des valeurs de Gravy des protéines LEA chez <i>M.truncatula</i> et <i>A.thaliana</i> appartenant aux principaux groupes de LEA.....	66
Figure 1.2 : Profil d'hydropathie de PM25	66
Figure 1.3 : Prédications <i>in silico</i> de structure de PM25 et EM6 à partir de leurs séquences primaires en acides aminés par PONDR VL-XT (www.pondr.com).....	68
Figure 1.4 : Caractéristiques générales des spectres protéiques obtenus en dichroïsme circulaire.....	70
Figure 1.5 : Spectre de PM25 en solution et en présence de SDS en dichroïsme circulaire et contribution des structures secondaires en spectroscopie FTIR et en DC de PM25 en solution, séchée, et en présence de SDS.....	70
Figure 1.6: Analyse par western blot de la solubilité à la chaleur de PM25 et EM6.....	74
Figure 1.7 : Expression de <i>PM25</i> au cours de la germination et de la croissance post-germinative dans des racines de <i>M. truncatula</i>	76
Figure 1.8 : Germination de graines de <i>M.truncatula</i> et expression de <i>PM25</i> dans l'eau et lors d'un stress osmotique provoqué par une solution de PEG ψ :-0.3 MPa.....	78
Figure 1.9 : Germination de graines de <i>M.truncatula</i> et expression de <i>PM25</i> dans l'eau et lors d'un stress salin provoqué par du NaCl 60 mM.....	78
Figure 1.10 : Séquence primaire de PM25 en acides aminés.....	80
Figure 1.11 : Adressage cellulaire de PM25 en microscopie.....	80
Figure 1.12: Empruntes tissulaires de graines de <i>Medicago truncatula</i> imbibées 3h.....	82
Figure 2.1 : Différentes conformations adoptés par l'ADN.....	90
Figure 2.2 : Effet de PM25 sur la conformation de l'ADN en dichroïsme circulaire.....	94
Figure 2.3: Croissance bactérienne après un stress UV.....	96
Figure 2.4: Croissance bactérienne après séchage.....	98
Figure 2.5 : Activité de la citrate synthase en fonction du temps de chauffage.....	100
Figure 2.6 : Pourcentage d'activité de la citrate synthase en fonction du temps de chauffage en présence de PM25, EM6 ou BSA.....	102
Figure 2.7 : Activité de la citrate synthase après séchage en présence de PM25.....	102
Figure 2.8 : Effet du nombre de cycle de congélation (A) et de l'ajout de protéines après 3 cycles de congélation (B) sur l'activité de la lactate déshydrogénase.....	104
Figure 2.9 : Effet de l'ajout de protéines sur l'activité de la lactate déshydrogénase après séchage...106	106
Figure 2.10 : Effet de l'ajout de PM25 sur l'agrégation avant dialyse et congélation.....	108
Figure 2.11 : Evolution de l'agrégation de protéines solubles en fonction du nombre de cycles de congélation.....	108
Figure 2.12 : Effet de la quantité de PM25 sur l'agrégation de protéines solubles de <i>M.truncatula</i> après congélation à -20°C.....	110
Figure 2.13: Effet de l'ajout de différentes protéines purifiées sur l'agrégation de protéines solubles de <i>M.truncatula</i>	110
Figure 2.14 : Evolution de l'agrégation en fonction du nombre de cycles de congélation.....	112
Figure 2.15 : Evolution de l'agrégation de protéines solubles en fonction du séchage.....	112

Figure 2.16 : Evolution de l'agrégation en fonction du pH.....	114
Figure 2.17 : Pourcentage d'activité de la citrate synthase puis ajout de protéines après le chauffage.....	117
Figure 2.18: Activité enzymatique de la citrate synthase après séchage puis ajout de PM25 pendant la réhydratation.....	117
Figure 2.19 : Effet de l'ajout de protéines sur l'activité de la lactate déshydrogénase après 3 cycles de congélation.....	118
Figure 2.20 : Observation en microscopie optique et mesure au nanosizer de l'agrégation d'échantillon en présence ou absence de PM25 avant congélation.....	120
Figure 2.21 : Observation en microscopie optique des échantillons congelés en absence (en A) ou en présence de PM25. En C, mesure de taille des agrégats observés.....	120
Figure 3.1: Représentation schématisée de l'insertion <i>Tnt1</i> au sein des différents mutants <i>pm25</i>	134
Figure 3.2: Identification des mutants <i>pm25</i> homozygotes par western blot.....	134
Figure 3.3 : Evolution de la germination de graines âgées de 28 JAP et séchées.....	138
Figure 3.4 : Courbes de germination de graines dormantes de <i>M.truncatula</i> et perte de la dormance en fonction du temps de post-maturation.....	140
Figure 3.5 : Courbes de germination de graines de <i>M.truncatula</i> en présence de fluridone 20 μ M....	140
Figure 3.6 : Taux finaux de germination de <i>M.truncatula</i> avant et après un vieillissement accéléré..	142
Figure 3.7 : Taux finaux de germination de <i>M.truncatula</i> en absence ou en présence de NaCl 60 mM.....	142
Figure 3.8 : Germination de graines de <i>M.truncatula</i> en absence ou en présence de PEG équivalent à ψ : -0.3 MPa.....	144
Figure 3.9 : Taille et masse de graines de <i>M.truncatula</i> déficiente ou non en PM25.....	147
Figure 3.10 : Evolution du taux de PM25 en western blot au cours de la maturation et masse de graines 28 JAP déficientes ou non en PM25.....	147
Figure 3.11 : Teneurs en eau de graines immatures et matures déficientes ou non en PM25.....	148
Figure 3.12 : Teneurs en protéines de réserves de graines matures de <i>M.truncatula</i> déficientes ou non en PM25.....	148
Figure 3.13 : Voies de biosynthèse des RFOs dans les semences de légumineuses.....	151
Figure 3.14 : Teneurs en sucres solubles de graines 28 JAP de <i>M.truncatula</i>	151
Figure 3.15 : Teneurs en sucres solubles de graines matures de <i>M.truncatula</i>	152
Figure 3.16 : Arbre phylogénétique des membres du groupe des D-34 chez <i>M.truncatula</i>	154
Figure 3.17 : Expression de <i>PM25</i> et de ses homologues chez <i>M.truncatula</i> dans les graines 28 jours après pollinisation.....	154
Figure 3.18 : Expression de <i>PM25</i> et de ses homologues chez <i>M.truncatula</i> dans les graines mutées pour ce gène 28 jours après pollinisation.....	156
Figure 3.19 : Expression de <i>PM25</i> et de ses homologues chez <i>M.truncatula</i> dans les graines matures mutées pour <i>PM25-1</i>	156
Figure 3.20 : Cinétique d'expression des homologues de <i>PM25</i> au cours de l'imbibition de graines de <i>M.truncatula</i> dans les graines sauvages et <i>pm25-1</i>	158
Figure 3.21 : Expression des homologues de <i>PM25</i> au cours de stress hydriques et salins chez des graines déficientes ou non en PM25.....	160
Figure M.1 : Schéma de chauffage de la citrate synthase.....	184
Figure M.2 : Schéma de congélation de la lactate déshydrogénase.....	184

Listes des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes classifications des protéines LEA et répartitions du nombre de séquences peptidiques répertoriées pour chacune des familles.....	32
Tableau 2 : Localisation cellulaire de protéines LEA.....	40
Tableau 3 : Récapitulatif de la diversité des résultats obtenus pour la caractérisation fonctionnelle des protéines LEA.....	43-44

Liste des abréviations

ABA	Abscissic Acid
ADNc	ADN complémentaire
ARNm	ARN messenger
CFU	Colony Forming Unit
CS	Citrate Synthase
DC	Dichroïsme Circulaire
DO	Densité Optique
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylène Diamine Tetraacetic Acid
FTIR	Fourier Transformation Infrared
GA	Gibberellic Acid
GFP	Green Fluorescent Protein
HR	Humidité relative
HSP	Heat Shock Protein
JAP	Jours Après Pollinisation
LB	Luria Bertani Broth
LDH	Lactate Deshydrogénase
LEA	Late Embryogenesis Abundant
MS	Matière Sèche
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucléotide (forme réduite)
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyéthylèneglycol
Pi	Point isoélectrique
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
QTL	Quantitative Trait Locus
RT-qPCR	Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium dodécylsulfate
TD	Tolérance à la dessiccation
TBS	Tris Buffer Saline
TE	tampon Tris EDTA
Tm	Température melting
UV	Ultra-Violet

Introduction Bibliographique

*À mon père, et à tous ceux trop
tôt disparus*

*Recherche : partir de ce qu'on croit savoir, et tirer sur le fil en souhaitant
qu'il se brise.*

Jean Rostand

L'étude décrite dans ce mémoire porte sur la caractérisation fonctionnelle de MtPM25, une protéine de type LEA (Late Embryogenesis Abundant) mise en évidence en relation avec la tolérance à la dessiccation pendant la germination chez la légumineuse *Medicago truncatula* (Boudet et al., 2006). Nous avons au cours de ce travail cherché à préciser son rôle dans la mise en place de la tolérance à la dessiccation et dans la qualité germinative des graines par des approches *in vitro*, et par une approche de génétique inverse. Par un souci de simplification, et toutes les études portant sur *M.truncatula*, MtPM25 sera annoté tout au long de la thèse PM25. Afin de restituer le contexte général de l'étude, nous nous attacherons au cours de cette introduction bibliographique à décrire la biologie des graines en portant une attention particulière aux phases tardives du développement pendant laquelle s'élabore la qualité germinative. Celle-ci se définit comme l'ensemble des attributs permettant à la graine de germer de manière rapide et homogène et de produire des jeunes plants vigoureux quelque soit les conditions du milieu. Elle se base donc essentiellement sur les attentes des producteurs de semences. Après avoir décrit les mécanismes de la tolérance à la dessiccation, composante importante de la qualité germinative, nous ferons l'état des connaissances sur les protéines LEA et en particulier sur le groupe 5 dont fait partie PM25. Nous décrirons également la plante modèle *M.truncatula*. Et, nous terminerons par la description des objectifs de ce travail ainsi que la démarche adoptée pour mener à bien ce projet.

1 Développement de la graine

La graine constitue l'organe qui se développe à partir de l'ovule fécondé des plantes phanérogames et qui va être le vecteur de la reproduction sexuée. Elle représente un moyen de dissémination efficace pour la plante. Chez les graines de Fabaceae (légumineuses), dont fait partie *Medicago truncatula*, notre modèle d'étude, la graine est constituée d'un embryon qui comprend un axe embryonnaire portant deux cotylédons. Aux extrémités de l'axe embryonnaire, se trouvent, d'un côté, les pré-feuilles qui formeront la tige feuillée et de l'autre la radicule qui produira les racines. La majorité des réserves amylacées, protéiques et lipidiques qui seront consommées lors de la germination se situent dans les cotylédons, mais s'accumulent également dans l'axe embryonnaire. L'ensemble est entouré et protégé par une ou plusieurs

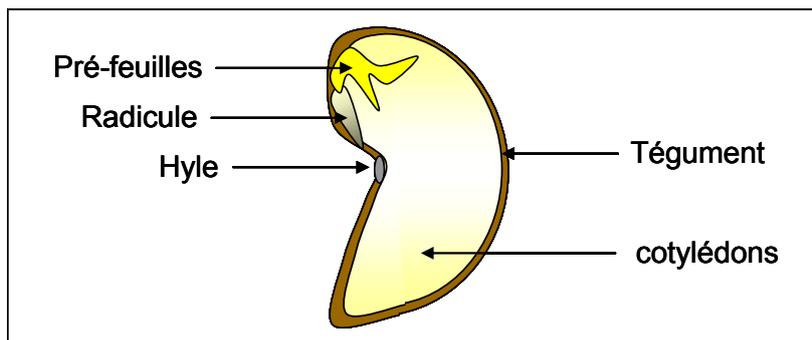


Figure 1 : Schéma simplifié d'une graine de légumineuse
L'ensemble radicule + pré-feuilles+ cotylédons constitue l'embryon.

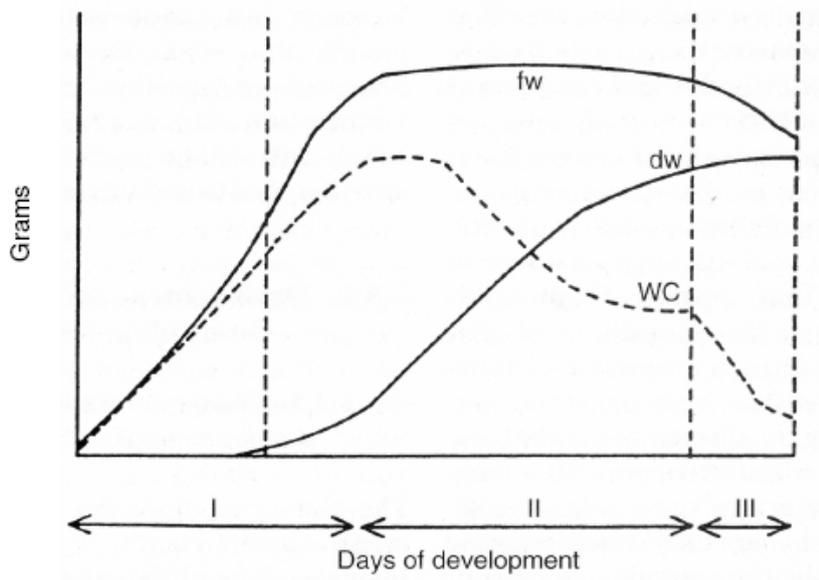


Figure 2 : Schéma général décrivant les phases du développement de la graine en fonction des variations de poids frais (fw), sec (dw) et de la teneur en eau (wc) au cours de le phase d'embryogenèse (I), de remplissage (II) et de dessiccation (III) des graines orthodoxes. (d'après Kermodé et Savage, 2002)

assises cellulaires constituant les téguments (Figure 1). Chez ce type de graine, il n'y a pas ou peu d'albumen dans la graine mature. L'albumen est un tissu nutritif qui sera consommé par l'embryon au cours du développement, contrairement à ce que l'on peut observer chez les graines de céréales ou chez la plupart des monocotylédones (l'axe embryonnaire ne porte qu'un seul cotylédon). Chez celles-ci, l'albumen perdure jusqu'à maturité et peut constituer la majeure partie de la graine.

Le comportement au stockage des graines fait l'objet d'une classification en trois grands groupes, les graines dites « orthodoxes », comme celles de *Medicago truncatula*, les graines dites récalcitrantes, comme le gland de chêne (*Quercus robur* L) (Hendry et al., 1992) et les graines dites intermédiaires comme les graines de caféier (*Coffea Arabica* L) (Ellis et al., 1990). Les deux premiers groupes ont été défini par (Roberts, 1973), tandis que la troisième catégorie n'a été décrite que plus récemment (Ellis et al., 1990). A maturité, les graines orthodoxes sont tolérantes à la dessiccation, c'est-à-dire qu'elles survivent à une faible teneur en eau de l'ordre de 5 à 15 % par rapport à la masse fraîche de la graine et peuvent même subir un séchage plus poussé. Elles vont ainsi pouvoir se conserver et être stockées sur de longues périodes (allant de quelques années à plusieurs décennies), et sont également capables de tolérer une conservation au froid. Les semences récalcitrantes ne tolèrent pas la dessiccation. Elles meurent généralement si elles subissent un séchage forcé qui amène leur teneur en eau à une gamme de valeurs inférieures à 20 à 50 % par rapport à la masse fraîche de la graine selon les espèces (Corbineau et Côme, 1988) Les graines à comportement intermédiaire sont tolérantes à la dessiccation. Cependant, la conservation au froid leur est fatale au contraire des graines orthodoxes (Hong et Ellis, 1996).

Notre travail portant sur une graine orthodoxe et sur l'implication d'une protéine dans la mise en place de la tolérance à la dessiccation par la suite nous ne décrirons que ce type de graine. Les graines orthodoxes ne vont pas être capables de tolérer la dessiccation à tous les stades de leur développement et vont devoir acquérir cette aptitude qui va leur permettre de conserver leur capacité germinative dans le temps au cours de leur maturation.

1.1 Acquisition de la tolérance à la dessiccation

L'étude du développement de la graine d'angiosperme orthodoxe a permis de mettre en évidence trois phases (Bewley et Black, 1994) qui se distinguent par des changements de poids frais et sec ainsi que de teneur en eau de l'embryon. La première est la phase d'embryogenèse caractérisée par une forte activité mitotique des cellules du zygote et de l'albumen. Lors de la seconde phase dite de « remplissage », les divisions cellulaires cessent et font place à une élongation cellulaire et à un remplissage de la graine. Pour les graines exalbuminées, l'albumen va être résorbé. Lors de cette phase vont s'accumuler les réserves protéiques, glucidiques et lipidiques (Bewley et Black, 1994). Le poids sec augmente fortement tandis que le poids frais reste stable ce qui a pour incidence de provoquer la diminution de la teneur en eau (Figure 2). Chez *Medicago truncatula*, les données obtenues par (Gallardo et al., 2006) montre qu'en chambre climatique, la phase de remplissage démarre aux environs de 12 JAP (Jours Après Pollinisation) et se termine vers 28 JAP. Lorsque le poids sec est stabilisé, la phase de dessiccation commence avec une diminution très rapide de la teneur en eau. Le développement va se terminer par cette troisième phase qui va démarrer avec l'arrêt du remplissage. Cette dernière phase va conduire la graine dans un état de quiescence caractérisé par un arrêt du métabolisme (Leopold, 1986; Bewley et Black, 1994). La teneur en eau de la graine orthodoxe à maturité varie entre 5 et 15 % selon les espèces (environ 7 % chez *M.truncatula*) et selon les conditions d'humidité relative ambiante. La tolérance à la dessiccation s'acquière vers la moitié du développement de la graine pendant la phase de remplissage. Ainsi, lors des premières phases de développement, la graine orthodoxe sera sensible à la dessiccation. La transition d'un stade sensible à la dessiccation vers un stade tolérant va être variable selon les espèces. Le critère physiologique le plus souvent utilisé pour tester la tolérance à la dessiccation de graines immatures est l'aptitude à germer après un dessèchement rapide amenant la teneur en eau de ces graines à une valeur proche de celles dans les graines matures (Fischer et al., 1988; Sun et Leopold, 1993; Sanhewe et Ellis, 1996). En effet, le pouvoir germinatif étant acquis juste avant la mise en place de la tolérance à la dessiccation, la graine pourra germer avant d'être apte à tolérer la dessiccation, ce qui permet par cette méthode de déterminer précisément le moment de sa mise en place (Gallardo et al., 2006). La transition d'un stade sensible à un stade tolérant à la

dessiccation chez la moutarde se situe à mi-course de la synthèse des substances de réserves (Fischer et al., 1988). Chez le haricot, la tolérance à la dessiccation est acquise lorsque le poids de la matière sèche se stabilise (entre 31 et 38 JAP) (Sanhewe et Ellis, 1996). Chez *M.truncatula*, la tolérance à la dessiccation est acquise entre 16 et 20 jours après pollinisation (20 JAP) (Gallardo et al., 2006). L'acquisition de la tolérance à la dessiccation va également dépendre de la vitesse de séchage de la graine. Ainsi, lorsque les graines sont séchées lentement, la tolérance à la dessiccation est acquise plus précocement que lors d'un séchage rapide (Leprince et al., 1993). En dehors de la mise en place de la tolérance à la dessiccation, d'autres changements physiologiques importants vont survenir pendant les phases tardives de la maturation. En effet c'est en fin de maturation que vont également être acquis la longévité et éventuellement la dormance.

1.2. Longévité des graines

La longévité se définit comme le temps pendant lequel une graine peut être conservée sans perdre son aptitude à germer. La faible teneur en eau des graines orthodoxes engendre de profondes modifications physico-chimiques tels que la formation d'un état vitreux, mais aussi physiologiques : très fort ralentissement puis arrêt du métabolisme. Ces modifications vont leur conférer une excellente aptitude à la conservation (Buitink et Leprince, 2004). De par leur aptitude à se conserver à l'état sec, les graines constituent un matériel idéal pour la conservation *ex situ* des ressources génétiques permettant ainsi de préserver la biodiversité. Chez certaines espèces des cas spectaculaires de longévité ont été observés. Par exemple pour *Phoenix dactylifera* L (Sallon et al., 2008) dont les graines sont encore viables après 2000 ans, pour le lotus sacré (*Nelumbo nucifera*) dont les graines sont encore viables 1300 ans (Shen-Miller et al., 2002) ou encore pour le canna (*Canna compacta*) dont les graines sont encore viables après 600 ans de conservation (Lerman et Cigliano, 1971). En ce qui concerne les légumineuses les valeurs maximales de viabilité peuvent atteindre jusqu'à 200 ans pour l'acacia (Daws et al., 2007). L'aptitude à la longévité dépend de facteurs génétiques inhérents à l'espèce. Ainsi chez *Arabidopsis thaliana* (Clerkx et al., 2004) et sur le riz (*Oriza sativa*) (Miura et al., 2002), plusieurs QTL (quantitative trait loci) de longévité ont ainsi pu être mis en évidence. Mais elle va également dépendre de l'environnement dans lequel la graine est

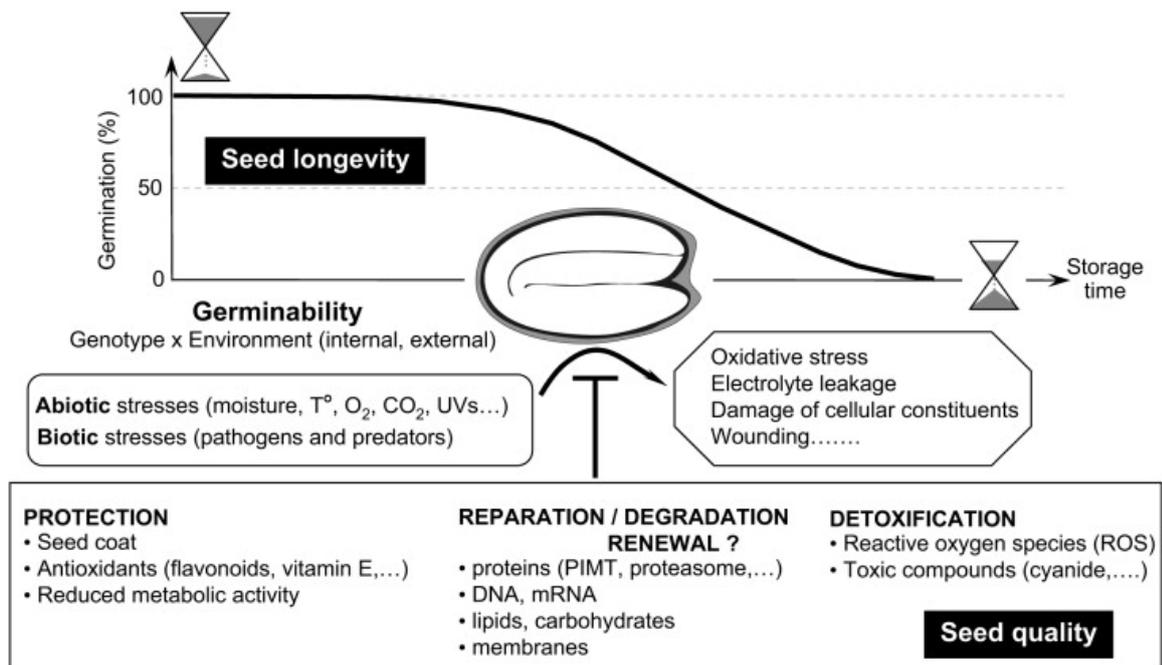


Figure 3 : Schéma des principaux paramètres influençant la longévité de la graine

Les flèches indiquent une induction tandis que les barres indiquent une répression. (Rajjou et Debeaujon (2008))

stockée à savoir les conditions d'humidité relative et la température, qui vont impacter sur la teneur en eau de la graine (Walters, 1998; Walters et al., 2005), et, probablement la teneur en oxygène (Hendry, 1993). En règle générale, les données de longévité sont basées sur des expériences de conservation démarrées par des chercheurs visionnaires des XVIII^{ème} et XIX^{ème} siècles et sur les données obtenues dans les banques de semences. Cependant, de part la faculté de conservation des graines orthodoxes ces expériences peuvent prendre des dizaines voir des centaines d'années. Ces temps d'expériences ont été considérablement raccourcis (temps d'expérience de quelques jours à quelques semaines) par la mise en place de protocoles de détérioration contrôlée ou vieillissement accéléré. Les graines vont être stockées dans des conditions de température et d'humidité relative plus élevées, conditions délétères qui vont accélérer leur vieillissement. Ces traitements sont supposés mimer le vieillissement naturel (Delouche et Baskin, 1973; Bentsink et al., 2000; Clercx et al., 2004). Cependant très peu de données étayent pour le moment cette hypothèse. Même si les récents résultats obtenus par (Rajjou et al., 2008) mettent en évidence que le vieillissement accéléré reproduit bien les phénomènes mis en jeu lors du vieillissement naturel au niveau du protéome, il a aussi pu être montré par des techniques de biophysiques que les cinétiques de vieillissement répondent à différentes lois selon que la graine est stockée dans des conditions optimales de conservation ou dans des conditions entraînant le vieillissement accéléré (Buitink et Leprince, 2004). Toutefois le vieillissement accéléré reste un outil essentiel pour apprécier la longévité.

Les mécanismes exacts impliqués dans l'aptitude à la conservation restent encore mal connus. Le tégument, des mécanismes de protection incluant les systèmes anti-oxydants, mais aussi de réparation et de détoxications des espèces réactives de l'oxygène ou de composés toxiques (cyanure...) seraient impliqués (Figure 3) (Rajjou et Debeaujon, 2008). L'efficacité des différents systèmes mis en place va permettre à la graine de se conserver plus ou moins longtemps, et va donc définir sa qualité.

Les connaissances acquises dans les mécanismes améliorant la longévité ont été très précieuses, notamment pour les banques de conservation de semences qui cherchent à déterminer des conditions optimales dans lesquelles la graine vieillira le plus lentement possible et pourra donc se conserver plus longtemps, ceci pour des

raisons écologiques de protection et de conservation d'espèces en danger, endémiques... Ainsi, le Millennium Seed Bank Project a été instauré au Royal Botanic Gardens, Kew (Angleterre), et vise à regrouper et à conserver une grande variété de semences dont certaines ont déjà disparu à l'état sauvage. La conservation des graines dans de bonnes conditions aura également un impact agronomique et économique. En effet il est nécessaire pour l'industrie semencière de pouvoir conserver les lots de semences sans altérer leur qualité physiologique en vue de leur culture par les producteurs.

1.3 La dormance

La dormance correspond à une inaptitude pour la graine de germer même dans des conditions favorables (Bewley, 1997). La dormance est acquise en fin de maturation de la graine. Elle est ensuite perdue progressivement pendant la post-maturation à sec, c'est-à-dire pendant la conservation. La dormance pourra être d'origine embryonnaire et/ou tégumentaire. Lorsque la dormance est tégumentaire, elle pourra être levée par scarification qui consistera en une disruption artificielle du tégument ; la graine pourra alors s'imbiber et germer. La dormance embryonnaire correspond à une inhibition de la germination au niveau de l'embryon et pourra être levée par des facteurs environnementaux tel que le froid (stratification), la durée du stockage (post-maturation à sec) ou la lumière, dont l'impact dépend des espèces. La dormance sera dite dormance primaire lorsqu'elle sera acquise pendant la maturation de la graine. Une dormance qualifiée de secondaire pourra être mise en place lorsque les graines rencontrent pendant l'imbibition des conditions défavorables telles que manque d'oxygène, conditions lumineuses, températures. Ainsi, même après le retour dans des conditions favorables, la graine ne germera pas immédiatement. La dormance est régulée de façon complexe par des signaux endogènes à la graine mais également par des facteurs environnementaux. Au sein de la graine, la balance hormonale Acide Abscissique (ABA)/ Acide Gibbérellique (GA) va être un régulateur majeur de la dormance, l'ABA favorisant la dormance, le GA l'inhibant. L'installation de la dormance primaire est montrée comme étant dépendante de l'ABA. En effet, la surexpression des enzymes de la voie de biosynthèse de l'ABA favorisent la dormance, tandis que des graines déficientes en ABA ne présentent pas de dormance (Finkelstein et al., 2002; Nambara et Marion-Poll, 2003; Kermodé, 2005; Finch-

Savage et Leubner-Metzger, 2006; Feurtado et al., 2007). La mise en place de la dormance secondaire semble également dépendante des teneurs en ABA. Par exemple, l'induction de la dormance secondaire chez *Brassica napus* est associée à une augmentation de la concentration en ABA au sein de la graine (Gulden et al., 2004), de même que chez l'orge (*Hordeum vulgare L.*) (Leymarie et al., 2008). Les gènes impliqués dans les voies de biosynthèse de l'ABA apparaissent surexprimés chez les graines d'*A.thaliana* présentant une dormance secondaire (Cadman et al., 2006). Chez certaines espèces, d'autres régulateurs interviennent tels que l'éthylène et les brassinostéroïdes (pour revue Cf. (Finkelstein et al., 2008)) mais cet aspect ne sera pas développé ici.

Chez *M truncatula*, la dormance primaire est initiée pendant la maturation à la fin de la phase de remplissage puis augmente dans les phases tardives pendant la dessiccation de la graine. Ainsi, au cours de la dernière phase de maturation de la graine de nombreux éléments, acquisition de la tolérance à la dessiccation, longévité, dormance, vont se mettre en place et de nombreux facteurs vont intervenir pour permettre un développement optimal et une résistance face aux facteurs environnementaux tel que la température, le stress hydrique, les conditions de lumière.

Après avoir redéfinis les caractéristiques principales du développement de la graine orthodoxe, nous allons maintenant décrire les mécanismes qui vont lui permettre de tolérer la dessiccation.

2. La tolérance à la dessiccation

2.1 Généralités

La tolérance à la dessiccation est la capacité à survivre à une perte quasi totale de l'eau cellulaire. Les organismes capables de tolérer la dessiccation sont dits anhydrobiotes (Leopold, 1986). On retrouve cette capacité chez les procaryotes comme *Deinococci ssp* et *Bacilli spp*, mais aussi chez les eucaryotes : chez des

invertébrés tel que des rotifères, acariens, nématodes, larves de crustacés (Crowe et al., 1992), chez des végétaux inférieurs tel que mousses, lichens, fougères (Bewley, 1979; Oliver et Wood, 1997), ainsi que chez quelques plantes angiospermes tels que *Craterostigma plantagineum* ou *Xerophyta villosa*. Chez ces espèces l'ensemble de l'appareil végétatif est capable de résister à des périodes de sécheresse intense à l'état sec. Mais de façon générale chez les plantes angiospermes la tolérance à la dessiccation va seulement se rencontrer au niveau de certaines parties de la plante c'est à dire des graines et du pollen. Pour des raisons encore peu connues peut-être liées à leur taille (Alpert, 2005), aucune plante gymnosperme n'a montré d'aptitude à tolérer la dessiccation en dehors des graines et du pollen. Chez les graines, nous avons vu que la tolérance à la dessiccation est mise en place pendant la maturation. Elle disparaît progressivement au cours de l'imbibition, d'abord dans la radicule en concomitance avec la germination puis plus tard dans les cotylédons (Boudet et al., 2006).

2.2 Impact de la dessiccation sur la cellule

L'eau est un composé essentiel à l'intégrité des cellules vivantes. De plus, elle constitue le milieu réactionnel cellulaire. La cellule qui subit une perte sévère en eau va donc devoir faire face à de nombreuses contraintes. Tout d'abord une contrainte mécanique au niveau des structures macromoléculaire (plasmalemmes, parois pariétales) due à la réduction du volume cellulaire (Iljin, 1957; Hoekstra et al., 2001). De plus, le retrait de l'eau cellulaire va provoquer de nombreux dégâts comme la déstabilisation des structures macromoléculaires et des dérégulations métaboliques qui en découlent. Il est donc nécessaire pour les organismes tolérant à la dessiccation de mettre en place des systèmes afin de conserver leur intégrité en absence totale d'eau. La mise en place de la tolérance à la dessiccation ne fait pas intervenir qu'une seule voie de signalisation, mais un réseau complexe de régulations (Hoekstra et al., 2001). Avant d'aborder les mécanismes mis en place, et afin de mieux comprendre comment ils régissent l'aptitude à la survie à l'état sec, nous exposerons tout d'abord dans la suite de ce relevé bibliographique les effets délétères provoqués par le retrait de l'eau cellulaire. Etant donné l'immense littérature sur la biophysique de l'hydratation des structures macromoléculaires tels que protéines, ADN et bicouche lipidique et de la préservation des protéines dans l'industrie pharmaceutique et

alimentaire, nous en aborderons seulement quelques éléments essentiels, pertinents pour nos recherches.

2.2.1 Impact sur les membranes

Les phospholipides membranaires peuvent adopter plusieurs types de conformation selon l'environnement hydrique dans lequel ils se trouvent. A l'état hydraté, les phospholipides se structurent en bicouche lamellaire, caractérisée par une conformation appelée phase liquide cristalline. Celle-ci se caractérise par une grande fluidité membranaire permise notamment par un large espacement entre les têtes polaires des lipides. La diminution de la teneur en eau durant la dessiccation force les têtes polaires des lipides à se rapprocher. Cette compaction permet la formation de liaisons de Van der Waals entre les chaînes hydrocarbonées des lipides (Crowe et al., 1987; Crowe et al., 1989), qui va entraîner une transition de phase liquide vers une phase gel, qui va avoir comme résultante une diminution de la fluidité membranaire. Cette transition de phase provoquée par le retrait de l'eau va déstabiliser la membrane. D'autres phénomènes telles que la fusion des lipides, la transition vers la phase hexagonale ainsi qu'une séparation de phases au sein de la membrane seraient également associés à la sensibilité au séchage. L'ensemble de ces modifications n'est pas réversible lors de la réhydratation, ce qui entraîne une perte de l'intégrité fonctionnelle de la membrane qui va conduire à une fuite des composés intracellulaires (ions, sucres, acides aminés...) (Crowe et al., 1989; Hays et al., 2001; Hoekstra et al., 2001).

2.2.2 Impact sur les protéines

L'eau joue un rôle fonctionnel crucial pour le fonctionnement enzymatique, la stabilité conformationnelle et le repliement des protéines (Imai et al., 2007). Lors de la dessiccation à des teneurs en eau inférieures à 0.3 g/g, la quantité de molécules d'eau qui appartiennent à la sphère d'hydratation des macromolécules diminue très fortement. Ceci va avoir pour incidence d'induire le dépliement des protéines, permettant l'exposition de groupes ou de zones hydrophobes qui seront alors mis en contact avec le solvant, ce qui va entraîner la déstabilisation des protéines

(Prestrelski et al., 1993; Hoekstra et al., 2001; Reyes et al., 2005). Lorsque les surfaces hydrophobes des protéines dépliées entrent en contact, les protéines s'agrègent et forment des structures supramoléculaires plus ou moins solubles (De Bernardez Clark et al., 1999). Lorsqu'elles vont être ainsi agrégées, en plus de la perte de fonction des protéines engagées dans ces agrégats et de l'encombrement que ceux-ci vont créer au sein de la cellule, un problème de toxicité peut apparaître. En effet, les agrégats sont généralement hydrophobes et peuvent affecter le fonctionnement membranaire, ceci étant le cas pour certaines maladies neurodégénératives (Prusiner, 1998; Bucciantini et al., 2002). Par la spectroscopie Infra Rouge à transformée de Fourier (FTIR), il a pu également être montré que la régulation de la conformation des protéines était associée à la tolérance à la dessiccation. En effet, en étudiant les spectres liés aux vibrations associées aux amides I avant et après séchage d'embryons immatures de maïs tolérants et sensibles à la dessiccation obtenus à différents stades de maturation, (Wolkers et al., 1998) ont montré que la proportion relative de protéines ayant adopté une conformation en hélice α est plus faible dans les tissus sensibles secs par rapport aux témoins non séchés ou par rapport aux embryons secs tolérants. De même, (Golovina et al., 1997) ont montré que dans les graines orthodoxes, la structure secondaire des protéines lorsqu'elles sont structurées est maintenue à l'état sec empêchant leur agrégation.

2.2.3 Impact sur le métabolisme, et augmentation du stress oxydant

La cellule va aussi devoir faire face à l'augmentation de la concentration en solutés et à l'augmentation de la viscosité cytoplasmique, entraînant des perturbations du métabolisme qui vont pouvoir engendrer une augmentation du stress oxydant. En effet, les perturbations du métabolisme notamment au niveau des chaînes transporteuses d'électrons au sein des mitochondries, lors du séchage, vont provoquer la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) qui vont causer l'attaque radicalaire des composés cellulaires (Leprince et al., 1994; Pammenter et Berjak, 1999; Bailly et al., 2004; Chaves et Oliveira, 2004). Les ROS vont notamment avoir un impact sur les membranes en peroxydant ou de-esterifiant les acides gras des phospholipides (Senaratna et al., 1987), ce qui aura pour effet de les déstabiliser (Potts, 1994). Ils vont également pouvoir oxyder les protéines.

2.2.4 Impact sur l'ADN

La conformation de l'ADN et de la chromatine sont sensibles à la dessiccation. La dessiccation *in vitro* de fragments d'ADN extraits de *Nostoc commune*, une cyanobactérie tolérante à la dessiccation engendre un surenroulement de la double hélice d'ADN et provoque la formation d'agrégats insolubles. En ce qui concerne la conformation de la chromatine, (Leprince et al., 1995) ont montré que dans les racines de maïs sensibles au séchage, la dessiccation entraînait *in vivo* une condensation irréversible de la chromatine. Cette condensation est similaire dans les tissus tolérants à la dessiccation mais en revanche elle est réversible, suggérant ainsi la présence de mécanismes permettant de maintenir l'intégrité fonctionnelle de la chromatine.

(Faria et al., 2005) ont également montré que les graines récalcitrantes de *Inga vera*, une légumineuse d'origine tropicale, présentaient des dommages irréversibles de l'ADN consécutivement à la réhydratation. De la même façon, différents types de dégâts subis par l'ADN (cassures...) ont été reportés dans des graines sensibles à la dessiccation ou ayant subi une conservation prolongée au-delà de la viabilité des lots (Walters et al., 2006). Au cours du stockage, il semble que l'ADN de feuilles séchées se dégrade plus rapidement que celui des graines orthodoxes (Walters et al., 2006). Non seulement la stabilité du génome durant le séchage, mais également la capacité des cellules à réparer des dommages physico-chimiques de l'ADN pendant la réhydratation semblent être des aptitudes nécessaires aux graines pour tolérer la dessiccation de manière prolongée (Boubriak et al., 1997). Cependant, d'après (Walters et al., 2006), des fragments d'ADN de très haute qualité peuvent encore être extraits de graines mortes conservées pendant plus de 70 ans, démontrant ainsi que le lien entre la survie à l'état sec et la nécessité de préserver l'intégrité et la fonctionnalité du génome reste encore mal compris.

Le maintien en vie de la cellule en absence d'eau et sa capacité à se réhydrater sans subir de dommages va donc requérir des systèmes complexes et finement régulés intervenant sur tous les composants cellulaires.

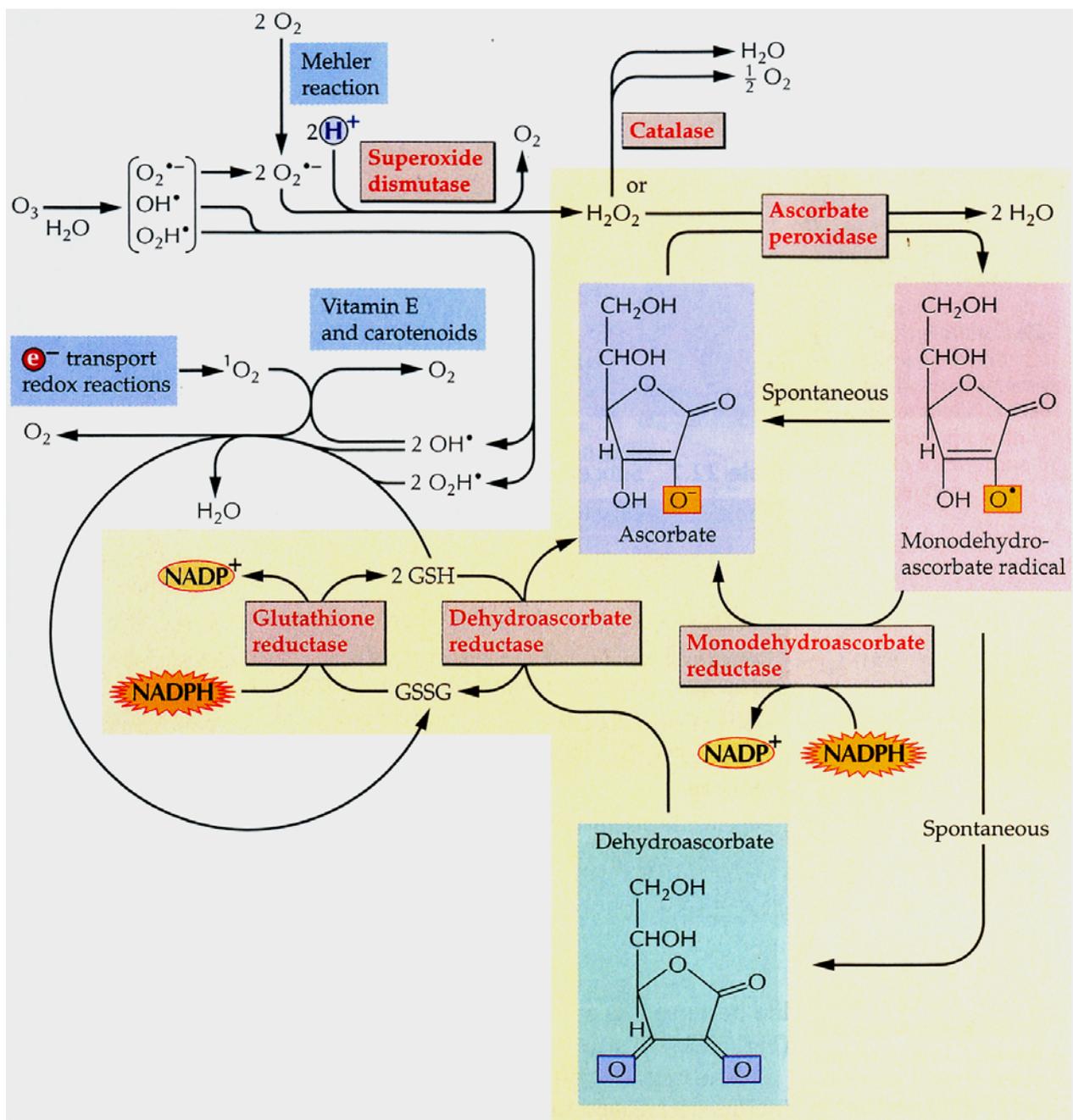


Figure 4 : Schéma des principales voies de détoxification des ROS (Reactive oxygen species)

Tiré de Bray, Bailey-Serres, Weretilnyk, Responses to abiotic stress (Biochemistry and molecular biology of plants, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds. © 2000, American Society of plant physiologists

2.3 Mécanismes impliqués dans la tolérance à la dessiccation

Pour faire face aux effets délétères de la dessiccation, la cellule va mettre en place un réseau complexe de signalisation et de systèmes de protection. L'efficacité et la synergie entre les différents systèmes permettront à la graine de tolérer la dessiccation de façon optimale, et ainsi de pouvoir être conservée à l'état sec.

2.3.1 Les systèmes antioxydants

Pour faire face en premier lieu à l'augmentation du stress oxydant, la graine dispose de molécules antioxydantes et de système de détoxification enzymatiques efficaces (Hendry, 1993). Parmi ces systèmes enzymatiques nous retrouvons la superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la réaction de dismutation de l'ion superoxyde O_2^- en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et O_2 , la catalase (CAT), la glutathion réductase (GR) et les peroxydases qui détoxifient le H_2O_2 . Parmi les systèmes non enzymatiques on retrouve le glutathion, l'ascorbate, les peroxyrédoxines et les tocophérols (vitamine E) qui vont également limiter la formation et l'accumulation des différentes espèces réactives de l'oxygène (Figure 4). Chez les graines de pois, il semble que l'acquisition de la tolérance à la dessiccation soit liée à une réorientation des systèmes antioxydants enzymatiques. En effet, les graines matures sèches tolérantes à la dessiccation sont caractérisées par de fortes activités des CAT et des GR et par de faibles activités des SOD et APX, tandis que l'inverse est observé chez les graines immatures non tolérantes (Bailly et al., 2001). Par ailleurs (Bailly et al., 2004) ont montré que l'augmentation de l'activité de la CAT était induite lors du séchage de graines tolérantes, et associée à une diminution du H_2O_2 et de la peroxydation des lipides. L'activité enzymatique étant étroitement liée à l'hydratation des protéines (Leopold, 1986), les antioxydants moléculaires joueraient un rôle prédominant contre le stress oxydatif à des teneurs en eau très faibles (Bailly, 2004). Chez le soja, la perte de la tolérance à la dessiccation au cours de la germination est associée à une diminution d'antioxydants liposolubles (Senaratna et al., 1987). Cependant, chez le maïs, la concentration en tocophérols n'est pas liée à la perte de la tolérance à la dessiccation (Leprince et al., 1990b). Par contre les tocophérols semblent être impliqués dans la longévité de la graine. En effet, les graines mutantes *vte2* d'*A.thaliana*, déficientes en tocophérols apparaissent plus sensibles que les graines

sauvages au vieillissement accéléré (Sattler et al., 2004). Il a également pu être observé chez les plantes reviviscentes une corrélation entre la survie à l'état sec et l'homéostasie des systèmes antioxydants (Kranner et al., 2002). Cependant les données concernant l'efficacité des systèmes antioxydants dans les graines récalcitrantes ne permettent pas de mettre en évidence un lien de causalité avec leur sensibilité au séchage (Finch-Savage et al., 1994a; Greggains et al., 2000).

2.3.2 Les sucres non réducteurs

Plusieurs données biochimiques montrent que les organismes anhydrobiotes accumulent de grandes quantités de sucres non réducteurs, des disaccharides, en particulier du tréhalose (levures et animaux) et du saccharose, et des oligosaccharides, raffinose, stachyose, verbascose (Koster and Leopold, 1988; Leprince et al., 1990a; Hoekstra et al., 1994). L'accumulation de sucres non réducteurs va permettre à la cellule de prévenir les dégradations engendrées par le séchage (Horbowicz et Obendorf, 1994). Les modes d'action de ces sucres en tant qu'agents protecteurs ont été mis en évidence par des études *in vitro* sur des liposomes (Crowe et al., 1997; Hoekstra et al., 1997; Popova et Hinch, 2005) et des protéines (Carpenter et al., 1987; Allison et al., 1999). Deux théories qui ne sont pas mutuellement exclusives quant à leur mode d'action ont été posées : l'hypothèse du remplacement de l'eau et la formation de l'état vitreux.

2.3.2.1 L'hypothèse de remplacement de l'eau

Des études sur des liposomes montrent que le dessèchement induit une transition de phase liquide-cristallin vers une phase gel rigide comme nous l'avons décrit précédemment (Crowe et al., 1997). Il a été montré que l'interaction des sucres non réducteurs avec les phospholipides lors du retrait de l'eau permet d'éviter une transition de phase et évite ainsi la perte de l'intégrité des liposomes au cours de la réhydratation (Crowe et al., 1989). Des expériences *in vitro* ont permis d'obtenir des indices sur le mécanisme par lequel les sucres empêchent la transition de phase des membranes déshydratées. Par spectroscopie FTIR (Crowe et al., 1987) ont montré que le tréhalose et le saccharose s'intercalaient entre les têtes polaires de

phospholipides et interagissaient avec celles-ci par des liaisons hydrogène entre le groupement phosphate du phospholipide et les groupements hydroxyls du sucre. Les phospholipides gardent alors leurs espacements originels empêchant la transition de phase délétère pour les phospholipides. Il a été suggéré que les groupements hydroxyls des sucres remplaceraient ainsi les molécules d'eau, permettant de maintenir la conformation fonctionnelle des membranes.

De la même façon, (Carpenter et al., 1987; Carpenter et al., 1990) ont montré que le saccharose, le maltose et le tréhalose avaient des propriétés stabilisantes sur la phosphofructokinase après dessiccation et/ou congélation. Comme pour les phospholipides, les données de spectroscopie FTIR suggèrent qu'à l'état sec, les sucres se substituent aux molécules d'eau à la surface des protéines (Carpenter and Crowe, 1989; Prestrelski et al., 1993; Wolkers et al., 1998a). Ainsi au cours du séchage, le dépliement et/ou l'agrégation des protéines serait empêché.

Cependant plusieurs observations ne corroborent pas cette hypothèse de remplacement de l'eau par les sucres dans les tissus déshydratés. Le comportement des phospholipides pendant le séchage des tissus intacts est différent de celui observé pour les membranes isolées en présence ou en absence de sucres (Hoekstra et al., 1997). De plus, le rapport massique sucre/Phospholipide mesuré chez divers végétaux anhydrobiotes semble être trop faible pour assurer une fonction de protection par intercalation entre les têtes polaires des phospholipides (Hoekstra et al., 1997). Il apparaîtrait donc que soit il existe d'autres composés protecteurs soit le mode d'action des sucres est plus complexe que l'hypothèse de remplacement de l'eau.

2.3.2.2 Formation de l'état vitreux

L'état vitreux se définit comme un état métastable amorphe qui ressemble à un solide mais qui a les propriétés physiques et le désordre d'un liquide (Franks et al., 1991). La viscosité au sein de l'état vitreux est telle (10^{12} Pa) que le système est solidifié et entraîne donc la formation d'une matrice qui va immobiliser les solutés cytoplasmiques, les organites et les éléments du cytosquelette (Bruni et Leopold, 1991). Cet état vitreux a pu être détecté dans les graines sèches. Par ailleurs, nous

savons que les sucres non réducteurs sont des molécules capables de former un état vitreux. Il a donc été supposé que l'accumulation de saccharose et/ou oligosaccharides dans les graines serait responsable de la formation de l'état vitreux du milieu intracellulaire qui va alors acquérir des propriétés physiques particulières, permettant à la cellule de tolérer l'absence d'eau et de pouvoir être réhydratée sans dommages. Non seulement, l'état vitreux conférerait une grande stabilité aux structures cellulaires mais il provoquerait également l'arrêt du métabolisme coordonné tel que la respiration. De la même façon, les réactions délétères sont très fortement ralenties voir inhibées (Slade et Levine, 1991). Bien qu'il ait été montré que l'état vitreux n'était pas un mécanisme qui confère à lui seul la tolérance à la dessiccation durant le séchage, il apparaît nécessaire pour la survie à l'état sec. En effet, la présence d'état vitreux a été associée à une meilleure aptitude au stockage (Sun et Leopold, 1993; Buitink et al., 2000a). Chez les pollens de *Typha Latifolia* et des graines de plusieurs espèces (pois, laitue, impatiens, poivron), (Buitink et al., 2000b) ont trouvé une relation entre la longévité et la mobilité moléculaire au sein du cytoplasme vitrifié.

Malgré le rôle essentiel que semble avoir les sucres non réducteurs dans la mise en place de la tolérance à la dessiccation, ils ne sont toutefois pas les seuls éléments intervenant dans celle-ci. En effet il a pu être montré une accumulation importante de ces sucres dans les graines récalcitrante de chêne sans que celles-ci soient tolérante à la dessiccation (Finch-Savage et Clay, 1994; Sun et al., 1994). Et à l'inverse, il existe certains rotifères tolérants à la dessiccation pour lesquels la présence de sucres non réducteurs n'est pas détectée (Lapinski et Tunnacliffe, 2003).

En plus des sucres et des systèmes antioxydants, deux grands familles de protéines de stress vont avoir une place importante dans l'aptitude à tolérer à la dessiccation : les protéines HSP (Heat Shock Protein) et les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant). Les premières sont décrites ci-dessous tandis que la description des protéines LEA formera un chapitre à part entière étant donné le contexte de cette thèse.

2.3.3 Les protéines HSP (Heat Shock Protein)

Les protéines HSP ont été découvertes comme s'accumulant lors de stress liés à une élévation de la température. La plupart sont capables d'interagir avec d'autres protéines sur lesquelles elles vont exercer la fonction de protéine chaperonne. Elles sont le système de protection le mieux connu contre l'agrégation ou la prévention du mauvais repliement des protéines suite aux stress ou lors de la synthèse des protéines. Elles minimisent l'agrégation protéique ou bien interagissent avec les protéines déjà dénaturées en vue de leur dégradation et de leur élimination. Par la suite, les protéines HSP ont été montrées comme pouvant s'accumuler lors d'autres stress comme le stress hydrique et ont également été identifiées comme étant capable d'intervenir dans l'inhibition de l'apoptose (Beere and Green, 2001; Concannon et al., 2003) et des dommages liés à l'oxydation (Gill et al., 1998; Collins and Clegg, 2004). La protéine p26, une petite HSP abondante dans les cystes tolérants à la dessiccation de la crevette *Artemia ssp*, permet à des cellules souches issues de foie humain d'être plus tolérantes au séchage en action synergique avec le tréhalose (Ma et al., 2005). Par analogie, il a également été prouvé un rôle important des protéines HSP et en particulier de ces petites protéines HSP (sHSP : small heat shock protein, 15 à 42 kDa) dans la tolérance à la dessiccation chez les plantes. Ainsi, dans les graines d'*Arabidopsis thaliana*, les sHSP s'accumulent pendant les phases tardives de la maturation et sont très abondantes dans la graine sèche (Wehmeyer et al., 1996). Leur représentation diminue ensuite rapidement au cours de l'imbibition en corrélation avec la perte de la tolérance à la dessiccation (Wehmeyer et al., 1996). De plus, (Alamillo et al., 1995) ont montré que certaines sHSP sont absentes de cals de la plante reviviscente *C. plantagineum* devenus sensibles à la dessiccation. En revanche, sous l'effet d'un traitement osmotique induisant la tolérance à la dessiccation dans ces cals, ces sHSP sont rapidement exprimées. Enfin, les mutants d'*Arabidopsis abi3-4, fus3-3, lec1-2* et *line24* présentent des graines qui contiennent de très faibles taux de la protéine HSP, sHSP17,4 (1 à 2% par rapport aux graines sauvages) et sont sensibles à la dessiccation (Wehmeyer and Vierling, 2000). Par contre, les mutants *lec2-1* qui produisent des embryons présentant les mêmes défauts pléiotropiques que *lec1-2*, mais qui contiennent la sHSP 17,4 en concentration comparable au type sauvage sont tolérants à la dessiccation. De plus, des graines de tournesol et de tabac surexprimant un facteur de transcription (HSF) induisant l'accumulation de sHSP se conservent mieux lors de tests de vieillissement accéléré

(Prieto-Dapena et al., 2006), ce qui semble étayer l'importance de leur rôle dans la graine.

Toutefois, comme pour les sucres réducteurs, les seules sHSP ne suffisent pas à conférer la tolérance à la dessiccation dont la mise en place reste gouvernée par un réseau complexe de régulation. En effet, des cotylédons de graines récalcitrantes de *Castanea sativa* possèdent des sHSP en abondance (Collada et al., 1997). La mise en place de plusieurs systèmes et les interactions entre ces différents systèmes est nécessaire à la graine pour supporter efficacement la dessiccation.

3. Les protéines LEA (*Late Embryogenesis Abundant*)

3.1 Origine des protéines LEA

Le terme LEA pour Late Embryogenesis Abundant a été introduit par (Galau et al., 1986) pour décrire un groupe d'ARNm qui s'accumulait fortement au cours des phases tardives de la maturation des graines de coton. Chez les embryons matures, les protéines LEA représentent 2 % des protéines totales (Roberts et al., 1993). L'observation de l'accumulation des protéines LEA en coïncidence avec l'acquisition de la tolérance à la dessiccation a été le premier support à l'hypothèse de leur implication dans la mise en place de ce phénomène. Ceci a été appuyé par l'étude de (Bartels et al., 1988) qui ont démontré que l'accumulation des protéines LEA pouvait être induite par l'ABA dans des embryons immatures d'orge simultanément à l'induction de la tolérance à la dessiccation. Par la suite il a été démontré que ces protéines n'étaient pas spécifiques des graines mais pouvaient également s'accumuler dans les tissus végétatifs soumis à un stress abiotique tel qu'un déficit hydrique ou le froid (Dure3rd, 1993; Bray, 1997; Garay-Arroyo et al., 2000). Par ailleurs, il est intéressant de constater que ces protéines ne sont pas spécifiques des plantes et ont pu être mise en évidence chez d'autres organismes anhydrobiotiques, chez des procaryotes, mais aussi dans le règne animal (pour revue (Tunnacliffe et Wise, 2007)). Chez ces organismes aussi leur rôle semble en lien avec la tolérance à la dessiccation. A titre d'exemple, la protéine AavLEA1 du nématode *Aphelanchus avenae* est surexprimée lorsqu'il est soumis à la dessiccation

Groupes					Nombre de séquences peptidiques répertoriés
Dure (1993)	Bray (1994)	Cuming (1999)	Wise (2003)	Familles Pfam	
D-19	1	1	I	LEA_5	81
D-11	2	2	II	Dehydrin	481
D-7	3	3	III	LEA_4	176
D-34	6	5	IV	SMP	103
D-73; LEA5	-	-	V	LEA_3	69
D-113	4	4	II; III	LEA_1	106
D-95; LEA14	-	5	VI	LEA_2	148
D-29	5	3	III	LEA_4	176

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes classifications des protéines LEA et répartitions du nombre de séquences peptidiques répertoriées pour chacune des familles

Les classifications de Dure (1993), Bray (1994) et Cuming (1999) sont basées sur les alignements de séquences tandis que celle de Wise est basée sur la proportion en acides aminés et sur la probabilité de trouver des consensus de 2-3 acides aminés. Le nombre de séquences peptidiques répertoriées pour chaque famille Pfam est disponible sur le site : <http://pfam.sanger.ac.uk/>

(Browne et al., 2004). Chez le rotifère bdelloïde *Adineta ricciae* tolérant à la dessiccation, les produits de deux allèles d'un même gène codant pour une protéine LEA, *Ar-lea-1* ont montré lors de la dessiccation *in vitro* l'un une interaction avec les membranes, et l'autre une action de protection des protéines contre l'agrégation (Pouchkina-Stantcheva et al., 2007).

3.2 Caractéristiques et classification des protéines LEA

Les protéines LEA sont des protéines nativement désordonnées. Elles possèdent une hydrophilicité élevée due à une forte proportion d'acides aminés hydrophiles et une faible complexité au niveau de leur séquence peptidique (Garay-Arroyo et al., 2000; Battaglia et al., 2008). Certains auteurs (Garay-Arroyo et al., 2000; Battaglia et al., 2008) considèrent les protéines LEA comme un sous groupe d'une famille très vaste de protéines de stress dénommée « hydrophiline », caractérisée par une teneur en glycine élevée (au moins 8 %) (Garay-Arroyo et al., 2000). Leur caractère hydrophile a renforcé l'idée qu'elles étaient bien impliquées dans la tolérance à la dessiccation et les stress osmotiques. Le séquençage des gènes LEA de plusieurs espèces végétales a mis à jour une grande diversité (Baker et al., 1988). A l'heure actuelle, plusieurs centaines de séquences peptidiques réparties dans les différentes familles sont connues, comme nous le montre le Tableau 1. La première classification a été établie en 1989 par (Dure et al., 1989) en se basant sur la similarité de séquences peptidiques des protéines au fur et à mesure de leur découverte. Cette classification a ensuite été modifiée plusieurs fois (Dure, 1993; Bray, 1994; Cuming, 1999; Wise et Tunnacliffe, 2003) (Cf. Tableau I). Il en résulte que si un consensus est établi en ce qui concerne la classification des groupes 1, 2 et 3, le contour des autres groupes n'est pas encore durablement établi. Selon certains auteurs (Bray, 1994) les groupes D-73 et D-95 ne sont même pas reconnus comme des protéines LEA. Récemment, (Wise et Tunnacliffe, 2003) ont critiqué ces regroupements basés uniquement sur les homologies de séquences de protéines peu complexes aux motifs répétés. A la place, il a proposé une classification fondée sur une analyse probabiliste basée sur la composition et la distribution de couples ou triplets d'acides aminés (POPP : Protein or Oligonucleotide Probability Profile). Cette nouvelle classification sépare les protéines LEA en 6 grandes classes (Tableau 1). Ce nouveau découpage se rapproche de celui basé sur l'algorithme de (Bateman et al., 2002) donnant lieu aux familles

PFAM (Protein Families Database) (basé sur le regroupement de protéines au sein de famille par leurs homologies de séquences de domaine). Les trois premiers groupes rassemblent la majorité des protéines tandis que les groupes 4, 5 et 6 sont minoritaires (tableau 1). L'origine de ces difficultés de classification repose sur deux caractéristiques particulières des protéines LEA à savoir la surreprésentation de certains acides aminés (Gly notamment) et la présence de motifs très répétées.

Dans ce travail, par soucis de simplicité, nous avons adopté la classification de Cuming (1999) qui divise les protéines LEA en 5 groupes et dont les caractéristiques sont les suivantes :

- Le groupe 1 représenté par la protéine Em de blé est caractérisé par la séquence consensus G- $\{EQ\}$ -TVVPGGT et un domaine conservé de 20 acides aminés qui peut être répliqué. Ce groupe est majoritairement identifié dans les graines
- Le groupe 2 est constitué des protéines appelées « déhydrines ». Elles possèdent toutes un motif riche en lysine de 15 acides aminés appelé domaine K : (KR)-(LIM)-K-(DE)-K-(LIM)-P-G présent en une ou plusieurs copies (Close, 1997), un domaine Y : (V/T)DEYGNP en position N-terminale et un domaine S phosphorylable : S(5)-(DE)-X-(DE)-G-X(1,2)-G-X(0,1)-(KR)(4) (Campbell et Close, 1997).
- Le groupe 3 est constitué par les protéines comportant un motif répété de 11 acides aminés TA(K/Q)AAE(Q/D)K(T/A)XE (Dure et al., 1989).
- Le groupe 4 contient les protéines ne présentant pas de motifs répétés, mais ayant un domaine N- terminal plus ou moins conservé. Il est à noter que (Wise et Tunnacliffe, 2003) considèrent que ce groupe très hétérogène rassemble en fait toutes les protéines ne pouvant être classées dans aucun des autres groupes.
- Le groupe 5 est composé de sous-familles à peu près équivalente en nombre de séquences identifiées: D95 et D34. Cette dernière contenant les protéines les plus hydrophobes. Selon (Cuming, 1999), ces deux sous familles sont prédites par les

logiciels de prédiction de structure comme ordonnées en solution, c'est-à-dire que contrairement aux autres LEA elles auraient une conformation globulaire en solution. A ce jour, les représentants de ce groupe n'ont été détectés que dans les plantes supérieures (graines et plantes reviviscentes). Dans ce groupe, on trouve PM25, qui appartient à la sous-famille D-34 et qui est l'objet de cette thèse.

3.3 Le groupe 5

3.3.1 Descriptions des membres du groupe 5

Il existe peu de travaux visant à caractériser les protéines appartenant à ce groupe. L'analyse des données transcriptomiques disponibles sur les bases de données de *M.truncatula* (Benedito et al., 2008) et *A.thaliana* (Hundertmark et Hinch, 2008) montrent que en conditions naturelles, l'expression des membres de ce groupe se localisent uniquement dans les graines et non dans les tissus végétatif. Leur expression ou leur présence au sein du génome n'a pas encore été détecté chez d'autres anhydriobotes (Tunnacliffe et Wise, 2007). En ce qui concerne leur régulation, les données disponibles sur plusieurs gènes étudiés *RAB28* chez le maïs, *AtRAB28* chez *A.thaliana* et *ECP31* chez *D. carrota* montrent qu'ils sont régulés par le facteur de transcription *abi3* qui jouent un rôle important dans la régulation des processus liés à la maturation (Shiota et al., 1998; Arenas-Mena et al., 1999). Par ailleurs, l'expression de ces trois gènes semblent être localisée au niveau des méristèmes et des éléments vasculaires de l'embryon mature (Kiyosue et al., 1992; Niogret et al., 1996; Arenas-Mena et al., 1999; Borrell et al., 2002).

A part ces points communs, les autres données disponibles concernant ces gènes sont relativement contradictoires. Comme pour la plupart des protéines LEA, *RAB28* chez le maïs est inductible par des traitements à l'ABA et par des stress osmotiques à la fois dans les graines et dans les tissus végétatifs (Niogret et al., 1996). En revanche, *AtRAB28* n'est pas réinduit par ces traitements dans les tissus végétatif (Arenas-Mena et al., 1999; Borrell et al., 2002) et *ECP31* n'est réinductible qu'au stade torpille lors du développement embryonnaire mais plus par la suite (Kiyosue et

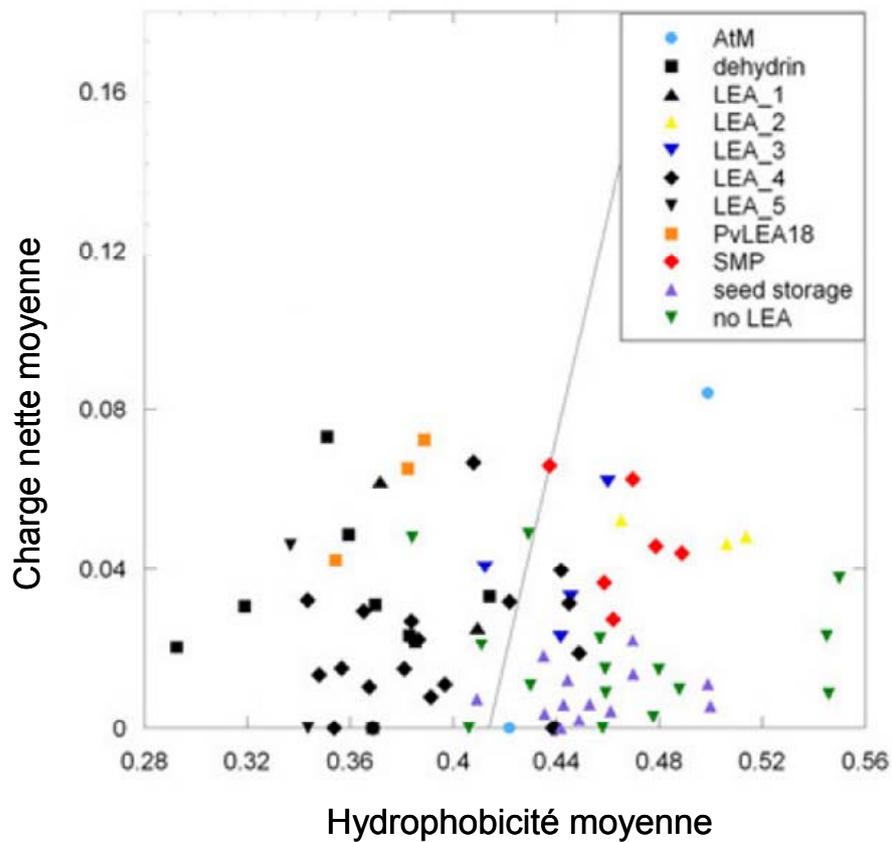


Figure 5 : Comparaison de la charge en fonction de l'hydrophobicité prédites à parti de la séquence protéines LEA chez *Arabidopsis thaliana*
 La ligne indique la limite empirique entre les protéines désordonnées à gauche et structurées à droite (Uverski et al., 2000). (Hundertmark et Hinch 2008)

al., 1992). De plus chez *A.thaliana*, les transcrits *AtRAB28* sont localisés au niveau des méristèmes et des éléments vasculaires de l'embryon mais également dans les enveloppes de la graine, contrairement au maïs où les transcrits de *RAB28* sont uniquement localisés dans la plumule, la radicule et le scutellum (Niogret et al., 1996) et à la carotte chez laquelle les transcrits *ECP31* sont uniquement détectable au niveau des cellules périphériques de l'embryon (Kiyosue et al., 1992).

La vaste majorité des membres de ce groupe possèdent dans la portion N-terminale un domaine QP(R/Q)RP connu pour être une séquence d'adressage vers le noyau. De fait, les hybridations par immunocytochimie ont démontré que les protéines *AtRAB28* et *RAB28* étaient localisées dans le noyau de la cellule (Niogret et al., 1996; Borrell et al., 2002).

Sur le plan fonctionnel, la surexpression de *AtRAB28* dans les graines transgéniques d'*Arabidopsis* a pour effet d'augmenter la tolérance aux stress salins et osmotique en présence de 100 mM NaCl ou 100 mM sorbitol (Borrell et al., 2002).

3.3.2 Particularités du groupe 5

Les analyses *in silico* des séquences peptidiques des membres du groupe 5 révèlent deux particularités qui les distinguent fortement des autres protéines LEA. Elles possèdent une moindre proportion en résidus polaires, ce qui les rend plus hydrophobes. Par ailleurs, il semblerait qu'elles soient en général plus structurées en solution que les membres des autres groupes, comme nous l'indique les prédictions menées chez *A.thaliana* ((Hundertmark and Hinch, 2008), figure 5). Il apparaît clairement que les protéines du groupe 5, ici indiqué LEA_2 et SMP (Cf. Tableau 1) sont prédites comme structurées en solution puisqu'elles se retrouvent toutes à droite de la limite empirique entre les protéines structurées et non structurées (Uversky et al., 2000) et effectivement plus hydrophobe, puisqu'elles ont une hydrophobicité moyenne supérieure, par rapport aux protéines LEA appartenant aux autres groupes. Ces particularités ont conduit certains chercheurs (Tunnacliffe et Wise, 2007; Battaglia et al., 2008) à reconsidérer l'appartenance des protéines de cette famille aux protéines LEA.

3.4 Caractéristiques physico-chimiques des protéines LEA

Comme l'indique le grand nombre de classifications existantes, les protéines LEA sont donc un groupe de protéines relativement hétérogène. Cependant, elles partagent certaines caractéristiques communes. Ainsi, les protéines LEA ont pour caractéristiques de posséder peu voir pas de résidus cystéine ou tryptophane, mais beaucoup d'acides aminés chargés (R, D, E, H et K) et polaires (R, N, D, E, Q, H, K, S, et T) ce qui les rend fortement hydrophiles. Une des propriétés les plus emblématiques est leur faible proportion (voir leur absence) de structures secondaires (hélice α , feuillet β) en solution à l'état natif. C'est par exemple le cas de la protéine p11 du pois qui est non structurée à 98 % (Russouw et al., 1997) ou de la protéine Em de blé qui présente une proportion de structures secondaires de l'ordre de seulement 30 % à l'état hydraté (McCubbin et al., 1985). Des études en RMN ont également montré que la protéine EMB-1 de la carotte ne présentait aucune structure secondaire ou tertiaire en solution aqueuse (Eom et al., 1996). Selon (Tompa et al., 2005), les protéines LEA font partie d'un set plus large de protéines dites « intrinsèquement désordonnées » (IDP : Intrinsically Disordered Protein) qui représentent une proportion substantielle du protéome. Entre 6 et 17 % des protéines dont les séquences déposées dans la base de données Swiss Prot sont des protéines désordonnées et 30 à 50 % des protéines eucaryotiques possèdent au moins une région non structurée d'une longueur minimale de 50 résidus (Tunnacliffe et Wise, 2007). Probablement parce qu'elles sont désordonnées et hydrophiles, les protéines LEA sont stables à la chaleur. Typiquement, elles restent solubles en solution même après chauffage à 95°C pendant 10 minutes (Boudet et al., 2006). Cette propriété a d'ailleurs été exploitée pour la purification de certaines d'entre elles (Jepson et Close, 1995).

Cependant, il est essentiel de préciser que si les protéines LEA sont connues pour être désordonnées à l'état hydraté, la plupart sont capables d'adopter une structuration majoritairement sous forme d'hélice α dans les conditions où elles sont supposées jouer un rôle, c'est-à-dire lors de la dessiccation. Ainsi, (Wolkers et al., 2001) ont montré en FTIR qu'une petite protéine LEA du groupe 3 exprimé chez *Typha Latifolia* se structurait en hélices α lors d'un séchage très rapide, un séchage lent induisant plutôt une conformation en feuillet β . De la même façon, MtEM6 de

Nom de la protéine LEA	Groupe	Espèces	Localisation sub-cellulaire	Références
COR15A	2	Arabidopsis	chloroplaste	Lin et Tomashow (1992)
DHN1	2	Maïs	noyau/cytoplasme	Godoy <i>et al.</i> , (1994)
DHR18	2	Arabidopsis	noyau/cytoplasme	Nylander <i>et al.</i> , (2001)
CuCOR19	2	Citron	mitochondrie	Hara <i>et al.</i> , (2003)
TAS14	2	Tomate	noyau/cytoplasme	Godoy <i>et al.</i> , (1994)
RAB21	2	Riz	cytoplasme	Mundy et Chua (1988)
CS120	2	Blé	noyau/cytoplasme	Houde <i>et al.</i> , (1995)
COR410	2	Blé	membrane plasmique	Danyluk <i>et al.</i> , (1998)
VCaB45b	2	Céleri	vacuole	Heyen <i>et al.</i> , (2002)
WCS19	2	Blé	chloroplaste	Ndong <i>et al.</i> , (2002)
REP14	2	Seigle	chloroplaste	Ndong <i>et al.</i> , (2002)
LEA13	2	Coton	cytoplasme	Roberts <i>et al.</i> , (1993)
LEAD7	3	Coton	chloroplaste	Roberts <i>et al.</i> , (1993)
PCC3-06	3	Craterostigma	chloroplaste	Iturriaga <i>et al.</i> , (1992)
DC-8	3	Carotte	cytoplasme	Franz <i>et al.</i> , (1989)
WAP27A	3	Mûrier	réticulum endoplasmique	Ukaji <i>et al.</i> , (2001)
LEA1	3	Orge	corps protéiques vacuolaires/cytoplasme	Marttila <i>et al.</i> , (1996)
SBP65	3	Pois	cytoplasme	Alban <i>et al.</i> , (2000)
RAB17	3	Maïs	cytoplasme	Riera <i>et al.</i> , (2004)
LEAm	3	Pois	mitochondrie	Grelet <i>et al.</i> , (2005)
RAB28	5	Arabidopsis	nucléaire	Borrell <i>et al.</i> , (2002)

Tableau 2 : Localisation cellulaire de protéines LEA

Sont présentées dans ce tableau uniquement la localisation déterminée expérimentalement.

Medicago truncatula a été montrée, comme se structurant majoritairement (60% de la protéine) en hélice α mais dans ce cas quelque soit la vitesse de séchage (Boudet et al., 2006). D'autres études effectuées en dichroïsme circulaire sur LEAM, une protéine mitochondriale de pois, ont également mis en évidence une structuration majoritaire sous forme d'hélice α lors du séchage (Tolleter et al., 2007). Ce gain de structure en hélice α induit par le séchage a également été observé chez les protéines LEA d'autres règnes comme c'est le cas pour Aav-LEA-1 du nématode *Aphelanchus avenae* (Goyal et al., 2003). De manière tout à fait remarquable, l'étude menée par (Tolleter et al., 2007) a pu aussi montrer que cette structuration était réversible, et que lors de la réhydratation, LEAM reprenait une structuration majoritairement désordonnée.

Certaines protéines LEA des groupes 2 et 3 peuvent aussi adopter une conformation ordonnée lorsqu'elles sont en contact avec des phospholipides ou détergents anioniques (SDS). Par exemple, (Koag et al., 2003) ont ainsi mis en évidence une aptitude de la déhydrine DHN1 du maïs à se structurer lorsqu'elle est incubée en présence de petites vésicules lipidiques acides. (Tolleter et al., 2007) ont mis en évidence la structuration en hélice α de LEAM, membre du group 3 en présence de SDS.

3.5 Localisation cellulaire des protéines LEA

Les protéines LEA sont présentes dans tous les compartiments cellulaires et ceci indépendamment de leur groupe d'appartenance (Tableau 2). On les retrouve majoritairement au niveau du cytoplasme (Neven et al., 1993; Roberts et al., 1993; Goday et al., 1994; Houde et al., 1995; Colmenero-Flores et al., 1999), mais également largement au niveau du chloroplaste. Ainsi, chez *C. plantagineum* les protéines DSP21 et DSP34 ont été détectées dans les chloroplastes de feuilles au cours de la dessiccation. La protéine REP14 chez le blé et le seigle a également été montré comme importée dans le chloroplaste et s'accumulant dans le stroma (NDong et al., 2002). Dans le groupe 3, il existe également une protéine LEA spécifique des mitochondries, la LEAM identifiée dans la graine de pois (Grelet et al., 2005) et spécifique du réticulum endoplasmique, la WAP27 identifiée dans les tiges du mûrier

platane (Ukaji et al., 2001). Dans le groupe 5, AtRAB28, est spécifique du noyau (Borrell et al., 2002).

3.6 Régulation transcriptionnelle des protéines LEA

Dans les graines l'expression des gènes codant pour les protéines LEA est induite par l'ABA (Finkelstein et al., 2002), tandis que dans les tissus végétatif l'expression de ces gènes pourra être induite non seulement par l'ajout d'ABA exogène mais aussi par des stress abiotiques tels que le déficit hydrique, le stress salin, le froid (Tunnacliffe et Wise, 2007; Bies-Ethève et al., 2008). (Hughes and Galau, 1989) ont proposé d'utiliser le terme *Lea* uniquement pour les gènes exprimé dans les tissus végétatifs et d'utiliser les terme *LeaA* pour les gènes présentant un pic d'expression durant les phases tardives de maturation de la graine en corrélation avec l'augmentation de la teneur en ABA. Bien que cette nomenclature n'ai jamais été retenue, l'induction par l'acide abscissique est devenu une autre des caractéristiques des protéines LEA, tout au moins chez les plantes. L'induction des gènes en réponse à des stress de dessiccation, des stress salins, des stress froid a également pu être mis en avant (Bray, 2000; Wise et Tunnacliffe, 2003) ainsi que le fait qu'une meilleure résistance à ces stress soit souvent corrélée à une augmentation de l'expression de ces gènes. Par exemple (Blackman et al., 1995) montrent que si les gènes codant pour les LEA sont activés prématurément par l'ajout d'ABA, des graines immatures de soja présentent une amélioration de leur intégrité cellulaire et donc une meilleure tolérance face à la dessiccation. Les gènes codant des protéines LEA peuvent donc être divisés en deux groupes, ceux dont l'expression est graine-spécifique et ceux qui s'expriment dans les tissus végétatifs. De manière remarquable, ces deux groupes se recouvrent très peu (Illing et al., 2005). Chez les animaux, les gènes codant des protéines LEA seront plutôt induits par un stress hydrique. Par exemple chez le nématode *Aphelanchus avenae* le gène codant pour la protéine AavLEA1 est induit par la dessiccation et le stress osmotique mais pas par le froid, l'augmentation de la température, ou les stress oxydatifs (Browne et al., 2004).

3.7 Implications des protéines LEA dans la tolérance aux stress abiotiques

Nom de la protéine LEA	Groupe	Organisme et/ou tissus source	Méthode	Organisme ou système modèle	Résultats obtenus	Référence
Em	1	Blé	S	levure	Meilleure tolérance au stress osmotique et salin	Swire-Clark et Marcotte, 1999
PMA1959	1	Blé	S	riz	Augmentation de la tolérance au déficit hydrique	Cheng <i>et al.</i> , 2002
EM6	1	Arabidopsis	KO	Arabidopsis	Protéine indispensable au développement de la graine	Manfre <i>et al.</i> , 2006
CuCOR 19	2	Citron	S	tabac	Augmente la tolérance au froid	Hara <i>et al.</i> , 2003
CuCOR 19	2	Citron	IV	lipides	Inhibe la peroxydation	Hara <i>et al.</i> , 2004
le4	2	Tomate	S	levure	Augmentation de la tolérance au stress salin et au gel	Zhang <i>et al.</i> , 2000
Déhydrines	2	Apex de bouleau	IV	α -amylase	Préservation de l'activité après 90 min à 4°C	Rinne <i>et al.</i> , 1999
P-80 et Dhn5	2	Orge	IV	LDH	Préservation de l'activité après 5 cycles de congélation/décongélation (C/D)	Bravo <i>et al.</i> , 2003
PCA60	2	Prunier	IV	LDH	Préservation de l'activité après 9 cycles de (C/D)	Wisniewski <i>et al.</i> , 1999
VcaB45	2	Céleri	IV	-	Liaison au Ca^{2+} améliorée quand la protéine est phosphorylée	Heyen <i>et al.</i> , 2002
ITP	2	Ricin	IV	Ricin	Liaison aux ions Fe^{3+} <i>in vitro</i> ; transport de cet ion dans la phloème <i>in vivo</i>	Krüger <i>et al.</i> , 2002
ERD14	2	Arabidopsis	IV	-	Liaison au Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} améliorée quand la protéine est phosphorylée	Alsheikh <i>et al.</i> , 2003
DHN1	2	Maïs	IV	liposomes	Liaison à des liposomes formés de phospholipides acides	Koag <i>et al.</i> , 2003
PMA80	2	Blé	S	riz	Augmentation de la tolérance au déficit hydrique	Cheng <i>et al.</i> , 2002
COR15A	2	Arabidopsis	S	Arabidopsis	Augmentation tolérance au gel	Artus <i>et al.</i> , 1996
RAB18+COR47	2	Arabidopsis	S	Arabidopsis	Augmentation tolérance au gel	Puhakainen <i>et al.</i> , 2004
XERO2+ERD10	2	Arabidopsis	S	Arabidopsis	Augmentation tolérance au gel	Puhakainen <i>et al.</i> , 2004
WCOR410	2	Blé	S	Fraisier	Augmentation tolérance au gel	Houde <i>et al.</i> , 2004
DHN5	2	Blé	S	Arabidopsis	Augmentation de la résistance aux stress osmotique et salin	Brini <i>et al.</i> , 2007
ERD10, ERD14	2	Arabidopsis	IV	Lysozyme, ADH, luciférase, CS	Préservation de l'activité et protection contre l'agrégation lors du séchage et du chauffage	Kovacs <i>et al.</i> , 2008
COR15am	2	Arabidopsis	IV	luciférase, LDH	Préservation de l'activité durant la congélation et le séchage	Nakayama <i>et al.</i> , 2008
HIC6	3	Chlorelle	S	levure	Augmentation de la tolérance au gel	Honjoh <i>et al.</i> , 1999
HVA1	3	Orge	S	riz	Augmentation de la résistance au déficit hydrique et au stress salin	Xu <i>et al.</i> , 1996
HIC6 et HIC12	3	Chlorelle	IV	LDH	Préservation de l'activité après 24h à -20°C	Honjo <i>et al.</i> , 2000
HVA1	3	Orge	S	levure	Augmentation de la tolérance au stress salin et au gel	Zhang <i>et al.</i> , 2000

gène DR1172 (homologue de LEA76)	3	<i>Deinococcus radurans</i>	KO	<i>Deinococcus radurans</i>	Sensibilité au séchage accrue	Battista <i>et al.</i> , 2001
HVA1	3	Orge	S	riz-blé	Augmentation de la tolérance au déficit hydrique	Xu <i>et al.</i> , 2003; Sivamani <i>et al.</i> , 2000
WCS19	3	Blé	S	tabac	Augmentation tolérance au gel	NDong <i>et al.</i> , 2002
LEA5	3	Arabidopsis	S	Levure/ Arabidopsis	Augmentation de la tolérance au stress oxydant	Mowla <i>et al.</i> , 2006
LEA3-1	3	Riz	S	Riz	Augmentation de la tolérance au déficit hydrique	Xiao <i>et al.</i> , 2007
LEAm	3	Pois	IV	liposomes	Protection des liposomes durant le séchage	Toltefer <i>et al.</i> , 2007
LEA4-1	3	Colza	S	E. coli, Arabidopsis	Augmentation de la tolérance au déficit hydrique et au stress salin	Dalal <i>et al.</i> , 2009
LE25	4	Tomate	S	levure	Augmentation de la résistance au gel et au stress salin	Imai <i>et al.</i> , 1996
RAB28	5	Arabidopsis	S	Arabidopsis	Augmentation de la tolérance au stress salin, osmotique et ionique	Borrell <i>et al.</i> , 2002
IDP1	V (W)	Lotus japonicus	IV	CS, LDH	Préservation de l'activité durant la congélation et le séchage	Haaning <i>et al.</i> , 2008

Tableau 3 : Récapitulatif de la diversité des résultats obtenus pour la caractérisation fonctionnelle des protéines LEA

S : surexpression ; IV : in vitro ; KO : mutant n'exprimant plus la protéine ; CS : citrate synthase ; LDH : lactate déshydrogénase. Pour la protéine IDP1 le groupe indiqué est celui selon la classification de Wise (2003), ce groupe n'étant pas répertorié dans la classification selon Cuming (1999) utilisée pour les autres protéines LEA classées ici.

De nombreuses fonctions au sein des différents organites ont été proposées tel que la séquestration d'ions, des fonctions de protections des membranes et l'aptitude à protéger les protéines contre la dénaturation (Dure, 1993). Cependant le mode d'action de la plupart des protéines LEA reste encore à élucider. S'il apparaît clairement que la plupart des gènes codant pour des protéines LEA sont exprimés en corrélation avec les stress abiotiques ou avec la mise en place de la résistance à ceux-ci, il est nécessaire de comprendre comment elles vont pouvoir intervenir. Pour ce faire, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont été menées. Nous avons regroupé de façon non exhaustive un certain nombre d'études de fonction des protéines LEA (Tableau 3). Nous pouvons voir que leurs rôles, bien qu'ayant toujours un rapport dans la protection contre les stress abiotique, sont très variés : protection enzymatique, protection contre les stress oxydant, protection des membranes, transport d'ions, acquisition d'une meilleure tolérance au stress salin, osmotique, froid... Et que ce rôle est en corrélation avec les fonctions qui leur avaient été supposées à savoir une implication dans la résistance aux stress abiotiques. D'après les données regroupées dans le tableau 3, il ne semble pas qu'il y est un lien entre leur rôle et le groupe auquel elles appartiennent. Cependant, comme pour les études menées sur la localisation cellulaire, les études de fonctions portent essentiellement sur les protéines LEA des groupes 2 et 3. Cependant quelques résultats sont obtenus pour les autres groupes et ceci ne semble pas non plus mettre en évidence de spécificité pour le groupe 1 notamment où 3 études sont présentées.

3.7.1 Rôle fonctionnel des protéines LEA : approches de génétique inverse

Des approches de transgénèse ont permis de vérifier à des degrés divers l'implication des protéines LEA des différents groupes dans la tolérance aux stress. Les études menées ont principalement consisté à surexprimer un gène candidat et à tester la tolérance des organismes transformés à des stress hydriques et salins comme nous pouvons le voir dans le tableau 3. Par exemple, la protéine HVA1 (groupe 3) d'orge surexprimée chez le riz a permis d'accroître significativement la tolérance des plantules au NaCl et à la sécheresse (Xu et al., 1996; Sivamani et al., 2000). Des résultats similaires ont été obtenues avec les protéines LEA PMA80 et PMA1959 de blé toujours sur le riz avec également une meilleure tolérance à la sécheresse des plantes transformées (Cheng et al., 2002), ainsi qu'avec LEA3 et LEA4-1

respectivement issues du blé et du colza sur *Leymus chinensis* et *A.thaliana* (Dalal et al., 2009; Wang et al., 2009).

La tolérance au froid a également pu être améliorée par la surexpression de gènes codant pour des protéines LEA, ainsi, la tolérance au froid de tabacs transgéniques surexprimant le gène codant pour CuCOR19, LEA issue du citronnier est augmentée. De même la tolérance au gel de plantes transgéniques est également améliorée par l'expression ectopique d'un gène de blé *WCS19* (NDong et al., 2002), d'*A.thaliana* *COR15A* (Artus et al., 1996), ou par la co-expression des gènes *RAB18* et *COR 47* d'une part et *XERO2* et *ERD10* d'autre part (Puhakainen et al., 2004).

L'implication des protéines LEA dans la protection contre les stress abiotiques a également été mis en évidence par des travaux de génétique quantitative. En effet, (Campbell and Close, 1997) ont montré chez l'orge et le soja une colocalisation des gènes codant pour des déhydrines avec des QTLs correspondant à des traits phénotypiques liés à la tolérance à la sécheresse et à des stress hivernaux.

Toutefois il est intéressant de constater que l'expression chez le tabac de deux protéines LEA d'épinard induites par le froid (Kaye et al., 1998) et de trois protéines LEA de *Craterostigma plantagineum* induites par la dessiccation (Iturriaga et al., 1992) n'a provoqué aucun avantage significatif vis-à-vis de la tolérance que ce soit aux stress froid ou hydrique. Cela semble indiquer que toutes les protéines LEA ne contribuent pas significativement à la résistance aux stress ou bien qu'elles ont besoin d'un contexte particulier pour agir. Ceci montre bien que de part leur diversité, toutes les protéines LEA ne peuvent pas jouer un rôle identique, mais possèdent bien leur spécificité propre, certaines permettant la résistance aux froid, d'autres aux stress hydriques, certaines étant spécifiques des graines, ou des tissus végétatifs ou encore d'un organite cellulaire. Cette aspect de spécificité au sein d'une même famille de protéines est suggérée par l'étude menée par (Zhang et al., 2000). En effet, dans cette étude les auteurs comparent la croissance de levures surexprimant les protéines LEA, Le4 et HVA1 appartenant au groupe 2 et 3 en présence de NaCl ou de KCl. Il apparaît que la protéine HVA1 est plus efficace pour protéger les levures contre le stress provoqué par le NaCl, tandis que Le4 confère une meilleure résistance des levures face au stress KCl.

Si beaucoup d'études ont été menées sur des mutants surexprimant des protéines LEA, en revanche, il n'en existe à notre connaissance que deux visant à comprendre l'impact de l'extinction des gènes LEA : celle de (Manfre et al., 2006;

Manfre et al., 2008) concernant *AtEM6* (groupe 1) chez les graines d'*A.thaliana* et celle de (Battista et al., 2001) sur *DR1172*, un homologue de *LEA76* (groupe 3) chez la bactérie anhydrobiote *Deinococcus radiodurans*. Ainsi, Manfre et coll. montrent que les graines déficientes en *AtEM6* ne présentent pas de phénotype, excepté pour les graines se trouvant à l'extrémité de la silique. En effet, celles-ci subissent une perte en eau prématurée, et donc une maturation raccourcie, ce qui pourrait indiquer que la protéine soit nécessaire pour un développement normal de la graine. De plus ils ont pu montrer que les mutants perdait plus d'eau que les graines sauvages lors du séchage, ce qui suggérerait un rôle de cette protéine dans la rétention de l'eau au cours de la maturation. Cependant, même si leur maturation est accélérée, les graines restent viables, et ne sont pas altéré au niveau de la germination. Quant à l'étude menée par Battista et coll. sur la bactérie *D.radiodurans* elle montre que l'extinction du gène *DR1172* augmente fortement la sensibilité à la dessiccation de cette bactérie.

3.7.2 Rôle fonctionnel des protéines LEA : approches in vitro

3.7.2.1 Protection des protéines

Les études menées montrent que des formes recombinantes de LEA appartenant aux groupes 1 à 3 sont capables de protéger l'activité de certaines enzymes contre le séchage ou la congélation. Ainsi, des membres du groupe 2, sont capables de protéger de façon plus ou moins efficace la lactate déshydrogénase (LDH) lors de la congélation (Kazuoka et Oeda, 1994; Wisniewsk et al., 1999; Hara et al., 2001; Bravo et al., 2003; Sanchez-Ballesta et al., 2004; Goyal et al., 2005; Kovacs et al., 2008; Nakayama et al., 2008; Reyes et al., 2008). D'autres études ont également misent en évidence une protection contre l'action délétère de la dessiccation sur plusieurs enzymes tel que la LDH, la malate déshydrogénase, la fumarase et la citrate synthase (CS) (Sanchez-Ballesta et al., 2004; Goyal et al., 2005; Grelet et al., 2005; Reyes et al., 2005). (Goyal et al., 2005) ont suggéré que la préservation de l'activité enzymatique de la citrate synthase (CS) pendant le séchage pouvait être due à une aptitude des protéines LEA à prévenir l'agrégation des enzymes provoquée par la perte en eau. En effet, les protéines testées, à savoir une protéine LEA du groupe 1 Em du blé, et AavLEA1 une protéine du groupe 3 issues d'un nématode ne sont pas

capables de protéger la CS lors de l'agrégation provoquée par le chauffage. Cette idée d'une action des protéines LEA sur la prévention de l'agrégation est renforcée par les observations de (Chakrabortee et al., 2007) qui montre qu'AavLEA1 une protéine LEA du groupe 3 issue du nématode *A.avenae* permet d'empêcher l'agrégation induite par le séchage de protéines solubles extraites de cellules de nématode ou de cellule de mammifère (Chakrabortee et al., 2007). Ceci a pu être également vérifié *in vivo*. En effet, la surexpression de cette protéine dans les cellules humaines permet la réduction de la formation d'extension de chaînes polyglutamines et polyalanines, entraînant la formation d'agrégats toxiques à l'origine de maladies neurodégénératives chez l'homme (Chakrabortee et al., 2007). Les protéines LEA pourraient donc avoir un rôle important dans la prévention de l'agrégation protéique lors de la mise en place de la tolérance à la dessiccation.

Par ailleurs cet effet sur l'agrégation pourrait être renforcé par une action synergique avec les sucres. Ainsi, (Goyal et al., 2005) ont pu montrer que des protéines LEA pouvaient avoir une action synergique avec le tréhalose lors de stress provoqués par la congélation ou la dessiccation sur la citrate synthase et la lactate déshydrogénase. Les modes d'action moléculaire responsable de la prévention de l'agrégation sont très mal compris. Par analogie avec les HSP, on pense que les protéines LEA joueraient un rôle de chaperon moléculaire. Une autre hypothèse de travail serait qu'elles agissent par encombrement stérique (bouclier moléculaire) qui empêcherait les protéines de s'agréger.

3.7.2.2 Protection membranaire

Des fonctions de stabilisation et d'interaction avec les membranes sont également attribuées aux protéines LEA des groupes 2 et 3. Par exemple, (Danyluk et al., 1998) ont montré que WCOR410, chez le blé, s'accumulait au niveau de la membrane plasmique durant l'adaptation au froid, en particulier au niveau des tissus les plus sensibles. (Koag et al., 2003) ont pu aussi mettre en évidence l'association de DHN1 avec des vésicules lipidiques constituées de phospholipides acides. De même une protéine LEA mitochondriale, LEAM a été également montrée comme capable d'interagir avec des liposomes, les protégeant ainsi des effets du séchage (Tolleter et al., 2007). Cette protection s'accompagnant aussi d'une structuration en hélice α de

la protéine, il apparaît dans ce cas qu'il y ait besoin de ce changement de conformation engendré par le séchage pour pouvoir s'associer aux liposomes et les protéger.

3.7.2.3 Séquestration d'ions

Lors du séchage, nous pouvons supposer que la concentration ionique dans le cytoplasme augmente du fait de la perte d'eau. Or, les ions pourraient avoir un effet dénaturant sur les protéines par un effet de salting-out. Les protéines LEA étant fortement chargées, il a été émis l'hypothèse que les déhydrines, en particulier, pourraient piéger les ions s'accumulant dans le cytoplasme (Dure, 1993; Danyluk et al., 1998; Wise et Tunnacliffe, 2003). Plusieurs déhydrines (VcaB45 et ERD14) ont en effet montré une aptitude à fixer, après phosphorylation, le Ca^{2+} , mais également d'autres ions comme le Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} ou le Mn^{2+} (Heyen et al., 2002; Alsheikh et al., 2003). La protéine ITP (Iron Transport Protein) quant à elle a été montrée comme transportant les ions Fe^{3+} dans le phloème (Kruger et al., 2002). Or, les ions ferreux et ferrique augmentent les risques de formation des ROS car à faible concentration ils catalysent la formation du radical $\text{OH}\cdot$ en présence de H_2O_2 (réaction de Fenton). La propriété de ces LEA de fixer le fer pourrait donc avoir un impact indirect sur la limitation du stress oxydant en limitant les réactions de Fenton. Cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi la surexpression de la déhydrine CuCOR19, dont le potentiel d'oxydo-réduction ne justifie pas d'être considérée comme un antioxydant, conduit à la diminution de la peroxydation des lipides engendrée par un stress froid dans des plantules de tabacs transgéniques (Hara et al., 2004). La même conclusion pourrait être faite concernant les travaux de (Wang et al., 2009) chez *Leymus sinensis* surexprimant une protéine LEA du groupe 3. En effet, après un épisode sans arrosage, la teneur en malonyldaldéhyde, un marqueur de stress oxydatif est plus faible dans les feuilles transgéniques que celles du type sauvage.

Par ailleurs, il a été récemment montré que les déhydrines en présence d'ions Zn peuvent se lier à l'ADN (Hara et al., 2009). Il semble donc que certaines protéines LEA peuvent mobiliser des ions non seulement afin d'en atténuer leur effets néfastes mais également afin d'assurer leur fonctions protectrices.

3.7.2.4 Implication des protéines LEA dans la formation des états vitreux

Il est maintenant établi que la tolérance à la dessiccation est corrélée avec des teneurs élevées en sucres non réducteurs et en protéines LEA. Outre un effet synergique observé dans la protection des protéines (voir ci-dessus), on a également émis l'hypothèse que ces molécules interagissent également dans la formation de l'état vitreux. En effet, (Wolkers et al., 2001) ont pu montrer que dans une matrice vitreuse formée par un mélange sucrose/LEA, la densité du réseau des liaisons hydrogène ainsi que leur force était plus élevée que lorsque la matrice vitreuse est formée uniquement de glucose. De la même façon, la présence il a été montré que la présence de GmPM16 (LEA du coton du groupe 4) dans une matrice vitreuse formée de sucrose et de raffinose, permettait d'augmenter la température de transition d'un état liquide vers un état vitreux, indiquant une interaction entre les sucres et la protéine. Ainsi les protéines LEA pourraient jouer un rôle important dans les propriétés des états vitreux des graines sèches (Shih et al., 2004).

Les protéines LEA semblent donc posséder une grande diversité structurale et fonctionnelle, ce qui semble en adéquation avec leur grande diversité au sein de la plante. Par exemple, on a recensé 51 gènes de LEA chez *Arabidopsis* (Hundertmark et Hinch, 2008). Mais seuls une dizaine de leurs homologues ont été caractérisés jusqu'à présent (Tunnacliffe et Wise, 2007). Ainsi, les protéines LEA restent encore mal connues. De plus, les mécanismes moléculaires mis en jeu dans leur mode d'action en lien avec la tolérance à la dessiccation et la longévité restent encore à élucider.

Au sein de notre laboratoire, (Boudet et al., 2006) ont mis en évidence des protéines LEA en lien avec la tolérance à la dessiccation et spécifiques de la graine chez *Medicago truncatula*. Parmi les protéines LEA identifiées se trouve PM25, qui est la protéine objet de cette étude. Avant de développer les connaissances déjà acquises en préliminaire de ce travail sur cette protéine, nous allons préciser l'intérêt de travailler sur *Medicago truncatula* qui est la plante modèle utilisée au sein du laboratoire.



Figure 6 : Diversité des légumineuses

En A, Fleurs d'*oxytropis amethystea* (plantsystematics.org), en B : *Castanospermum australe* (davesgarden.com), en C : *phaseolus vulgaris* (traderscity.com), en D : *Medicago sativa* (agroatlas.ru)



Figure 7 : Plante de *Medicago truncatula*

En insert sont présentés la fleur, la gousse et la graine.

4. *Medicago truncatula*, un bon modèle d'étude de la physiologie des légumineuses

M. truncatula appartient aux fabacées ou légumineuses. Les légumineuses forment une grande famille comprenant environ 18 000 espèces présentes dans toutes les régions du monde. Elles représentent un douzième des plantes à fleurs connues, allant de l'herbacée naine en arctique comme l'oxytropis (*Oxytropis amethystea*) à des arbres tropicaux massifs tel que *Castanospermum australe* (Figure 6). Parmi les espèces cultivées nous retrouvons le pois (*Pisum sativum*), le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le soja (*Glycine max*), les lentilles (*Lens culinaris*) ainsi que la fève (*Vicia faba*) qui vont servir à l'alimentation humaine, mais également, la luzerne (*Medicago*) et le trèfle (*Trifolium*) qui seront utilisés en alimentation animale. Les légumineuses représentent les dicotylédones ayant la plus grande importance économique. Elles se placent juste derrière les céréales avec lesquelles elles forment la base de l'alimentation mondiale.

Même si en Europe, elles restent peu cultivées (5 % des surfaces cultivées, source INRA, contre 30% aux États-Unis), leur culture tend à se développer de part leur fort intérêt agronomique et environnemental. En effet, grâce à leur aptitude à fixer l'azote de par leur symbiose avec *Rhizobium*, leur culture ne nécessitent pas l'apport d'engrais azotés, à la différence des céréales ou des oléo-protéagineux comme le colza et le tournesol. De plus, il a été montré récemment que des rotations incluant des légumineuses pouvaient diminuer les pertes en azote et en carbone dans l'agriculture (Drinkwater et al., 1998). Leur efficacité énergétique élevée (leur production nécessite peu d'énergie au regard de l'énergie qu'elles contiennent) les rendent également très attractives dans le contexte de prise de conscience politique et sociologique du réchauffement de la planète et du futur manque d'eau potable dans le monde. Le développement d'une agriculture plus économe, plus autonome et plus respectueuse de l'environnement, semble donc passer par une meilleure utilisation des légumineuses. Il est donc important d'améliorer celles ci notamment au niveau de leurs semences. En effet, il est nécessaire dans une optique de meilleure pratique culturale, d'optimiser les pourcentages de germination ainsi que la vigueur des plantules. Ceci nécessite de disposer de meilleures connaissances et d'outils scientifiques permettant d'améliorer la qualité germinative des semences.

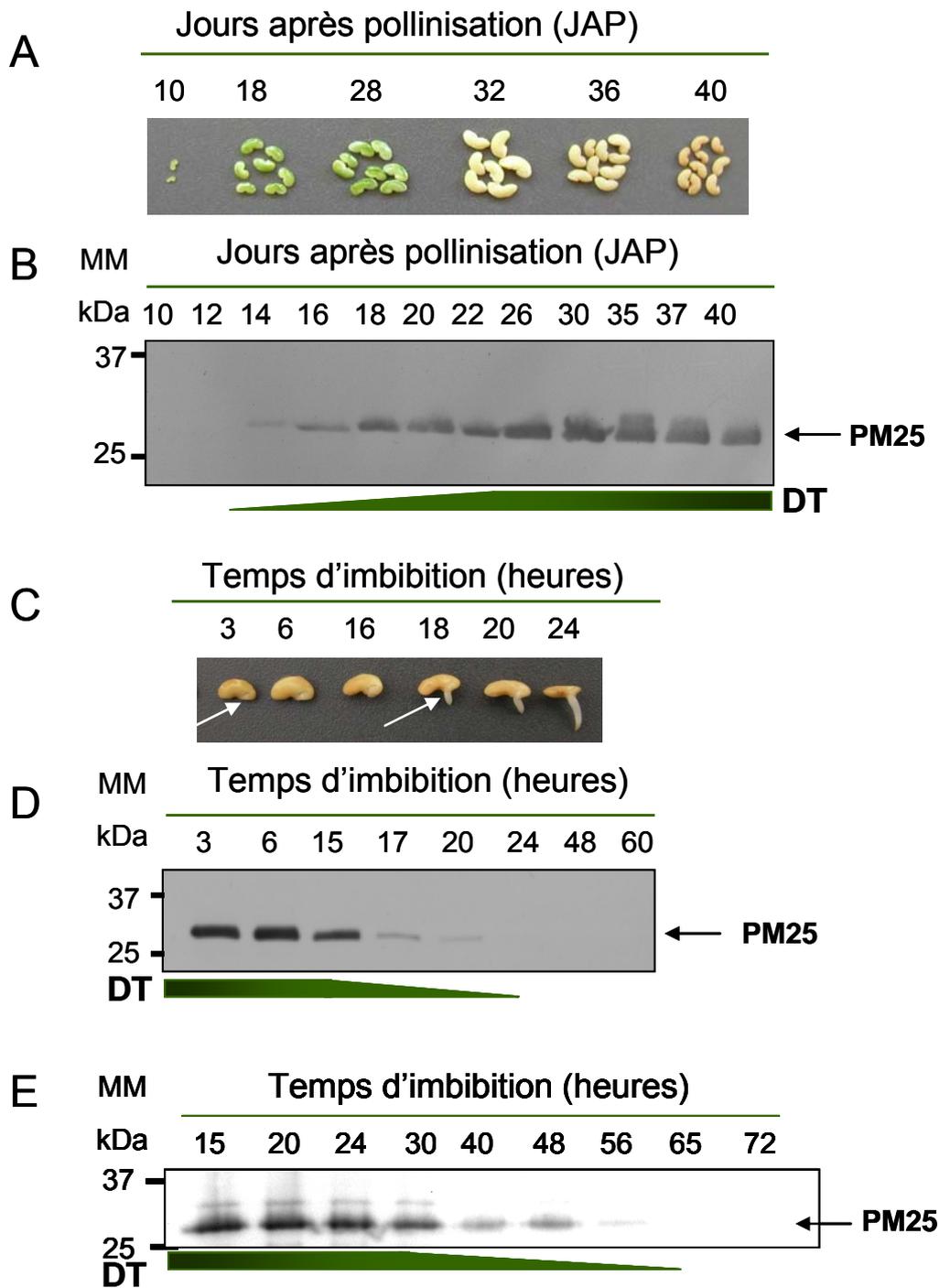


Figure 8 : Evolution du niveau de PM25 en corrélation avec la tolérance à la dessiccation

En A : Evolution de la graine de *M. truncatula* au cours de la maturation. En B : Apparition de PM25 dans les graines au cours de la maturation en Western blot en parallèle à l'acquisition de la tolérance à la dessiccation (DT) signifié par la barre verte. En C, percée et allongement de la radicule au cours de la germination. Les flèches blanches indiquent la radicule avant percée puis après percée. En D, disparition de PM25 dans la radicule au cours de la germination et en E, disparition de PM25 dans les cotylédons au cours de la germination, en parallèle à la perte de la tolérance à la dessiccation signifiée par la barre verte et suivi par western blot. Tous les western blot sont révélés au moyen d'un anticorps spécifique de PM25 d'après Boudet et al., 2006.

M.truncatula (fig.7) dont le nom vernaculaire est luzerne tronquée est un modèle génétique et physiologique d'étude des légumineuses. Elle est très proche génétiquement d'espèces de grande culture comme le pois. C'est une espèce diploïde ($2n=16$) qui possède un petit génome de 450 MB bientôt entièrement séquencé (pour l'instant environ 70% des régions riches en gènes), et qui est autogame. Elle est relativement facilement transformable. La taille de ses graines (de l'ordre de 4 mm de long) en fait un bon modèle pour les études physiologiques et biochimiques puisque les différents organes peuvent être disséqués. Elle possède un cycle de vie court, environ 3 mois et demi de graine à graine. Elle est adoptée par un nombre croissant de laboratoire en Europe et aux Etats Unis d'Amérique tel que la Samuel Noble Foundation aux Etats Unis comme légumineuse modèle. Des mutants TILLING et d'insertions (mutants *Tnt1*) y sont développés. Le fait qu'elle ait été choisie par de grandes institutions comme plante modèle permet un développement rapide des outils utilisables comme par exemple les banques de mutants comme il existe déjà pour *A.thaliana*.

5. *PM25 et origine de ce travail*

PM25 a été identifiée lors d'une étude protéomique comparative visant à étudier le protéome stable à la chaleur en association avec la mise en place de la tolérance à la dessiccation dans les graines germées de *M.truncatula* (Boudet et al., 2006). Une étude par western blot au moyen d'un anticorps polyclonal dirigé contre la forme recombinante de la protéine a montré que l'abondance de PM25 était corrélée avec les stades tolérants à la dessiccation dans les graines de *M.truncatula* (Figure 8, (Boudet et al., 2006)). En effet, elle s'accumule en concomitance avec l'acquisition de la tolérance à la dessiccation pendant la maturation et disparaît rapidement au cours de la germination en corrélation avec sa perte, dans la radicule dans un premier temps puis dans les cotylédons dans un deuxième temps (Figure 8). De plus, si la tolérance à la dessiccation est réinduite dans des radicules germées sensibles par une incubation en présence de PEG, la protéine est également réinduite.

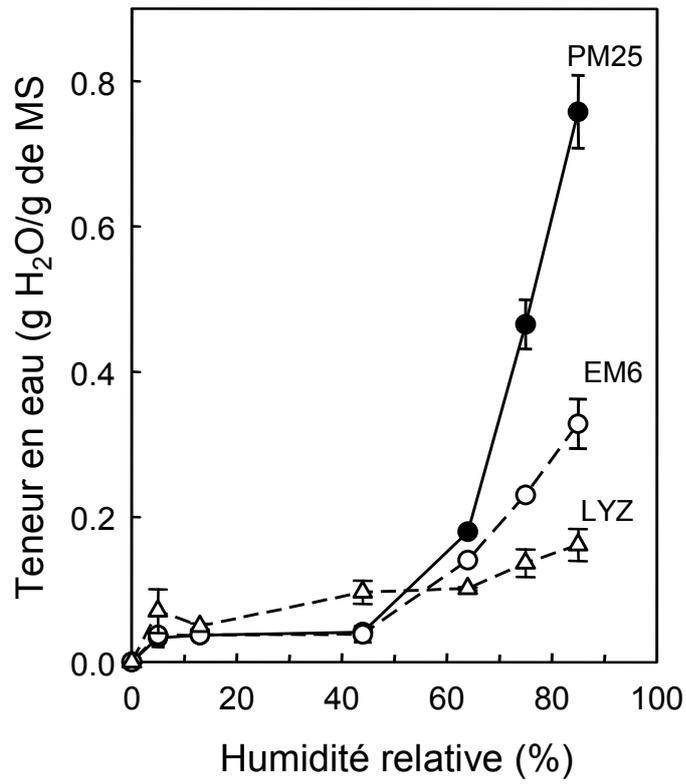


Figure 9 : Isotherme de sorption de l'eau de PM25, EM6 et du lysosyme
 Les mesures sont effectuées à 25°C. Les mesures obtenues sont issues de 2 à 6 répliquats obtenus de 2 expérimentations indépendantes.

Au moyen d'un protocole d'expression chez *E coli* et de purification optimisé (Boudet et al., 2006), une quantité élevée de protéines recombinantes a été obtenue (15 mg) ce qui a permis d'initier l'analyse fonctionnelle de PM25. D'une part, la structure secondaire à l'état hydraté, mesuré par spectroscopie FTIR montre que PM25 est majoritairement non structurée à l'état natif tout en présentant un pourcentage significatif en hélices α et feuillet β (10-15%). D'autre part, un séchage lent induit une structuration majoritairement en hélice α (56%), ainsi qu'une augmentation de la proportion en feuillet β (25%), une observation tout à fait singulière comparée aux autres protéines LEA. Selon Julie Boudet (2005 thèse), c'est la première fois que cette structure secondaire est présente de manière aussi significative chez une protéine LEA.

Par ailleurs, la spectroscopie FTIR a permis d'observer que PM25 est capable de former un état vitreux à température ambiante et d'interagir avec une matrice vitreuse formée de sucres en influençant la densité moléculaire et le réseau des liaisons hydrogènes (Julie Boudet, 2005 thèse). Sachant que les états vitreux jouent un rôle fondamental dans la conservation des semences (Buitink et al., 2000b; Buitink and Leprince, 2004), ces observations suggèrent que PM25 contribue, comme d'autres protéines LEA, à la stabilisation de l'état vitreux. Il apparaît donc nécessaire de vérifier dans quelle mesure PM25 contribue à la longévité des semences.

Des expériences *in vitro* ont également été réalisées afin de vérifier si PM25 protégeait l'intégrité membranaire de phospholipides, comme c'est le cas pour certaines LEA (Koag et al., 2003; Tolleter et al., 2007). Les résultats montrent que PM25 est incapable de maintenir l'intégrité membranaire de liposomes. Dès lors, il semblerait que la fonction protectrice ne soit pas localisée au niveau des membranes. En lien avec les travaux récents sur la protection des protéines, PM25 pourrait jouer plutôt un rôle de chaperon moléculaire.

Au sein du laboratoire, des isothermes de sorption à partir de protéines recombinantes purifiées ont également été réalisés. Ainsi, il a pu être constaté qu'à 80 % d'humidité relative, PM25 contient 2,7 fois plus d'eau que EM6, une protéine du groupe 1 et un polymère de lysine, alors que ces deux polypeptides sont nettement

PM25_SOYBN MSQE-**OPRRR**DK-----GQNF IKY**GDVF**-VMSGDLAQPVPAPEDAAM**QSAEA** 45

PM26_SOYBN MSQE-**OPRRR**DK-----GQNF IKY**GDVF**-VMSGDLAQPVPAPEDAAM**QSAEA** 45

PM24_SOYBN MSQE-**OPRRR**Q-----GQDF IKY**GDVL**-FVSGDLSQKPIPFEDAAM**QSAEA** 45

MtPM25 MSQE-**OPRRR**QA-----GQDF IKY**GDVL**-FVSGDLSQKPIPFEDAAM**QSAEA** 46

D34_GOSHI MSQG-**OPRRR**QFAGQGE-----NQEF IKY**GDVF**-NMSGELANKPIAPEDAAM**QTAET** 52

ECP31_ARATH MSQE-**OPRRR**R-----EPVKY**GDVF**-EVSSELADKPIAPEDAAM**QSAET** 43

ECP31_MEDTR MSQE-**OPRRR**R-----EPVKY**GDVF**-EVSSELADKPIAPEDAAM**QSAET** 43

D34_ARATH MSQEB-**OPRRR**Q-----EPVTY**GDVF**-EVSSELADKPIAPEDANM**QAAET** 44

ECP31_DAUCA MSQQ-**OPRRR**QEEQ-----PIKY**GDVF**-DVSGQLSSQPVPAPNDASAM**QAAEN** 45

LEAD-34b_MEDTR MSQE-**OPRRR**QAEQFS-----EQEF IKY**GDVF**-NMSGELASQPIKPRDAALM**QATEN** 50

PM24_MEDTR MSQE-**OPRRR**EEG-----IKY**GDVF**-NVEGDIGSRVAVPDAAM**QKAET** 43

RAB28_MAIZE MSQE-**OPRRR**SGHEETS**GGG**---EQGAVRY**GDVF**PAVSGGLA**EKPVARR**-TATM**QSAEN** 54

D-34_RICE MAQP-**OPRRM**EDQLSQSQAGGGQGGQTEAIKY**GHVF**-AVT**GELAGQPIAPRDAAMRSAAE** 58

*** ** :

PM25_SOYBN RVLG----QTQ**F**GGAA**S**--VMQ**SAA**TRNEQAGLVGHRD**V**TDVTGDRGV**T**VTETK**V**PGR-R 98

PM26_SOYBN RVLG----QTQ**F**GGAA**S**--VMQ**SAA**TRNEQAGLVGHRD**V**TDVTGDRGV**T**VTETK**V**PGR-R 98

PM24_SOYBN RVLG----KTQ**F**GGAA**S**--VMQ**SAA**TRNEQAGLVGHRD**V**TDITG**D**HGV**T**VTET**F**FHR-R 98

MtPM25 RVLG----QTQ**F**GGV**A**S--VMQ**SAA**TRNEQAGIVGHK**D**VTDVTGDRGV**T**VTETQ**V**PGR-R 99

D34_GOSHI QVLG----QTQ**K**GGT**A**A--VMQ**SAAA**TRNEQ**G**VGVGHNDITD**I**AGEQ**V**T**L**AETD**V**AGR-R 105

ECP31_ARATH HVFG----HTQ**K**GGP**A**A--VMQ**SAA**TTNIRGGF**V**HPD**D**KTELVAER**G**AT**V**EQ**T**-VPAA-T 95

ECP31_MEDTR HVFG----HTQ**K**GGP**A**A--VMQ**SAA**TTNIRGGF**V**HPD**D**KTELVAER**G**AT**V**EQ**T**-VPAA-T 95

D34_ARATH RVFG----HTQ**K**GG**A**A**A**--VMQ**SAA**TANKRGGF**V**HPGD**T**D**L**AAER**G**VT**V**AQ**T**D**V**PGA-R 97

ECP31_DAUCA MVLG----KTQ**K**GGP**A**S--VMQ**SAAA**ANL**Q**R**G**V**G**R**H**EG**T**P**I**ASEQ**G**V**T**I**S**E**A**I**A**GT-R 98

LEAD-34b_MEDTR QALG----QTQ**K**GS**P**A**S**--VMQ**SAA**AVNTAAGLV**S**H**G**D**I**S**I**AK**N**Q**S**MS**V**S**K**T**K**V**G**AN-R 103

PM24_MEDTR QMHG----KTQ**K**GG**A**A**A**--SMQ**SAA**M**K**NER**D**GI**V**G**H**ND**M**SE**N**A**D**GG**V**VE**Q**LS**Q**NA**P**M-N 96

RAB28_MAIZE LVFG----Q**T**L**K**GGP**A**A--VMQ**SAA**TTNER**M**GA**V**G**H**D**Q**A**T**D**A**T**A**V**O**G**V**VE**S**ET**R**V**P**GG**R** 108

D-34_RICE SVF**G**V**P**V**F**Q**D**I**G**G**Y**S**A**G**V**A**M**E**T**A**A**Y**N**Q**A**V**A**V**R**P**Q**A**S**D**A**A**T**N**O**I**A**V**T**Q**S**V**P**GG**R**-R 117

* : : : *

PM25_SOYBN IITEAVGGQ**V**VEQ**Y**VEAT**P**-VE**A**GR**S**S**A**-----IKEN**A**IT---IG**E**ALE**A**T**A**Q**T**-V**G**Q**K** 147

PM26_SOYBN IITEAVGGQ**V**VEQ**Y**VEAT**P**-VE**A**GR**S**S**A**-----IKEN**A**IT---IG**E**ALE**A**T**A**Q**T**-V**G**Q**K** 147

PM24_SOYBN IITEAVGGQ**V**VEQ**Y**VE**F**K**S**Q**F**EAGRT**S**C**N**-----L**R**S**A**Y**N**Q---L**G**E**A**L**K**A**T**A**Q**T**-V**G**H**K 150

MtPM25 IITEAVGGQ**V**VEQ**F**VE**P**T**-V**O**V**GL**T**G**A**-----V**R**E**S**A**L**T---IG**E**ALE**A**T**A**Q**T**-V**G**D**K** 148

D34_GOSHI IITEAVAGQ**V**VEQ**Y**VEAT**P**-V**M**T**S**Q**V**G**V**-----V**L**Q**N**A**I**T---IG**E**ALE**A**T**A**K**T**-A**G**D**K** 154

ECP31_ARATH VTTEFVGGQ**V**VEQ**H**VE**F**RR**V**V**A**A**R**T**D**EE-----A**L**Q**S**T**I**T---IG**E**ALE**A**T**V**K**T**-A**G**N**K** 146

ECP31_MEDTR VTTEFVGGQ**V**VEQ**H**VE**F**RR**V**V**A**A**R**T**D**EE-----A**L**Q**S**T**I**T---IG**E**ALE**A**T**V**K**T**-A**G**N**K** 146

D34_ARATH VTTEFVGGQ**V**VEQ**Y**VE**F**RP**T**A**A**V**Y**G**K**Q**L**V**L**G**S**L**S**A**I**T---IG**E**ALE**A**T**V**Q**T**-A**G**N**K** 153

ECP31_DAUCA IITEAVGGQ**V**VEQ**Y**LE**P**G**K**F**K**M**T**S**P**A**G**L-----G**S**D**S**I**T**---IG**E**ALE**T**T**A**L**T**-A**G**D**K** 148

LEAD-34b_MEDTR VITE**S**V**G**S**Q**V**V**Q**F**VE**P**-D**V**P**M**N**D**F**L**V**L**-----D**K**N**A**I**T**---IG**E**ALE**A**S**A**L**S**Q**A**G**D**K 153

PM24_MEDTR TM**P**P**A**S-----L**V**K**D**M**S**A**G**-----A**D**G**G**V**T**---IG**E**ALE**A**T**A**L**T**-A**G**Q**K** 131

RAB28_MAIZE IVTEFVAGQ**V**VEQ**Y**L**A**R**D**D**D**G**G**G**I**A**G**F**A**G**A**G---V**A**G**K**D**I**T**K**V**T**IG**E**ALE**A**T**A**L**A**-A**G**D**A** 166

D-34_RICE IITEFVAGQ**V**VEQ**Y**S**V**A**D**Q**A**VE**Q**-----D**A**T**K**I**T**---V**G**E**A**L**E**A**T**A**L**A-**A**G**E**R 161

* :***** : *

PM25_SOYBN **AVDQ**SD**A**S**A**I**Q**AA**E**V**R**A**T**G-**S**N**V**I**P**G**G**L**A**A**M**A**Q**S**A**A**A**Y**N**A**D**C**K**L**D**Q**D**K**V**K**L**---L**A**G**A**T 203

PM26_SOYBN **AVDQ**SD**A**F**A**I**Q**AA**G**G**E**S**N**G**E**V**N**I**P**G**G**L**A**A**M**A**Q**S**A**A**A**Y**N**A**D**C**K**L**D**Q**A**K**V**K**L**A**D**I**L**A**G**A**T** 207

PM24_SOYBN **PVDQ**SD**A**S**A**I**Q**AA**E**V**R**A**T**G-**S**N**V**I**P**G**G**L**A**A**M**A**Q**S**A**A**A**Y**N**A**D**C**K**H**D**Q**D**K**V**K**L**A**D**V**L**T**G**A**T** 209

MtPM25 **PVEQ**SD**A**S**A**I**Q**AA**E**V**R**A**T**G-**S**N**V**I**P**G**G**L**A**S**M**A**Q**S**A**A**A**F**N**A**E**C**Q**R**E**E**K**I**K**M**G**D**V**L**T**G**A**T 207

D34_GOSHI **PVDQ**SD**A**AA**V**Q**AA**E**V**R**A**T**G**-**S**N**V**I**P**G**G**L**A**A**T**A**Q**S**A**A**A**H**N**A**T**L**D**R**E**E**K**I**K**L**N**Q**V**L**T**G**A**T 213

ECP31_ARATH **PVDQ**SD**A**AA**I**Q**AA**E**M**R**A**S**G**-**T**N**V**I**A**L**A**G**V**A**A**S**A**Q**S**A**A**D**H**N**A**T**V**D**R**N**E**R**K**I**K**L**R**D**V**L**T**G**A**A 205

ECP31_MEDTR **PVDQ**SD**A**AA**I**Q**AA**E**M**R**A**S**G**-**T**N**V**I**A**L**A**G**V**A**A**S**A**Q**S**A**A**D**H**N**A**T**V**D**R**N**E**R**K**I**K**L**R**D**V**L**T**G**A**A 205

D34_ARATH **PVDQ**SD**A**AA**I**Q**AA**E**V**R**A**C**G**-**T**N**V**I**A**P**G**G**I**A**A**S**A**Q**S**A**A**N**H**N**A**T**I**D**R**D**E**D**K**I**K**L**I**D**V**L**A**G--- 210

ECP31_DAUCA **PVDQ**SD**A**AA**I**Q**AA**E**V**R**A**S**G**---**Y**A**H**P**G**G**V**A**A**A**Q**S**A**A**D**Y**N**A**R**T**M**N**V**A**S**K**T**K**L**G**D**V**L**A**D**A**S** 205

LEAD-34b_MEDTR **PLDQ**SD**A**AA**I**Q**AA**E**M**R**A**T**G**-**K**N**H**T**E**P**G**L**G**A**I**A**Q**S**A**A**T**R**N**R**T**M**P**D**L**Q**K**T**L**G**D**V**V**S**G**A**R** 212

PM24_MEDTR **PVEW**SD**A**AA**I**Q**AA**E**V**R**A**T**G**-**R**T**N**I**V**P**G**G**V**A**A**A**Q**S**A**A**T**L**N**A**R**T**K**E**D**K**T**K**L**G**D**I**L**A**D**A**T** 190

RAB28_MAIZE **PVER**SD**A**A**R**I**Q**AA**E**A**R**A**T**G-**L**D**N**I**V**P**G**G**L**A**R**A**Q**S**A**A**A**A**N**S**W**A**W**G**E**D**K**A**T**L**G**D**V**L**A**N**A**T 225

D-34_RICE **PVDR**T**D**VE**A**I**R**AA**E**M**A**A**Q**G-**S**D**V**T**M**P**G**L**A**D**A**Q**AA**A**R**S**N**A**D**A**D**R**D**D**K**I**T**V**G**D**V**L**T**D**A**T 220

:: :* : : * : : *

PM25_SOYBN AK**L**P**A**D**K**A**A**T**L**Q**D**A**E**G**V**A**C**A**E**V**R**N**N**F**D**A**T**A**T**P**G**G**V**A**A**S**V**A**A**A**A**R**L**N**E**N**V**K----- 253

PM26_SOYBN AK**L**P**A**D**K**A**A**T**L**Q**D**A**E**G**V**A**C**A**E**V**R**N**N**F**D**A**T**A**T**P**G**G**V**A**A**S**V**A**A**A**A**R**L**N**E**N**V**K----- 257

PM24_SOYBN AK**L**P**A**D**K**A**A**T**L**Q**D**A**E**G**V**A**S**A**E**A**R**N**N**F**D**A**T**A**T**P**G**G**V**A**A**S**V**A**A**A**A**R**L**N**E**N**V**K----- 259

MtPM25 AK**L**P**A**D**K**A**A**T**R**Q**D**A**G**V**A**S**A**E**M**R**N**N**F**D**A**T**A**T**P**G**G**V**A**A**S**V**A**A**A**A**R**L**N**E**N**V**G**N**V**M----- 260

D34_GOSHI AK**L**P**A**D**K**A**V**T**R**Q**D**A**E**G**V**S**A**E**L**R**N**N**P**N**V**A**T**H**F**G**G**V**A**A**S**M**A**A**A**A**A**R**L**N**E**N**V**N**A**----- 264

ECP31_ARATH **GK**L**S**A**D**R**A**V**T**R**E**D**A**E**G**V**V**S**A**E**M**R**N**N**F**K**L**C**H**F**G**G**V**A**A**S**L**T**V**A**A**R**L**N**E**R**F**D**I**----- 256

ECP31_MEDTR **GK**L**S**A**D**R**A**V**T**R**E**D**A**E**G**V**V**S**A**E**M**R**N**N**F**K**L**C**H**F**G**G**V**A**A**S**L**T**V**A**A**R**L**N**E**R**F**D**I**----- 256

D34_ARATH ----CD**R**E**V**S**R**R**Q**H**B**-----D**E**S**N**T**E**X**I**S**T**----- 231

ECP31_DAUCA I**R**L**A**E**D**K**A**V**T**R**E**D**A**E**G**V**V**G**A**E**V**R**N**N**F**E**M**M**T**Y**P**G**G**V**A**S**S**M**A**A**A**A**R**L**N**Q**D**P**T**F----- 256

LEAD-34b_MEDTR **E**K**L**G**S**D**K**A**V**T**R**E**D**A**E**G**V**I**G**A**E**L**R**N**K**A**D**M**R**T**K**F**G**G**V**A**A**S**M**A**A**A**A**T**L**N**Q**T**K**S**G**----- 264

PM24_MEDTR T**K**L**P**A**D**R**A**A**T**R**R**D**A**E**R**V**T**G----- 209

RAB28_MAIZE **A**R**L**V**A**D**K**F**V**E**S**A**D**A**L**G**V**A**G**A**E**N**R**N**R**N**D**G**T**A**R**F**G**G**V**A**A**S**M**A**A**A**A**R**L**N**R**N**E**A**V**W**E**----- 278

D-34_RICE **A**K**L**G**D**K**V**A**G**A**E**D**A**A**K**V**Q**A**E**T**Y**S**D**A**A**A**R**T**R**A**G**G**V**A**A**V**S**T**A**A**R**L**N**Q**A**D**D**D**D**D**A**E 277

* : . :

Figure 10 : Alignement de séquences protéiques homologues de PM25

Les séquences ont été alignés grâce à l’algorithme ClustalW (Higgins et al., 1994). Les symboles du consensus sont : « * » : acides aminés identiques dans toutes les séquences « : » : substitutions conservées « . » : substitutions semi-conservées. Les motifs conservés sont en caractères gras. La boîte grisée correspond à un peptide d’adressage nucléaire vers le noyau. Les noms des protéines de différentes espèces et leur numéro d’accession utilisées pour cette alignement sont : D37 d’*A.thaliana* (Q39137) ; D34 du coton (CAA31594) ; D34 du riz (Q5z9Y8) ; ECP31 d’*A.thaliana* (Q96245) ; ECP31 de la carotte (Q5KTS8) ; ECP31 de *M.truncatula* (TC96862) ; LEA-34b de *M.truncatula* (TC107159) ; MtPM25 de *M.truncatula* (DQ206870) ; PM24 de *M.truncatula* (TC96521) ; PM24 du soja (AAF21311) ; PM26 du soja (AAF21312) ; Rab28 du maïs (Q41850). SOYBN : soja ; MEDTR : *M.truncatula* ; GOSHI : coton ; MAIZE : maïs ; RICE : riz ; ARATH : *A.thaliana* ; Daucus : carotte (D’après Boudet, thèse 2005).

plus hydrophiles (figure 9). A 42 % d'humidité relative (c'est à dire les conditions d'humidité employée pour tester la TD) et à 33 % HR (humidité optimale de conservation), la teneur en eau est similaire pour ces protéines. Cette observation est concordante avec la fonction de tampon d'hydratation qui a été proposée pour les déhydrines (Tunnacliffe et Wise, 2007) et EM6 (Manfre et al., 2006; Manfre et al., 2008).

L'analyse de la séquence primaire de PM25 et les données expérimentales sur ses homologues avec lesquels nous avons comparé sa séquence (figure 10) montre qu'elle possède un site d'adressage nucléaire de type QPRRP (Niogret et al., 1996). Chez *A. thaliana* (Arenas-Mena et al., 1999; Borrell et al., 2002) et chez le maïs (Niogret et al., 1996) il a pu être montré que ce site d'adressage était effectif et que ces homologues étaient localisés dans le noyau.

Thématique du laboratoire et objectifs de la thèse

L'objectif général de l'UMR Physiologie moléculaire des semences est d'acquérir une meilleure compréhension de la biologie des semences au cours de la germination et de la levée, en vue d'en améliorer la qualité physiologique. L'équipe TAS (Tolérance Aux Stress) au sein de laquelle s'inscrit ce travail de thèse a pour but de mieux comprendre les mécanismes mis en place dans la graine au cours de la maturation pour tolérer la dessiccation, puis ceux mis en place pendant la germination pour supporter les différents stress auxquelles elle va devoir faire face.

L'objectif du travail de thèse a été l'élucidation du rôle de PM25. Le but de ce projet était également d'apprécier dans quelle mesure les connaissances apportées sur cette protéine LEA pouvaient améliorer nos connaissances sur la qualité des semences de légumineuses. Pour mener à bien ce travail, deux approches ont été employées : une approche physico-chimique de caractérisation plus précise de la fonction de PM25 *in vitro* et une approche de génétique inverse impliquant *E. coli* et des mutants d'insertion de *M. truncatula* déficient en PM25.

Introduction bibliographique

La description du travail réalisé se déroulera en trois parties :

Dans la première partie nous aborderons les caractéristiques de PM25 protéine LEA atypique puisque appartenant au groupe 5. Dans cette partie nous décrirons également comment s'exprime *PM25* pendant la maturation et la germination de la graine mais aussi lors de stress salins et osmotique. Nous déterminerons également les localisations tissulaire et cellulaire de PM25.

Dans la seconde partie, nous éluciderons quelle pourrait être le rôle de PM25 au sein de la cellule, *in vivo* sur le modèle *E. coli* et *in vitro* sur des modèles enzymatiques et protéiques plus complexes.

Enfin, dans la troisième partie, nous développerons une approche de génétique inverse en caractérisant des mutants *Tnt1* déficient en PM25. Ainsi, nous chercherons à savoir quels aspects de la physiologie de la graine ont été altérés

Partie 1

PM25, une L.E.A atypique,

spécifique de la graine et localisée

dans le noyau

INTRODUCTION

Comme nous l'avons précisé dans l'introduction bibliographique, la question de savoir si le groupe 5, appartient à la famille des protéines LEA est encore discutée (Boudet et al., 2006; Tunnacliffe et Wise, 2007; Battaglia et al., 2008). Or, PM25, objet de notre étude appartient à ce groupe. Il nous a donc semblé important de mieux la caractériser afin que son appartenance aux protéines LEA ne soit plus remise en cause. L'objectif des travaux présentés dans ce chapitre a été, dans un premier temps, de démontrer que PM25 possédait bien les caractéristiques communes aux protéines LEA. Puis, dans un deuxième temps, en préambule aux chapitres 2 et 3 consacrés à la caractérisation fonctionnelle *in vitro* et *in vivo* de PM25, nous nous sommes intéressé à l'expression spatio-temporelle de PM25. Nous avons caractérisé son expression pendant et après la germination en conditions optimales et pénalisantes. Ensuite, nous avons vérifié la localisation cellulaire et tissulaire de la protéine, sachant que, son homologue AtRAB28 dans le graine se localise spécifiquement au niveau des tissus provasculaires, téguments et épiderme de l'embryon (Arenas-Mena et al., 1999). Enfin, l'étude de la séquence peptidique ayant mis en évidence une séquence d'adressage nucléaire (Boudet et al., 2006) et sachant que AtRAB28 possède un site d'adressage fonctionnel (Arenas-Mena et al., 1999), nous avons vérifié s'il était aussi effectif pour PM25.

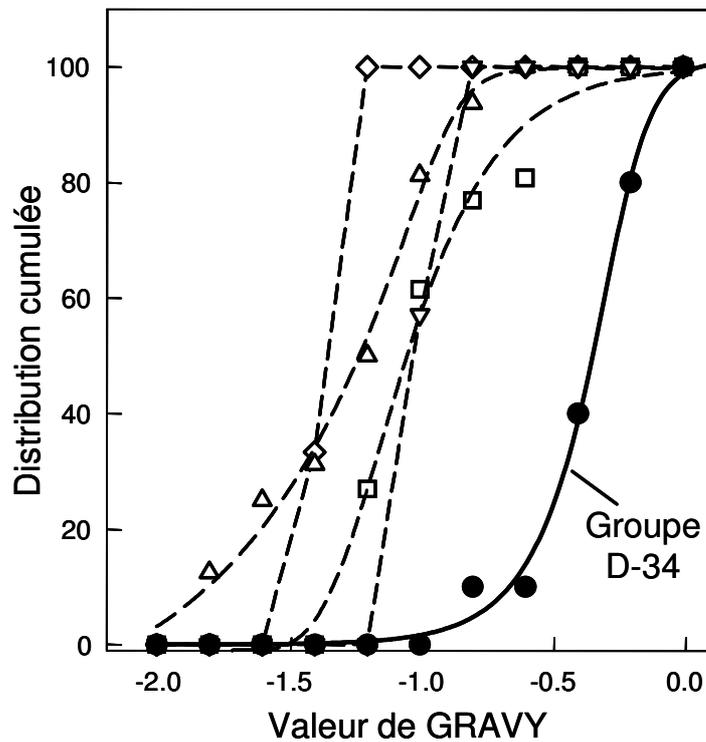


Figure 1.1 : Distribution cumulée des valeurs de Gravy des protéines LEA chez *M.truncatula* et *A.thaliana* appartenant aux principaux groupes de LEA

Les distributions cumulées des valeurs de gravy reflétant l'hydrophobicité des protéines sont calculées pour les protéines LEA majoritaires de *M.truncatula* et *A.thaliana* tel que : groupe 1 (◇) ; groupe 2 (Δ) ; group 3 (□) ; groupe 4 (▽) ; groupe 5 (●). Les valeurs sont obtenues en utilisant le programme Protparam (www.expasy.ch).

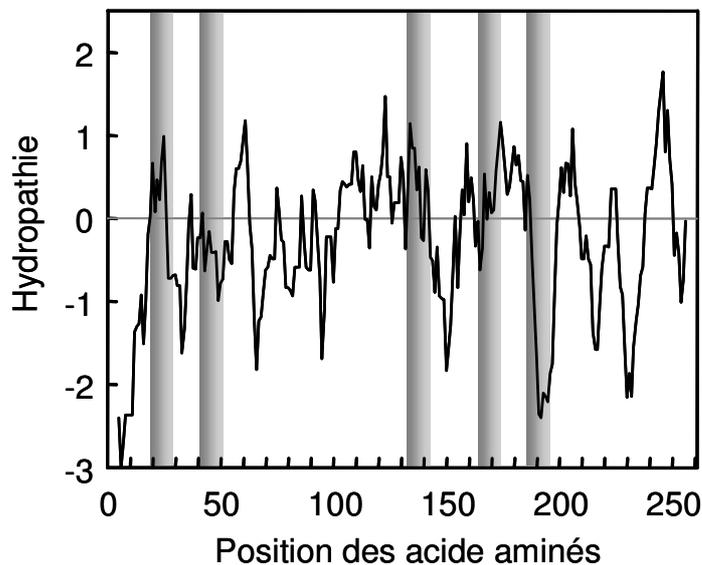


Figure 1.2 : Profil d'hydrophathie de PM25

Prédiction *in silico* des domaines hydrophobes de PM25 au moyen du logiciel de prédiction ProtScale (Kite & Doolittle) (www.expasy.ch). Les barres grises indiquent les séquences consensus en acides aminés de la famille des D34 de *M. truncatula* identifiés par alignement de séquence sur D34 Multalin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/>). Les valeurs positives présent par la courbe indiquent les régions hydrophobes et les valeurs négatives indiquent les régions hydrophiles.

RESULTATS

1.1. PM25, une protéine hydrophobe largement désordonnée à l'état natif et stable à la chaleur.

1.1.1 Détermination de l'hydrophobicité de PM25

Une des caractéristiques majeures des protéines LEA est leur forte hydrophilie. Or, la famille à laquelle appartient PM25 est une famille constituée de protéines LEA présentant des caractéristiques hydrophobes que nous avons détaillée dans la figure 1.1. Nous avons calculé les valeurs de GRAVY (Grand Average of Hydropathicity) qui vont refléter le niveau d'hydrophobicité des protéines d'après leur séquence en acides aminés selon l'algorithme de Kyte et Doolittle disponible sur le site EXPASY (www.expasy.ch). Les valeurs ont été obtenues à partir de l'ensemble des séquences de protéines LEA connues chez *A.thaliana* (soit 52 séquences, (Hundertmark et Hinch, 2008)) et de *M.truncatula* (36 séquences). De cette façon, nous avons cherché une représentation réaliste des différents groupes majeurs de LEA au sein d'une espèce. Nous n'avons pas inclus dans l'analyse les groupes rares pour lesquelles l'appartenance au LEA n'est pas établie (D-95, LEA14), ainsi, les protéines appartenant au groupe 5 ne sont ici représentées que par la famille des D-34 (Cf tableau 1) dont fait parti PM25. Afin de rendre la comparaison plus aisée, les données obtenues pour chaque groupe sont présentées sous forme de distribution cumulée. Plus la courbe est décalée vers la droite, moins les valeurs de GRAVY sont négatives et donc, plus les protéines sont considérées comme hydrophobes. Il apparaît clairement que la distribution obtenue pour les protéines du groupe D-34 se détache de celles obtenues pour les autres groupes révélant le caractère plus hydrophobe des protéines de cette famille. Ainsi, le groupe D-34 est effectivement plus hydrophobe que les autres groupes appartenant aux protéines LEA. Par ailleurs, le profil d'hydropathie de PM25 qui permet de prédire les segments hydrophobes de la protéine (Figure 1.2) montre effectivement que PM25 possède plusieurs domaines hydrophobes (c'est-à-dire les valeurs positives prises par la courbe). Ces régions hydrophobes de 10 à 20 acides aminés sont réparties tout le long de la protéine et ne semblent pas se localiser préférentiellement dans une région. Nous n'observons pas de corrélation entre les domaines conservés des D-34 représentés par les bandes

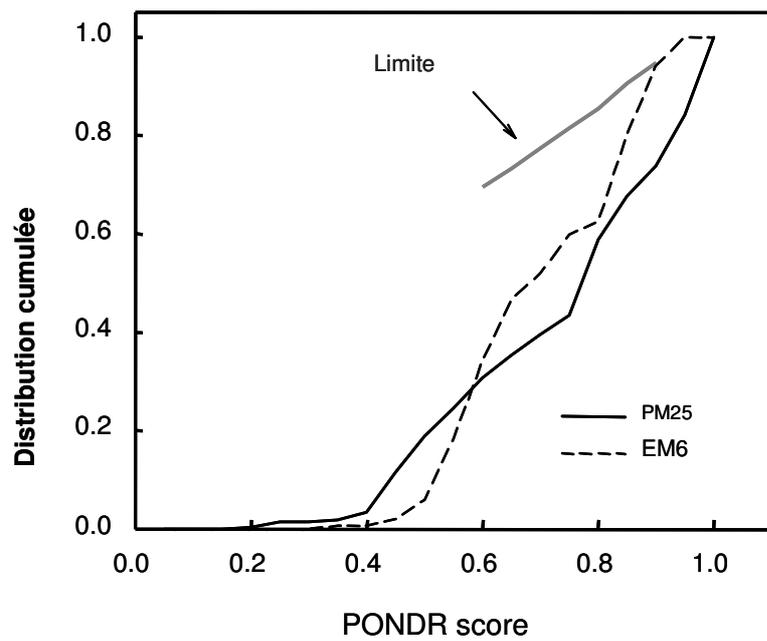


Figure 1.3 : Prédictions *in silico* de structure de PM25 et EM6 à partir de leurs séquences primaires en acides aminés par PONDR VL-XT (www.pondr.com)
 La limite (ligne grise) représente la frontière entre les protéines considérées comme ordonnées au dessus et désordonnées en dessous.

grises et les régions hydrophobes. Ces zones conservées apparaissent donc selon les prédictions tantôt ayant un caractère hydrophile, tantôt un caractère hydrophobe.

1.1.2 PM25, une protéine majoritairement non structurée en solution

Une autre des principales caractéristiques des protéines LEA est leur absence de structuration en solution. Cependant, il existe une divergence entre les résultats des prédictions obtenues successivement (Cuming, 1999; Tunnacliffe et Wise, 2007; Battaglia et al., 2008; Hundertmark et Hinch, 2008) suggérant que les membres du groupe 5 présentent une conformation secondaire majoritairement ordonnée, et, les données de spectroscopie FTIR obtenues pour PM25 par (Boudet et al., 2006) qui indiquent que la forme recombinante de cette protéine, à l'état hydraté, est majoritairement désordonnée. Selon ces auteurs, elle présente en effet seulement 33 % d'hélice α et 18 % de feuillet β . Mais il faut noter que ce dernier type de structure est moins abondant chez d'autres protéines avérées être des LEA (Tunnacliffe et Wise, 2007).

Récemment, plusieurs travaux ont abouti à la publication de nouveaux algorithmes tel que PONDR VL-XT (Predictor Of Natural Disordered Regions (www.pondr.com)) dont l'objectif est de prédire les contributions de domaines désordonnés à partir de la séquence primaire d'acides aminés. Ces algorithmes sont réputés plus fiables pour cet exercice que ceux utilisés jusqu'à présent (tel que PELE). En effet, ces derniers ont été mis au point pour prédire les contributions relatives de chaque type de structure d'une protéine intrinsèquement ordonnées et apparaissent moins efficaces dans la prédiction de structures désordonnées. Cette méthode de calcul a récemment été utilisée pour prédire la structure d'une protéine LEA inhabituelle, hydrophobe, de lotus (*L.japonicus*), IDP1, appartenant au groupe V selon la classification de Wise, et dont le comportement, ressemble à celui d'une protéine globulaire (Haaning et al., 2008). Nous avons donc soumis la séquence de PM25 à ce logiciel qui transforme les scores PONDR sous forme d'une fonction de distribution cumulée (Figure 1.3). Nous avons comparé le résultat obtenu pour PM25 avec celui obtenu pour EM6, une protéine LEA du groupe 1 dont le caractère intrinsèquement désordonné a été vérifié expérimentalement (Soulages et al., 2002) et qui est, également, étudiée dans notre laboratoire. Nous pouvons remarquer que les 2 protéines sont en dessous d'une droite symbolisant la limite virtuelle entre les protéines considérées comme majoritairement ordonnées et les protéines considérées

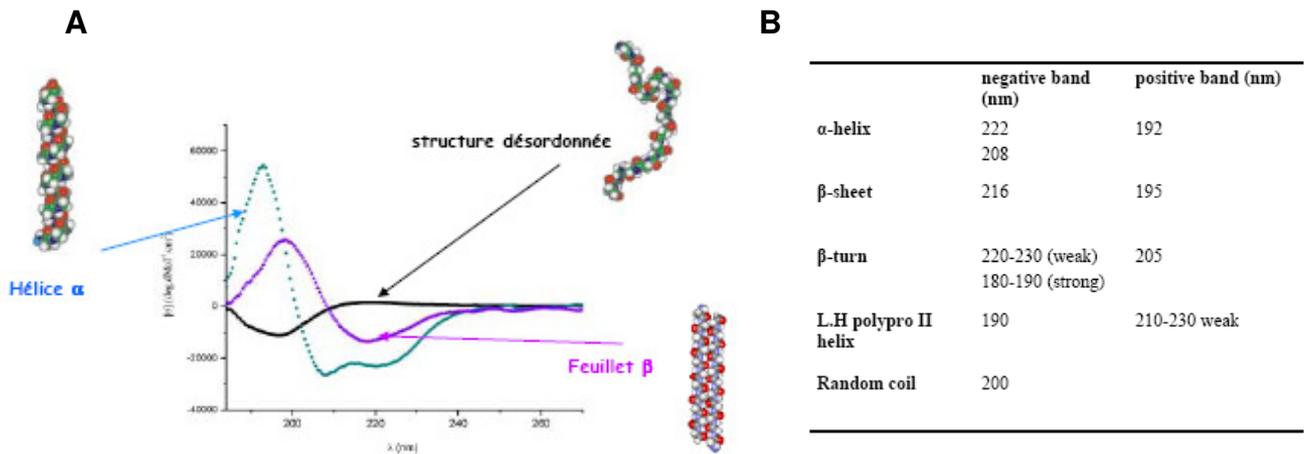


Figure 1.4 : Caractéristiques générales des spectres protéiques obtenus en dichroïsme circulaire

En A : Spectres typiques obtenus pour différentes conformations protéiques. En B : Valeurs maximales et minimales attendues pour les différentes conformations.

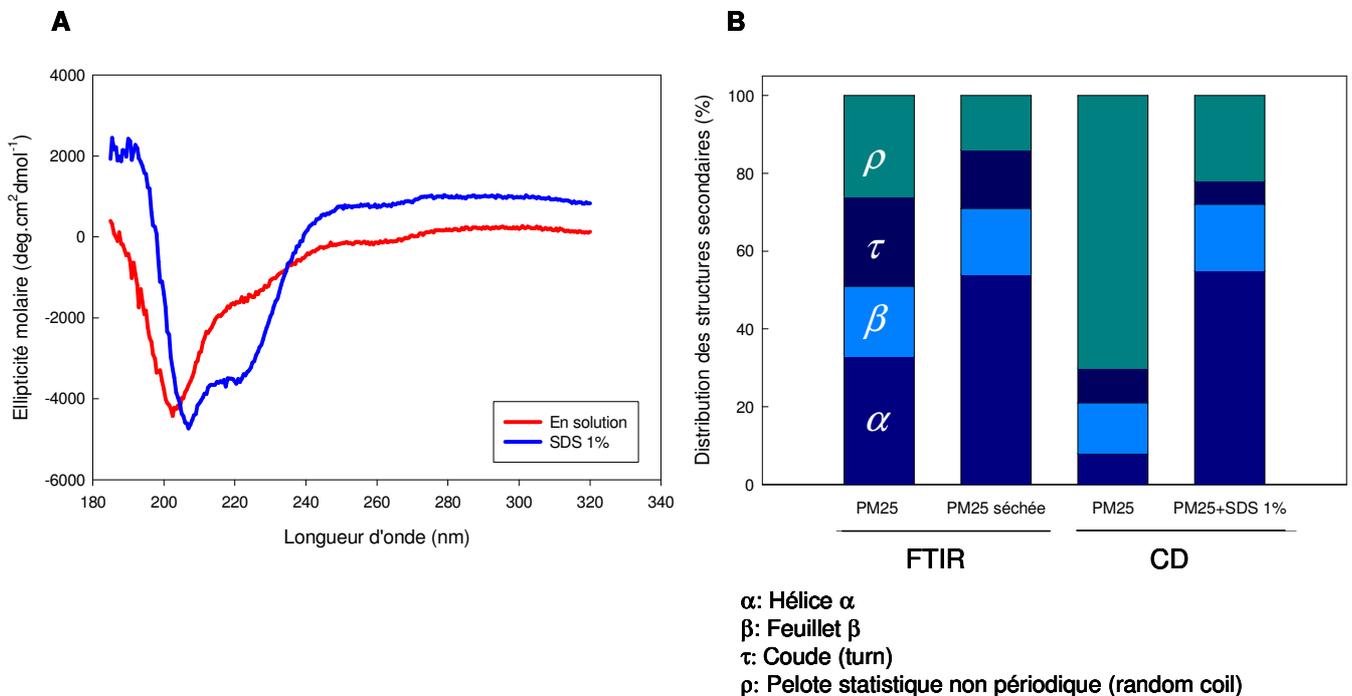


Figure 1.5 : Spectre de PM25 en solution et en présence de SDS en dichroïsme circulaire et contribution des structures secondaires en spectroscopie FTIR et en DC de PM25 en solution, séchée, et en présence de SDS

En A : Spectre de PM25 seule en solution (PM25 : 1 mg/ml ; tampon phosphate 5 mM pH 7.5) et en présence de SDS 1%. En B : Les pourcentages des différents types de structures secondaires obtenues par spectroscopie FTIR sont issus de Boudet et al., (2006). Pour les valeurs de DC, elles sont déduites des spectres obtenus en A grâce au programme DICHROWEB (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>, Lobley et al., 2002)

comme majoritairement désordonnées. Ainsi, PM25 apparaît bien comme une protéine majoritairement désordonnée en solution tout comme EM6. Ce résultat est similaire à celui obtenu par (Haaning et al., 2008) pour la protéine IDP1.

Afin de conforter cette prédiction, nous avons déterminé la contribution des différentes structures secondaires de PM25 en solution par une technique complémentaire à la spectroscopie FTIR (FTIR : Fourier Transformed Infra Red): le dichroïsme circulaire (DC) en UV lointain. En effet, cette méthode est couramment utilisée dans les études de structure/fonction des protéines LEA (Soulages et al., 2002; Mouillon et al., 2006; Tolleter et al., 2007). Les spectres obtenus en spectroscopie FTIR par (Boudet et al., 2006) l'avaient été en diluant la forme recombinante purifiée de PM25 dans du D₂O. Nous avons ici repris la même forme recombinante provenant de la même série de purification mais diluée dans du tampon phosphate 5 mM pH 7.5.

La technique de dichroïsme circulaire (CD) en UV lointain permet d'avoir accès à la structure et/ou conformation d'une macromolécule en solution et notamment la structure secondaire d'une protéine par l'étude de son spectre d'absorption en lumière polarisée. Le groupement amide de la liaison peptidique est un chromophore, qui, placé entre deux carbones asymétriques que sont les carbones α de deux acides aminés voisins, va absorber différemment une onde polarisée circulaire gauche et une onde polarisée circulaire droite. En effet, les groupements peptidiques sont orientés selon des angles ϕ et ψ caractéristiques des différents types de structures secondaires. L'allure et les valeurs maximales et minimales du spectre obtenu en DC vont donc varier selon que la protéine est repliée en hélices α , feuillet β ou qu'elle est non structurée (Fig.1.4 A et B). La fraction de chaque type de structures secondaires présentes dans la protéine peut ainsi être estimée en considérant le spectre CD de celle-ci comme la somme des contributions de chaque type par rapport à un spectre de référence pour chacun de ces types (Greenfield et Fasman, 2002).

La figure 1.5 A montre le spectre d'absorption de PM25 (courbe rouge), obtenu dans la région des UV lointain, dissoute dans le tampon phosphate. Il présente un maximum dans les ellipticités molaires négatives aux alentours de 200 nm typique

d'une absence de structuration de la protéine (Random coil ou pelote statistique) et ne présente aucun des autres critères attendus pour les autres conformations. Ce spectre est très similaire à celui d'autres protéines LEA du groupe 1 (Soulages et al., 2002), 2 (Mouillon et al., 2006) et 3 (Tolleter et al., 2007), et confirme que PM25 présente une conformation majoritairement désordonnée en solution.

Il a été décrit à plusieurs reprises que des protéines LEA pouvaient se structurer en hélice α lors du séchage (Boudet et al., 2006; Tolleter et al., 2007) mais également sous l'effet d'un agent chimique tel que le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) (Ismail et al., 1999; Tolleter et al., 2007). Nous avons voulu savoir si la conformation de PM25 pouvait également être influencée par le SDS. Le spectre CD obtenu en présence de SDS 1% (Figure 1.5 A, courbe bleue) fait apparaître les caractéristiques typiques d'une protéine majoritairement structurée en hélice α avec deux minima à 208 et 222 nm pour les valeurs d'ellipticité négative et un maximum à 192 nm pour les valeurs d'ellipticité positives. Ceci nous indique une capacité de la protéine à se structurer en présence de SDS. Le site internet DICHROWEB (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>, (Lobley et al., 2002)) dispose d'algorithmes qui permettent de comparer les spectres étudiés à ceux de protéines de référence dont la structure est parfaitement connue grâce à l'analyse des cristaux protéiques par diffraction des rayons X. Cette comparaison permet par une méthode de « curve fitting » d'estimer la contribution des différentes structures secondaires en décomposant le spectre obtenu en DC. Nous avons ainsi pu estimer la contribution de chaque structure en solution et en présence de SDS 1% et confronter nos résultats avec les données obtenues en spectroscopie FTIR par (Boudet et al., 2006).

Les structures en coude (turn) et en pelote statistique non périodique (random coil) représentent les régions désordonnées de la protéine. Les structures en coude sont des régions non ordonnées mais présentant tout de même un repliement particulier de la protéine faisant souvent le lien entre deux régions ordonnées. Les structures en pelote statistique non périodique sont des régions ne présentant aucune structuration. Si les deux méthodes indiquent que PM25 est globalement non ordonnée en solution (Figure 1.5 B), les données obtenues en DC indiquent une absence de structuration en solution plus importante par rapport aux données obtenues en spectroscopie FTIR. En effet, le DC indique une proportion en hélice

α de seulement 8 % contre 33 % en spectroscopie FTIR, et 70 % de random coil contre 26 %. Seule la prédiction de structuration en feuillet β évolue peu entre les deux techniques (contribution de 13 à 20 %). Par ailleurs, en présence de SDS 1 %, PM25 adopte une structuration majoritairement sous forme d'hélices α , soit, 55 % de la protéine. Les pourcentages de contribution des structures secondaires obtenus en présence de SDS et après séchage sont assez similaires.

1.1.3 PM25 est stable à la chaleur dans une solution complexe de protéines

Une autre propriété caractéristique des protéines LEA est d'être stable à la chaleur. Même si PM25 a été identifiée dans le protéome stable à la chaleur de graines de *M.truncatula* (Boudet et al., 2006), elle ne pourrait être que partiellement stable pendant le chauffage. En effet, une proportion significative en acides aminés hydrophobes et la présence de feuillets β à l'état natif sont des facteurs favorisant l'agrégation des protéines. Nous avons donc voulu, mettre en évidence la capacité de PM25 à rester soluble en solution après chauffage. Ainsi, nous avons soumis à une gamme de températures, des extraits protéiques solubles de graines de *M. truncatula* imbibées 6 heures, dans lesquelles PM25 est encore présente. Au cours du chauffage, les protéines sensibles à la chaleur, vont se dénaturer et précipiter. Elles vont pouvoir être séparées des protéines stables par centrifugation. Les protéines ayant précipité se retrouvent dans le culot tandis que les protéines stables restent dans le surnageant. L'analyse de la présence de PM25 dans le surnageant et le culot est faite après migration en gel une dimension SDS-PAGE suivie d'une révélation de la protéine par western blot au moyen d'un anticorps dirigé contre PM25 (Boudet et al., 2006). Nous avons suivi en parallèle l'évolution au cours du même traitement de EM6, protéine LEA du groupe 1 déjà citée précédemment (section 2.1.2).

Lorsque les extraits protéiques sont chauffés, nous constatons que jusqu'à 75°C PM25 est absente dans le culot et très abondante dans la fraction stable à la chaleur (Figure 1.6). A 95°C, la protéine se trouve également majoritairement dans le surnageant, toutefois, une faible quantité en PM25 est détectée dans le culot. Ceci pourrait indiquer une faible précipitation de la protéine, toutefois il apparaît que PM25 est une protéine stable à la chaleur. En ce qui concerne EM6 dans les mêmes

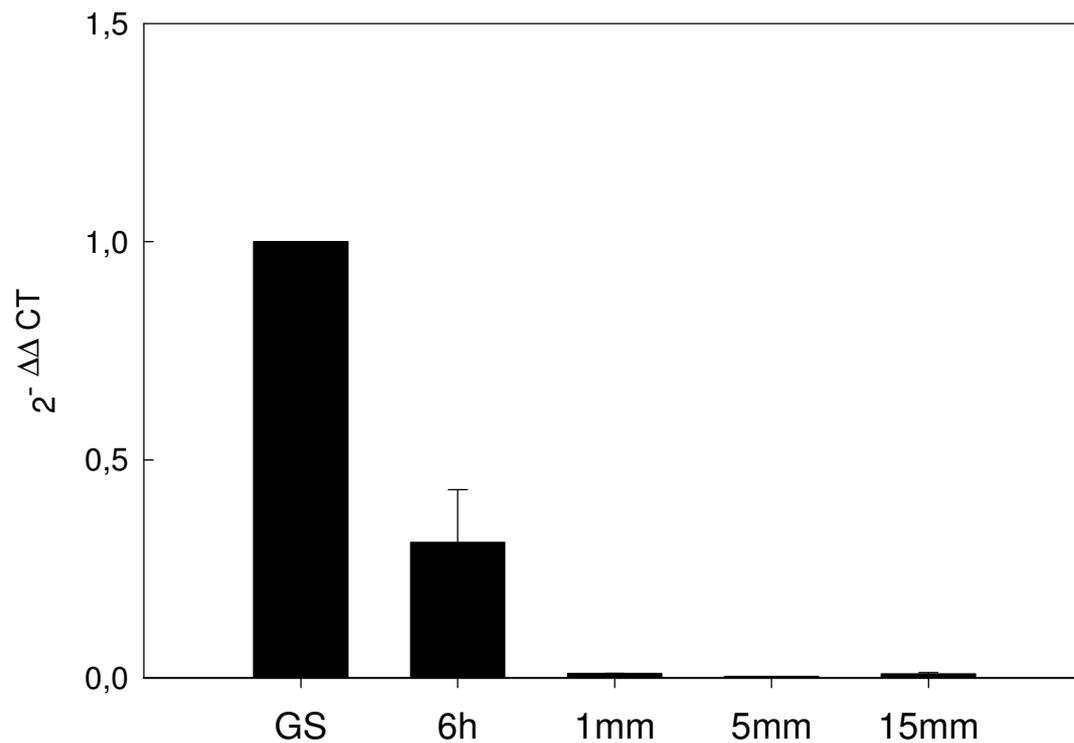


Figure 1.7 : Expression de *PM25* au cours de la germination et de la croissance post-germinative dans des racicules de *M. truncatula*

L'expression relative de *PM25* (\pm écart type, sur trois réplicats techniques) est suivie au cours de la germination par RT-qPCR. GS : graine sèche, 6h : graines imbibées 6h, 1 mm, 5 mm, 15 mm : longueur de la racicule. Le taux d'expression est calculé par rapport aux graines sèches en utilisant la formule du $2^{-\Delta\Delta CT}$ et en ramenant les valeurs par rapport à l'expression dans les graines sèches. Toutes les données sont normalisées par rapport au gène de référence *Msc27*.

conditions, elle n'est pas retrouvée dans les fractions du culot même lorsque les échantillons sont chauffés à 95°C.

1.2 Etude de l'expression de PM25 au cours de la germination et de la croissance post-germinative en conditions optimales et pénalisantes

Les protéines LEA spécifiques des graines ont pour caractéristique de s'accumuler en fin de maturation de la graine et de disparaître rapidement pendant la germination. Cette observation a été également confirmée pour PM25 par western blot ((Boudet et al., 2006) ; Figure 8). En revanche, nous ne possédons pas de données concernant l'expression de PM25 au cours de la germination. C'est pourquoi, nous avons suivi par RT-qPCR (Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction) son expression dans la radicule au cours de la germination et de la croissance post-germinative en conditions optimales et pénalisantes. L'absence de variation de quantité d'ARNm entre les différents échantillons est déterminée. Puis, après la reverse transcription, les valeurs obtenus en qPCR sont normalisées par le suivi de l'expression d'un gène dont l'expression est constitutive au cours du développement et de la germination, *Msc27*, gène codant pour une protéine homologue de protéines intervenant dans le control des tumeurs chez l'homme (Pay et al., 1992).

1.2.1 Expression de PM25 au cours de l'imbibition

La figure 1.7 représente l'expression relative de PM25 au cours de l'imbibition normalisée par rapport à la quantité d'ARNm dans les graines sèches dont le niveau d'expression est fixé arbitrairement à 1. Au cours de la germination, nous observons très rapidement une décroissance du nombre relatif de transcrits de PM25. En effet, dès 6h d'imbibition, ils ont déjà diminué de plus de la moitié par rapport au niveau observé dans les graines sèches. Au stade 1 mm, juste après la percée de la radicule, le signal n'est plus significativement différents du bruit de fond, et ne présente plus de variations au cours de la croissance de la radicule. Ainsi, PM25 n'est rapidement plus exprimé pendant la germination. Ces résultats sont en parfaite corrélation avec ceux obtenus pour le taux de protéine qui diminue également rapidement pendant l'imbibition (Boudet et al., 2006).

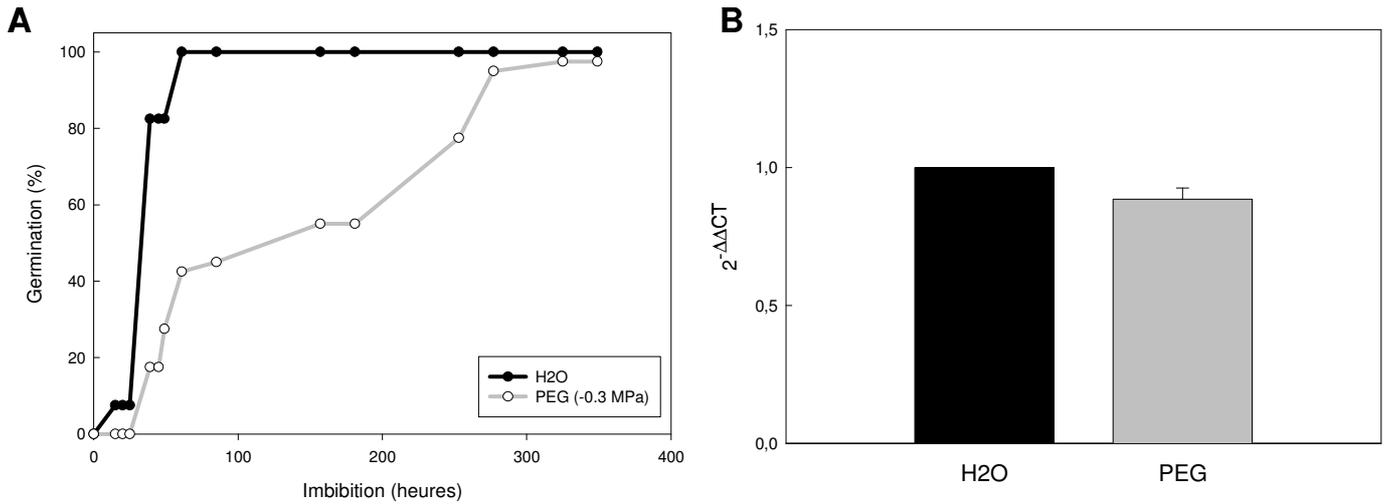


Figure 1.8 : Germination de graines de *M.truncatula* et expression de *PM25* dans l'eau et lors d'un stress osmotique provoqué par une solution de PEG ψ : -0.3 MPa

En A, courbes de germination de 80 graines de *M.truncatula* à l'obscurité à 20°C dans l'eau (●) ou en présence d'une solution de PEG (○) équivalent à un potentiel hydrique de - 0.3 MPa. En B, Analyse par RT-qPCR de l'expression relative (\pm écart type) de *PM25* dans des graines imbibées 6 h à l'obscurité dans l'eau ou en présence de PEG. L'expression de *PM25* dans le PEG est rapportée par rapport à son expression dans l'eau. Toutes les données sont normalisées par rapport au gène de référence *Msc27*.

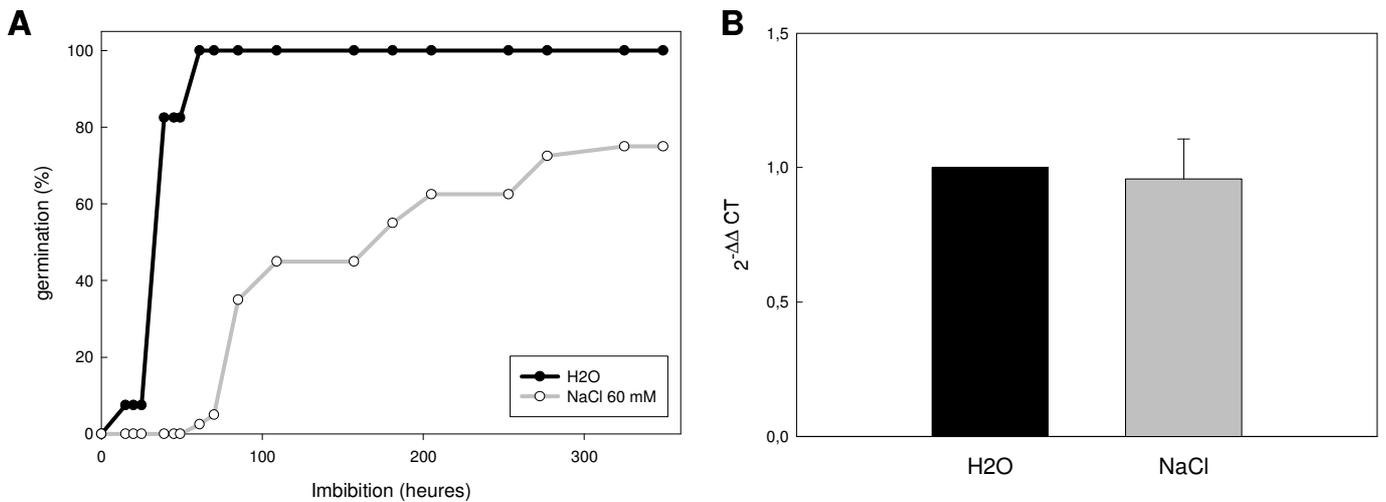


Figure 1.9 : Germination de graines de *M.truncatula* et expression de *PM25* dans l'eau et lors d'un stress salin provoqué par du NaCl 60 mM.

En A, courbe de germination de 80 graines de *M. truncatula* à l'obscurité et à 20°C dans l'eau (●) ou en présence de NaCl (○). En B, analyse par RT-qPCR de l'expression relative (\pm écart type) de *MtPM25* sur graines 6h imbibées dans l'eau ou en présence de NaCl. L'expression de *PM25* dans le NaCl est rapportée à son expression dans l'eau. Toutes les données sont normalisées par rapport au gène de référence *Msc27*.

1.2.2 Expression de *PM25* en conditions osmotiques pénalisantes

En préambule à la caractérisation fonctionnelle de *PM25*, qui sera développée dans le chapitre 3, il était nécessaire de vérifier si *PM25* pouvait être induit par des stress osmotiques comme cela a été observé pour le gène *RAB28* du maïs mais également chez les déhydrines et la vaste majorité des LEA du groupe 3 (Skriver et Mundy, 1990; Close, 1996; Ingram et Bartels, 1996; Allagulova et al., 2003). Par ailleurs, cette étude se justifie également par le fait que l'application de traitements osmotiques est souvent utilisée par les semenciers pour améliorer la qualité germinative des graines, un processus connu sous le nom de « priming » (Heydecker et Coolbear, 1977).

Afin de déterminer si *PM25* est induit par un stress osmotique dans les graines de *M.truncatula*, nous avons fait germer les graines dans une solution de PEG (polyéthylène glycol) nous permettant d'induire une pression osmotique de $\psi = -0.3$ MPa dans le milieu. Cette valeur de pression osmotique est en effet suffisante pour induire un délai de germination comme nous le montre la figure 1.8 A, mais est insuffisante à inhiber la germination puisque les taux finaux atteignent 100 %. Ainsi, en présence de PEG, les graines accusent un retard d'environ 50 h pour que le lot traité atteigne 50 % de germination par rapport aux graines imbibées dans de l'eau. Le niveau d'expression du gène décroissant rapidement au cours de l'imbibition (fig. 1.7) nous avons choisi de déterminer le taux relatif de transcrits uniquement à 6 h d'imbibition. La figure 1.8 B indique que le nombre relatif de copies d'ARNm *PM25* en présence de PEG est identique à celui observé dans le témoin eau ; le gène n'est donc pas surexprimé en présence de PEG à 6h après imbibition.

Selon la même démarche nous avons suivi d'une part la germination des graines et d'autre part l'expression de *PM25* après 6h d'imbibition en présence de NaCl 60 mM (Figure 1.9). En effet, la surexpression de l'homologue de *PM25*, *AtRAB28* permet d'améliorer les vitesses de germination chez *A.thaliana* lors d'un stress salin (Borrel et al., 2002), Dans notre expérience, les graines de *M. truncatula* imbibées en présence de NaCl présentent un retard d'environ 15h par rapport au témoin eau pour atteindre 50 % de germination. Par ailleurs, contrairement à ce qui est observé lors d'un traitement au PEG, les taux finaux de germination sont affectés, puisque ils

```

MSQEQPRRPQAGQDPIKYGDVLPVSGDLSQKPITPEDAAMMQSAESR
VLGQTQPGGVASVMQSAATRNEQAGIVGHKDVTDVTGDRGVTVTETQ
VPGRRITETVGGQVVGQFVEPTPVQVGLTGAVRESALTIGEALEATAH
TVGDKPVEQSDASAIQAAEVRATGSNVITPGGLASMAQSAAAFNAECQ
REEEKIKMGNVLTGATAKLPADKAATRQDAAGVASAEMRNNPDATATP
GGVAASVAAAARLNENVGNVM

```

Figure 1.10 : Séquence primaire de PM25 en acides aminés

En encadré jaune : séquence NLS (QPRRP), en rouge, les acides aminés supprimés dans la construction sans NLS.

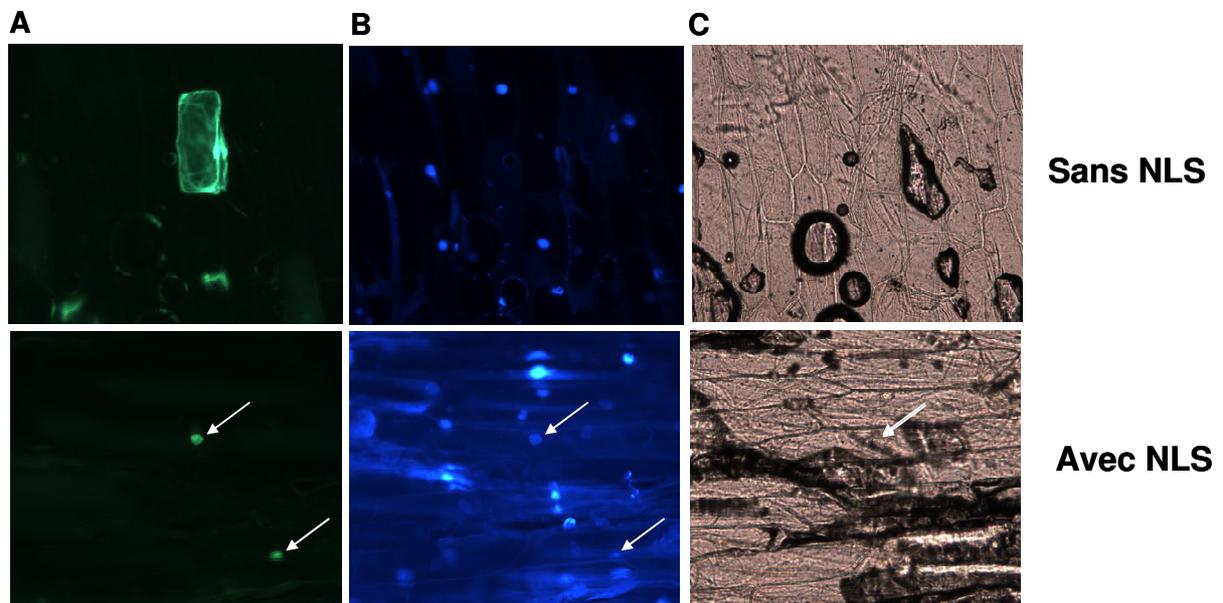


Figure 1.11 : Adressage cellulaire de PM25 en microscopie

L'observation des cellules d'oignon, transformées par biolistique pour permettre l'expression transitoire de *PM25 :GFP* afin de déterminer la localisation cellulaire de PM25 avec ou sans NLS, est faite avec filtre GFP en A, DAPI en B et lumière blanche en C. Les flèches indiquent une localisation préférentielle de la fluorescence.

n'atteignent que 80 % (Figure 1.9 A). Lorsque nous suivons le taux relatif de transcrits de *PM25* après 6h d'imbibition en présence de NaCl, aucune différence n'est observée par rapport au témoin eau (Figure 1.9 B). Le gène ne semble donc pas induit lors d'un stress salin.

1.3 Localisation cellulaire et tissulaire de PM25

1.3.1 Localisation cellulaire de PM25

Comme mentionné dans le relevé bibliographique, les 2 homologues de *PM25*, *AtRAB28* et *RAB28* sont localisés dans le noyau (Niogret et al., 1996; Borrell et al., 2002). Ces auteurs ont démontré que cette localisation était due à la présence d'une séquence d'adressage nucléaire (QPRRP) située dans la portion N-terminale de la protéine. La séquence primaire de *PM25* présente également ce peptide d'adressage (Figure 1.10). Nous avons donc vérifié s'il était fonctionnel. Pour cela nous avons exprimé le gène *PM25* fusionné à la GFP (Green Fluorescent Protein) dans des cellules d'oignon transformées par biolystique. La biolystique est une méthode de transfert direct de gène dans une cellule. Elle consiste à intégrer le gène d'intérêt, ici *PM25:GFP*, dans les cellules d'épiderme d'oignon par bombardement de celles-ci avec des billes d'or enrobées d'ADN plasmidique contenant le gène d'intérêt. Comme témoin, nous avons choisi d'utiliser la protéine *PM25* mutée sans le peptide d'adressage en supprimant par clonage les 10 premiers acides aminés incluant la séquence QPRRP. De plus, les tissus transformés ont été coloré au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole), une molécule fluorescente capable de se lier à l'ADN, ce qui permet de valider ou non la localisation nucléaire du signal de fluorescence émis par la GFP. Lorsque nous observons les tissus transformés (Figure 1.11) avec le gène *PM25:GFP* muté sans le signal d'adressage (sans NLS), la fluorescence est détectable dans toute la cellule sans localisation préférentielle. Par contre, lorsque les cellules sont transformées avec *PM25:GFP* possédant son signal d'adressage, nous observons que le signal est concentré dans une organelle. La colocalisation de la fluorescence verte avec celle du DAPI en bleue suggère qu'il s'agit du noyau. Ainsi, le signal d'adressage de *PM25* au noyau est fonctionnel dans la cellule d'oignon.

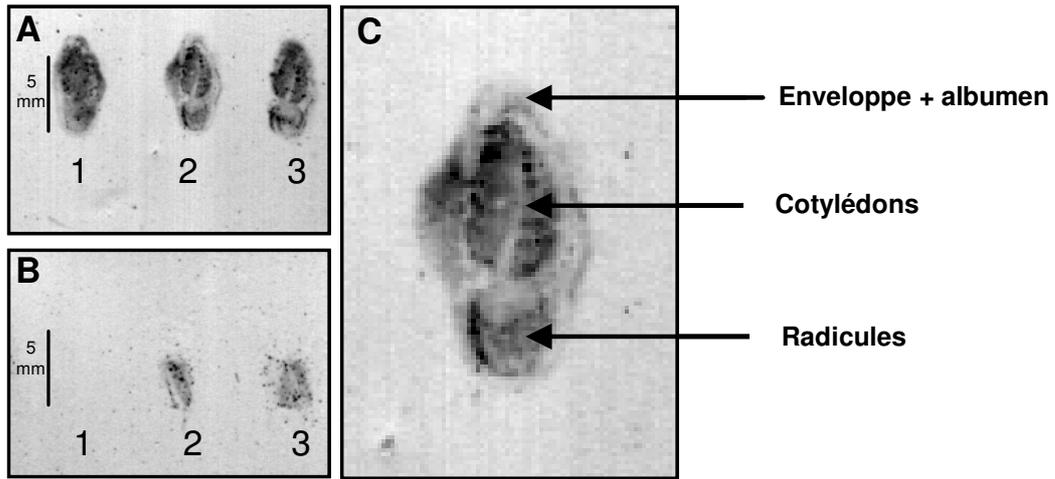


Figure 1.12: Empreintes tissulaires de graines de *Medicago truncatula* imbibées 3h
En A l’empreinte tissulaire est réalisée sur les graines sauvages, en B sur les mutants PM25 (décrits partie 3) et en C : un agrandissement du résultat obtenu pour les graines sauvages.

1.3.2 Localisation tissulaire de PM25

Plusieurs études ont montré que les protéines LEA pouvaient avoir des localisations tissulaires spécifiques au sein de la plante (Vicient et al., 2000; Nylander et al., 2001; Carjuzaa et al., 2008) mais aussi et surtout au sein de la graine (Arenas-Mena et al., 1999; Vicient et al., 2000; Garnczarska et al., 2008). Il nous a semblé judicieux de déterminer dans quel organe et tissus PM25 était localisée. Pour ce faire nous avons employé la technique de l’empreinte tissulaire. Cette technique, dérivée du western blot va permettre après impression d’une coupe de graine imbibée sur membrane de nitrocellulose, de déterminer la localisation de la protéine d’intérêt en la révélant au moyen d’un anticorps. La marque laissée par l’impression permet de reconnaître à la loupe binoculaire les contours de la graine et les organes. Afin de vérifier la spécificité de l’hybridation, nous avons utilisé comme témoin des graines de *Medicago truncatula* mutantes déficientes en PM25 fournies par la « Samuel Noble Foundation » (USA), qui seront caractérisées dans la troisième partie de ce manuscrit. Dans les graines sauvages imbibées 3h, le signal indiquant la présence de PM25 est détectable au niveau de la radicule et des cotylédons mais pas dans les enveloppes (Fig.1.12). De plus, la répartition de PM25 semble relativement uniforme dans les organes. En revanche, le signal est très faible voir nul pour les graines mutantes déficientes en PM25.

DISCUSSION

Nos résultats montrent que PM25 est une protéine LEA plus hydrophobe que les protéines LEA appartenant aux groupes majoritaires 1, 2, et 3. Elle apparaît bien comme les autres protéines LEA, majoritairement désordonnée en solution comme l'indiquent les données obtenues en spectroscopie FTIR et en dichroïsme circulaire. Cependant nous avons pu noter des divergences entre les pourcentages de contributions notamment en hélice α et en pelotes statistiques obtenues pour chacune des deux techniques. Sachant que la nature du solvant influence la structure secondaire des protéines, nous suspectons que la faible contribution du caractère désordonné de la protéine obtenu en FTIR proviendrait du fait que PM25 était dissoute dans du D₂O, un solvant qui influence l'enthalpie du repliement. Ceci suggère que le réseau de ponts hydrogène autour de la protéine influence sa conformation. Par ailleurs nous avons pu démontrer que PM25 possédait une aptitude à adopter une structuration majoritaire en hélice α en présence de SDS, l'effet étant assez proche de celui obtenu au cours du séchage en FTIR. Un certain nombre d'études (Wu et Yang, 1970; Lark et al., 1989; Tsikaris et al., 1989; Pasta et al., 1990) ont montré que la structuration sous forme d'hélices α en présence de SDS était due à un caractère amphiphile de certaines régions de la protéine. En effet, les peptides ne présentant pas cette caractéristique d'amphiphilicité ne se structurent pas en présence de SDS. La capacité de PM25 à se structurer en présence de SDS pourrait donc indiquer que la protéine soit légèrement amphiphile. Cette hypothèse est renforcée par la prédiction obtenue pour son profil d'hydropathie qui indique que PM25 possède des zones très hydrophiles et des zones plutôt hydrophobes. Ce caractère amphiphile suggère que la protéine pourrait être impliquée dans le repliement de protéines partenaires et pourrait avoir une fonction de protéine chaperonne (Parker et Song, 1992). En effet, c'est au niveau des zones hydrophobes des protéines chaperonnes que vont se faire les interactions avec les protéines mal repliées ou dont le repliement est altéré (Parker et Stezowski, 1996; Jitsuhara et al., 2002; Wu et al., 2008; Ivanov et al., 2009). Cette particularité a pu être observée chez une autre LEA hydrophobe LjIDP1 (Haaning et al., 2008), pour laquelle les auteurs citent le modèle de « small cageless chaperones », qui sont des protéines capable d'assister le repliement d'autres protéines sans nécessité d'ATP, et qui a été décrit pour l' α -caséine et mini-GroEL (Stan et al., 2005; Jewett et Shea, 2006). De

plus, ces fonctions de chaperonnes ont été suggérées pour plusieurs autres protéines LEA (Tunnacliffe et Wise, 2007). Cette caractéristique de *PM25* pourrait donc suggérer un rôle de chaperon.

Dans un second temps nous avons mis en évidence que l'expression du gène *PM25* décroît très rapidement pendant la germination. Ceci est nouveau par rapport aux connaissances déjà acquises sur les homologues de *PM25*, *AtRAB28* et *RAB28*. Il avait seulement été montré que *RAB28* chez le maïs pouvait être réinduit dans les tissus végétatifs par l'ABA tandis que *AtRAB28* non. L'extinction rapide de l'expression du gène pendant la germination corrélée à la disparition rapide de la protéine (Boudet et al., 2006) suggère un rôle dans les phases précoces de la germination ou bien pendant la maturation. Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence que *PM25* n'est pas réinduite après 6 h d'imbibition dans du NaCl ou dans une solution aqueuse à un potentiel hydrique de Ψ : -0.3 MPa. Ceci concorde avec les résultats obtenus par (Soeda et al., 2005) qui avait pu montrer par une analyse transcriptomique qu'un homologue de *PM25* chez *Brassica oleacea* At3G22490 (ECP31) n'était pas non plus induit par un traitement au PEG équivalent à un potentiel hydrique de -1MPa dans le milieu, un traitement qui bloque la germination. Cependant, (Boudet et al., 2006) avait montré que la protéine *PM25* était réinduite dans des racines germées de 2.8 mm sensibles à la dessiccation par un traitement au PEG équivalent à un potentiel hydrique Ψ de -1,7MPa. Le traitement osmotique provoqué sur les graines germées qui ont perdu leur capacité à tolérer la dessiccation leur permet d'être de nouveau tolérantes à la dessiccation, tandis que dans le cas du travail sur le colza et dans notre étude, les graines étaient déjà tolérantes à la dessiccation. Ainsi, les mécanismes moléculaires mis en jeu sont probablement différents, et *PM25* serait plutôt induit dans le cadre d'une réinduction des systèmes mis en place pour tolérer la dessiccation et non par un stress osmotique ou le priming. Cependant, il est nécessaire de tester des concentrations supérieures de PEG, par exemple une pression osmotique de -1,7 MPa pendant l'imbibition des graines afin de valider cette hypothèse. De plus, il faudrait également savoir si l'ensemble des gènes faisant partie de la famille des LEA D-34 (tels que ECP31 et *AtRab28*) sont régulés de la même manière au cours de la germination et en condition de stress.

Partie 1 : PM25, une LEA atypique, spécifique de la graines et localisée dans le noyau

Les empreintes tissulaires montrent que PM25 semble répartie de façon homogène dans la radicule et les cotylédons, contrairement à ses homologues chez *A.thaliana* et le *Z.mays* qui sont localisés principalement dans les tissus provasculaires (Niogret et al., 1996; Arenas-Mena et al., 1999). Cependant, ces auteurs ont eu recours, afin de déterminer la localisation préférentielle des protéines étudiées, à la technique d'immunocytochimie qui est plus précise que la technique d'emprunte tissulaire. Toutefois, la comparaison entre le bruit fond, tel qu'on peut le détecter avec les mutants déficients en PM25 pour les différents organes, et le signal observé pour les graines sauvages ne semble pas indiquer une localisation préférentielle. En effet, dans le cas d'une localisation au niveau des tissus vasculaires, on devrait s'attendre à un signal très marqué au centre la radicule, ce qui n'est pas le cas. Donc, il est fort probable que PM25 soit effectivement présente dans tous les tissus de la graine. Chez *A.thaliana* comme *M.truncatula*, il existe plusieurs gènes appartenant à la même famille de protéines LEA. Donc, nous pouvons nous demander si la fonction de PM25 et ses mécanismes de régulation sont identiques aux 2 homologues AtRAB28 et RAB28 décrits jusqu'à présent (Niogret et al., 1996; Arenas-Mena et al., 1999; Borrell et al., 2002). Cette suggestion se fonde sur les observations faites chez les protéines LEA du groupe 1. Dans ce groupe, il n'existe que deux gènes chez *A.thaliana* : à savoir EM1 et EM6 (Vicent et al., 2000). Or EM1 est exprimé spécifiquement dans les tissus provasculaires et EM6 partout dans la graine. L'ensemble de ces résultats suggère des rôles différents pour des LEA d'une même famille au vu de leur répartition tissulaire. Dans ce cas de figure, chez *Medicago truncatula* il existerait un homologue de PM25 préférentiellement localisé dans les tissus provasculaires.

Nous avons également mis en évidence l'adressage de PM25 au noyau indiquant que la séquence QPRRP présente dans sa séquence était fonctionnelle. Cette localisation cellulaire préférentielle suggérerait un rôle au niveau des composants du noyau comme l'ADN ou les protéines nucléaires.

*Partie 2 : Caractérisation
fonctionnelle de PM25*

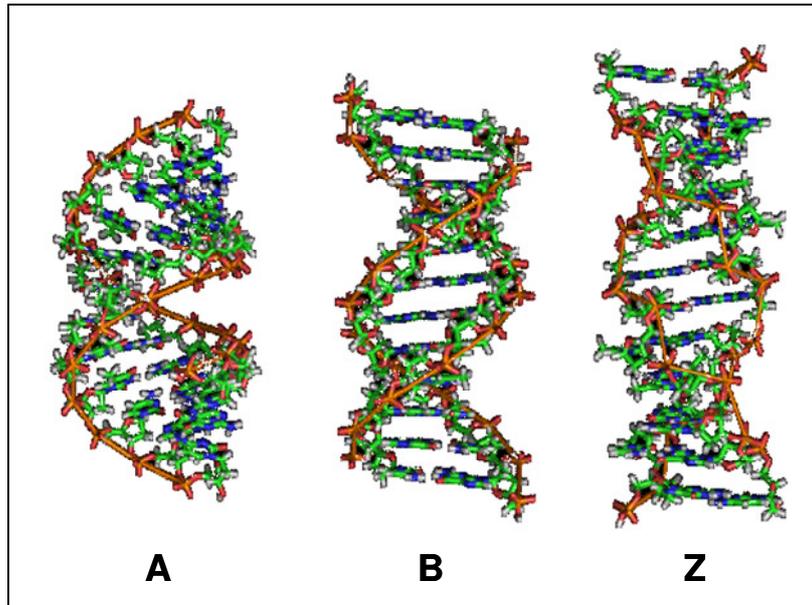


Figure 2.1 : Différentes conformations adoptés par l'ADN

Illustration tirée de http://clubs.ncsu.edu/genetics/img/800px-A-DNA,_B-DNA_and_Z-DNA.png

INTRODUCTION

Sachant que PM25 n'intervenait pas dans la protection membranaire (relevé bibliographique, Boudet, 2005, thèse) et la localisation nucléaire putative de PM25, nous avons cherché, dans un premier temps, à savoir si PM25 pouvait interagir avec l'ADN afin de le préserver lors de la dessiccation. L'ADN est capable d'adopter différentes conformations selon l'environnement hydrique dans lequel il se trouve. Chez les eucaryotes il existe 3 conformations particulières qui sont les formes A, B, Z (Figure 2.1). La conformation B est la plus commune. Le changement de conformation va être essentiellement dû au pourcentage d'eau liée aux phosphates présent dans l'ADN. En effet, lorsque l'humidité relative descend en dessous de 75 %, l'ADN sous forme B subit un changement de conformation réversible vers la forme A, qui est une forme plus compactée. Cette dernière va permettre à la molécule d'être plus résistante au séchage mais aussi aux rayons UV. En effet, l'augmentation de la distance entre des pyrimidines successives induite par la compaction structurelle va empêcher la formation de liaisons covalentes entre celles-ci en présence de rayons UV (Voet et Voet, 2004). Les données préliminaires obtenues par le laboratoire en collaboration avec le Dr. F.A. Hoekstra (université de Wageningen, Pays-Bas) ont montré que PM25 avait une action sur la conformation de l'ADN de sperme de saumon *in vitro*. En effet, le spectre obtenu par spectroscopie FTIR dans la région de vibrations moléculaires des groupements phosphate montre que PM25 induit une modification du spectre de l'ADN ressemblant à un changement de conformation B vers A. Nous avons donc voulu confirmer ces résultats par la méthode du dichroïsme circulaire déjà défini précédemment.

Par ailleurs, l'ADN sous conformation A a été observé dans une situation biologique bien particulière qui est celle de la sporulation des bactéries Gram⁺. Les spores de *Bacillus sp.* ou *Clostridium ssp* contiennent une proportion élevée de petites protéines acido-solubles, les SASP (small acid-soluble spore protein). *In vitro*, ces protéines sont capables de provoquer une transition de B vers A de l'ADN (Voet et Voet, 2004), et des bactéries déficientes en SASP présentent une diminution de leur résistance face aux rayonnements UV. En effet, les SASP vont permettre à l'ADN, en changeant sa conformation, et en le rendant plus compact, d'être moins soumis à la formation des dimères de pyrimidines (Setlow, 2007). Ceci va permettre

à la bactérie de préserver son ADN face aux rayonnements UV et donc de mieux tolérer ce stress. Par analogie, si PM25 agit sur la conformation de l'ADN, et, sachant qu'il s'agit d'une protéine LEA relativement acide (pI 4.25, (Boudet et al., 2006)), nous avons voulu savoir si la surexpression de PM25 chez *Escherichia coli* pouvait permettre une meilleure résistance de ces bactéries face à un stress aux UV.

Dans un second temps, comme nous l'avons décrit dans le relevé bibliographique, il a pu être mis en évidence par des études *in vitro* que des protéines LEA des groupes 1, 2, et 3 protégeaient l'activité d'enzymes des effets délétères de la congélation, du chauffage ou du séchage. Dans la partie 1, nous avons mis en évidence le caractère amphiphile de PM25 tout en soulignant la suggestion de (Parker et Song, 1992) selon laquelle cette propriété serait le plus souvent associée à la fonction de molécules chaperonnes. C'est pourquoi, dans la seconde partie de ce chapitre, nous avons testé si PM25 pouvait exercer *in vitro* une fonction protectrice vis-à-vis de protéines. Pour ce faire, nous avons choisi de travailler sur deux modèles enzymatiques couramment utilisés, d'une part, la citrate synthase, connue pour s'agréger et perdre son activité enzymatique lors d'un chauffage (Wu et Yang, 1970), (Srere, 1966), et d'autre part, la lactate déshydrogénase connue pour s'agréger et perdre son activité enzymatique lors de la congélation (Greiff et Kelly, 1966). Nous avons également étudié un modèle plus complexe consistant en un extrait de protéines solubles dans l'eau de radicules germées de *M.truncatula*, sensibles à la dessiccation.

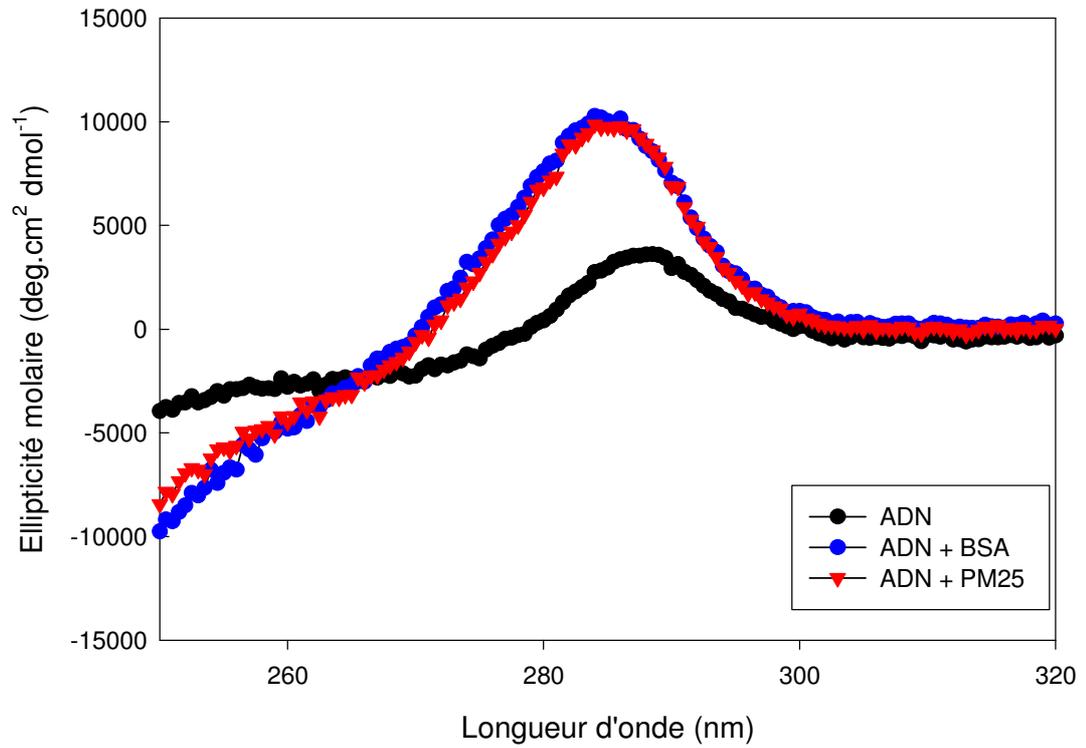


Figure 2.2 : Effet de PM25 et de la BSA sur la conformation de l'ADN en dichroïsme circulaire.

Spectre de l'ADN de thymus de veau (5 µg/ml) seul en noir, en présence de BSA, en bleu, ou de PM25, en rouge, ratio massique : 1:1. Le spectre du tampon (NaPO₄ 1mM ; EDTA 0,1 mM pH 7) a été soustrait pour chacun des spectres

RESULTATS

2.1 Effet de PM25 sur la protection de l'ADN et la survie bactérienne lors de stress

2.1.1 Effet de PM25 sur la conformation de l'ADN

En dichroïsme circulaire, l'amplitude et la position du spectre entre 250 et 300 nm nous renseignent sur la conformation de l'ADN. Dans cette région PM25 n'absorbe pas de manière significative, nous n'avons donc pas d'interférences avec le signal obtenu pour l'ADN. Les caractéristiques des pics obtenus et leurs amplitudes vont dépendre du milieu (eau, ethanol, sels), mais également de la composition en bases de l'ADN (pour revue (Kypr et al., 2009)). Pour l'ADN de thymus de veau, la forme B présente typiquement un pic de faible amplitude aux alentours de 285 nm, tandis que la forme A présente un pic de forte amplitude aux alentours de 270 nm. Les spectres ici présentés sont obtenus pour de l'ADN de thymus de veau seul dans un tampon NaPO₄ 1 mM ; EDTA 0,1 mM, pH 7, puis en présence de PM25 ou de BSA qui est utilisée comme protéine témoin dans le même tampon (Figure 2.2). Le spectre de l'ADN seul présente un pic de faible amplitude qui est centré à 288 nm indiquant qu'il se trouve sous conformation B. Lorsque PM25 est ajoutée à la solution (ratio massique 1 :1), le pic montre un glissement à 285 nm et une augmentation de son amplitude de 4000 à 10000. deg.cm²dmol⁻¹, ce qui pourrait indiquer un changement de conformation de l'ADN. Cependant, la modification du spectre obtenu est très inférieure à celle généralement observée dans le cas d'un changement avéré de conformation vers la forme A qui devrait montrer un glissement plus important aux alentours de 270 nm ainsi qu'une plus forte augmentation d'amplitude (Nejedlý et al., 2005; Nejedlý et al., 2007). Par ailleurs, lorsque la BSA est ajoutée dans le même rapport massique, le profil du spectre obtenu est tout à fait similaire à celui en présence de PM25. Il ne semble donc pas y avoir d'effet spécifique de PM25 sur la conformation de l'ADN.

2.1.2 Protection contre les UV

Par analogie avec les SASP, nous avons testé si la surexpression de PM25 chez *Escherichia coli* engendrait une résistance accrue de ces bactéries face à un stress

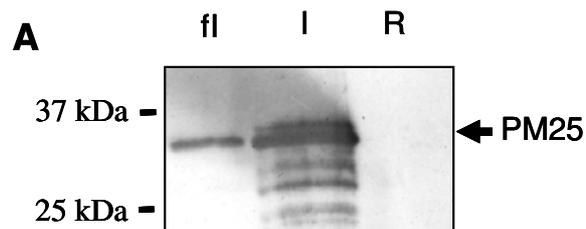
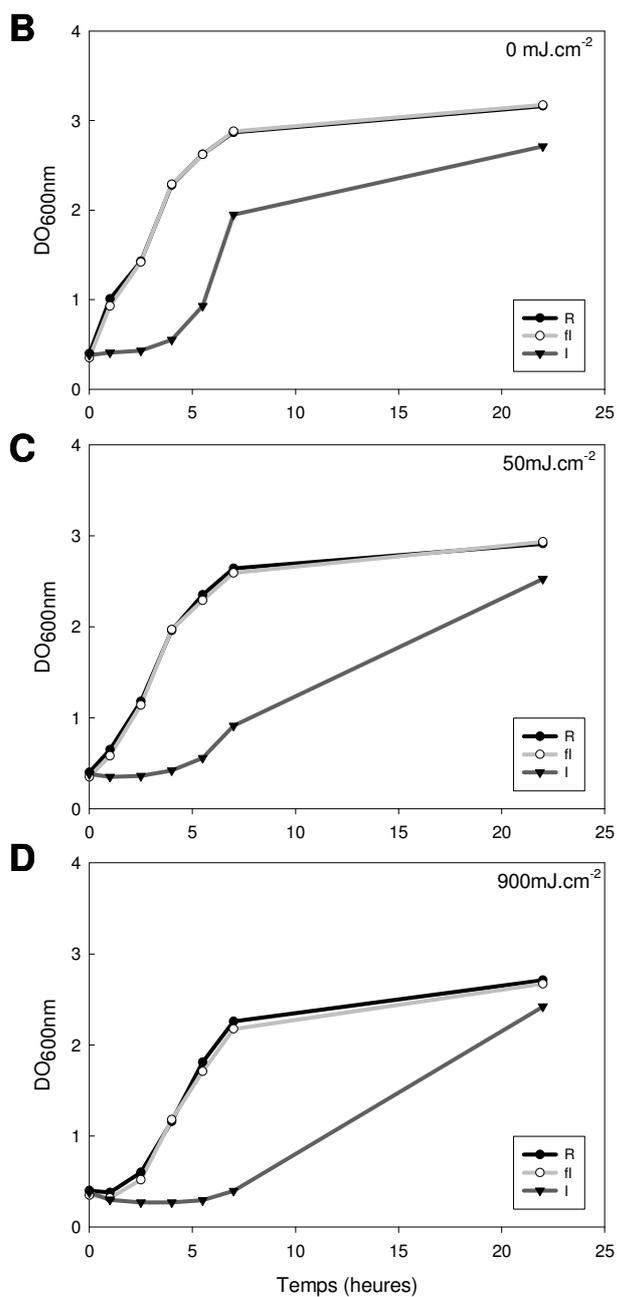


Figure 2.3: Taux de PM25 déterminé en western blot pour les bactéries faiblement induite, induite et réprimé (A) et effet de stress UV (B, C, D) sur des bactéries surexprimant ou non PM25

L'expression de *PM25* est réprimée en présence de glucose (R), induite faiblement (fl) en absence d'inducteur ou de répresseur, ou fortement (I) en présence de *L-arabinose* chez *E.Coli*. En A : Le taux de *PM25* pour les 3 niveaux d'expression est vérifié en western blot. En B, C, D : les bactéries sont soumises à différentes doses d'UV, 0, 50 et 900 mJ.cm⁻² puis remises en culture dans du LB liquide. La reprise de la croissance bactérienne est suivie au cours du temps par mesure de la DO à 600 nm.

UV. Nous avons utilisé la souche BL21-AI de *E coli* transformée avec le plasmide pDEST17 contenant la séquence codant pour PM25. Les taux d'expression de PM25 dans les bactéries sont vérifiés par western blot (2.3 A). L'expression de *PM25* est induite par le L-arabinose et réprimée par le glucose (Fig. 2.3.A). De plus, elle est également faiblement induite en absence de ces deux sucres (Fig 2.3.A). Nous avons mis à profit cette observation en incluant dans nos essais des bactéries contenant une faible teneur en PM25. Ceci nous permettant de mettre en évidence un éventuel effet dose-réponse.

Les bactéries transformées ont été soumises à des rayonnements UV à des doses énergétiques de 50 et 900 mJ.cm⁻². Après exposition, la reprise de la croissance est suivie par mesure de la DO à 600 nm en fonction du temps en milieu LB liquide. En absence de stress, lorsque *PM25* est faiblement induit, la courbe de croissance bactérienne présente le même profil que lorsque *PM25* n'est pas exprimé. En revanche, les bactéries surexprimant plus fortement *PM25* présentent un retard de croissance allant jusqu'à environ 5 heures. Lorsque les bactéries subissent des rayonnements UV de 50 mJ et 900 mJ/cm², les bactéries n'exprimant pas *PM25* présentent un retard de croissance de 1 et 3 h respectivement par rapport au témoin (Figure 2.3 B-D). Suite aux stress UV, la présence d'une faible concentration en *PM25* ne provoque pas de différence significative dans la reprise de croissance par rapport aux bactéries pour lesquelles l'expression du gène est réprimée. Les courbes se superposent parfaitement. En présence d'une forte concentration de *PM25*, les bactéries ne semblent pas être avantagée puisque elle accuse un retard de croissance, par rapport aux bactéries réprimées ou faiblement induites pour *PM25*, similaire à celui observé en l'absence de stress pour les deux intensités de rayonnement UV. Ainsi, il apparaît que *PM25* ne semble pas conférer un avantage pour les bactéries face à un stress UV. Une forte concentration de la protéine apparaît même pénalisante pour la croissance bactérienne.

2.1.3 Protection contre la dessiccation

Nous avons ensuite testé si la présence de *PM25* chez *E.coli* leur conférait un avantage sélectif en cas de dessiccation, un stress plus approprié dans le cadre de ce travail. Ainsi, nous avons testé l'effet du séchage sur des suspensions bactériennes

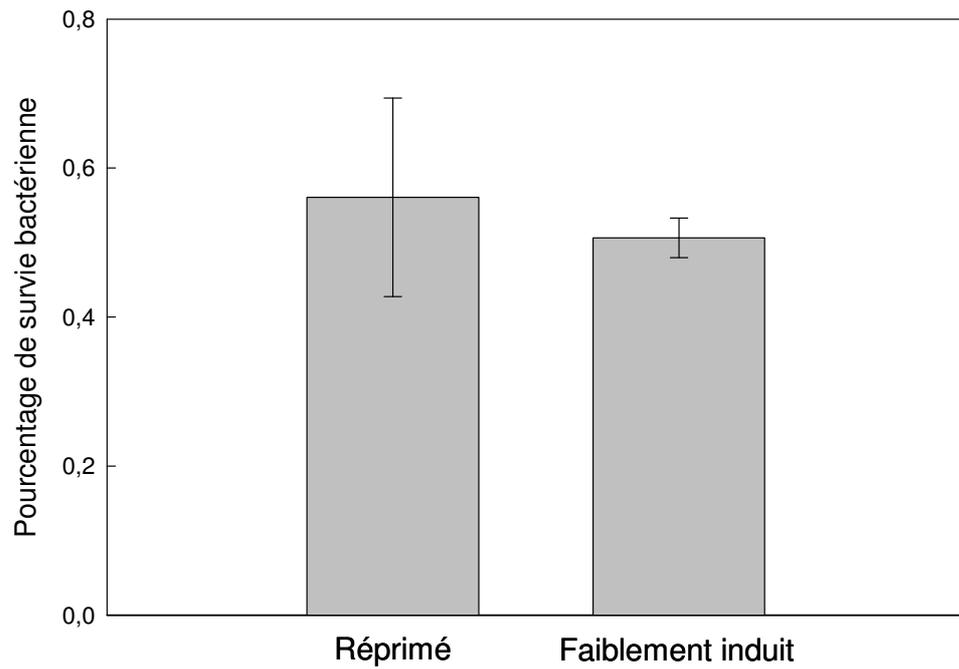


Figure 2.4: Croissance bactérienne après séchage

PM25 est réprimé en présence de glucose ou faiblement induit en absence du répresseur chez *E.Coli*. Les bactéries sont ensuite séchées pendant 7 jours à 43 % d'humidité relative puis remis en culture dans du LB. Le taux de survie bactérien est évalué par comptage sur boîte en CFU. Le pourcentage de survie bactérienne est ensuite évalué par rapport aux CFU avant séchage. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types déterminés sur la moyenne de 3 réplicats biologiques.

présentant une faible teneur en PM25 étant donné que nous avons pu montrer qu'une forte induction était néfaste à une croissance optimale (figure 2.3 B). Des culots bactériens amenés à une $DO_{(600nm)}$ de 1,2 ont été séchés pendant 7 jours à 75 % ou 43 % d'humidité relative (HR), permettant de tester un effet éventuel de PM25 en relation avec sa capacité de rétention en eau à ces deux valeurs d'humidité relative (Cf. figure 9). Les bactéries séchées sont ensuite réhydratées délicatement en milieu LB liquide puis une dilution sériée est effectuée afin de déterminer les quantités de CFU (Colony-Forming Unit) sur milieu LB solide. Après dessiccation à 43 % d'HR, les bactéries n'exprimant pas *PM25* présentent un très faible taux de survie, de l'ordre de 0.6 % par rapport aux bactéries non séchées (figure 2.4). En présence de PM25 la tolérance à la dessiccation des bactéries n'est pas améliorée, le taux de survie étant similaire à celui observé en absence de la protéine. Les résultats obtenus pour un séchage à 75 % HR sont similaires (données non montrées). PM25 ne semble donc pas améliorer la survie bactérienne lors de la dessiccation

2.2 Effet de PM25 sur la protection enzymatique

La citrate synthase et la lactate déshydrogénase sont des enzymes modèles couramment utilisées pour tester les effets protecteurs de protéines LEA (Cf. Introduction bibliographique). En effet, elles perdent leur activité après respectivement chauffage ou congélation. Leur activité enzymatique étant aisément mesurable par spectrophotométrie, l'impact protecteur d'une molécule ou d'une protéine est facilement appréciable. De plus, ces modèles ont été également utilisés pour comprendre l'influence du solvant et de solutés sur la stabilisation et les structures secondaire et tertiaire des protéines (Mishra et al., 2005).

2.2.1 Tests de protection de la citrate synthase

2.2.1.1 Effet de PM25 sur la protection de la citrate synthase pendant le chauffage

La citrate synthase (CS) est une enzyme mitochondriale homodimérique thermosensible. Lorsqu'elle est chauffée à 43°C elle s'agrège et perd son activité. Afin de valider le modèle, nous avons dans un premier temps mis au point les

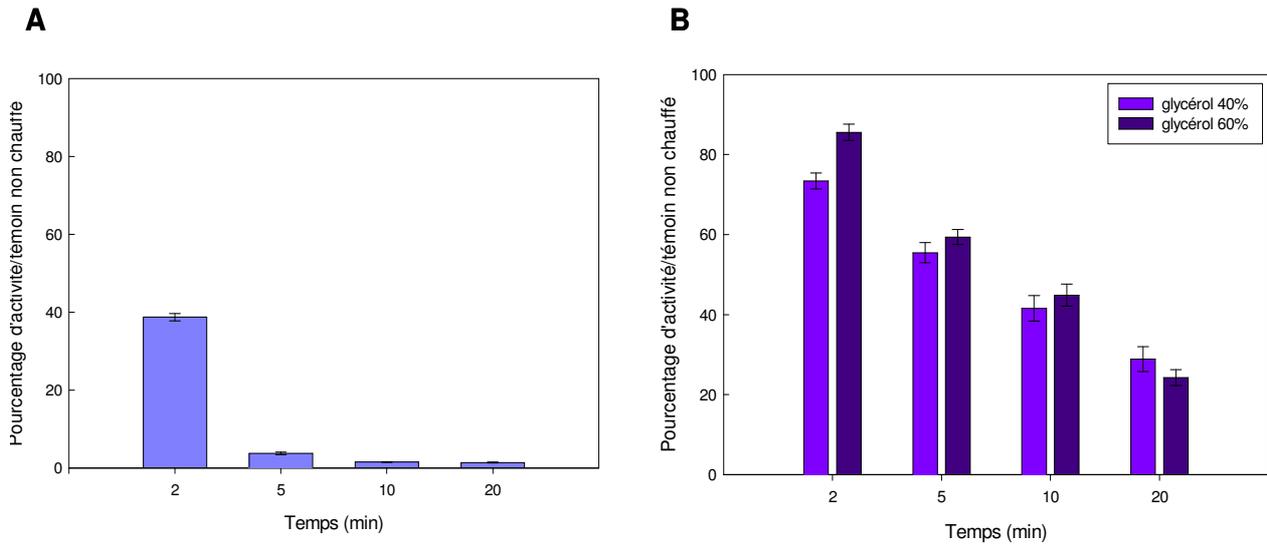


Figure 2.5 : Effet du chauffage à 43°C sur l'activité de la citrate synthase en absence (A) ou en présence (B) de glycérol

En A, l'enzyme à une concentration de 10 ng/μl est chauffée à 43°C dans le tampon de réaction seul puis refroidie sur la glace. En B, différentes concentrations de glycérol (40, 60 % vol/vol) sont ajoutées avant chauffage. Les pourcentages d'activité sont calculés par rapport aux témoins avant chauffage en présence/absence de glycérol. Les écart-types sont calculés par rapport à la moyenne de 3 réplicats techniques.

conditions expérimentales en étudiant les effets protecteur du glycérol tels que décrits dans la littérature (Mishra et al., 2005). Ceci nous permettant de nous affranchir des artéfacts liés notamment à l'encombrement moléculaire lorsque de trop fortes concentrations protéiques sont utilisées. Lorsque l'enzyme est chauffée à 43°C, son activité diminue très rapidement, elle n'est plus que de 40 % après seulement 2 minutes de chauffage et devient très faible, aux alentours de 5 %, après 5 minutes, puis négligeable après 10 minutes (Figure 2.5 A). En revanche, en présence de glycérol 40 et 60 % (Figure 2.5 B) après 2 minutes de chauffage à 43°C l'activité se situe entre 75 et 80 % de celle mesurée avant chauffage ; et après 20 minutes elle reste de l'ordre de 30 %. Les résultats indiquent que le glycérol est capable de retarder la dénaturation de l'enzyme, et sont similaires à ceux obtenus par (Mishra et al., 2005).

Ayant validé le modèle, nous avons ensuite étudié les effets de PM25 recombinante dans les mêmes conditions que ci-dessus. Nous avons également testé l'effet de EM6 et de la BSA comme protéines témoins. Comme nous l'avons précisé au cours de la partie 1, EM6 est une protéine LEA du groupe 1, qui a été clonée et purifiée au laboratoire. EM6 a été choisie car son abondance est corrélée à la mise en place de la tolérance à la dessiccation tout comme PM25 (Boudet et al., 2006). Lorsque la CS est chauffée en présence de PM25 (rapport massique 2 :1), la perte d'activité enzymatique est significativement ralentie pendant des temps très courts de chauffage (Figure 2.6 A). En effet, à 2 minutes, nous observons encore une activité d'environ 60 % en présence de PM25 contre 30 % dans le témoin (effet est comparable à celui du glycérol 40 %). Après cinq minutes de chauffage, bien que l'activité résiduelle soit fortement réduite, un effet significatif de PM25 est toujours observé. Ces observations prennent toutes leurs significations lorsque nous les comparons avec les résultats obtenus en présence de EM6 et BSA. En effet, ces deux protéines n'exercent aucune protection contre le chauffage. Après 10 min, PM25 n'exerce plus d'effet protecteur. Lorsque des concentrations croissantes de PM25, 0,5 à 4 :1 (masse :masse ; protéine :CS) sont ajoutées, si pour un rapport de 0.5 :1 aucune amélioration significative n'est obtenue, à partir d'un rapport 1 :1 la protection devient effective (Figure 2.6 B). De plus nous pouvons constater un effet dose-réponse puisque plus la quantité de PM25 est augmentée, plus la protection est efficace. Cependant, ceci ne reste valable que pour les temps court de chauffage, en

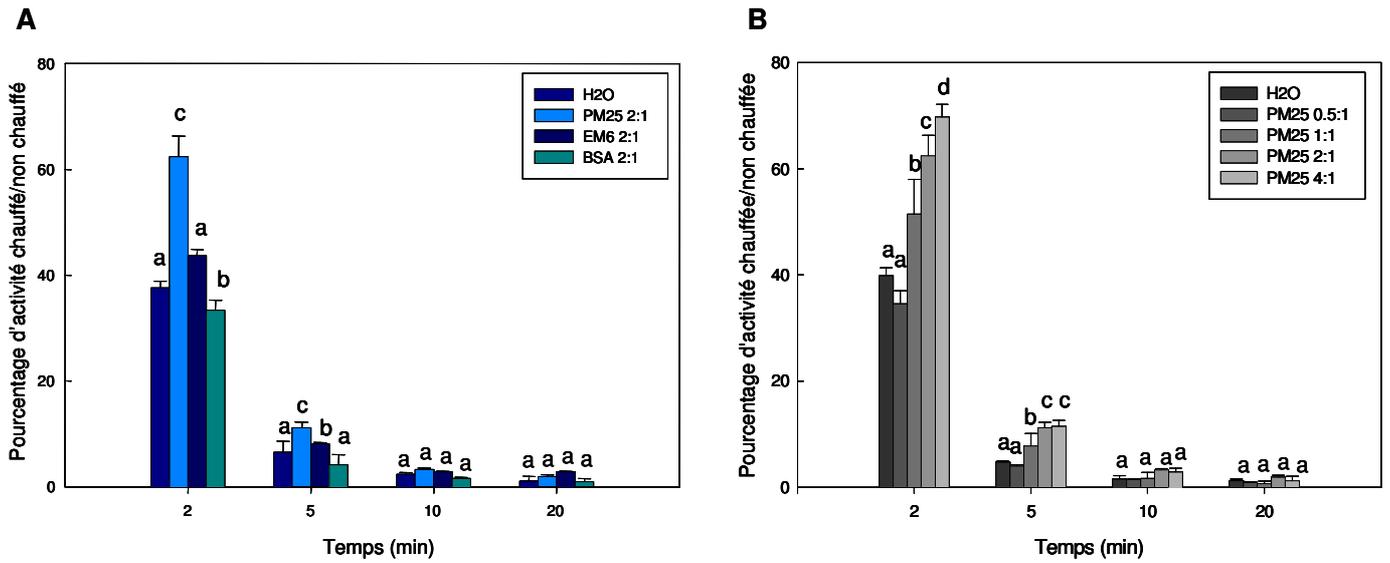


Figure 2.6 : Pourcentage d'activité de la citrate synthase en fonction du temps de chauffage en présence de PM25, EM6 ou BSA

En A, l'enzyme est chauffée de la même façon qu'en 2.6, mais en présence de PM25, EM6 ou BSA en ratio massique protéine:CS 2:1. Les pourcentages d'activité sont calculés par rapport aux témoins non chauffés respectifs. En B, L'enzyme est chauffée en présence de PM25 0.5:1 ; 1:1 ; 2:1 ; 4:1 en masse ratio protéine:CS. Les pourcentages d'activité sont déterminés par rapport aux témoins respectifs. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats biologiques. Un test ANOVA est effectué afin de déterminer les niveaux de significativité obtenus, les lettres indiquent les groupes résultants avec $p < 0.05$

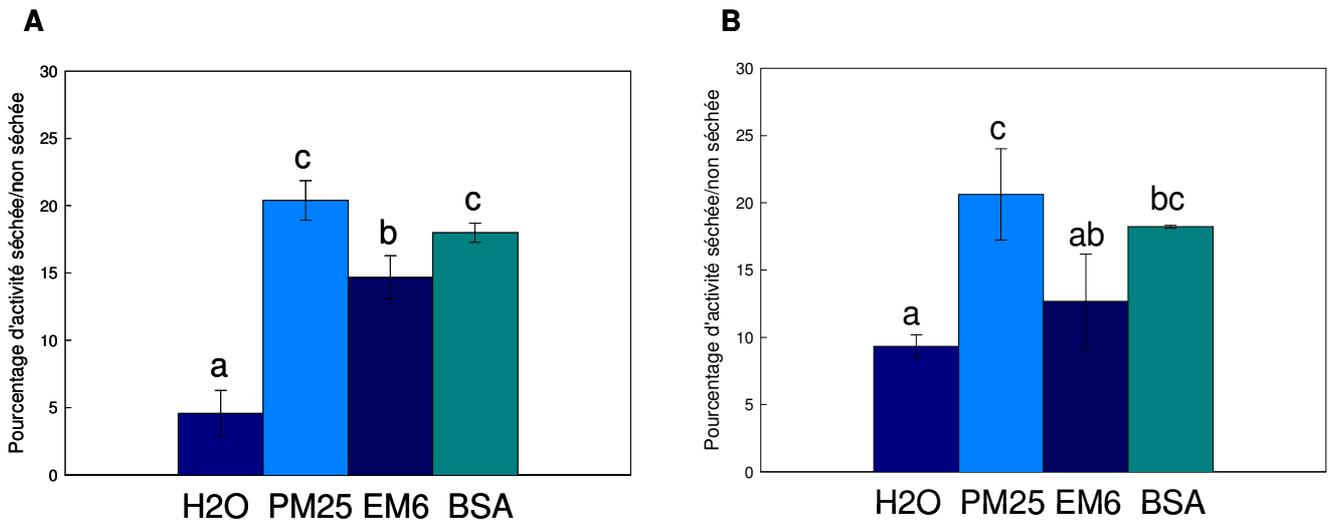


Figure 2.7 : Activité de la citrate synthase après séchage en présence de PM25

L'enzyme (10 ng/ μ l) est séchée pendant 4h à 43% d'humidité relative en A et pendant 5h à 75% d'humidité relative en B. L'évolution du pourcentage de l'activité enzymatique est mesurée par rapport aux témoins non séchés respectifs. PM25, EM6 et BSA sont ajoutées avant séchage en masse ratio 2:1 protéine : CS. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats biologiques. Un test ANOVA est effectué afin de déterminer les niveaux de significativité obtenus, les lettres indiquent les groupes résultants avec $p < 0.05$

effet, des concentrations élevées de PM25 ne sont pas suffisantes pour induire une protection après 10 min suggérant la possibilité d'une réaction irréversible induite par la chaleur (Figure 2.6 B).

2.2.1.2 Effet de PM25 sur la protection de la citrate synthase pendant le séchage

La CS est également sensible au séchage. Cependant, il a pu être montré un effet protecteur de son activité enzymatique pour plusieurs protéines LEA lors du séchage (Goyal et al., 2005; Haaning et al., 2008). Nous avons donc séché l'enzyme en présence ou en absence de PM25 dans deux conditions d'humidité relative différentes 43 et 75 % et mesuré son activité après réhydratation. Comme nous l'avons indiqué dans le relevé bibliographique, PM25 possède des propriétés de rétention en eau différentes pour ces deux valeurs d'humidité relative.

En l'absence de PM25, la perte d'activité résultante d'un séchage à 43 ou 75 % d'humidité relative est très proche, entre 90 et 95 % de perte d'activité pour les deux types de séchage (Figure 2.7 A et B). Lorsque l'enzyme est séchée en présence de PM25, l'activité enzymatique après le traitement est améliorée, puisqu'elle est d'environ 20 % soit 10 à 15 % supérieure à celle dans le témoin. Cependant, si l'effet observé est significativement différent de celui obtenu en présence de EM6, il ne l'est pas de celui obtenu en présence de la BSA et cela pour les deux conditions testées. Par ailleurs, PM25 ne semble pas protéger de manière plus efficace la CS quelque soit les conditions d'humidité relative puisque nous atteignons 20 % d'activité après séchage dans les deux conditions.

Afin de compléter ces résultats nous avons travaillé sur un autre système enzymatique modèle : la lactate déshydrogénase qui, elle, a la propriété de s'agréger et de perdre son activité lors de la congélation.

2.2.2 Tests de protection de la lactate déshydrogénase

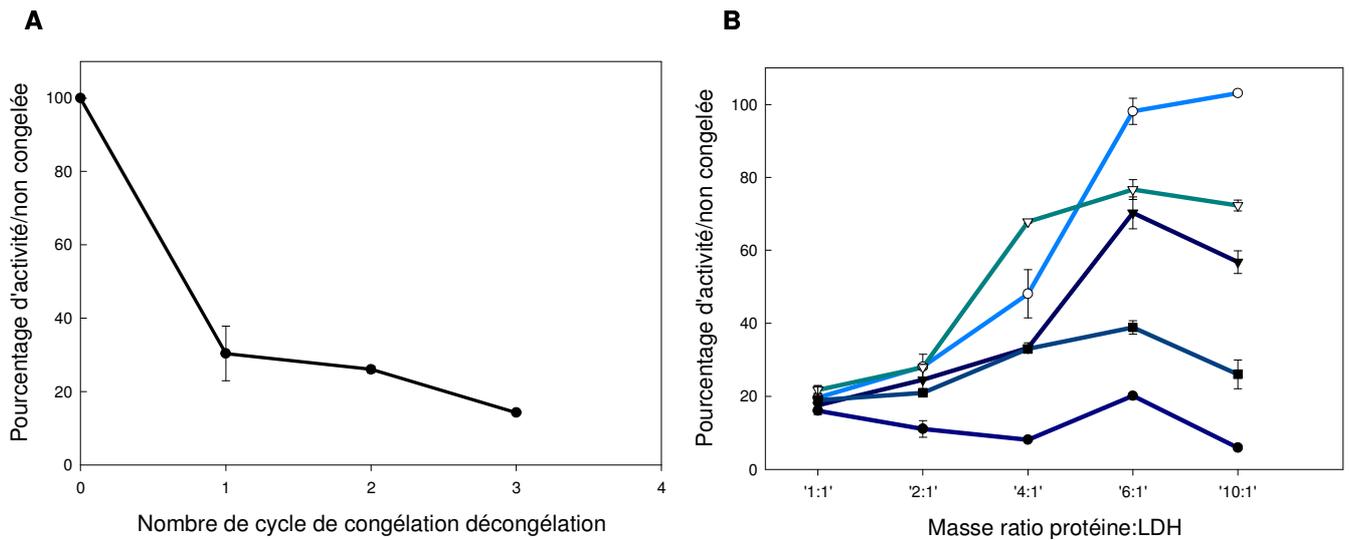


Figure 2.8 : Effet du nombre de cycle de congélation (A) et de l'ajout de protéines après 3 cycles de congélation (B) sur l'activité de la lactate déshydrogénase

En A, mesure de la perte d'activité enzymatique de la LDH provoquée par des cycles de congélation à l'azote liquide, par suivi de la disparition du NADH (mesure de la DO à 340 nm). En B, des quantités croissantes de protéines (PM25, EM6, BSA, lysozyme) sont ajoutées pendant la congélation en masse ratio protéine:LDH 1:1, 2:1, 4:1, 6:1, 10:2. La courbe en présence d'eau représente le témoin sans ajout de protéines. Le pourcentage d'activité après traitement est calculé par rapport aux témoins respectifs sans traitements mais en présence des protéines. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats biologiques. Un test ANOVA est effectué afin de déterminer les niveaux de significativité obtenus, les lettres indiquent les groupes résultants avec $p < 0.05$

2.2.2.1 Effet de PM25 sur la protection de la lactate déshydrogénase pendant la congélation

La lactate déshydrogénase est une enzyme tétramérique qui a la propriété de s'agréger et de perdre son activité lorsqu'elle est congelée (Greiff et Kelly, 1966). Sur le même principe que pour la CS, nous avons testé si PM25 avait des propriétés cryoprotectrices. Dans un premier temps, nous avons testé le nombre de cycles de congélation nécessaire pour diminuer significativement l'activité de l'enzyme. Après 1 cycle consistant en une congélation rapide dans l'azote liquide suivie d'une décongélation à température ambiante pendant 10 minutes, l'activité enzymatique chute à 30 % de la valeur obtenue avant congélation et chute à moins de 20 % après 3 cycles (Figure 2.8 A). Nous avons donc choisi de travailler après 3 cycles de congélation/décongélation. En présence de PM25, aucun effet significatif n'est observé pour un rapport massique de PM25:LDH 1 :1 (Figure 2.8 B). Par contre, plus la quantité de PM25 est augmentée et plus l'activité de la LDH après la congélation est améliorée. Ainsi, dès un rapport massique de 6:1, l'activité est complètement préservée. En ce qui concerne EM6 et BSA, elles sont capables d'offrir une protection partielle mais nettement moins efficace que PM25. En effet, en présence d'un rapport massique de 6 :1 et 10 :1, l'activité résiduelle après congélation atteint un palier aux alentours de 80 % en présence de BSA. De la même façon, l'activité résiduelle après congélation en présence de EM6 se situe aux alentours de 60% pour un rapport massique 10 :1.

2.2.2.2 Effet de PM25 sur la protection de la lactate déshydrogénase pendant le séchage

Tout comme pour la CS, le séchage à 43 % HR diminue très fortement l'activité de la LDH (Figure 2.9 A). En effet après séchage et réhydratation, l'activité n'est plus que de 1 à 1.5 % de l'activité mesurée avant séchage. Lorsque l'enzyme est séchée en présence de PM25 en ratio masse protéine 2 :1, l'activité enzymatique est augmentée de manière significative, mais peu efficacement puisque elle n'atteint que 5 % de l'activité avant traitement. Cet effet protecteur est également observé pour EM6 mais pas pour la BSA ou le lysozyme. Cependant si PM25 est ajoutée en quantité plus élevée (10 :1 ratio massique protéine protectrice : LDH) la préservation de l'activité enzymatique est améliorée puisque elle est de l'ordre de 12 fois supérieure à celle

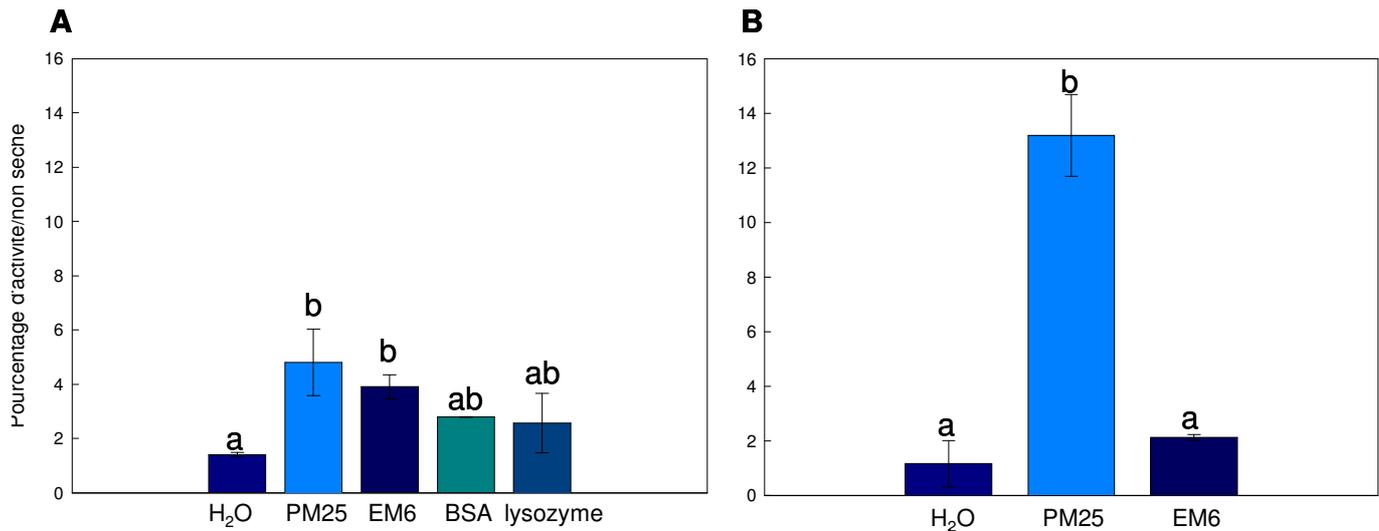


Figure 2.9 : Effet de l'ajout de protéines sur l'activité de la lactate déshydrogénase après séchage

L'enzyme est séchée pendant 4h à 43% d'humidité relative en présence de PM25, EM6, BSA ou de lysozyme en A : masse ratio 2 :1 protéines : LDH et en B : masse ration 10 :1 protéine : LDH. Le pourcentage d'activité après traitement est calculé par rapport aux témoins respectifs sans traitements mais en présence des protéines. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats biologiques. Un test ANOVA est effectué afin de déterminer les niveaux de significativité obtenus, les lettres indiquent les groupes résultants avec $p < 0.05$

dans l'eau (figure 2.9 B). Par ailleurs, cet effet n'est pas retrouvé en présence de EM6 dans les mêmes proportions. Comme pour la CS, l'effet protecteur de PM25 est beaucoup plus limité que pendant la congélation cependant il reste spécifique puisqu'il n'est pas observé en présence de BSA ou de EM6.

2.3 Effet de PM25 sur la prévention de l'agrégation protéique

Une des causes de la perte de l'activité enzymatique après un stress consiste en un phénomène d'agrégation des protéines en solution (Greiff et Kelly, 1966; Srere, 1966; Wu et Yang, 1970). Par ailleurs, (Goyal et al., 2005) insistent sur le fait que les tests de protection effectués sur les enzymes ne sont pas suffisamment instructifs pour comprendre la fonction des protéines LEA. En effet, selon ces auteurs, le principal impact délétère de l'agrégation protéique sur la cellule n'est pas la perte d'activité des protéines en elle-même, mais la toxicité inhérente aux agrégats. C'est pourquoi, nous avons testé si PM25 était capable de prévenir la formation d'agrégats suite à la congélation et au séchage sur un échantillon plus complexe de protéines. Celui-ci consiste en un extrait protéique soluble à l'eau isolé à partir de radicules germées d'une longueur de 5 mm correspondant à un stade sensible à la dessiccation et dans lesquelles PM25 et EM6 ne sont plus présentes (Boudet et al., 2006). Les échantillons ont subi une dialyse contre de l'eau milli-Q afin d'éliminer les ions et sucres solubles qui pourrait interférer dans le phénomène d'agrégation. En effet, les tampons qui permettent l'extraction de ces protéines contiennent beaucoup de sels qui participent à la stabilité des protéines et peuvent interférer sur les mécanismes agrégatifs. Les extraits protéiques sont ensuite congelés ou séchés en présence ou absence de PM25 et l'agrégation engendrée a été étudiée à l'aide de différentes méthodes (mesure de turbidité par spectrophotométrie, diffraction dynamique de la lumière (nanosizer), analyse en gels une dimension SDS-PAGE et par microscopie photonique).

Lorsque des protéines subissent un ou plusieurs cycles de congélation/décongélation elles tendent à former des agrégats qui vont altérer leurs propriétés. La turbidité engendrée par la formation de ces agrégats peut être évaluée au spectrophotomètre par mesure des absorbance à 280 et 340 nm. Nous avons dans un premier temps vérifié que les variations d'absorbance n'étaient pas le reflet de la

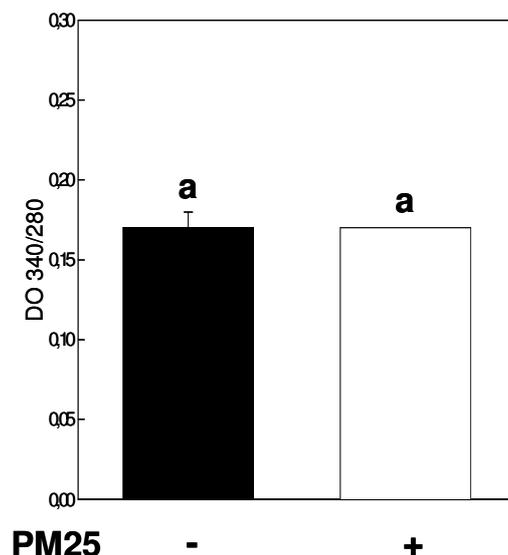


Figure 2.10 : Effet de l'ajout de PM25 sur l'agrégation avant dialyse et congélation

Nous mesurons l'agrégation des protéines par mesure de la DO à 340/280 nm avant dialyse puis nous ajoutons PM25 en proportion 2 :1 en ratio massique PM25 : protéine. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats. Un test ANOVA est effectué afin de déterminer les niveaux de significativité obtenus, les lettres indiquent les groupes résultants avec $p < 0.05$

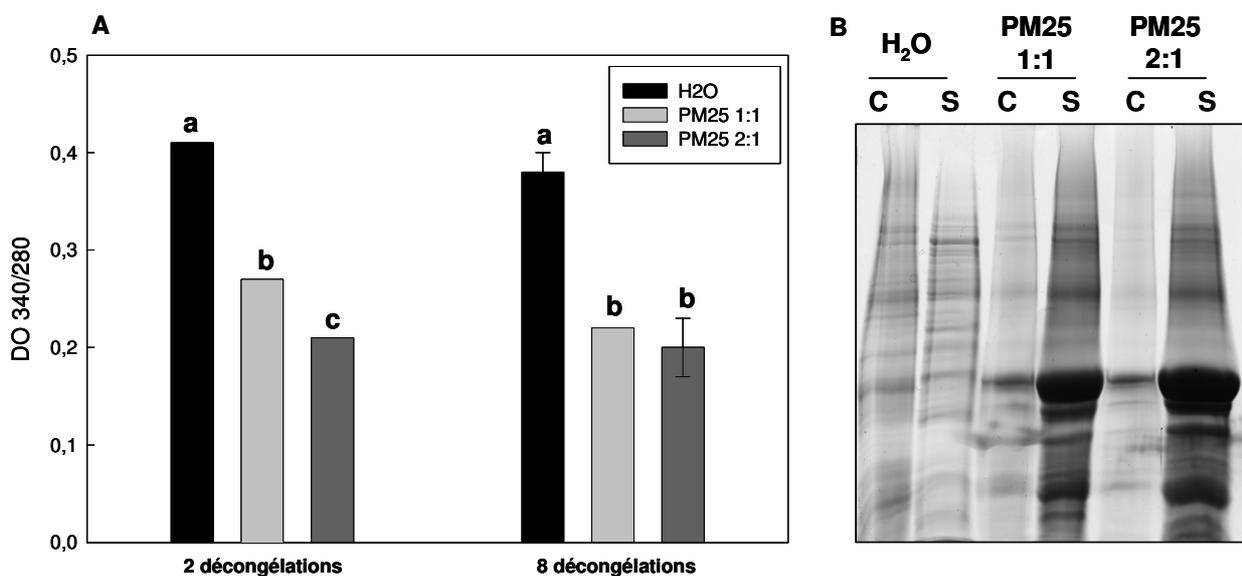


Figure 2.11 : Evolution de l'agrégation de protéines solubles en fonction du nombre de cycles de congélation

L'agrégation de protéines solubles de radicules de *M.truncatula* est suivie après 2 ou 8 cycles de congélation/décongélation en présence ou en l'absence de PM25 rapport massique 1 :1 ou 2 :1 PM25 : protéine soluble. En A, l'agrégation est suivie par mesure de la DO à 340/280. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats. Un test ANOVA est effectué afin de déterminer les niveaux de significativité obtenus, les lettres indiquent les groupes résultants avec $p < 0.05$. En B l'agrégation est suivie sur gel coloré en bleu colloïdale après centrifugation des échantillons et séparation des fractions culot/surnageant.

contribution de PM25 au lieu de la formation/disparition d'agrégats. Pour ce faire, nous avons testé l'effet de l'ajout de PM25 sur l'échantillon protéique avant les stress, c'est-à-dire avant dialyse et congélation. Lorsque PM25 est ajoutée dans un échantillon protéique avant traitement (Figure 2.10) aucune variation du rapport A_{340}/A_{280} n'est observable. Dès lors, nous pouvons conclure que le rapport A_{340}/A_{280} est un reflet de la turbidité de la solution et non de la quantité de PM25.

2.3.1 Effet de PM25 sur l'agrégation engendrée par la congélation

Nous avons voulu tester dans un premier temps si, la multiplication du nombre de cycles de congélation/décongélation engendrait une agrégation de plus en plus importante. Nous avons donc fait subir aux échantillons de protéines solubles de 2 à 8 cycles de congélations/décongélation (Figure 2.11). Après 2 cycles de congélation, le rapport de A_{340}/A_{280} augmente jusque 0,4 (figure 2.11 A). Par contre, après 8 cycles, la valeur est identique à celle obtenue pour 2 cycles, ainsi, le niveau d'agrégation ne semble pas être amplifié avec la multiplication du nombre de cycles de congélation au-delà de 2. Lorsque l'échantillon est congelé en présence de PM25 en rapport massique PM25: protéines solubles 1 : 1 et 2 : 1, les protéines sont préservées de l'agrégation quelque soit le nombre de cycles de congélation. Nous avons également analysé l'agrégation des protéines lors de la congélation, par centrifugation suivie d'une électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel d'acrylamide 1D. Pour cela, nous avons fait migrer les protéines dialysées puis congelées, après centrifugation, et, séparation du culot et du surnageant. Les protéines qui se sont agrégées vont précipiter et se retrouver dans le culot, tandis que les autres seront présentes dans le surnageant (Chakrabortee et al., 2007). Nous avons donc fait migrer sur gel les échantillons ayant subi 8 cycles de congélation, après séparation des protéines agrégées et non agrégées par centrifugation. Nous observons effectivement qu'une partie des protéines se retrouvent dans le culot en absence de PM25 (figure 2.11 B). Par contre, en présence de PM25, la majorité des protéines se retrouvent dans le surnageant et ce pour les deux concentrations de PM25 testées.

Par analogie avec les résultats obtenus dans la littérature, nous pouvons dès à présent émettre l'hypothèse que PM25 pourrait jouer le rôle de chaperon moléculaire en empêchant de manière passive la formation d'agrégats, comme cela a été montré

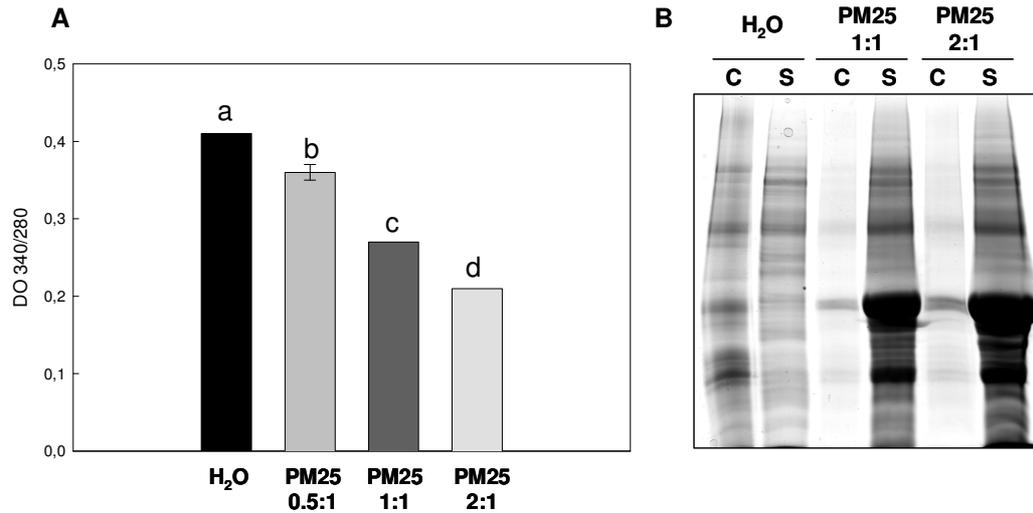


Figure 2.12 : Effet de la quantité de PM25 sur l'agrégation de protéines solubles de *M.truncatula* après congélation à -20°C

En A, l'agrégation des protéines est suivie par mesure de la DO à 340/280 avant ou après ajout de quantités croissantes de PM25 après congélation en rapport massique PM25 : protéines solubles. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats. Un test ANOVA est effectué afin de déterminer les niveaux de significativité obtenus, les lettres indiquent les groupes résultants avec $p < 0.05$. En B, les échantillons protéiques sont centrifugés puis le culot : C et le surnageant : S sont déposés sur gel à volume constant. PM25 est ajoutée après congélation en rapport massique 1 : 1 et 2 : 1 PM25 : protéines solubles. La révélation est faite au bleu colloïdal.

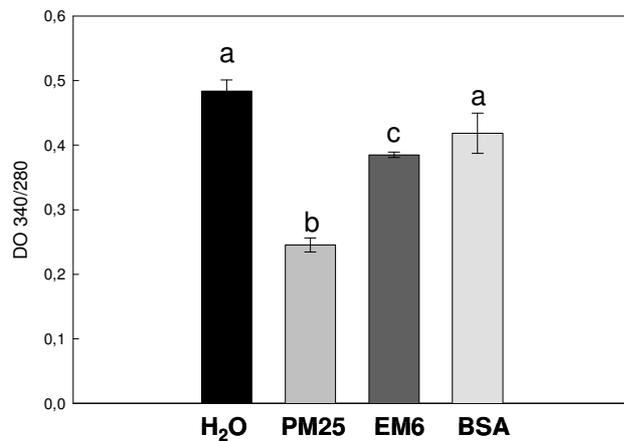


Figure 2.13: Effet de l'ajout de différentes protéines purifiées sur l'agrégation de protéines solubles de *M.truncatula*

PM25, EM6, et BSA sont ajoutées en rapport massique 2 : 1 PM25 : protéines solubles après congélation. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats. Un test ANOVA est effectué afin de déterminer les niveaux de significativité obtenus, les lettres indiquent les groupes résultants avec $p < 0.05$

pour d'autres protéines LEA. (Chakrabortee et al., 2007; Kovacs et al., 2008b). Nous nous sommes donc attaché dans un second temps à mettre en évidence un effet de PM25 sur la dissolution des agrégats.

2.4 Effet de PM25 sur la dissolution des agrégats

Nous avons voulu savoir si l'analogie fonctionnelle que l'on peut faire avec les protéines HSP pouvait être étendue aux propriétés de ces dernières à replier des protéines mal repliées en dissolvant rapidement les agrégats formés par différents stress. Nous avons testé cette possibilité en examinant si l'ajout de PM25 après congélation ou séchage permettait d'éliminer les agrégats formés dans les extraits protéiques de radicules de 5 mm.

2.4.1 Effet de PM25 sur la dissolution des agrégats après congélation

En absence de PM25, après 2 cycles de congélation, le rapport A_{340}/A_{280} atteint 0,4. Lorsque PM25 est ajoutée en concentration croissante après que l'échantillon ait été décongelé, un effet de dissolution des agrégats est observé, de plus cet effet apparaît dose dépendant. En effet, plus la quantité de PM25 ajoutée après congélation/décongélation, plus la diminution du rapport A_{340}/A_{280} reflétant la diminution de l'agrégation est importante (figure 2.12 A). Il est de 0.37 en présence de PM25 0.5:1 rapport massique PM25 : protéine soluble, 0.28 pour un rapport de 1 :1 et atteint 0.2 soit pratiquement le niveau avant congélation pour un rapport de 2 :1. Par ailleurs si nous faisons migrer sur gel 1D SDS-PAGE les échantillons 1 :1 et 2 :1 (Figure 2.12 B), nous confirmons l'effet de dissolution des agrégats puisque, sans PM25 les protéines sont majoritairement dans le culot, tandis que en présence de PM25 elles sont majoritairement dans le surnageant.

Nous avons ensuite déterminé si cet effet était spécifique de PM25. Pour cela nous avons répété les expériences dans les mêmes conditions mais en présence de EM6 et de BSA en proportion 2:1. EM6 semble également capable de diminuer l'agrégation protéique (Figure 2.13) mais moins efficacement que PM25 puisque la DO passe de 0.5 dans le témoin à 0.4 en présence de EM6, tandis qu'elle est

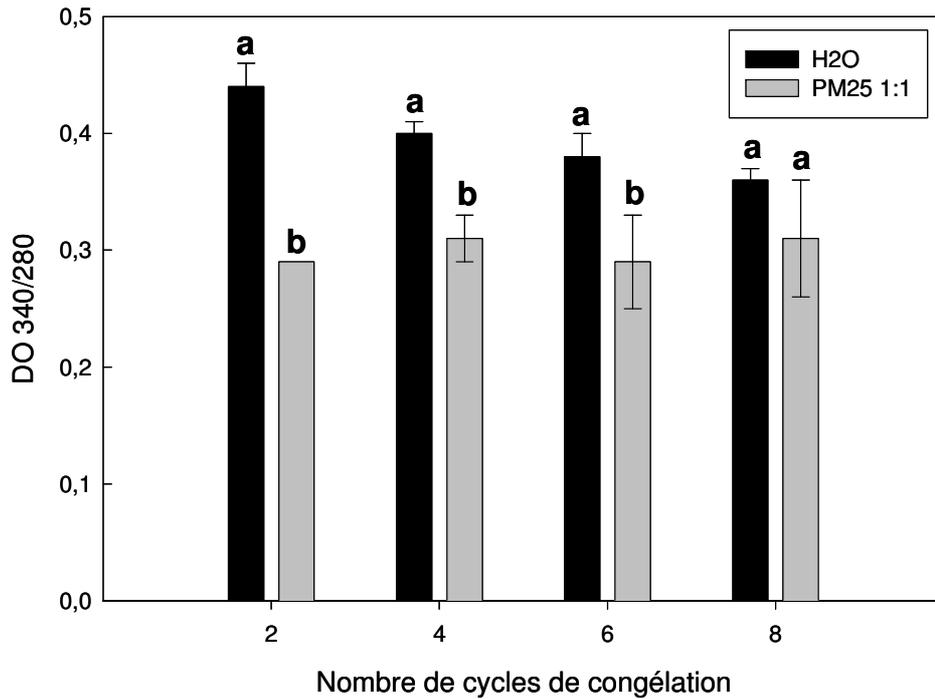


Figure 2.14 : Evolution de l'agrégation en fonction du nombre de cycles de congélation

L'agrégation de protéines solubles de radicules de *M.truncatula* est suivie après 2 à 8 cycles de congélation/décongélation puis PM25 est ajouté en rapport massique 1:1 PM25 : protéine soluble. L'agrégation est suivie par mesure de la DO à 340/280. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats. Un test ANOVA est effectué afin de déterminer les niveaux de significativité obtenus, les lettres indiquent les groupes résultants avec $p < 0.05$.

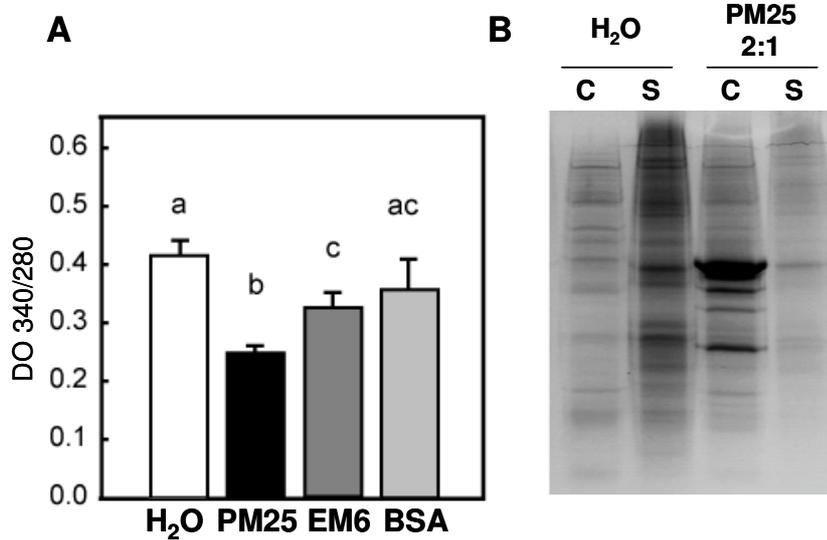


Figure 2.15 : Evolution de l'agrégation de protéines solubles en fonction du séchage

L'agrégation de protéines solubles de radicules de *M.truncatula* est suivie après séchage. PM25, EM6, BSA sont ajoutés pendant le séchage en rapport massique protéine : protéines solubles 2:1. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats. Un test ANOVA est effectué afin de déterminer les niveaux de significativité obtenus, les lettres indiquent les groupes résultants avec $p < 0.05$.

d'environ 0.25 en présence de PM25. Lorsque la BSA est ajouté aucun effet n'est observé. PM25 est efficace pour dissoudre les agrégats, et ce de manière plus efficace que EM6.

2.4.2 Effet de PM25 sur la dissolution d'agrégats après des cycles de congélation multiples

Bien que nous n'ayons pas observé d'augmentation de la DO en multipliant le nombre de cycles de congélations/décongélations, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la multiplication de ces cycles pourrait engendrer une modification dans la stabilité des agrégats. Nous avons donc testées si l'effet de dissolution des agrégats observé pour 2 cycles de congélation allait être effectif sur des échantillons ayant subi un plus grand nombre de cycles. Nous avons donc ajouté PM25 pour un rapport massique de 1:1 PM25 : protéines solubles (gamme de proportion pour laquelle la protéine est efficace) et suivi l'évolution du rapport A_{340}/A_{280} suite à cette ajout. Ainsi, nous constatons que jusqu'à 6 cycles de congélation PM25 ajoutée après les stress est efficace pour défaire les agrégats (figure 2.14). Par contre, après 8 cycles il n'y a plus de différences entre le niveau d'agrégation observé avant ou après ajout de PM25, ce qui pourrait suggérer que les agrégats formés deviennent de plus en plus stable et que PM25 soient inefficaces sur ce type d'agrégats.

2.4.3 Effet de PM25 sur l'agrégation engendrée par le séchage

L'étude de (Chakrabortee et al., 2007) ayant montré un effet protecteur de AavLEA1 lors du séchage, et notre thématique s'inscrivant dans la résistance à la dessiccation, nous avons testé si PM25 était capable de défaire des agrégats formés pendant le séchage lorsque la protéine est ajoutée après réhydratation. En l'absence de PM25, l'extrait protéique séché et réhydraté présente une turbidité importante. De la même façon que pour la congélation, l'ajout de PM25 après réhydratation induit une importante réduction du rapport A_{340}/A_{280} , indiquant que PM25 a dissous les agrégats formés (Figure 2.15). Un effet est également observé pour EM6 cependant, il reste significativement inférieur à celui obtenu pour PM25. Aucun effet significatif n'est obtenu après ajout de la BSA. Les résultats obtenus après séchage sont en concordance avec ceux obtenus après congélation.

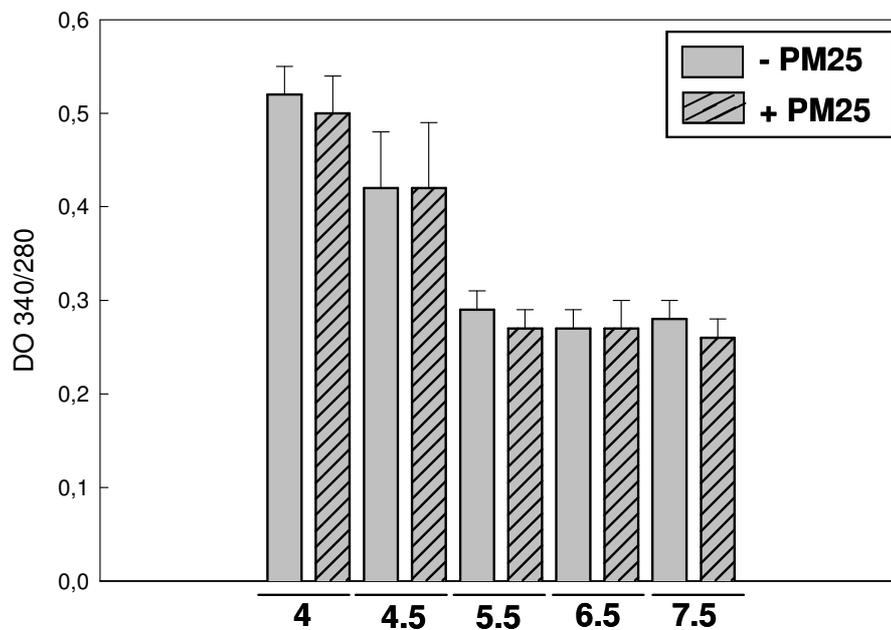


Figure 2.16 : Evolution de l'agrégation en fonction du pH

L'agrégation de protéines solubles de racicules de *M.truncatula* est suivie à différents pH en tampon citrate en présence ou en l'absence de PM25 rapport massique 2:1 PM25 : protéine soluble. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats. Un test ANOVA est effectué afin de déterminer les niveaux de significativité obtenus, mais aucune différence significative entre les échantillons en présence ou en absence de PM25 n'est obtenue.

2.4.4 Effet de PM25 sur l'agrégation engendrée par une dialyse à différents pH : mesure spectrophotométrique

PM25 étant une protéine chargée, nous avons ensuite cherché à déterminer si les effets observés lors de la congélation pouvaient être dépendant du pH. En effet, la modification du pH peut entraîner des modifications des propriétés de certaines protéines en modifiant les charges électrostatiques, les liaisons hydrogène, la solvataion. Ces modifications pouvant entraîner des changements de conformation pouvant conduire à l'agrégation des protéines (Harrison, 2004). Nous avons donc dialysé des échantillons de protéines solubles de radicules de *M.truncatula* à différents pH dans du tampon citrate et observé si l'agrégation engendrée à pH acide pouvait être reversée par l'ajout de PM25. En dessous d'un pH de dialyse de 5.5 les protéines s'agrègent fortement comme le révèle la mesure de la DO à 340/280 nm (Fig. 2.16). Il est intéressant de noter que cette agrégation est déjà visible à l'œil nu puisque par rapport aux pH plus élevés où les échantillons gardent leur aspect translucide, dans le cas de dialyse en dessous de pH 5.5 les échantillons prennent un aspect laiteux. Lorsque PM25 est ajoutée aucune évolution de la DO n'est observée pour les pH acides. Il semblerait donc que PM25 n'est pas d'effet sur les agrégats formés ici. Cependant, le mode agrégatif mis en jeu est probablement très différent de celui mis en jeu lors de la congélation. En effet après congélation les échantillons ne prennent pas un aspect laiteux mais juste plus trouble avec des particules qui apparaissent visible en suspension. Il est donc probable que PM25 ne soit capable d'avoir une action que sur un certain type d'agrégats ce qui corrobore bien les résultats obtenus avec les modèles enzymatiques, puisque nous avons observé une meilleure efficacité de PM25 sur la protection de la LDH par rapport à la CS.

2.4.5 Effet de PM25 sur la protection de la citrate synthase après le chauffage

Ayant identifié l'aptitude tout à fait particulière de PM25 à pouvoir défaire les agrégats et, sachant que les pertes d'activité des enzymes testées précédemment (CS et LDH) était lié à l'agrégation de ces protéines, nous avons testé si PM25 allait pouvoir restaurer l'activité de ces enzymes si elle était ajoutée après traitement.

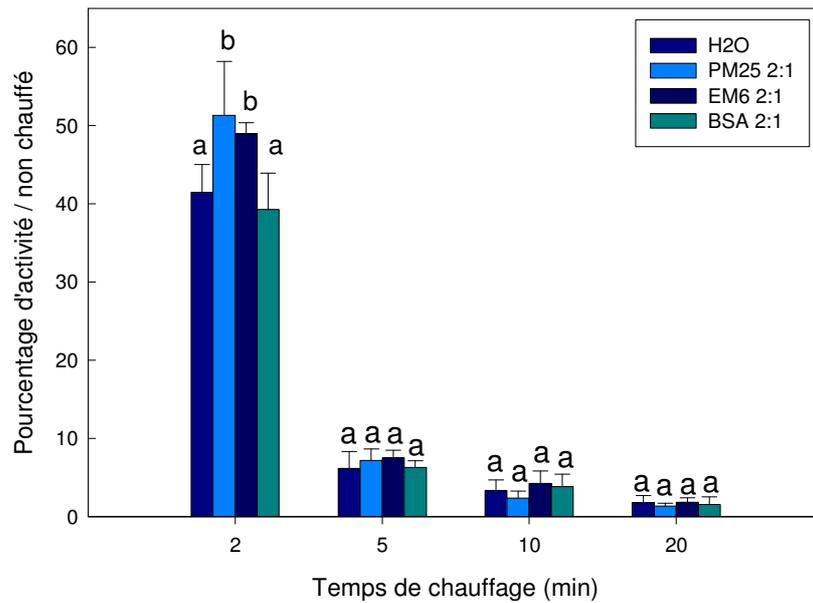


Figure 2.17 : Pourcentage d'activité de la citrate synthase puis ajout de protéines après le chauffage

L'enzyme est chauffée seule pendant différents temps, puis après mise sur la glace PM25, EM6 ou BSA 2:1 en masse ratio protéine:CS sont ajoutées. Les pourcentages d'activités sont calculés par rapport aux témoins non chauffés respectifs. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats. Un test ANOVA est effectué afin de déterminer les niveaux de significativité obtenus, les lettres indiquent les groupes résultants avec $p < 0.05$.

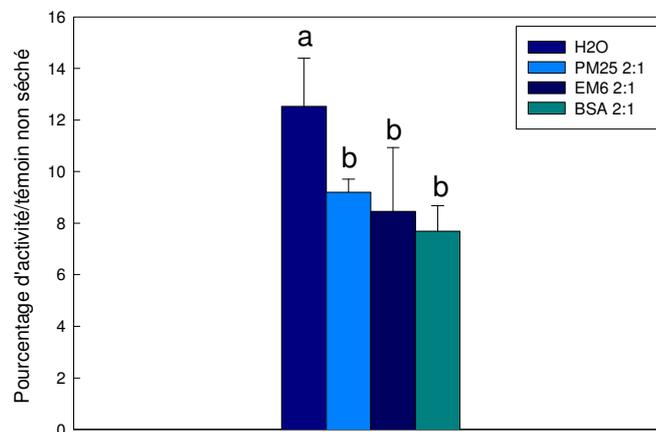


Figure 2.18: Activité enzymatique de la citrate synthase après séchage puis ajout de PM25 pendant la réhydratation

L'enzyme est séchée pendant 5h à 75% d'humidité relative puis PM25, EM6 et BSA sont ajoutées en masse ratio 2:1 pendant la réhydratation. L'évolution du pourcentage de l'activité enzymatique est mesurée par rapport aux témoins non séchés respectifs. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats. Un test ANOVA est effectué afin de déterminer les niveaux de significativité obtenus, les lettres indiquent les groupes résultants avec $p < 0.05$.

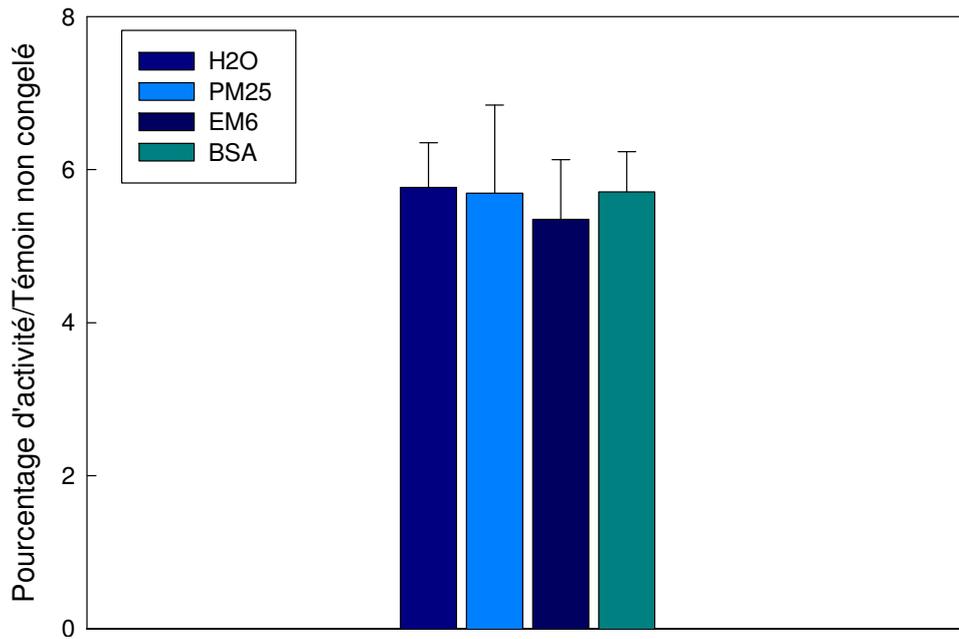


Figure 2.19 : Effet de l'ajout de protéines sur l'activité de la lactate déshydrogénase après 3 cycles de congélation.

L'enzyme est congelé dans l'azote liquide, après congélation PM25 EM6 ou BSA sont ajoutés en masse ration protéine : CS 2 :1. Le pourcentage d'activité après traitement est calculé par rapport aux témoins respectifs sans traitements mais en présence des protéines. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type calculé pour 3 réplicats. Un test ANOVA est effectué indiquant que les résultats ne présentent aucune différence significative.

L'enzyme est donc chauffée dans le tampon en absence de PM25 puis une fois le temps de chauffage écoulé la solution est mise sur glace, la protéine est ajoutée, et l'activité est mesurée. Lorsque PM25 en masse ratio 2 :1 protéine : CS est ajoutée après le chauffage, la restauration de l'activité est plus faible que lors d'un ajout avant le traitement thermique (Fig.2.17). L'activité observée à 2 minutes en présence de la protéine est de 50 %, alors que lorsque la protéine est ajoutée avant, elle est de 60 %. A 5 minutes aucune amélioration significative n'est plus observée par rapport au témoin tandis que lorsque la protéine était ajoutée avant, un effet était encore observé même si celui-ci était faible (autour de 15 %) au même temps. En ce qui concerne EM6, la même préservation de l'activité enzymatique que pour PM25 est obtenue. Il n'y a donc pas d'effet spécifique de PM25. En présence de BSA aucun effet n'est observé.

Nous avons également testé les effets de l'ajout de la protéine lors de la réhydratation après séchage. Il apparaît clairement que lorsque la protéine est ajoutée suite au séchage, dans le tampon de réhydratation, il n'y a aucune préservation de l'activité enzymatique observable et ce pour toutes les protéines testées (Figure 2.18). Ainsi, si PM25 est capable d'avoir une action protectrice sur la CS après le chauffage, aucune action spécifique n'a pu être mise en évidence après le séchage. Les mécanismes mis en jeu dans la perte d'activité lors du séchage et lors du chauffage sont probablement différents. Et l'action protectrice de PM25 pourrait être plus spécifique d'un type.

2.4.6 Effet de PM25 sur la protection de la lactate déshydrogénase après la congélation

De la même façon que pour la CS, nous avons cherché à vérifier les effets d'un ajout de PM25 consécutivement au stress (figure 2.19). Lorsque PM25 est ajoutée après la congélation de la lactate déshydrogénase nous n'observons aucune restauration de l'activité enzymatique de même que pour les autres protéines testées. Si PM25 est capable de stabiliser la lactate déshydrogénase lors de la congélation, elle n'est pas capable de restaurer sa fonction a posteriori.

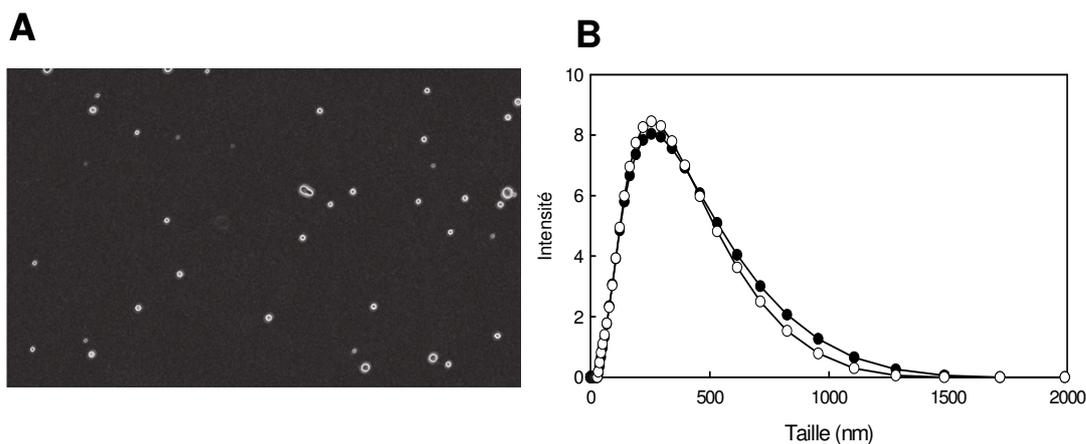


Figure 2.20 : Observation en microscopie optique et mesure au nanosizer de l'agrégation d'échantillon en présence ou absence de PM25 avant congélation

En A, observation de l'échantillon de protéines solubles de *M.truncatula* avant dialyse. En B, mesure de l'agrégation en nanosizer de l'échantillon, en l'absence de PM25 (symbole fermé), ou en présence de la protéine (Symbole ouvert).

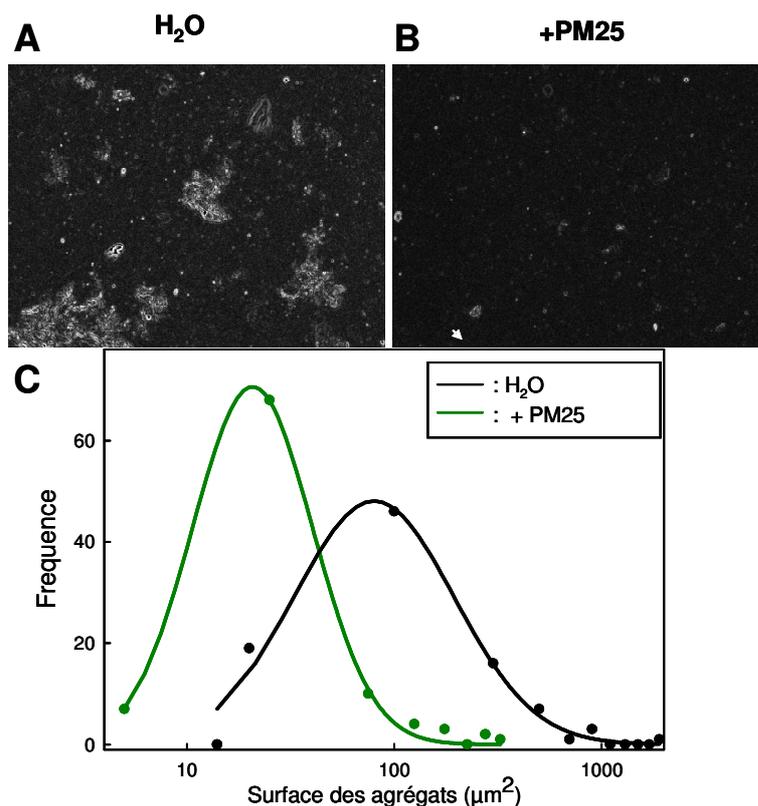


Figure 2.21 : Observation en microscopie optique des échantillons congelés en absence (en A) ou en présence de PM25. En C, mesure de taille des agrégats observés.

En A et B : Observation microscopique en grossissement x 63 d'agrégats protéiques en solution après congélation à -20°C pendant 1h, en A sans PM25, en B avec PM25. En C : Répartition en taille selon la surface des agrégats en présence ou pas de MtPM25 sur 26 clichés de microscopie pour chaque traitement.

2.5 Mesure et visualisation des agrégats

La morphologie des agrégats dépend de la séquence en acides aminés et de leur environnement, ce qui va entraîner une variation de leur potentialité à entraîner des dysfonctionnements au sein de la cellule (Bucciantini et al., 2002; Nigen et al., 2007; Weijers et al., 2008). C'est pourquoi, nous avons vérifié la morphologie des agrégats formés avant et après congélation au moyen de la microscopie photonique et en mesurant la distribution de leur taille par diffusion dynamique de la lumière (DLS). La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une méthode efficace pour déterminer la vitesse de diffusion des protéines et nanoparticules en solution et fournir une mesure précise de la taille hydrodynamique et de la distribution granulométrique. Se basant sur ce principe, le nanosizer (Malvern instrument) permet de déterminer pour la population de particules un indice de polydispersité du diamètre qui reflète la distribution des diamètres plus ou moins resserrée autour de la valeur moyenne.

Les images obtenues en microscopie montrent qu'avant congélation l'extrait protéique dialysé présente de nombreuses petites structures sphériques qui ont été identifiées comme des coacervats (D. Renard, INRA Nantes, communication personnelle (Figure 2.20 A)). Ces structures sont le résultat d'une séparation de phase liquide-liquide de protéines chargées donnant naissance à une phase concentrée très dense en protéines entourée d'une phase très diluée (Nigen et al., 2007). Les mesures de DLS montrent qu'à 25°C, le diamètre moyen des coacervats est d'environ 250 nm. L'ajout de PM25 ne montre pas d'effet significatif sur la distribution de ces diamètres (Figure.2.20 B). En revanche la congélation a un effet très marqué. En l'absence de PM25, la solution décongelée présente des agrégats amorphes de grandes tailles et non plus des coacervats. La présence de ces agrégats est d'ailleurs telle que les capacités du Nanosizer sont dépassées. Leur taille n'ont pas donc pu être mesurée par DLS. Grâce à l'observation effectuée en parallèle en microscopie photonique nous avons pu pallier à ce problème. Comme nous pouvons l'observer sur la figure 2.21 A, la diminution de la taille et du nombre des agrégats apparaît assez remarquable lorsque PM25 est ajoutée (Figure 2.21 B). Au moyen du logiciel Image J nous avons évalué la taille et le nombre de ces agrégats. Ainsi, il apparaît effectivement que lorsque l'on ajoute PM25, une diminution nette de la taille moyenne de la population d'agrégats est provoquée (Figure 2.21 C).

DISCUSSION

Les données de CD confirment celles obtenues précédemment par F.Hoesktra par mesure spectroscopique FTIR montrant que PM25 est capable d'induire une conformation plus compacte de l'ADN en solution. L'isotherme de sorption de PM25 (Figure 9) pourrait expliquer cette observation. En effet, PM25 à l'état désordonné est capable de retenir un nombre important de molécules d'eau. Nous pouvons donc supposer que PM25 pourrait modifier l'organisation du réseau de molécules d'eau qui entourent les molécules d'ADN. La conformation de celui-ci étant sensible à l'environnement hydrique, cette réorganisation entraînerait un changement de conformation vers une forme plus compacte. Cependant, ces changements peuvent également être obtenus en présence de BSA. Dès lors, il reste à évaluer si PM25 va pouvoir spécifiquement influencer la structure de l'ADN *in vivo*. Par ailleurs, PM25 apparaît inefficace pour protéger *E coli* lors de stress UV ou après dessiccation. De plus en absence de stress, sa surexpression à de fortes concentrations dans la bactérie semble délétère à sa croissance (Figure 2.3). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par (Campos et al., 2006). En effet, ces auteurs ont pu également observés des symptômes de toxicité importants lorsque les protéines LEA, ERD10 et LEA4-D113 étaient surexprimées chez *E coli*. Cette toxicité a également été retrouvée pour LEAM, une protéine LEA du groupe 3 spécifiquement associée aux mitochondries de graines de pois. (D.Tolleter, communication personnelle). Cette capacité antimicrobienne de PM25 reste encore à élucider. Elle pourrait être due à la présence de régions chargées de la protéine comme cela a été montré dans l'étude mené par (Campos et al., 2006). Ces auteurs mettent également en avant le caractère amphiphile de ERD10, caractéristique retrouvée pour des peptide possédant une activité anti-microbienne (Powers et Hancock, 2003), et également présente chez PM25 comme nous avons pu le démontrer dans la partie 1.

Les données obtenues *in vitro* suggèrent que l'action protectrice de PM25 pourrait plutôt se situer au niveau des protéines. PM25 exerçant un effet délétère sur les membranes. Dans ce travail, nous avons démontré, la capacité de PM25 à stabiliser des modèles enzymatiques ainsi qu'un ensemble complexe de protéines solubles après congélation ou séchage. Les résultats obtenus sont globalement en

accord avec ceux trouvés pour d'autres protéines LEA des groupes 1 (Gillet et al., 2007), 2 (Kovacs et al., 2008b; NAKAYAMA et al., 2008; REYES et al., 2008), 3 (Goyal et al., 2005; Chakrabortee et al., 2007). Il est également intéressant de rapprocher nos données montrant que PM25 est capable de protéger complètement l'activité de la LDH lors de la congélation avec celles obtenues pour la protéine LjDP1 Lea5, une protéine LEA du groupe 4 (Haaning et al., 2008). Tout comme PM25, LjDP1 présente également une hydrophobicité plus importante que les LEA des groupes 1, 2 et 3 ainsi qu'une proportion significative de feuillet β . Nous avons également pu mettre en évidence un effet stabilisateur transitoire de PM25 sur l'inactivation thermique de la CS, PM25 retardant la perte d'activité de la CS au cours du chauffage. Un retard de perte d'activité avait également été observé en présence de concentrations élevées en glycérol sur le même modèle expérimental (Mishra et al., 2005). Ces auteurs ont montré que le glycérol était nécessaire pendant les étapes précoces du repliement de la CS. Une fois les agrégats formés, le glycérol n'est plus capable de replier l'enzyme chauffée vers son état natif. Dès lors, nous pouvons nous demander si PM25 pourrait avoir un rôle protecteur très tôt pendant le dépliement de la protéine provoqué par le chauffage. La comparaison de nos données avec celles de la littérature suggère que PM25 interviendrait surtout pour prévenir l'agrégation protéique au cours de stress. Or, la prévention de l'agrégation des protéines est cruciale pour la préservation des fonctions biologiques (Ben-Zvi et Goloubinoff, 2001; Bucciantini et al., 2002). Comme il a été souligné par (Chakrabortee et al., 2007) et plus indirectement par (SREEDHAR et al., 2002), la prévention *in vivo* de l'agrégation protéique au cours du séchage est probablement une des clés de la tolérance à la dessiccation chez les graines.

Il est intéressant de noter que PM25 apparaît comme ayant un rôle spécifique de fonction anti-agrégative puisque les effets obtenus pour une autre protéine LEA : EM6 sont moindres que pour PM25 et rarement différents de ceux obtenus en présence de BSA ou de lysozyme. De plus nous avons montré que si PM25 est capable de prévenir la formation d'agrégats elle est également capable de les dissoudre après le stress. Cette action pourrait être assimilée à un processus de réparation des protéines. PM25 étant probablement une protéine nucléaire, elle pourrait être essentielle pour empêcher la formation d'agrégats au cours de la réhydratation qui pourrait

compromettre l'activité nucléaire durant la reprise du métabolisme au cours de l'imbibition.

Les fonctions anti-agrégatives des protéines LEA peuvent être expliqués par deux mécanismes moléculaires, un mécanisme dit de protéine chaperonne (Kovacs et al., 2008a) et un mécanisme dit de bouclier moléculaire (Tunnacliffe et Wise, 2007). Récemment, (Kovacs et al., 2008a) ont suggéré que cette distinction n'avait pas vraiment lieu d'exister. Nos résultats supportent cette affirmation puisqu'ils peuvent satisfaire aux deux modèles. L'activité chaperonne peut être expliquée par la nature amphiphile et désordonnée de PM25, qui permet à la fois de faciliter ou d'induire des interactions transitoires avec les surfaces hydrophobes des protéines impliquées dans un processus d'agrégation, comme suggéré par (Haaning et al., 2008) et par (Mishra et al., 2005). Comme pour un système classique de protéine chaperonne tels que les HSP (Ben-Zvi et Goloubinoff, 2001), PM25 pourrait dissocier les agrégats de grandes tailles après un stress permettant l'action d'autres systèmes enzymatiques de chaperonnes moléculaires. Le modèle d'une activité chaperonne ne requérant pas d'ATP est un système intéressant pendant la réhydratation puisque l'ATP est absent dans les graines sèches et ne sera que progressivement synthétisé au cours de l'imbibition (Leprince et al., 2000). Cependant, l'action protectrice offerte par PM25 au niveau du protéome soluble ne met pas en évidence d'action spécifique de la protéine sur une cible particulière, ce qui va contre l'idée que le terme de chaperonne ne soit utilisée que pour une interaction spécifique entre certaines protéines ainsi que l'argumentent (Kovacs et al., 2008a). Par ailleurs le modèle de bouclier moléculaire dérive des connaissances sur la stabilisation des polymères dans des solutions de colloïdes (Tunnacliffe et Wise, 2007). Selon ce modèle, PM25 pourrait entourer de façon non spécifique les protéines natives durant le stress et via un effet d'encombrement stérique prévenir l'agrégation. Cependant ce type de mécanisme ne peut pas expliquer comment PM25 est capable de dissoudre efficacement les agrégats après le stress. Le phénomène de floculation par déplétion est un autre facteur affectant la stabilité des colloïdes en suspension (Dickinson, 2003; Radford et Dickinson, 2004). La floculation correspond à des phénomènes physico-chimiques menant à l'agrégation de particules stabilisées pour former des flocons ou « flocs ». Ce phénomène est réversible au sens que les agrégats peuvent disparaître par forte agitation par exemple. Nous pouvons imaginer dans notre modèle le scénario suivant

lors du séchage de l'extrait protéique. Quand les coacervats colloïdaux se rapprochent suite au retrait de l'eau, le solvant présent entre les particules tend à diffuser sous l'influence d'un gradient de pression osmotique local, ce qui va provoquer la transformation des coacervats en agrégats stables appelé floculation par déplétion (Dickinson, 2003; Radford et Dickinson, 2004; Nigen et al., 2007). PM25 pourrait déstabiliser les agrégats en interférant sur la distribution de l'eau autour des parties hydrophiles et hydrophobes des protéines. Cette hypothèse est étayée par les capacités de rétention d'eau observées dans l'isotherme de sorption (Figure 9). Elle est également discutée par (Mishra et al., 2005) pour expliquer les effets du glycérol et du sorbitol sur le repliement de la CS. Cependant, il reste encore à déterminer dans quelle mesure cette hypothèse est valide au sein du noyau de la cellule.

*Partie 3: Analyses
physiologiques de mutants
d'insertion tnt 1 de M.truncatula
pour le gène PM25*

INTRODUCTION

Les travaux présentés dans les précédents chapitres nous ont permis de montrer que PM25 était une protéine LEA nucléaire dont la fonction est en lien avec la protection des protéines contre la congélation et la dessiccation. Cependant ces données se focalisent sur une caractérisation biochimique *in vitro*, il était donc nécessaire de valider et de compléter les résultats obtenus par une approche de génétique inverse *in planta*. La stratégie adoptée a été d'étudier l'impact de l'absence de PM25 sur la biologie de la graine de *M. truncatula*. Nous avons ainsi choisi de décrire des mutants d'insertion *Tnt1* issus de la collection de la Samuel Noble Foundation (<http://www.noble.org/>). Dans le cadre d'une collaboration entre notre laboratoire et le groupe « Plant Biology division, Dr. M Udvardi », le Dr. A Andriankaja nous a informé de l'existence d'individus présentant des insertions dans le gène codant pour PM25 et a mis leurs graines à notre disposition.

Si PM25 joue un rôle fondamental dans la protection des protéines contre les stress tel qu'il a été décrit pour d'autres protéines LEA (Goyal et al., 2005; Chakrabortee et al., 2007; Tunnacliffe et Wise, 2007), nous pouvons nous demander si elle ne constituerait pas un facteur important pour la qualité physiologique des graines. Celle-ci se définit comme l'ensemble des attributs permettant à la graine de germer de manière rapide et homogène afin de produire des jeunes plants vigoureux quelles que soient les conditions du milieu. Dans un premier temps, nous avons précisé si la survie à l'état sec était altérée dans les graines mutantes. Pour ce faire, nous avons testé l'impact de la mutation sur la tolérance à la dessiccation, lors d'un vieillissement accéléré et pendant la post-maturation à sec. Nous nous sommes également intéressés à l'influence de PM25 sur la composition de la graine et notamment sur les teneurs en sucres solubles, indispensables pour la survie à l'état sec et sur la teneur en protéines de réserve, indispensables pour la croissance post-germinative. Par la suite, nous avons déterminé si les graines mutantes présentaient une germination altérée face aux stress hydriques et salins.

Enfin, nous avons identifié dans les banques génomiques de *M. truncatula* des TC (Tentative Consensus) homologues de *PM25* qui sont surexprimés pendant les phases tardives de la maturation (Benedito et al., 2008) et pendant la réinduction de la tolérance à la dessiccation des graines germées (Buitink et al., 2006). Nous nous sommes posés la question de savoir s'ils pouvaient compenser l'extinction de *PM25* dans les mutants *Tnt1* en analysant leur expression respective dans les différentes conditions physiologiques énoncées ci-dessus.

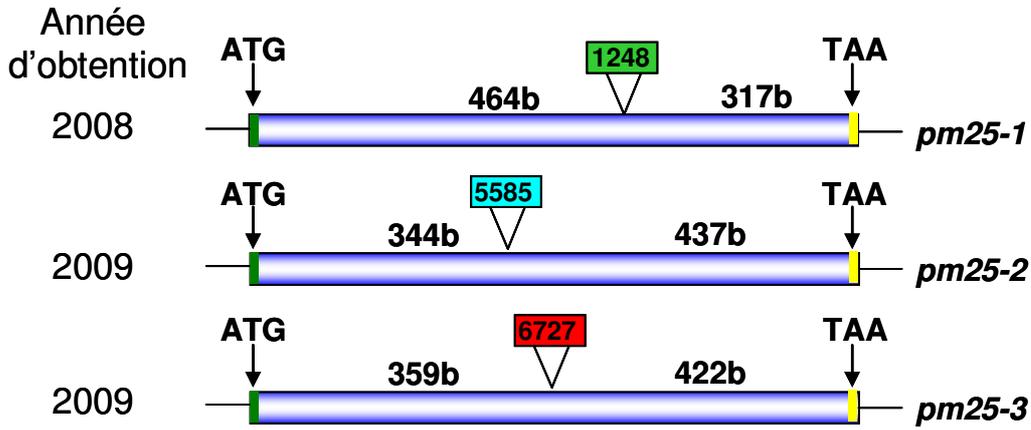


Figure 3.1: Représentation schématique de l'insertion *Tnt1* au sein des différents mutants *pm25*

A gauche sont indiqués l'année d'obtention des graines et à droite les numéros d'allèles adoptés pour chacune des insertions. Les barres vertes et jaunes indiquent respectivement les sites d'initiation de la traduction (ATG) et de fin de traduction (TAA). Les sites d'insertion des transposons de *Nicotiana tabacum* (*Tnt1*) sont représentés pour chacun de mutants par les rectangles verts, rouges et bleus avec les numéros de lignée.

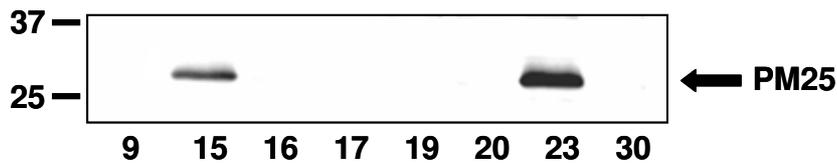


Figure 3.2: Identification des mutants *pm25* homozygotes par western blot

Les extraits protéiques solubles sont issus de demi-cotylédons de graines de *M.truncatula* imbibées 3h. PM25 est révélée par un anti-corps spécifique (Boudet et al., 2006). Les numéros représentent les individus testés pour le mutant *pm25-1*.

RESULTATS

3.1 Vérification des mutations et sélection de lignées homozygotes

Les mutants d'insertion *Tnt1* ont été obtenus par la Samuel Noble Foundation Inc, (Oklahoma, USA) grâce à un crible sur une population de 5000 individus. Ces mutants obtenus sur le génotype R108 présentent une insertion d'un rétrotransposon *Tnt1* de *Nicotiana tabacum* d'une longueur de 5,3 kb. L'insertion est stable et le nombre d'insertions surnuméraires varient entre 4 et 40. Celles-ci peuvent facilement être éliminées par rétrocroisement (Ratet et al., 2006). Nous avons travaillé sur des graines issues de 3 mutants alléliques. En mai 2008, nous avons reçu la lignée NF1248 suite à un premier crible puis ensuite, en mai 2009 deux lignées additionnelles NF5585 et NF6727. Les allèles ont été numérotées de 1 à 3 comme indiqué figure 3.1 Les études les plus approfondies ont été menées sur l'allèle *pm25-1*.

Après réception des graines fournies par la Noble Foundation, il a été nécessaire de vérifier si l'insertion *Tnt1* était correctement localisée, et si elle suffisait à supprimer l'expression du gène. Pour cela, deux méthodes ont été employées. Dans un premier temps, nous avons sélectionné les graines pour lesquelles PM25 n'était plus présente. Nous avons donc réalisé un western blot au moyen de l'anticorps dirigé contre PM25 sur des extraits protéiques issus d'un demi cotylédon de graine imbibée 3 heures, le reste de la graine étant mis directement à germer. Dans la Figure 3.2 nous présentons les résultats obtenus pour *pm25-1*, 6 graines sur 8 sont déficientes en PM25 (phénotype Pm25⁻, les graines qui expriment toujours PM25 seront annotées Pm25⁺). La même démarche a été utilisée pour les mutants *pm25-2* et *pm25-3*, 12 graines déficientes ont été identifiées sur 20 testées pour le premier et 4 sur 10 pour le deuxième (données non montrées). Afin de vérifier que l'absence de PM25 était bien liée à l'insertion de *Tnt1* dans le gène *PM25*, nous avons réalisé des PCR à cheval entre la séquence génomique et le transposon. Ainsi, la position de *Tnt1* a pu être vérifiée sur chacune des lignées. Des rétrocroisements sur le mutant

pm25-1 ont été engagés afin de supprimer les insertions surnuméraires et la production de graines F2 a été lancée. En attendant, nous avons décidé d'entamer les caractérisations physiologiques et biochimiques sur les mutants présentant encore des insertions surnuméraires. Il a donc été nécessaire de travailler sur plusieurs individus pour chaque allèle afin de déterminer si les effets observés étaient provoqués par l'absence d'expression de *PM25* ou fortuitement induits par une ou plusieurs insertions *Tnt1* ailleurs dans le génome. Nous avons ainsi pu observer que certaines plantes présentaient un comportement anormal sur certains critères physiologiques (taille des plantes, mortalité, avortement des fleurs...) par rapport à l'ensemble des plantes et les éliminer de notre étude. Pour exemple, la plante identifiée 9 sur le western blot (Figure 3.2) qui était bien un mutant pour *PM25* présentait un taux d'avortement floral très important, nous avons donc choisi de l'écartier de notre étude, les autres plantes ne présentant pas cette caractéristique, qui était probablement l'effet d'une insertion surnuméraire. Dans la suite de ce travail, les différents numéros qui seront accolés au numéro de l'allèle correspondront donc aux différentes plantes testées pour chacun des allèles.

3.2 Phénotypage physiologique des mutants *pm25*

3.2.1 Effet de *PM25* sur la tolérance à la dessiccation

Dans un premier temps, nous avons noté qu'il était possible de multiplier les lots de graines mutantes *pm25*⁻ sans observer de perte significative de viabilité des graines matures sèches. Nous pouvons donc conclure que *PM25* n'est pas indispensable pour conférer la tolérance à la dessiccation. Cependant, nous avons voulu savoir si la mutation *pm25* affectait l'acquisition de la tolérance à la dessiccation pendant la maturation. En effet, les mutants *Atem6* déficient en EM6, protéine LEA du groupe 1 chez *A.thaliana* présentent des graines ayant une maturation raccourcie et une dessiccation précoce sans altération de leur capacité germinative (Manfre et al., 2006; Manfre et al., 2008). Le critère le plus souvent utilisé pour tester la tolérance à la dessiccation de graines immatures est l'aptitude à germer après un dessèchement rapide amenant leur teneur en eau à une valeur proche de celles de graines matures (Fischer et al., 1988; Sun et Leopold, 1993; Sanhewe et Ellis, 1996). Des graines immatures ont donc été récoltées à 28 jours après pollinisation (JAP) sur des portes-

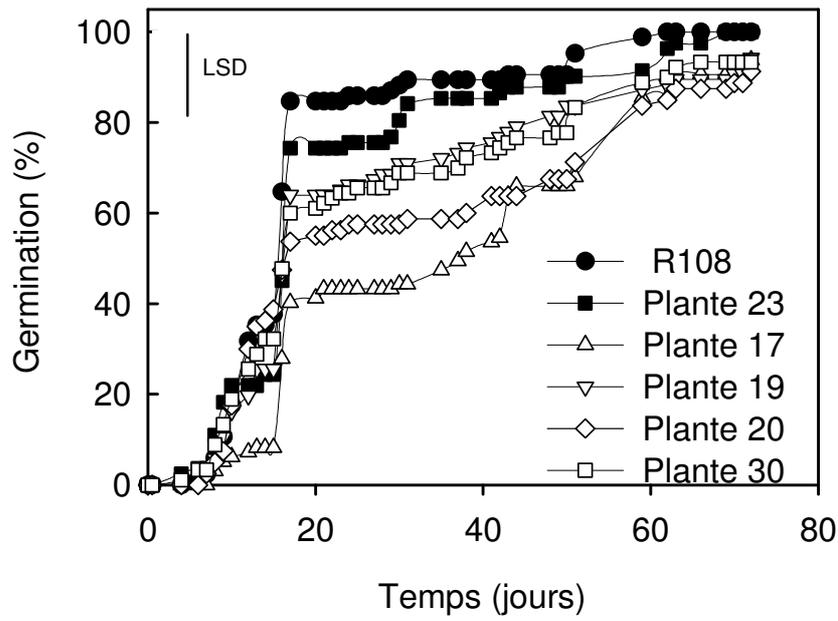


Figure 3.3 : Evolution de la germination de graines âgées de 28 JAP et séchées

Les graines (80 à 90) sont récoltées 28 jours après pollinisation, puis séchées pendant 48h à 20°C et 43 % d'HR. La germination est suivie au cours du temps d'imbibition à l'obscurité et à 20°C. Les symboles fermés représentent les graines Pm25⁺ et les symboles ouverts les graines Pm25⁻. LSD : Least Significant Difference.

graines sauvage R108 et des individus *pm25-1* cultivés en même temps et dans les mêmes conditions. Ces graines ont été mises à sécher 48 h à 20°C et à 43 % d'humidité relative puis imbibées à l'obscurité afin de suivre l'évolution de la germination. Les courbes de germination ainsi obtenues sont présentées dans la figure 3.3. Les graines $Pm25^+$ (wt et mutant *Tnt1* $Pm25^{+23}$) sont tolérantes à la dessiccation puisqu'elles sont capables de germer à 100 %. En revanche, les taux de germinations des plantes $PM25^-$ semblent quelque peu réduits puisqu'ils n'atteignent que 90 % ; cependant d'après les valeurs de LSD qui indiquent si les valeurs sont significativement différentes, il n'existe pas de différences significatives entre les taux finaux de germination pour les graines mutantes $PM25^-$ et les graines $PM25^+$. Lorsque nous examinons les cinétiques de germination après séchage forcé, nous observons que les graines mutantes $Pm25^-$ germent plus lentement que les sauvages. Les vitesses de germination peuvent être estimées en mesurant la différence entre les temps nécessaires pour obtenir respectivement 80 et 20 % de germination. Cette différence varie entre 8 et 20 jours pour les graines $PM25^+$ et entre 36 et 49 jours pour les mutants $PM25^-$. Ainsi, les graines 28 JAP déficientes en $PM25$ semblent avoir des vitesses de germinations réduites par rapport aux graines exprimant encore la protéine, mais leur viabilité ne semblent pas significativement altérée.

3.2.2 Effet de $PM25$ sur la dormance

Les graines de *Medicago truncatula* sur lesquelles nous travaillons appartiennent au génotype R108. Or, les graines issues de ce génotype présentent une dormance. La dormance se définit par l'incapacité de la graine à germer même lorsque celle-ci se trouve dans des conditions favorables (Bewley, 1997; Finch-Savage et Leubner-Metzger, 2006). Chez *M.truncatula*, celle-ci s'acquière à partir d'environ 30 JAP (Gallardo et al., 2006) et est déjà visible dans la figure 3.3. En effet, les graines non dormantes sont connues pour germer après 20 h d'imbibition (Julie Boudet, thèse, 2006) alors qu'il faut attendre cinq jours ici avant de voir les premières graines germer (Figure 3.3). La dormance va être progressivement levée au cours de la post-maturation à sec (after-ripening). Cette levée de dormance est obtenue en quelques mois pour le génotype R108 (Julia Buitink, communication personnelle). Il a été supposé que certaines protéines LEA pourraient être impliquées dans le maintien de la dormance, leur taux étant corrélé au maintien ou à la disparition de celle-ci (Li et Foley, 1995; Bailey et al., 1996). Or, $PM25$ apparaît pendant la maturation de la

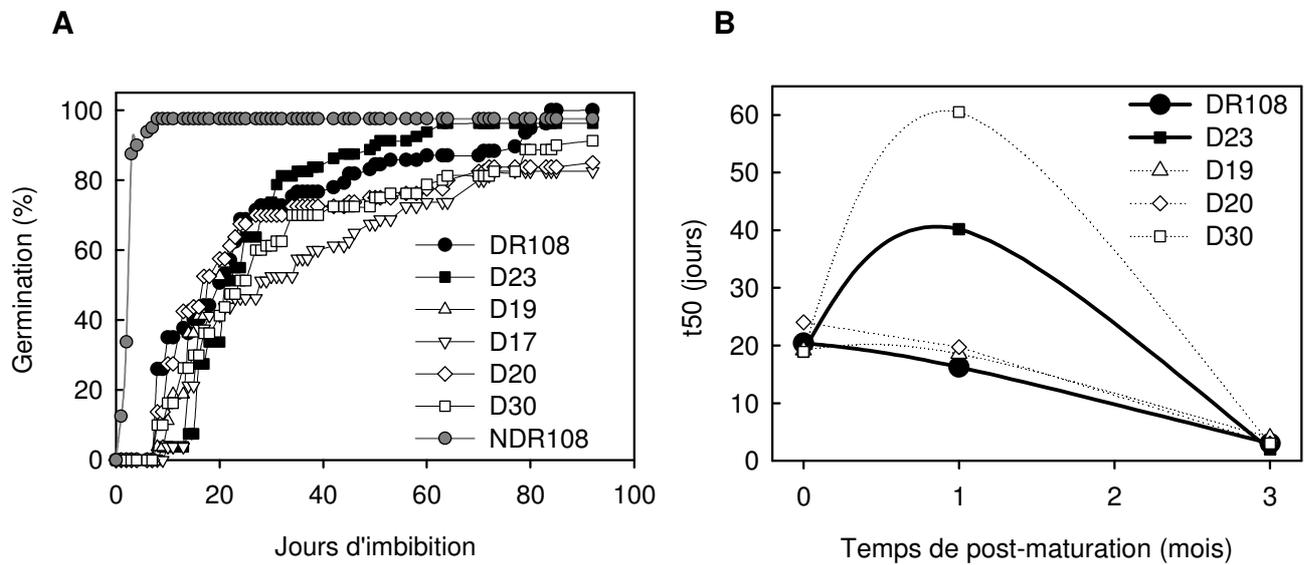


Figure 3.4 : Courbes de germination de graines dormantes de *M.truncatula* et perte de la dormance en fonction du temps de post-maturation

En A, 80 graines présentant la mutation ou non pour *PM25* sont mises à germer dans l'eau, à 23°C, à la lumière continue immédiatement après récolte. Les plantes D23, DR108 expriment *PM25*, les plantes D17, D19, D20, D30 sont des mutants *pm25-1* ne l'exprimant plus. Des graines de R108 conservées pendant 3 mois, (NDR108) sont également testées dans les mêmes conditions. En B, l'évolution du temps mis pour obtenir 50 % de germination (t_{50}) de graines déficientes (symbole ouvert) et non déficientes (symbole fermé) en *PM25* en fonction du temps de post-maturation à sec. Les mesures sont effectuées sur 80 graines à 23°C et en lumière 24h/24. La courbe pleine représente l'évolution de la perte de dormance pour les graines sauvages dormante DR108 et les graines *pm25*⁺, les courbes en pointillés l'évolution pour les graines mutantes *pm25*⁻.

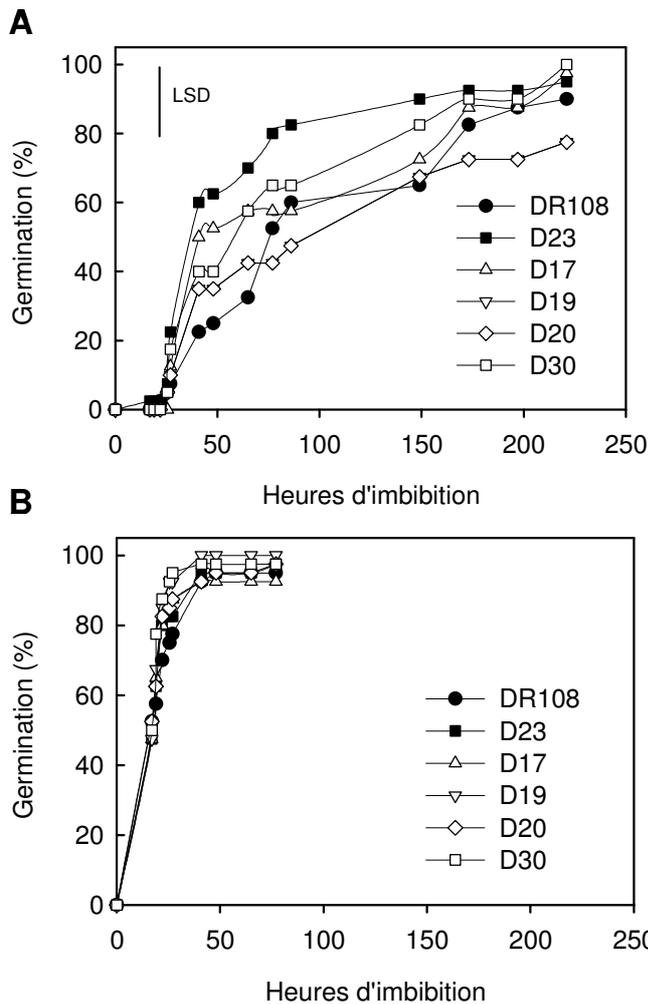


Figure 3.5 : Courbes de germination de graines de *M.truncatula* en présence de fluridone 20 μ M

40 graines déficientes (symboles ouvert) ou non (symbole fermé) pour *PM25* sont imbibées en absence (figure A) ou en présence de fluridone 20 μ M (figure B), inhibiteur de la synthèse d'ABA. Le pourcentage de germination est suivi en fonction du temps à l'obscurité et à 20°C. LSD : Least Significant Difference

graine en concomitance avec l'augmentation de la dormance (Boudet et al. 2006). Nous avons donc testé l'hypothèse selon laquelle PM25 serait impliquée dans la dormance des graines.

Nous avons comparé la germination de graines de deux lignées présentant le phénotype Pm25⁺ (wt et mutant *Tnt1* Pm25⁺²³) et de 4 lignées présentant le phénotype Pm25⁻ immédiatement après la récolte des gousses, c'est à dire n'ayant pas subi de post-maturation. Tous les tests ont été effectués uniquement sur l'allèle *PM25-1*. Les graines sont mises à germer dans des conditions identifiées comme favorisant la mise en évidence de la dormance : 23°C et lumière blanche 24h/24. Les graines sont scarifiées afin de s'affranchir de toute dormance tégumentaire et d'obtenir une imbibition homogène de toutes les graines. Nous pouvons voir sur la figure 3.4A qu'une dizaine de jours sont nécessaires pour que les premières graines de R108 fraîchement récoltées commencent à germer alors qu'il ne faut que quelques heures (environ 20h) pour que les graines ayant été stockées pendant 3 mois germent (R108ND). Lorsque nous observons les courbes de germination obtenues pour les mutants *Tnt1* présentant le phénotype Pm25⁻, aucune différence significative n'est visible par rapport aux courbes obtenues pour les graines Pm25⁺. En effet, le début de la germination commence dans les deux cas, 10 jours après le semis, et suit la même cinétique que les graines sauvages. Il ne semble donc pas y avoir de différences entre les niveaux de dormance des graines sauvages et mutantes à la récolte.

Nous avons voulu ensuite déterminer si PM25 pouvait influencer la levée de dormance pendant la post-maturation à sec. Pour cela, des graines fraîchement récoltées ont été stockées à température ambiante. Après 1 et 3 mois de stockage, elles sont imbibées à la lumière. A partir des courbes de germination (données non présentées), nous avons calculé le T₅₀, qui est le temps nécessaire pour obtenir 50 % de germination. Chez les graines sauvages et celles de la lignée 23 présentant le phénotype Pm25⁺, la dormance est levée progressivement puisque le T₅₀ est d'environ 20 jours juste après récolte et atteint environ 24 h après 3 mois de stockage, même si on relève un point aberrant à un mois de stockage pour les graines de la lignée 23 (Figure 3.4B). Les graines au phénotype Pm25⁻ ne semblent pas se comporter de manière significativement différente par rapport au phénotype Pm25⁺.

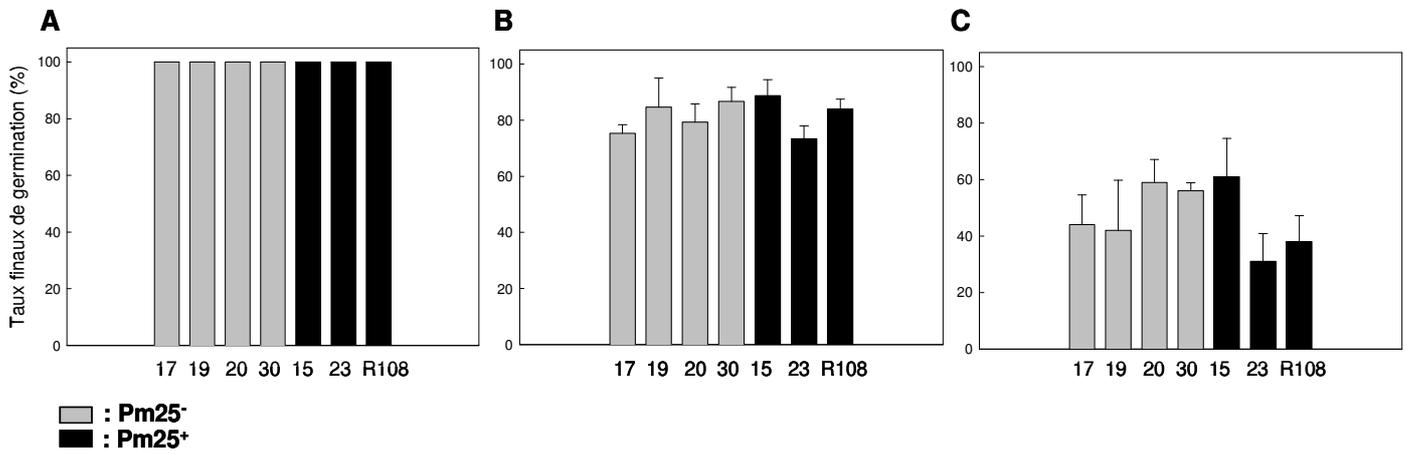


Figure 3.6 : Taux finaux de germination de *M.truncatula* avant et après un vieillissement accéléré

3 lots de 40 graines Pm25⁻, Pm25⁺ et sauvage R108 de *M.truncatula* sont stockés pendant 0 (A), 14 (B) ou 21 jours (C) à 35°C et 75 % d'humidité relative, puis, mis à germer dans l'eau à 20°C et à l'obscurité. Les taux finaux de germination sont déterminés. Les barres d'erreurs représentent la moyenne des 3 réplicats biologiques.

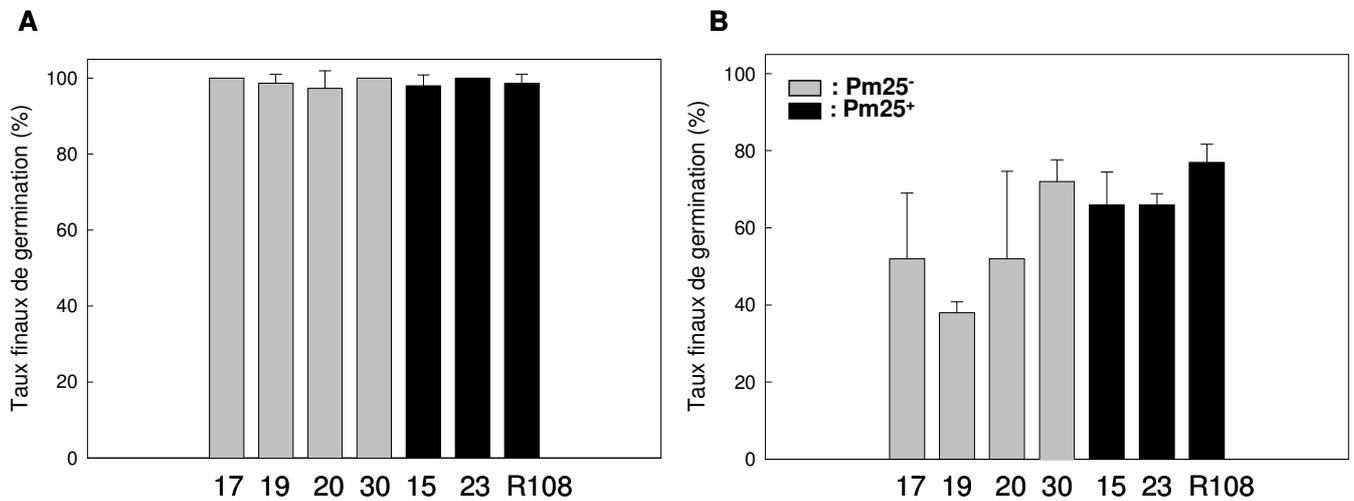


Figure 3.7 : Taux finaux de germination de *M.truncatula* en absence ou en présence de NaCl 60 mM

3 lots de 25 graines de *M.truncatula* pour chaque individu sont mis à imbiber dans l'eau ou dans une solution de NaCl 60 mM à 20°C et à l'obscurité. Les taux finaux de germination sont déterminés. Les barres d'erreurs représentent la moyenne des 3 réplicats biologiques.

Afin de valider ce résultat, nous avons voulu savoir si PM25 pourrait altérer le lien entre dormance et métabolisme de l'ABA. Ainsi, lorsque nous imbibons des graines sauvages récoltées depuis 2 mois en présence de fluridone 20 μM , un inhibiteur de la synthèse d'ABA, nous observons que la dormance est levée puisque toutes les graines germent de façon parfaitement homogène et atteignent 50 % de germination en 25h, contrairement aux graines non traitées qui atteignent 50 % de germination entre 50 et 80h d'imbibition (Figure 3.5). Chez les graines mutantes, les courbes de germination obtenues en présence et en l'absence de l'inhibiteur sont identiques à celle obtenues pour les graines sauvages. L'effet de la fluridone est donc tout à fait similaire à celui observé pour les graines PM25⁺.

Il apparaît donc que PM25 ne joue pas un rôle dans la dormance ou la levée de dormance des graines de *M.truncatula*.

3.2.3 Impact de PM25 au cours du vieillissement accéléré

Au cours de leur conservation, les graines vieillissent inéluctablement. Les principaux facteurs environnementaux qui vont influencer la vitesse de ce processus sont la température et l'humidité relative du stockage. Par ailleurs, nous avons mentionné dans le relevé bibliographique l'hypothèse selon laquelle PM25 contribuerait à la stabilisation de l'état vitreux, améliorant ainsi sa longévité. Nous avons donc testé si les graines déficientes en PM25 présentaient une sensibilité accrue au vieillissement. La longévité des graines de *M.truncatula* étant très supérieure à la durée d'une thèse (3 ans), nous avons fait subir un vieillissement accéléré aux graines en les stockant à 35°C, 75 % HR. Au bout de 14 et 21 jours de stockage dans ces conditions, les graines sont imbibées en conditions optimales à 20°C et à l'obscurité. Les taux finaux de germination obtenus sont présentés figure 3.6. En A, en absence de vieillissement accéléré, les taux de germination sont de 100% quelque soit le génotype. En B, après 14 jours de vieillissement, les graines dans lesquelles PM25 est exprimée présentent une chute de leur taux finaux de germination à 80 %. Cependant, les graines déficientes en PM25 présentent la même diminution de leurs taux finaux de germination et ne semblent donc pas être plus sensibles. Après 21 jours de vieillissement, les taux finaux de germination pour les graines PM25⁺ chutent à des valeurs entre 35 et 60 %. Les mêmes résultats sont

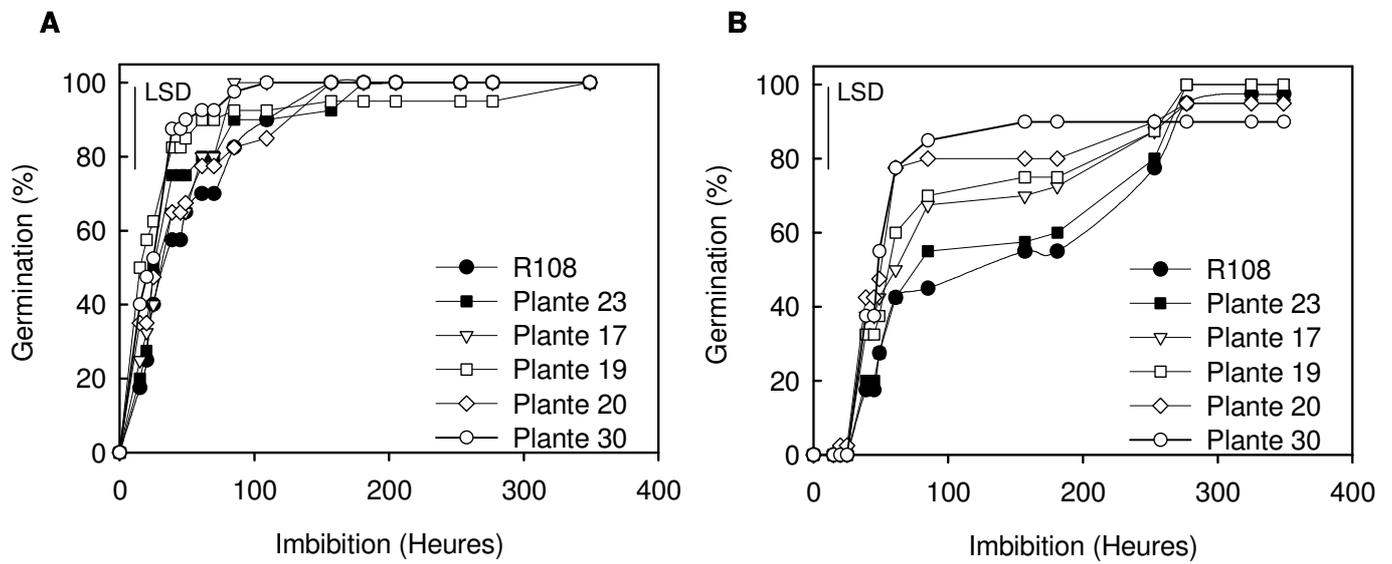


Figure 3.8 : Germination de graines de *M.truncatula* en absence ou en présence de PEG équivalent à $\psi: -0.3$ MPa
 40 graines de *M.truncatula* sont mises à imbiber dans l'eau, en A, ou dans une solution de PEG équivalent à $\psi: -0.3$ MPa, en B, à 20°C et à l'obscurité. Les symboles fermés indiquent les graines exprimant encore PM25, les symboles ouverts, les graines déficientes. LSD : Least Significant Difference

obtenus pour les graines déficientes en PM25. Ainsi, aucune réduction significative des taux finaux de germination au cours du vieillissement n'est mise en évidence par rapport aux graines PM25⁺.

3.2.4 Implication de PM25 dans la tolérance aux stress osmotique et salins

(Borrell et al., 2002) ont montré que des graines surexprimant *AtRAB28*, l'homologue de *PM25* chez *A.thaliana* devenaient plus tolérantes à un stress salin ou à un stress osmotique. Nous avons donc cherché à déterminer si les graines mutantes déficientes en PM25 allaient montrer une sensibilité accrue dans des conditions pénalisantes du même type. Dans un premier temps, des graines ont donc été mises à imbiber dans une solution de NaCl 60 mM et les pourcentages finaux de germination ont été déterminés (Figure 3.7). Chez les graines sauvages et mutantes *Tnt1* présentant le phénotype Pm25⁺, la présence de NaCl 60 mM dans le milieu d'imbibition induit une chute du pouvoir germinatif puisque en moyenne seulement 70 à 80 % des graines germent. Chez les graines mutantes *pm25*, il ne semble pas y avoir une plus grande sensibilité au stress salin par rapport aux graines présentant le phénotype PM25⁺, les taux finaux de germination étant identiques. Ces essais ont été répétés également à 15°C. Cependant, aucune différence significative entre graines sauvages et mutantes n'a pu être observée.

Dans un deuxième temps, des graines ont été imbibées dans une solution de PEG induisant une pression osmotique de $\psi = -0.3$ MPa, et la germination a été suivie au cours du temps. Nous avons pu voir dans la partie 1 de ce mémoire que ce traitement n'altère pas les taux finaux de germination qui reste de 100 % pour les graines sauvages. Par contre, la figure 3.8 montre qu'il induit une diminution de la vitesse de germination. En effet, pour les graines sauvages et *Pm25*⁺ le T₅₀, passe de 20h dans l'eau à 50h en présence de PEG (Figure 3.8). Pour les graines déficientes en PM25, les courbes de germination montrent qu'elles réagissent de la même façon au stress osmotique que les graines sauvages. De plus les taux finaux de germination ne sont pas non plus altérés et reste de 100 %. Cette expérience a également été réalisée à 15°C. Dans ces conditions, les graines mutantes n'ont pas montré de différences de comportement par rapport aux graines PM25⁺, tout comme pour le stress salin,

3.2.5 Impact de l'absence de PM25 sur la masse des graines

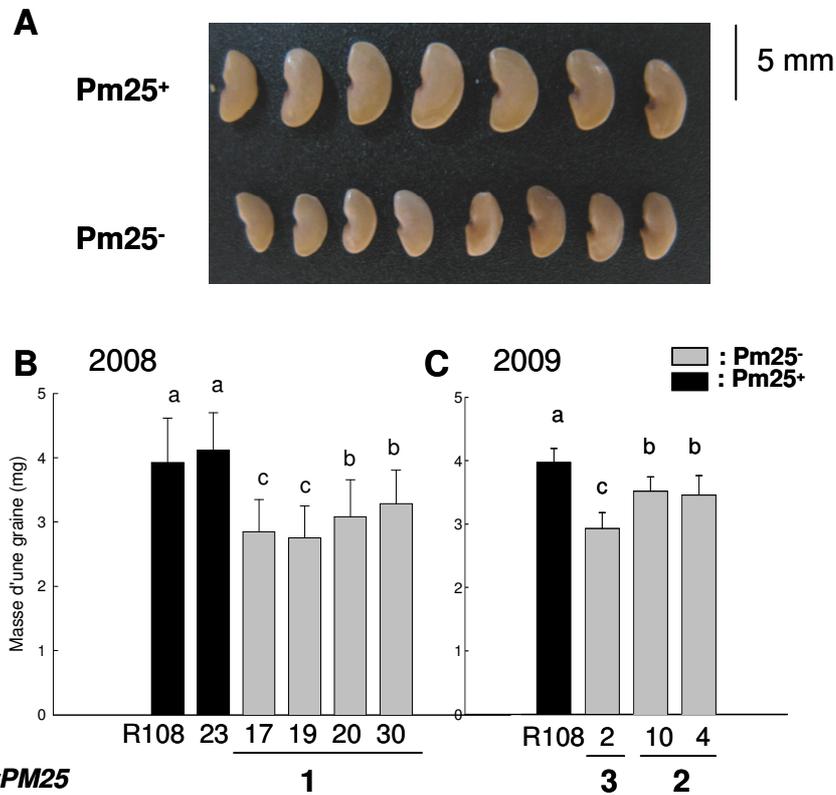


Figure 3.9 : Taille et masse de graines de *M.truncatula* déficientes ou non en PM25

En A, photographies de graines matures de *M.truncatula* déficientes ou non en PM25. En B, mesure des masses fraîches de graines matures des 3 allèles mutées pour PM25 en comparaison avec les graines dans lesquelles le gène est toujours exprimé. Les mesures sont obtenues par détermination de la moyenne de la masse unitaire de 50 graines et de la masse de 5 lots de 10 graines pour l'allèle 1, et sur 5 lots de 10 graines pour les allèles 2 et 3, les barres d'erreurs sont déterminées sur la moyenne de ces réplicats. Les lettres indiquent des différences significatives après un test ANOVA, $p < 0.05$.

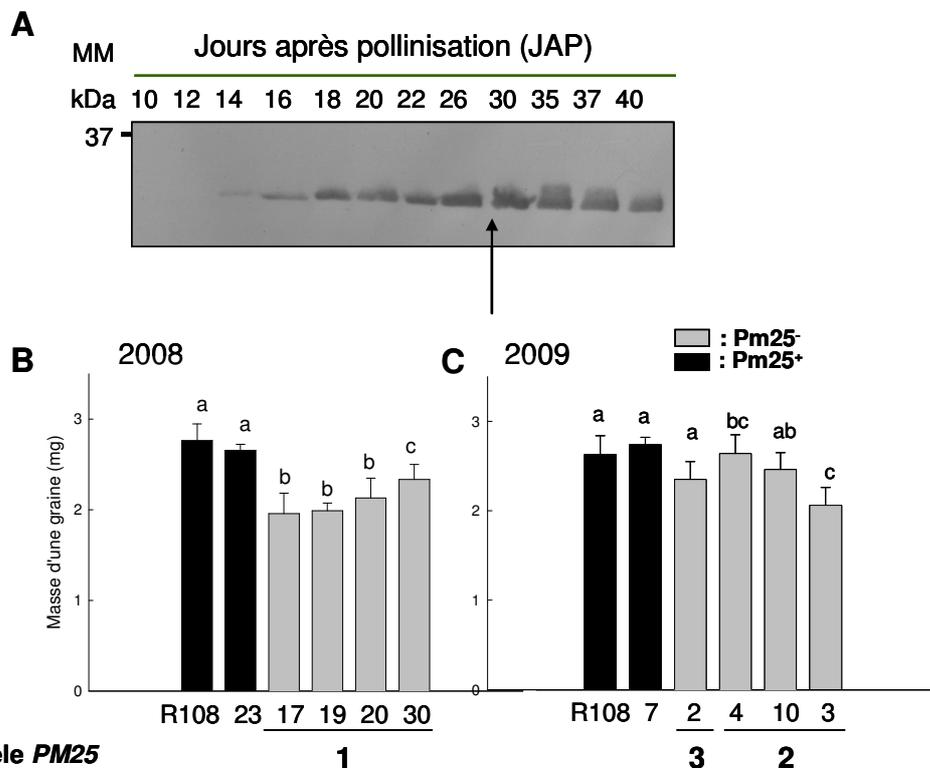


Figure 3.10 : Evolution du taux de PM25 en western blot au cours de la maturation et masse de graines 28 JAP déficientes ou non en PM25

En A, le western blot indique l'évolution de la teneur en PM25 révélé par un anticorps spécifique au cours de la maturation (Boudet et al., 2006). La flèche indique le temps 28 JAP. En B, les masses des graines récoltées 28 jours après pollinisation sont déterminées après séchage des graines pendant 39 h à 98°C pour les 3 allèles et les deux années de récolte. Les mesures sont effectuées sur 5 lots de 3 graines. Les barres d'erreurs sont déterminées sur la moyenne de ces réplicats. Les lettres indiquent des différences significatives après un test ANOVA, $p < 0.05$.

Chez *A.thaliana*, les graines déficientes en AtEM6, présente une maturation réduite, c'est-à-dire qu'elles subissent une dessiccation plus précoce que les graines sauvages. Nous avons voulu savoir si le développement de la graine de *M. truncatula* en absence de PM25 pouvait également être modifié. La figure 3.9A montre que les graines matures des mutants *pm25* apparaissent plus petites que les graines sauvages. De plus, les graines $Pm25^-$ ont une masse significativement inférieure de 15 à 20 % par rapport aux graines présentant le phénotype $Pm25^+$ (Figure 3.9B). Nous avons confirmé cette observation sur les deux autres mutants *pm25-2* et *pm25-3* produits en 2009, ce qui indique bien que l'effet observé est provoqué par l'absence de PM25 et non par des insertions surnuméraires ou par les conditions de cultures. Cela pourrait donc suggérer que PM25 influence le remplissage de la graine lors de la maturation. (Boudet et al., 2006) avaient montré que la teneur maximale en PM25 est atteinte pendant la maturation aux alentours de 28 jours après pollinisation comme l'illustre l'analyse par western blot de la figure 3.10A. Nous avons donc choisi ce stade pour déterminer si les différences dans le poids des graines se dessinaient déjà. En ce qui concerne le mutant *pm25-1* dont les graines ont été produites en 2008 (Figure 3.10B), nous observons comme pour les graines matures une différence significative entre les phénotypes $Pm25^+$ et $Pm25^-$. Les graines déficientes en PM25 présentent une masse réduite d'environ 20 à 25 % par rapport aux graines qui expriment toujours le gène. Par contre, pour les mutants de la récolte 2009, seul les graines de la plante 3 de l'allèle *pm25-2* présentent une diminution significative de masse. La grande hétérogénéité des masses pour ce qui concerne les autres génotypes n'a pas permis de mettre en évidence de différences significatives.

3.3 Phénotypage biochimique

Les graines déficientes en PM25 présentent une masse inférieure aux graines sauvages. Cette différence de masse pourrait être provoquée par un arrêt précoce du développement de la graine, un développement plus lent, ou bien par la modification de l'accumulation d'un des composants de la graine. Dans un premier temps, afin de tester cette dernière hypothèse, nous avons comparé la composition des graines sauvages et des graines déficientes en PM25.

3.3.1 Mesure des teneurs en eau

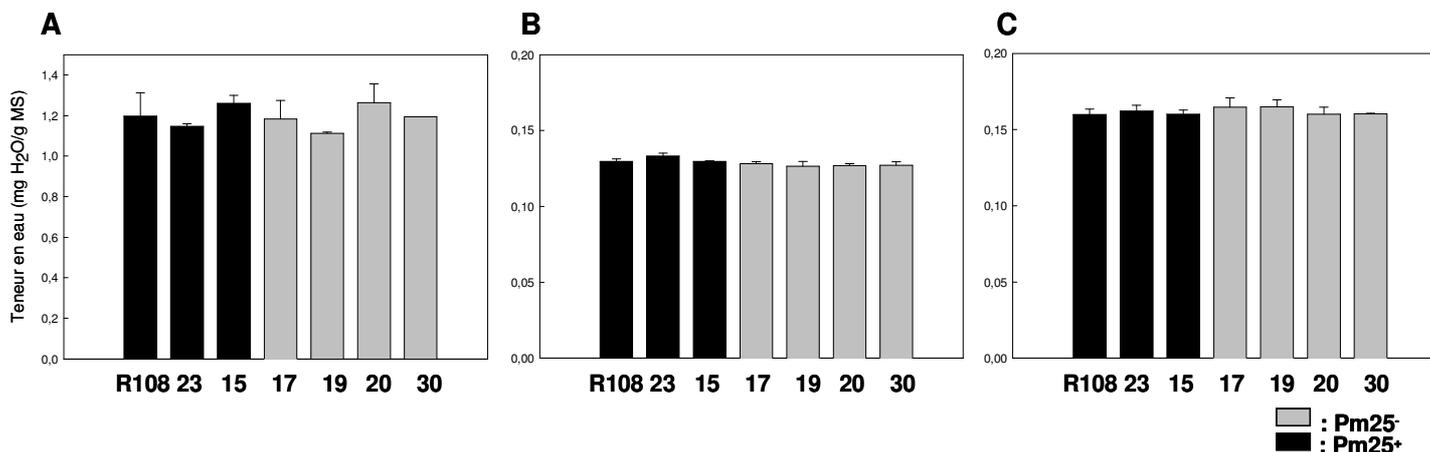


Figure 3.11 : Teneurs en eau de graines immatures et mures déficientes ou non en PM25

En A, comparaison des teneurs en eau de graines 28 jours après pollinisation présentant ou non la mutation *pm25*. En B, comparaison des teneurs en eau de graines mures équilibrées à 43 % d'HR et à 20°C, et en C, comparaison des teneurs en eau de graines mures équilibrées à 75 % d'HR et à 20°C. Les teneurs en eau sont calculées après séchage des graines 39 h à 98°C et mesure des différences entre poids frais et poids sec. Les mesures ont été répétées 10 fois sur un lot de 3 graines, les barres d'erreurs représentent l'écart-type obtenu.

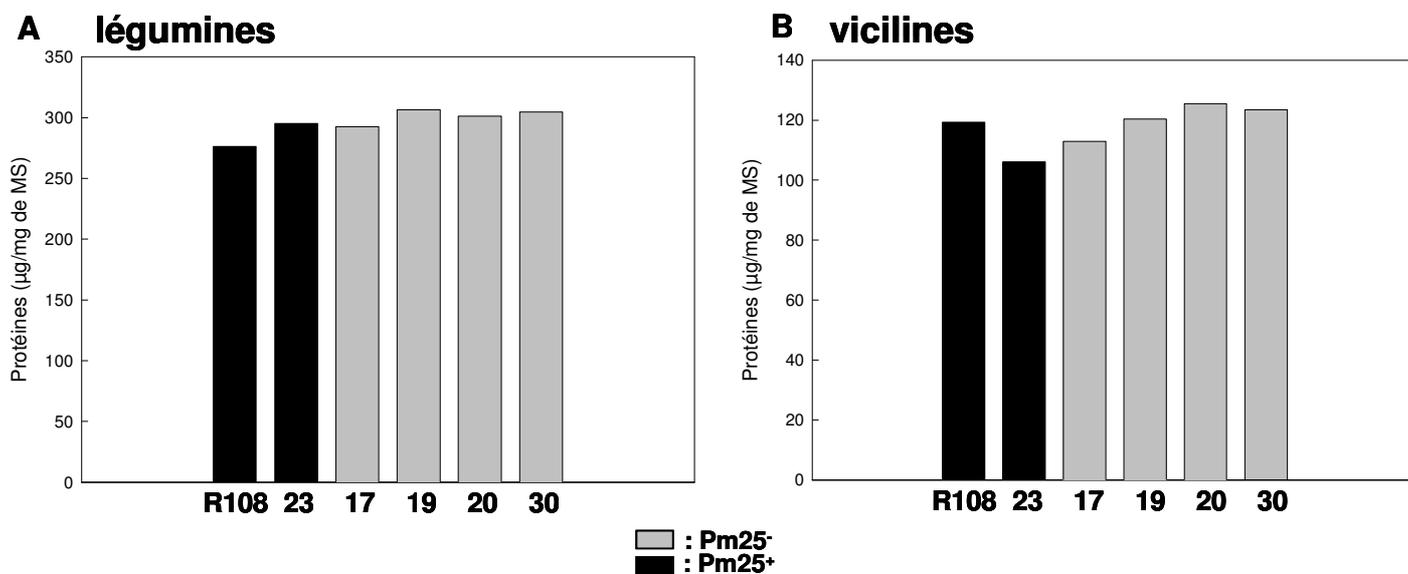


Figure 3.12 : Teneurs en protéines de réserves de graines mures de *M.truncatula* déficientes ou non en PM25

Comparaison des teneurs en légumine, en A, et en vicilines, en B, extraites par extraction séquentielle en présence de NaCl 1M pour les légumine, et NaCl 0.2 M pour les vicilines, de graines mures de *M.truncatula* présentant le phénotype Pm25⁺ (plante sauvage R108 et plante 23) et Pm25⁻ (plante 17, 19, 20, 30).

Comme nous l'avons présenté dans l'introduction bibliographique, PM25 possède des capacités particulières de rétention de l'eau à des humidités relatives > 75 % (figure 9). Nous avons donc mesuré les teneurs en eau de graines âgées de 28 JAP, et, mature, mutées ou non pour le gène *PM25* pour l'allèle 1. Le stade 28 JAP correspondant au départ de la phase finale de dessiccation. La Figure 3.11 A montre que les teneurs en eau des graines mutantes et sauvages à 28 JAP ne sont pas significativement différentes. Un résultat similaire est obtenu sur des graines matures récoltées et équilibrées à 43 % (figure 3.11 B) ou 75 % d'humidité relative (figure 3.11 C).

3.3.2 Teneur en protéines de réserves

Les réserves accumulées chez *M.truncatula* le sont principalement sous forme protéique (Gallardo et al., 2003). Si le remplissage de la graine est altéré au cours de la maturation, il se peut que les réserves protéiques soient modifiées. Nous avons donc comparé les teneurs en légumine et vicilines, qui sont les principales protéines de réserves dans les graines de légumineuses (Müntz et al., 1985). Ces protéines ont été extraites des graines sauvages et *pm25-1* au stade mature de manière séquentielle dans des tampons contenant 0, 0.2 puis 1 M NaCl (Krochko et Bewley, 1988), et ensuite, dosées selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Les résultats présentés Figure 3.12 n'indiquent aucune différence significative pour les 2 types de protéines entre le phénotype $Pm25^+$ et $Pm25^-$. Une analyse après séparation des protéines totales sur gel 1D de polyacrylamide en présence de SDS n'a pas non plus révélé de différences dans les profils de migrations entre mutants et sauvages (données non montrées). En l'absence de différences, nous n'avons pas poursuivi l'étude sur les autres mutants.

3.3.3 Teneur en sucres solubles

N'ayant pu mettre en évidence de différences dans les constituants principaux de la graine, nous avons ensuite tester l'hypothèse selon laquelle la différence de masse pourrait être provoquée par un retard dans la maturation de la graine. Pour ce faire, nous avons mesuré les teneurs en sucres solubles, glucose, saccharose et oligosaccharides de la famille des RFOs présents dans la graine à 28 JAP et à maturité. En effet, la teneur en saccharose et oligosaccharides de la famille des RFOs et, plus particulièrement le rapport des teneurs Sac/RFO sont considérés comme des

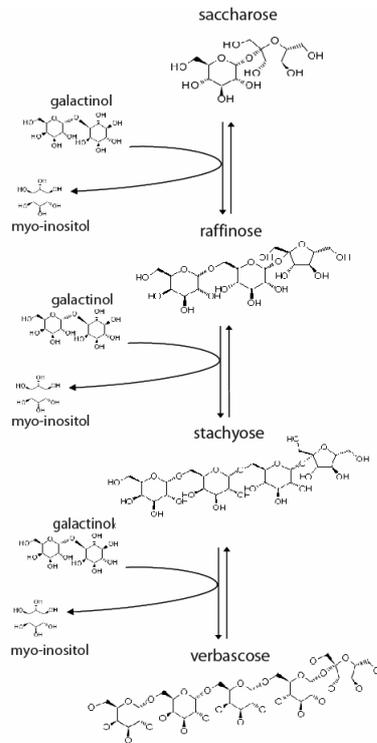


Figure 3.13 : Voies de biosynthèse des RFOs dans les semences de légumineuses

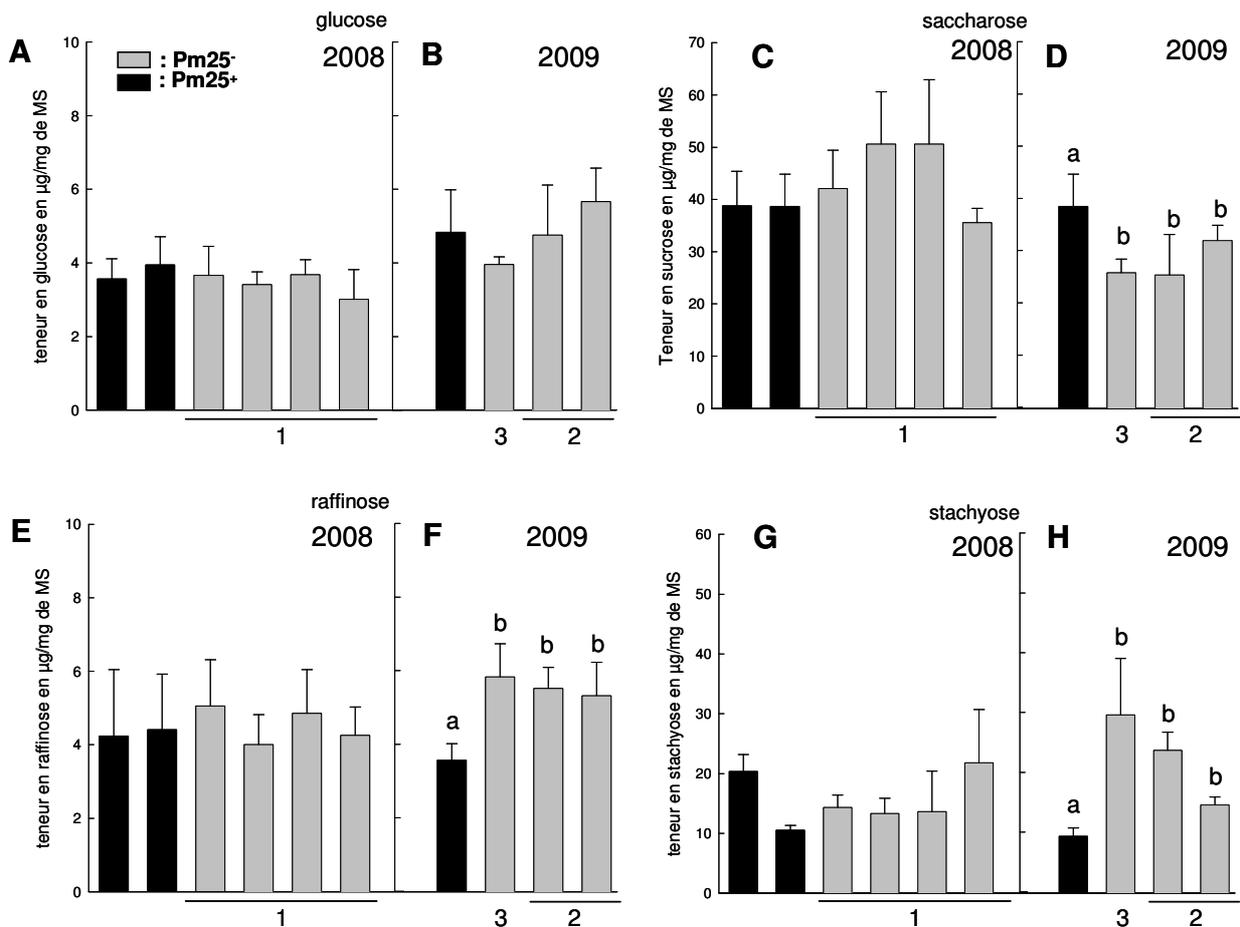


Figure 3.14 : Teneurs en sucres solubles de graines 28 JAP de *M. truncatula*

Les teneurs en sucres solubles, glucose (A,B) ; saccharose (C,D) ; raffinose (E,F) ; stachyose (G,H) de graines immatures âgées de 28 JAP de *M. truncatula* sont déterminées sur 3 lots de 15 graines pour l'allèle *pm25-1* (1) (A, C, E, G) et sur 3 lots de 10 graines pour les 2 autres allèles (2 et 3) (B, D, F, H) par dosage Dionex. Les écarts-types sont déterminés sur trois réplicats techniques pour chaque répétition biologique. Les groupes a et b identifient les valeurs présentant des différences statistiques après un test Anova $p < 0.05$.

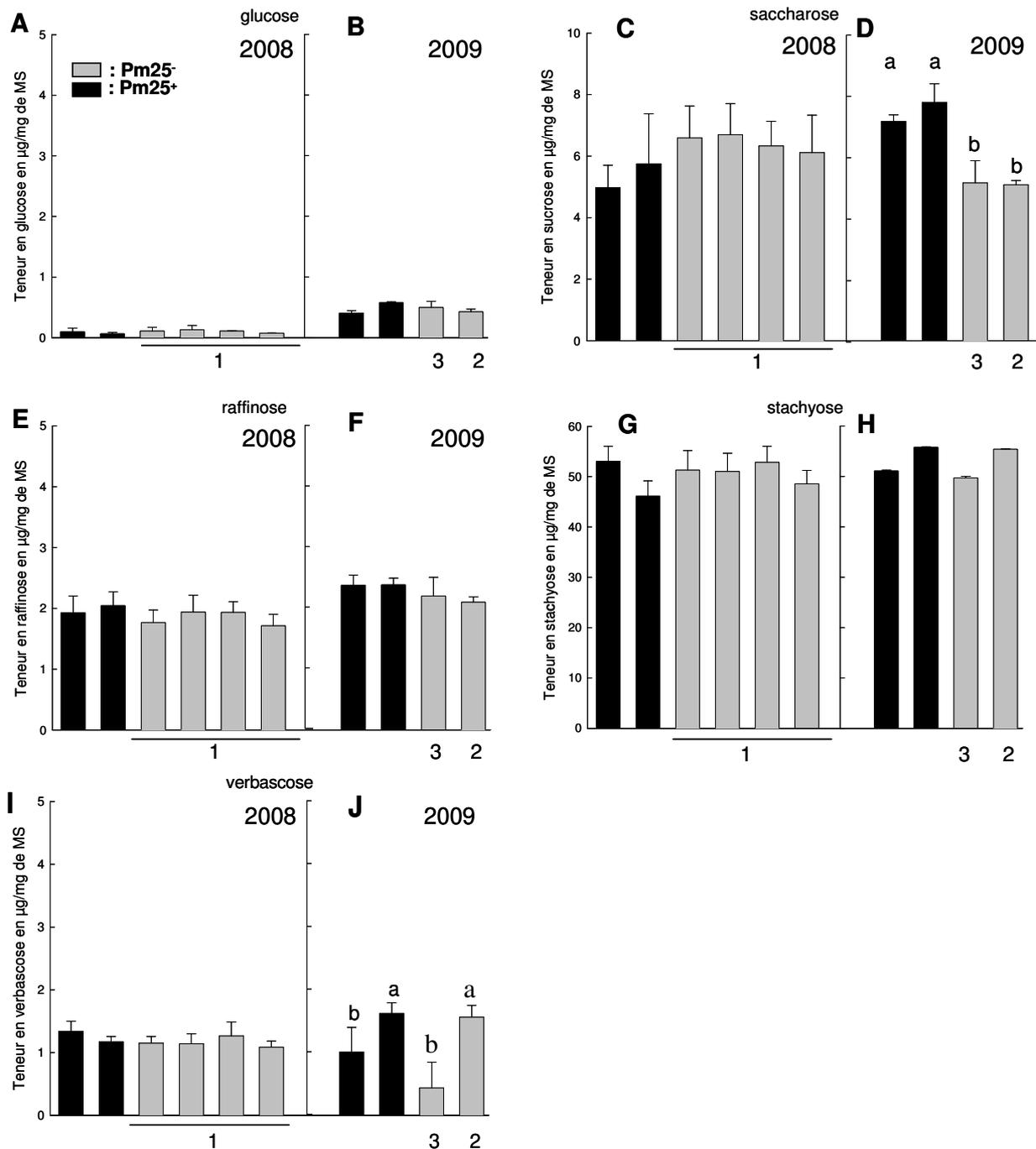


Figure 3.15 : Teneurs en sucres solubles de graines matures de *M.truncatula*

Les teneurs en sucres solubles, glucose (A,B); saccharose (C,D); raffinose (E,F); stachyose (G,H) et verbascose (I, J) de graines matures de *M.truncatula* sont déterminées sur 3X15 graines pour l'allèle *pm25-1* (1) (A, C, E, G, I) et sur 3X15 graines pour les 2 autres allèles (2 et 3) (B, D, F, H, J) par dosage Dionex. Les écarts-types sont déterminés sur trois réplicats techniques pour chaque répétition biologique. Les groupes a et b identifient les valeurs présentant des différences statistiques après un test Anova $p < 0.05$.

indices du stade de maturation et de la qualité des graines (Bailly et al., 2001). Par ailleurs, chez le soja il a pu être montré un lien entre l'accumulation de stachyose et l'acquisition de la tolérance à la dessiccation (Blackman et al., 1992; Sinniah et al., 1998). Les RFOs s'accumulent selon la voie de biosynthèse présentée figure 3.13.

Dans la Figure 3.14, nous observons, dans les graines sauvages à 28 JAP, que le sucre majoritaire est le saccharose, avec environ 40 µg/mg de MS (matière sèche), suivi du stachyose, avec environ 20 µg/mg de MS ; le glucose et le raffinose sont moins abondant, avec environ 4 µg/mg de MS. Pour la récolte 2008, aucune différence significative de teneurs pour les sucres solubles testés n'apparaît entre les graines mutantes appartenant au phénotype Pm25⁻ par rapport aux graines Pm25⁺. Pour la récolte 2009, les graines sauvages présentent une accumulation de saccharose significativement plus importante que les graines déficientes, mais elles ont moins de raffinose et moins de stachyose, ce qui pourrait indiquer un retard de maturation puisque les sucres de fin de voie de biosynthèse sont moins représentés, et donc une maturation plus précoces des graines pm25⁻.

En ce qui concerne l'évolution des teneurs en sucres solubles dans les graines sèches (Figure 3.15), nous constatons chez les graines sauvages que le sucre majoritaire est devenu le stachyose (environ 60 µg/mg de MS) dont le taux a été multiplié par 3 par rapport aux graines 28 JAP. Le taux de saccharose a fortement diminué par rapport aux graines 28 JAP puisqu'il n'est plus que d'environ 6µg/mg de MS, les teneurs ont donc été divisé par 7. Le taux de raffinose a également été réduit, environ 2 fois, et le glucose est devenu très minoritaire. Un nouveau sucre est apparu, le verbascose qui est situé plus en aval de la fin de la voie de biosynthèse des sucres par rapport aux autre sucres cités précédemment, (environ 1µg/mg de MS). Lorsque les teneurs en sucres entre les graines sauvages et déficientes en PM25 sont comparées, nous n'observons aucune différence pour la récolte 2008, seule la récolte 2009 montre des différences entre les graines PM25⁺ et PM25⁻ avec des teneurs supérieures en saccharose et en verbascose pour les graines sauvages.

Il n'apparaît donc pas clairement de lien entre l'absence de PM25 et une variation des teneurs en sucres, que ce soit en quantité ou en qualité. Nous pouvons remarquer que les teneurs en sucres dans les plantes sauvages ont peu évolué d'une

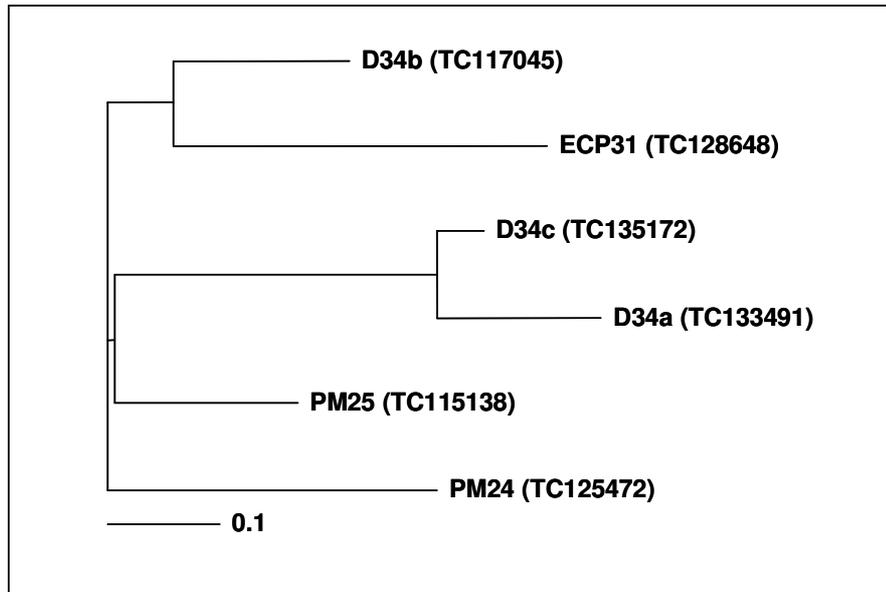


Figure 3.16 : Arbre phylogénétique des membres du groupe des D-34 chez *M.truncatula*
 Les numéros de TC indiquent les homologies de séquence retrouvées dans la banque EST TIGR de *Medicago* (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/mta1/>) pour les différents gènes. L'arbre phylogénétique est obtenu au moyen du logiciel Tree View (Page, 1996)

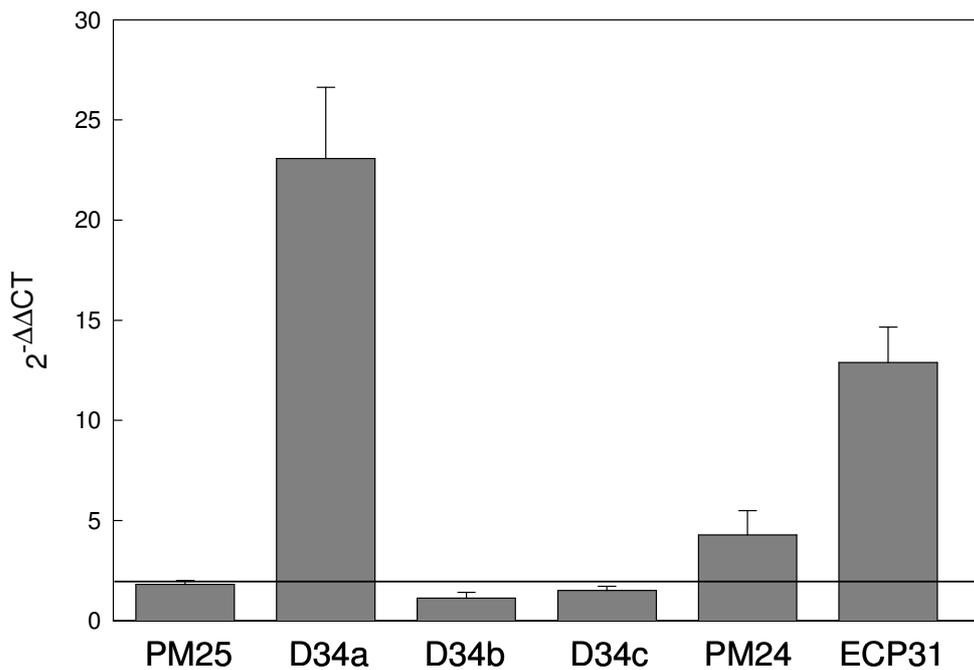


Figure 3.17 : Expression de *PM25* et de ses homologues chez *M.truncatula* dans les graines 28 jours après pollinisation
 L'expression relative de *PM25* et des différents homologues (\pm écart type, sur trois réplicats techniques) est suivie par RT-QPCR. Toutes les données sont comparées par rapport à l'expression dans les graines sèches. Toutes les données sont normalisées par rapport à *Msc27*. Les expressions relatives sont mesurées par calcul du $2^{-\Delta\Delta CT}$. La barre noire représente le seuil de significativité.

année de récolte sur l'autre, ce qui indique que nos mesures sont fiables et qu'il ne semble pas y avoir d'effet récolte.

3.4 Etude de l'expression des homologues de PM25 au cours de la maturation et de la germination en conditions optimales et pénalisantes

L'absence de phénotype en réponse aux différents stress nous a amené à nous poser la question de savoir si des phénomènes de compensation pouvait être induit par des homologues de *PM25* dans les graines mutantes. Dès lors, nous avons comparé par RT-qPCR l'expression relative des différents transcrits de la famille des D-34 identifiés chez *M.truncatula*. Nous avons vérifié dans la banque EST TIGR de *Medicago* (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/mta1/>) si de nouveaux TC avaient été identifiés comme des protéines LEA appartenant à cette famille depuis le travail de thèse de J Boudet (Décembre 2005). Après avoir éliminé les TC redondants et vérifié leur cadre de lecture, 5 ont été retenus et annotés selon la nomenclature adoptée par (Boudet et al., 2006). Parmi eux, un seul nouveau TC est apparu et a été annoté D34c. Les séquences peptidiques ont été alignées à l'aide de ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) puis visualisées sous forme d'arbre phylogénétique (unrooted tree; (Page, 1996)) au moyen de TreeView (Figure 3.16). Trois clusters se dégagent : un premier cluster inclut *D34b* et *ECP31*. Un second cluster comprend *D34c*, *D34a* et *PM25* et enfin *PM24* constitue le dernier cluster à lui seul.

3.4.1 Expression des homologues de PM25 au cours de la maturation

Les études transcriptomiques menées par (Benedito et al., 2008) montre que les transcrits pour les gènes décrits précédemment s'accumulent entre 24 et 36 JAP. Nous avons suivi en RT-qPCR les niveaux d'expression relatifs de *PM25* et de ses 5 homologues à 28 JAP en les comparant au niveau d'expression mesuré dans les graines sèches. Au préalable, les données ont été normalisées par rapport à l'expression du gène *Msc27* dont on sait qu'elle est constitutive. La figure 3.17 montre des niveaux d'accumulation des transcrits différents selon l'homologue considéré, avec essentiellement 2 profils d'expression qui se dégagent. Le premier profil est constitué par *PM25*, *D-34b* et *D-34c*. Ces 3 gènes ont une expression non

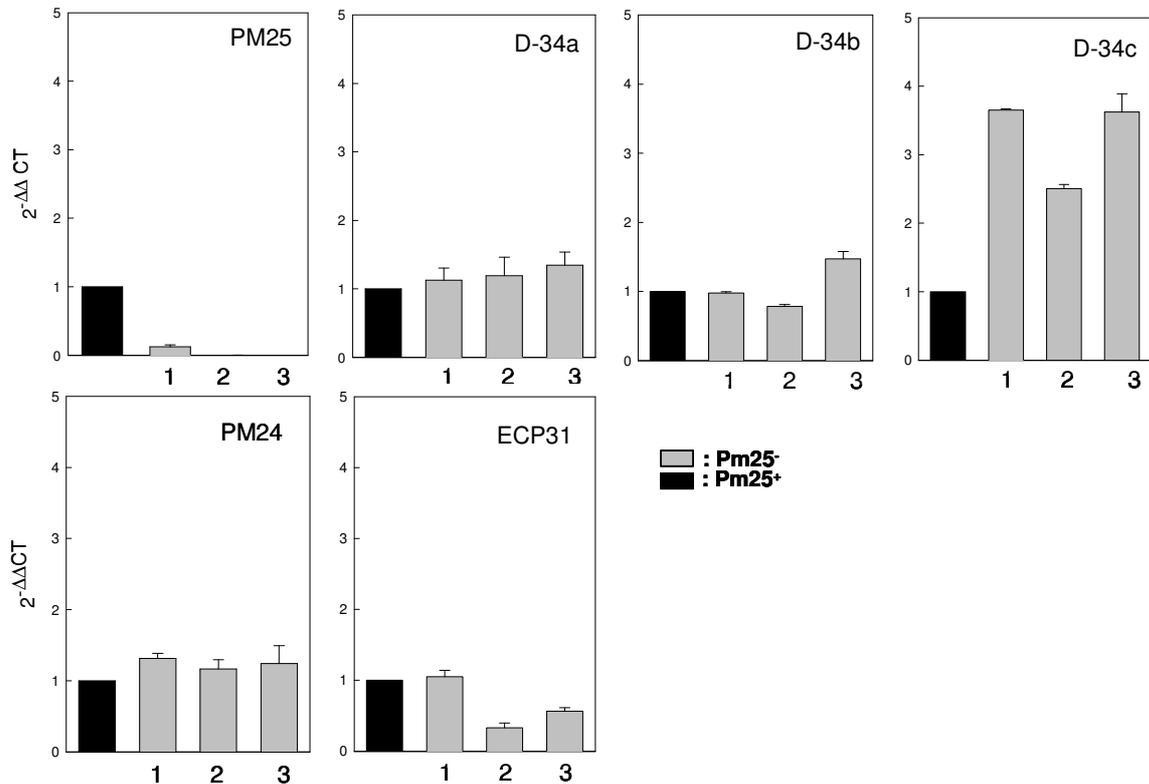


Figure 3.18 : Expression de *PM25* et de ses homologues chez *M.truncatula* dans les graines mutées pour ce gène 28 jours après pollinisation

L'expression relative de *PM25* (\pm écart type, sur trois réplicats techniques) et des différents homologues est suivie par RT-qPCR dans les graines sauvages (*Pm25+*) et pour les 3 mutants alléliques, *pm25-1*, *pm25-2*, *pm25-3* annotés 1, 2 et 3. Toutes les données sont comparées par rapport à l'expression dans les graines 28 JAP sauvages. Toutes les données sont normalisées par rapport à *Msc27*. Les expressions relatives sont mesurées par calcul du $2^{-\Delta\Delta CT}$.

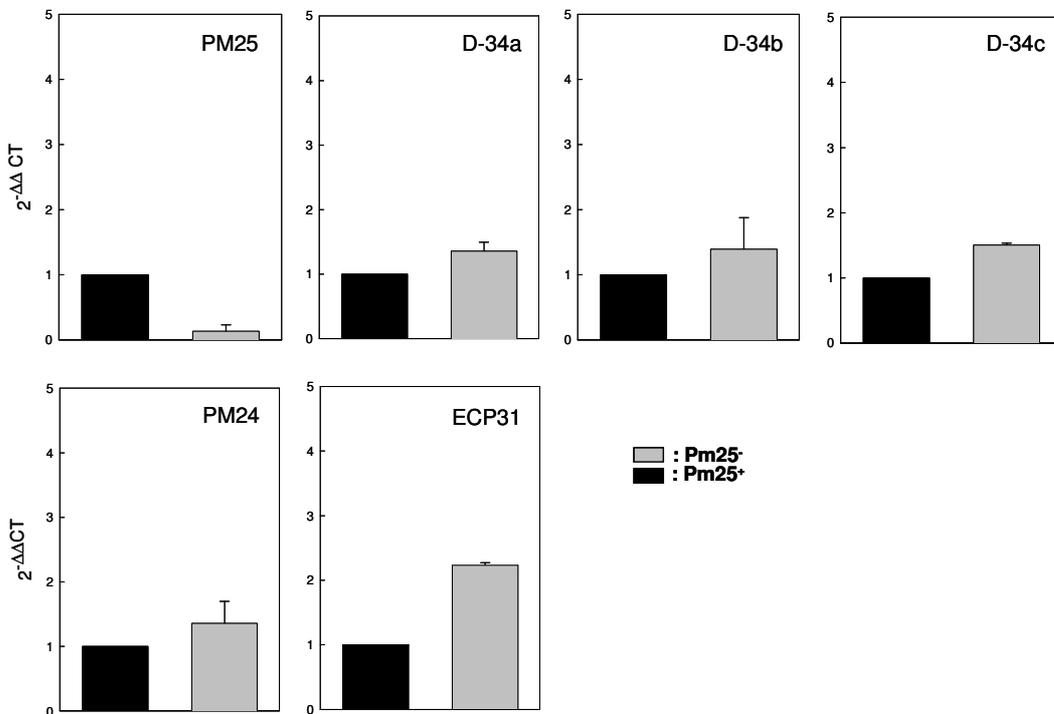


Figure 3.19 : Expression de *PM25* et de ses homologues chez *M.truncatula* dans les graines matures mutées pour *PM25-1*

L'expression relative de *PM25* (\pm écart type, sur trois réplicats techniques) et des différents homologues est suivie par RT-qPCR. Toutes les données sont comparées par rapport à l'expression dans les graines matures sauvages, barre noire et dont l'expression est égale à 1. Toutes les données sont normalisées par rapport à *Msc27*. Les expressions relatives sont mesurées par calcul de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

significativement différente dans les graines 28 JAP par rapport aux graines matures. Le taux de transcrit n'évolue donc plus de 28 JAP jusqu'à maturité de la graine pour ces gènes. Le deuxième profil regroupent *PM24*, *ECP31* et *D-34a* qui présentent des taux de transcrits à 28 JAP entre 5 et 20 fois supérieurs à ceux au sein des graines matures. Dans ce cas, l'expression de ces gènes semble diminuer au cours de la maturation et de la dessiccation de la graine.

Après avoir précisé l'évolution de l'expression des gènes de la famille D-34 dans le génotype sauvage en fin de maturation, nous avons examiné l'effet de l'absence de *PM25* dans des graines mutantes récoltées à 28 JAP. Dans cet essai, les données de RT-qPCR de chaque homologue ont été normalisées par rapport aux valeurs obtenues pour chacun d'eux sur les graines sauvages âgées de 28 JAP (Figure 3.18). Afin de faciliter l'interprétation, ces valeurs sont de 1 pour chaque homologue dans le génotype sauvage et sont représentés par la barre noire dans la figure 3.18. Les mesures d'expression sont effectuées sur les trois mutants alléliques *pm25*. Nous constatons sur la figure 3.18 que *PM25* est bien sous exprimé dans les mutants. Nous observons une faible expression résiduelle, notamment pour l'allèle 1. Ce résultat peut être expliqué par la localisation des amorces choisies. Pour les gènes *D-34a*, *D-34b*, *PM24* et *ECP31* aucune variation significative du taux de transcrits n'est observée entre les graines mutantes et sauvages. En revanche, le gène *D-34c* apparaît largement surexprimé dans les mutants par rapport aux graines sauvages. Ce gène pourrait donc être susceptible de compenser l'expression de *PM25* dans les graines 28 JAP. Il est à noter que le gène *D-34c* fait parti du set de gènes identifiés comme restant invariant entre 28 JAP et graine mature et auquel appartient aussi *PM25*.

Nous avons ensuite cherché à déterminer quels étaient les niveaux d'expression des homologues de *PM25* dans les graines sèches afin de déterminer si un éventuel effet de l'absence de *PM25* pouvait être masqué. Les données obtenues en RT-qPCR sont présentées figure 3.19. Les données sont exprimées par rapport au niveau de transcrits présents dans les graines matures sauvages, après normalisation par rapport à *Msc27*. Dans les graines matures, la surexpression de *D-34c* observées dans les graines immatures mutantes a disparu. Seul *ECP31* apparaît faiblement surexprimés dans les graines mutantes par rapport aux graines sauvages matures puisque son expression est doublée. Les autres homologues ne présentent pas de variations

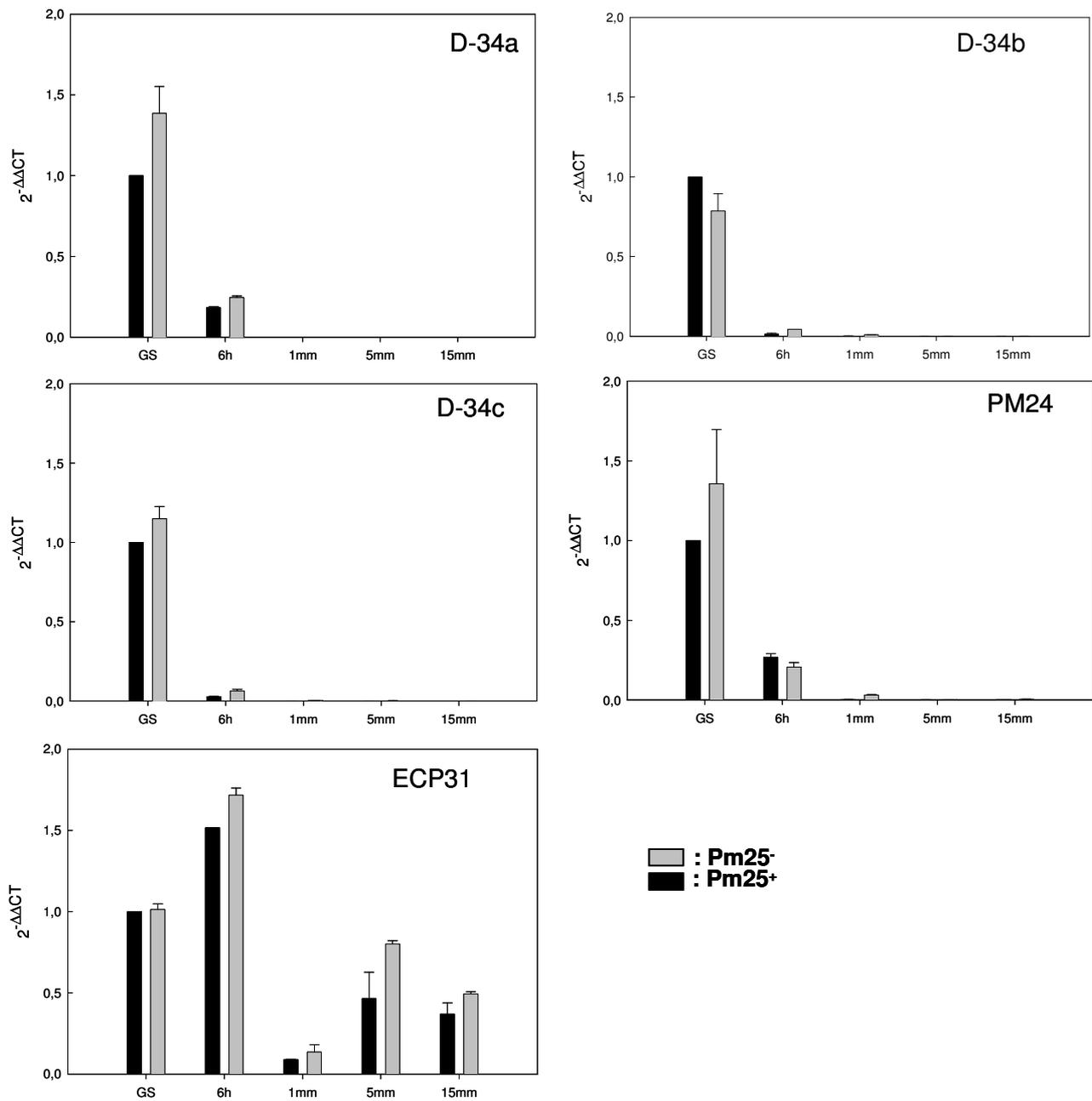


Figure 3.20 : Cinétique d'expression des homologues de *PM25* au cours de l'imbibition de graines de *M.truncatula* dans les graines sauvages et *pm25-1*

L'expression relative des homologues de *PM25* (\pm écart type, sur trois réplicats techniques) au cours de la germination est suivie par RT-qPCR dans les radicules. Toutes les données sont comparées par rapport à l'expression dans les graines matures sauvages avant imbibition. Toutes les données sont normalisées par rapport à *Msc27*. Les expressions relatives sont mesurées par calcul de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

significative des niveaux de transcrits dans les graines mutantes. Il n'apparaît donc pas clairement de compensation de *PM25* par l'un de ses homologues dans les graines sèches.

3.4.2 Expression des homologues de *PM25* au cours de la germination

Nous avons pu montrer dans la première partie de ce travail que les taux de transcrits de *PM25* décroissaient très rapidement au cours de l'imbibition. Nous avons donc voulu caractériser les profils d'expression des homologues de *PM25* au cours de l'imbibition dans les graines sauvages mais également dans les graines mutantes (allèle *pm25-1*) (Figure 3.20). Dans cette expérience, la normalisation est effectuée par rapport à la valeur obtenue pour les graines matures sauvages avant imbibition ($Pm25^+$, barre noire) pour chaque homologue. Nous pouvons voir que pour les gènes *D-34a*, *D-34b*, *D-34c*, et *PM24* la diminution du taux de transcrits au cours de l'imbibition est, comme pour *PM25*, très rapide puisque nous avons une diminution de 60 à 70 % des niveaux de transcrits à 6h imbibée par rapport aux graines non imbibées et que plus tard au cours de l'imbibition et de la croissance post-germinative, les taux deviennent négligeables. Seul le gène *ECP31* présente un profil d'expression différent au cours de l'imbibition. En effet, à 6h, bien que l'augmentation observée ne soit pas significative puisqu'elle ne dépasse pas de plus de 1,5 fois le niveau de transcrits dans les graines matures avant imbibition, nous pouvons considérer que le niveau de transcrits du gène reste stable, et ne diminue donc pas contrairement aux autres homologues. De plus au cours de l'imbibition les transcrits apparaissent comme diminuant moins rapidement que pour les autres homologues puisque dans les radicules de 15 mm, le niveau d'expression de *ECP31* n'est divisé que par 2 par rapport aux graines matures avant imbibition tandis que pour les autres homologues nous n'avons plus de transcrits détectable au stade 15 mm.

En ce qui concerne les profils d'expression de ces gènes dans le mutant *PM25-1*, aucune différence significative n'est observée, les niveaux et les profils d'expression des homologues de *PM25* ne sont pas modifiés chez le mutant.

3.4.3 Expression des homologues de *PM25* au cours de stress osmotique et salins

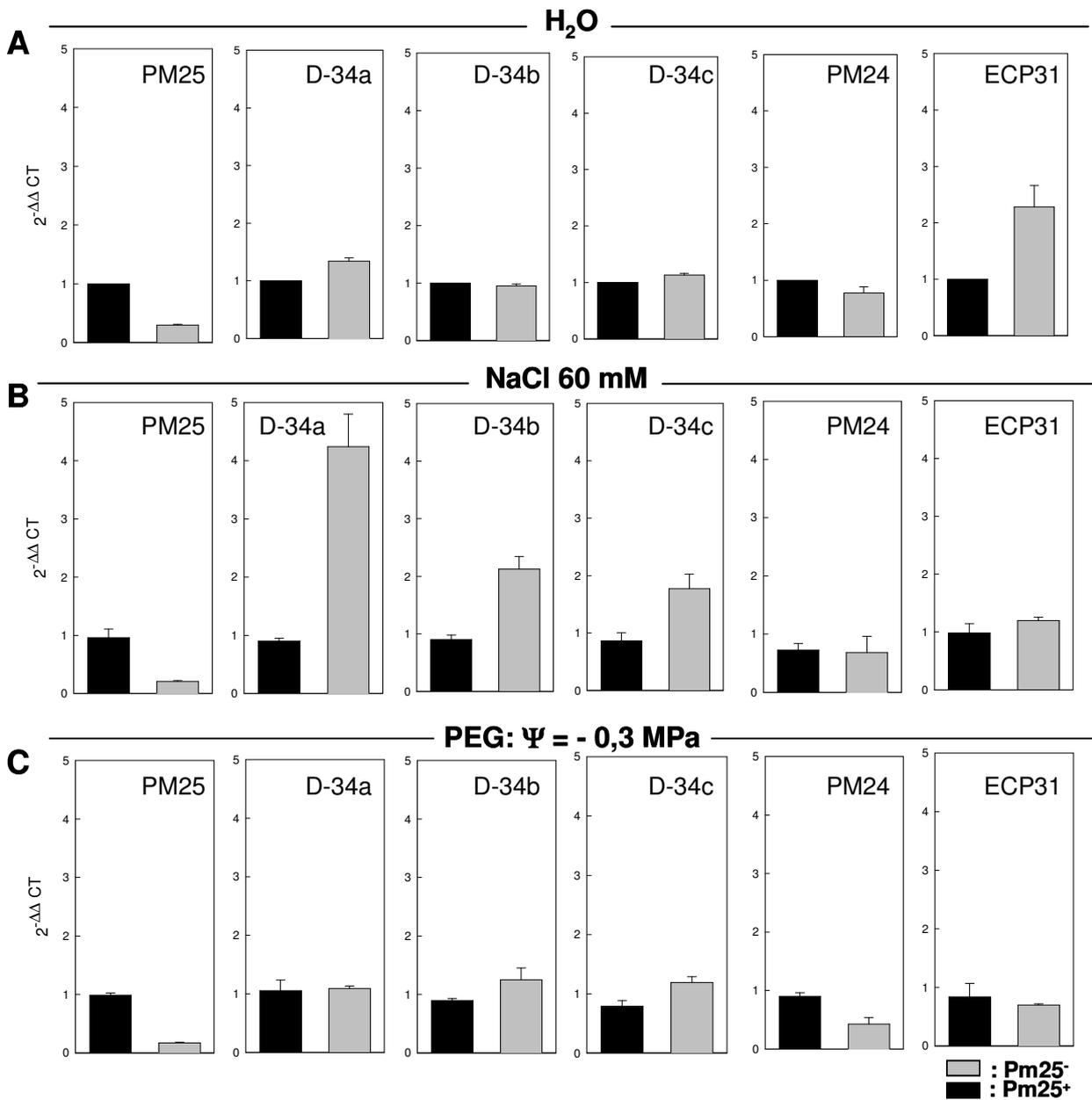


Figure 3.21 : Expression des homologues de *PM25* au cours de stress hydriques et salins chez des graines déficientes (*pm25-1*) ou non en *PM25*

L'expression des différents homologues de *PM25* (\pm écart type, sur trois réplicats techniques) est suivie par RT-qPCR dans les graines, déficientes en *PM25* (allèle *PM25-1*) ou non, imbibées 6 h en conditions non pénalisantes, dans l'eau en A, ou pénalisantes, en B et C respectivement en présence de NaCl 60 mM et PEG, à ψ : -0.3 MPa. Toutes les données sont comparées par rapport à l'expression dans les graines matures sauvages 6h imbibées dans l'eau. Toutes les données sont normalisées par rapport à *Msc27*. Les expressions relatives sont mesurées par calcul de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Nous avons également pu mettre en évidence au cours des travaux présentés dans cette partie que les graines déficientes en *PM25* ne semblaient pas plus sensibles au stress provoqué par le PEG $\psi = -0.3$ MPa ou par la NaCl 60 mM. Afin de vérifier si cette absence de phénotype pouvait être expliquée par une compensation par un de ses homologues, nous avons suivi leur expression dans des graines sauvages et mutantes (*pm25-1*) au cours de ces stress. Nous avons évalué les niveaux d'expression des homologues lorsque les graines sont imbibées 6h dans de l'eau ou en présence de PEG -0.3 MPa ou de NaCl 60 mM. Les niveaux d'expression relative pour chaque homologue sont exprimés par rapport à leur expression respective mesurée dans les graines sauvages imbibées 6h dans l'eau.

Dans les graines sauvages (barres noires), nous ne constatons aucune variation des niveaux de transcrit pour l'ensemble des homologues quelque soit les conditions d'imbibition, présence de NaCl ou de PEG (Figure 3.21B et C). Aucun des homologues de *PM25* n'est donc induit par le stress salin ou par le stress osmotique provoqué dans cette expérience. Pour les graines mutantes imbibées dans l'eau, seul *ECP31* apparaît légèrement surexprimé (Figure 3.21 A), ce qui confirme les résultats obtenus dans la figure 3.20. Lorsque les graines sont imbibées 6h en présence de NaCl 60 mM, *D-34a* et dans une moindre mesure *D-34b*, *D-34c* sont surexprimés dans les graines mutantes par rapport aux graines sauvages alors que *PM24* et *ECP31* voient leur niveau d'expression inchangé par rapport aux graines sauvages. Lorsque les graines sont imbibées en présence de PEG aucune variation n'est observée quelque soit l'homologue.

L'ensemble de ces données suggère donc des phénomènes complexes de régulation des gènes de la famille des D34, dépendant à la fois du stade de développement, du stress imposé et de la présence de *PM25*.

DISCUSSION

Les démarches de génétique inverse visant à comprendre le rôle des protéines LEA ont été, jusqu'à présent de surexprimer un gène candidat et de vérifier si la plante ou la graine transgénique présentait une tolérance accrue aux stress abiotiques (Tunnacliffe et Wise, 2007). Comme nous l'avons décrit auparavant, cette démarche a, par exemple, montrer l'importance de AtRAB28 dans la tolérance aux stress salins chez *Arabidopsis thaliana* (Borrell et al., 2002). Dans ce travail, nous avons entrepris une démarche inverse visant à étudier l'impact de l'extinction de PM25 sur divers aspects de la qualité physiologique des semences. Cependant, aucun phénotype particulier n'a été observé quant à la résistance au vieillissement accéléré, ainsi que aux stress salins et osmotiques, des graines déficientes en PM25. De même, aucun impact n'a pu être mis en évidence quant à une implication de la protéine dans la dormance. Ces résultats peuvent s'expliquer de plusieurs manières : il se pourrait que l'intensité du stress n'ait pas été suffisante pour mettre en évidence la fonction de PM25. Cependant, une incubation dans 50 mM de NaCl suffit à réduire la croissance de la plante entière de plus de 50 % pour ce qui concerne la partie aérienne et plus 64 % pour l'appareil racinaire (López et al., 2008) ce qui suggère une sensibilité de *M.truncatula* dans cette gamme de concentration. De plus les taux finaux de germination des graines sont significativement réduits en présence de NaCl 60 mM (Figure 3.7). De même, lors du vieillissement accéléré les taux finaux de germination sont également significativement réduits, et, lors du stress osmotique un décalage de croissance est observé. Les graines de *M.truncatula* sont donc affectées par les stress provoqués. Une autre hypothèse serait de dire que PM25 ne joue pas un rôle crucial dans la tolérance à ces stress. L'observation que le stress salin et le stress osmotique n'induisent pas l'expression de PM25 dans les graines sauvages imbibées dans 60 mM NaCl et dans le PEG corrobore cette hypothèse. Dans ce cas, PM25 aurait une fonction différente de son homologue AtRab28. Une dernière hypothèse, que nous avons testée dans ce travail, et qui apparaît comme la plus envisageable, est que le faible impact phénotypique observé pourrait trouver son origine dans un phénomène de compensation engendrée par la surexpression d'homologues de PM25 dans les mutants *pm25* stressés. Cette hypothèse, déjà suggérée pour l'implication des systèmes antioxydants dans la tolérance aux stress oxydants (Mittler et al., 2004)

repose ici sur l'homologie des séquences d'acides aminés au sein de la famille des D-34 dont nous avons détecté 5 gènes chez *M.truncatula* (Figure 3.16).

En effet, lorsque les graines sauvages sont imbibées en conditions non pénalisantes, les gènes *D-34a*, *D-34-b*, *D-34c* et *PM24* présentent des cinétiques de disparition similaires à celles observées pour *PM25* (figure 3.20). Seuls les niveaux de transcrits de *ECP31* présentent un profil différent caractérisé par un niveau de transcrit plus important qui perdure pendant la croissance post-germinative (Figure 3.20). Ces deux profils ont été retrouvés au cours de l'imbibition de graines *pm25-1*. En revanche, lorsque les graines sont soumises à un stress salin, l'accumulation des transcrits après 6h d'imbibition est significativement augmentée dans les mutants pour les gènes *D-34c*, *D-34b* et surtout *D34a*. Ces résultats corroborent l'idée que l'absence de phénotype observé chez les graines imbibées dans la solution saline pourrait être provoqué par une surexpression de ces gènes qui compenserait l'absence de *PM25*. Par ailleurs, (Borrell et al., 2002) ont montré une germination moins pénalisée lors d'un stress osmotique pour les graines surexprimant *AtRAB28*. Cependant, nous n'avons pas pu observer d'induction de *PM25* ni d'aucun de ses homologues lors d'un stress osmotique et cela même dans les mutants, il apparaîtrait donc que d'autres mécanismes interviennent chez *M.truncatula* dans la résistance aux stress osmotique et que les gènes étudiés ici ne soient pas impliqués dans la résistance à ce type de stress.

Si aucun phénotype de résistance aux stress n'a pu être mis en évidence, nous avons pu observer que les graines déficientes en *PM25* présentaient une taille et une masse plus faible que les graines sauvages alors que les analyses biochimiques indiquent que la composition de la graine n'est pas altérée. En effet, les teneurs en eau, en protéines de réserves et en sucres solubles chez les graines mutantes sont identiques à celles des graines sauvages, ce qui pourrait nous orienter vers l'idée d'un arrêt précoce ou d'un ralentissement de la maturation de la graine conduisant à une taille plus petite sans altération de ses capacités germinatives. (Manfre et al., 2008) ont pu montrer que des graines mutantes d'*A.thaliana* déficientes en *AtEM6*, une protéine LEA du groupe 1 présentaient une réduction de leur maturation sans altération des capacités germinatives de la graine, ceci étant provoqué par une diminution de la teneur en eau des graines mutantes plus tôt au cours de la

maturation que les graines sauvages. Cependant, les mécanismes mis en jeu pour PM25 apparaissent différents puisque ceci n'a pas pu être observé sur les mutants PM25 qui présentent les mêmes teneurs en eau que les graines sauvages.

Au cours de la maturation, en ce qui concerne les profils d'accumulation des transcrits dans les graines mutantes à 28 JAP, seul le gène *D-34c* est surexprimé (Figure 3.18). Si nous retenons l'idée d'un phénomène de redondance au sein de cette famille et son implication dans la tolérance au stress (Borrell et al., 2002), il serait intéressant de tester si *D-34c* participe à la survie à l'état sec (tolérance à la dessiccation, longévité de la graine). En revanche, nous pouvons exclure l'implication de *D-34c* dans le contrôle de la taille de la graine. Par ailleurs, nous avons mis en évidence 2 profils d'accumulation des transcrits des homologues de PM25 au cours de la fin de la maturation, c'est-à-dire entre 28 JAP et graines matures. Un profil d'accumulation pour lequel le taux de transcrits ne varie pas entre 28 JAP et graines matures pour les gènes *PM25*, *D-34b*, *D-34c*, et un profil montrant une diminution du niveau de transcrits entre 28 JAP et graines matures sauvages pour les gènes *D34a* et *ECP31*. Ceci apparaît assez nouveau à notre connaissance puisque les protéines LEA ont été identifiées comme s'accumulant en fin de maturation (Galau et al., 1986; Baker et al., 1988). Il est intéressant de noter que le gène *D-34c* présente le même profil d'expression que PM25 au cours de la maturation dans les graines sauvages, mais dans les graines mutantes présentent l'autre type de profil. En effet, il est surexprimé dans les graines à 28 JAP mais ne l'est plus dans les graines matures. Ainsi, chez les graines mutantes il bascule d'un profil à un autre, suggérant un rôle de ce gène dans la fin de la maturation des graines et la nécessité de compenser l'absence de PM25 en fin de maturation, mais plus dans la graine mature. Une étude protéomique pourrait être intéressante afin de déterminer si la protéine *D-34c* est accumulée de façon plus abondante dans les graines matures pour compenser l'absence de PM25.

Dans les graines matures mutantes, seul le gène *ECP31* apparaît faiblement surexprimé. Toutefois, les résultats obtenus pour ce gène semblent montrés des variations d'un échantillon à l'autre, il serait donc nécessaire de recommencer les expériences avec un nouveau couple d'amorce afin de pouvoir conclure. Aucun autre

Partie 3 : Analyses physiologiques de mutants d'insertion *tnt1* de *M.truncatula* pour le gène *PM25*

gène n'apparaît surexprimé, il ne semble donc pas y avoir de compensation à ce stade.

Ainsi, nos études montrent que la mutation du gène *PM25* serait compensée selon le stade de maturation de la graine ou selon le stress par un gène différent. Par *D-34c*, pendant la maturation et, principalement par *D-34a* lorsque les graines sont soumises à un stress salins. Or ces deux gènes appartiennent au même cluster de gène que *PM25* d'après l'arbre phylogénétique (Figure 3.16). *PM25* apparaît donc compenser par ces homologues les plus proches.

Conclusions et perspectives

Les semences en tant que vecteur de dissémination de l'espèce sont à la base de l'agriculture. C'est pourquoi, il est fondamental de comprendre les facteurs moléculaires gouvernant la qualité physiologique des graines. Cette qualité va dépendre notamment de la capacité qu'ont les graines orthodoxes de survivre à l'état sec. Les études qui ont porté sur la compréhension des mécanismes permettant aux graines de survivre à l'état sec, ont permis d'identifier un certain nombre de protéines protectrices telles que les protéines LEA (Tunnacliffe et Wise, 2007). La synthèse et la dégradation des protéines LEA sont généralement corrélées à l'acquisition et à la perte de la tolérance à la dessiccation des graines. Ainsi, l'étude menée par (Boudet et al., 2006) avait permis de mettre en évidence que l'abondance des protéines EM6 et PM25 était corrélée à la tolérance à la dessiccation chez *Medicago truncatula*. L'objectif de cette thèse était de mieux comprendre la fonction de PM25, en lien avec divers aspects de la qualité physiologique des graines. PM25 est un membre de la famille des D-34 dont l'appartenance aux protéines LEA a été régulièrement mise en cause dans la littérature (Tunnacliffe et Wise, 2007).

Les travaux menés au cours de cette thèse nous ont permis de confirmer que PM25 est bien une protéine LEA mais présentant des caractéristiques atypiques d'hydrophobicité. Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence son caractère amphiphile ainsi que ses propriétés protectrices vis-à-vis d'enzymes contre la congélation/séchage et vis-à-vis d'un échantillon complexe de protéines représentatif de tissus sensibles à la dessiccation dans les graines. Ainsi, nous avons montré que, comme la plupart des protéines LEA, PM25 pouvait jouer, *in vitro*, un rôle protecteur contre l'agrégation des protéines provoquée par la dessiccation ou la congélation. Nos travaux ont permis également de montrer que PM25 était capable de désagréger de manière très efficace les agrégats lors de la réhydratation ou de la décongélation. Ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse que PM25 pourrait participer à la réparation des protéines lors de l'imbibition des graines. Ceci constitue donc une première piste de travail pour la suite, que nous imaginons se dérouler en 2 étapes :

- a) Dans un premier temps, il s'agira de valider une fonction d'anti-agrégation par des études *in vivo*. Pour ce faire, nous pourrions utiliser le système cellulaire mis au point par (Chakrabortee et al., 2007) pour tester l'activité d'anti-agrégation d'une protéine LEA. Par génie génétique, ces auteurs ont obtenus des cellules humaines qui synthétisent des protéines mutées présentant des motifs de répétitions de glutamines et

alanines associés à des maladies neurodégénérative. Ces protéines ont une forte tendance à s'agréger *in vivo* en formant des globules macromoléculaires visibles en microscopie confocale. Ici, il s'agirait de tester si la coexpression de PM25 dans ces cellules réduirait leur teneur en agrégats, tel que cela a été démontré pour une protéine LEA du groupe 3.

b) Dans un 2^{ème} temps, en s'appuyant sur les 3 mutants alléliques déficients en PM25 que nous avons caractérisé, nous pourrions voir si les mécanismes de réparation des protéines sont affectés notamment après vieillissement des graines ou lors de stress thermiques. Ceci peut être envisagé par des approches sans *a priori* telles qu'une étude transcriptomique ou protéomique ou par des approches plus ciblées sur des protéines impliquées dans la réparation des protéines telles que les HSP ou le système protéasome-ubiquitine puisque ces deux système ont été suggéré comme impliqué dans la tolérance à la dessiccation (O'Mahony et Oliver, 1999).

Nos données nous ont permis de suggérer plusieurs hypothèses sur le mécanisme d'action moléculaire conduisant à la désagrégation. Nos observations contribuent notamment à l'idée émise par (Kovacs et al., 2008) selon laquelle la distinction entre chaperon et bouclier moléculaire n'a pas lieu d'être. Il serait intéressant de vérifier si le rôle protecteur correspond à une activité de chaperon moléculaire ou fait intervenir des mécanismes plus complexes liés à la déstabilisation de polymères tels que la floculation par déplétion. Ces aspects sortent du cadre de l'objectif général de cette thèse mais peuvent intéresser les biochimistes étudiant les phénomènes d'agrégation protéique dans l'agroalimentaire et surtout dans la médecine. Ainsi, une meilleure connaissance de l'influence de PM25 sur ces phénomènes pourrait déboucher sur de nouvelles applications biotechnologiques.

Nous avons également montré que PM25 possédait une séquence d'adressage nucléaire fonctionnelle. Ceci est un élément probablement important qui doit permettre de cerner sa fonction. Ici, nous avons montré sa localisation nucléaire au sein du noyau dans un système hétérologue. Il est maintenant nécessaire de valider ce résultat chez *M.truncatula*. En effet, on a démontré chez le maïs que la protéine Rab17, une LEA du groupe 2 était adressée au sein du noyau pour y être phosphorylée par une kinase nucléaire pour ensuite regagner le cytoplasme (Riera et al., 2004). De manière remarquable, cet état de phosphorylation semble conditionner

la tolérance aux stress hyperosmotiques chez *A. thaliana*. Pour vérifier la localisation de PM25 au sein de la cellule, une collaboration a été engagée au cours de ce travail de thèse avec le Dr. Jill Farrant (Université de Cape Town, Afrique du Sud). Par une technique immunocytochimique couplée à la microscopie électronique, nous pourrions non seulement valider la localisation nucléaire mais également préciser la structure à laquelle PM25 est associée (euchromatine, nucléole, nucléoplasme ; ...). La localisation cellulaire préférentielle démontrée dans ce travail couplée à l'étude *in vitro* suggèrent que PM25 aurait une fonction de protection au niveau des protéines nucléaires. Afin de mettre en évidence quelles pourraient être ses partenaires préférentiels une approche double hybride bactérien a été entamée. Par ailleurs nous savons que sous l'effet du séchage, la chromatine se condense de manière irréversible dans les radicules germées sensibles contrairement aux radicules tolérantes (LEPRINCE et al., 1995), nous pourrions donc également tester si PM25 est impliquée *in vitro* dans la dynamique conformationnelle de la chromatine.

Dans l'étude développée au cours du chapitre 3, nous avons étudié l'effet de l'extinction de *PM25* dans des mutants d'insertion, ce qui constitue à présent la deuxième étude utilisant ce type d'approche pour les protéines LEA, la première étant celle de (Manfre et al., 2006) sur EM6 chez des mutants d'*A.thaliana*. Nos données ne nous ont cependant pas permis de mettre en évidence un phénotype lié à la tolérance aux stress. Outre une analyse plus fine de la tolérance aux stress de graines mutantes *pm25*, une autre stratégie serait de surexprimer *PM25*. A cet effet, nous avons travaillé au cours de cette thèse sur l'obtention de graines transgéniques surexprimant *PM25*. Un seul transformant a été obtenu et les travaux visant à ce qu'il produise une plante porte-graine sont en cours. Les études physiologiques menées sur celui-ci nous permettrons de compléter les résultats obtenus sur les mutants déficients.

Dans la discussion du chapitre 3, nous avons présenté plusieurs hypothèses permettant d'expliquer l'absence de phénotype lié à différents aspects de la qualité physiologique des graines (tolérance au stress osmotique, longévité, dormance). Une des causes pourrait provenir d'un effet de redondance liée aux forts pourcentages de similarité des 6 gènes de la famille des D-34 à laquelle *PM25* appartient et en particulier du cluster auquel *PM25* appartient. Nos données de QPCR sur les graines

sauvages et *pm25* à différents stades de la maturation et germination suggèrent un phénomène de régulation génique afin de compenser l'absence de PM25. Ceci pourrait être vérifié *in vitro* en testant les fonctions protectrices de l'ensemble des homologues ou *in vivo* sur des doubles ou triples mutants. Les données de ce travail permettent d'établir une priorité dans les gènes candidats à étudier, à savoir D-34a et D-34c. Poursuivant l'idée de phénomène de redondance, il serait également intéressant de tester si d'autres gènes LEA répondent également à l'absence de PM25, en particulier ceux identifiés dans l'analyse protéomique de (Boudet et al., 2006) comme étant lié à la tolérance à la dessiccation. Parmi ceux-ci, nous pourrions étudier le comportement de EM6 dont (Manfre et al., 2006; Manfre et al., 2008) ont suggéré un rôle dans la maturation et la dessiccation des graines.

L'analyse des mutants *Pm25⁻* ouvre également vers une perspective remarquable : celle de la régulation de la taille et de la masse des graines. Nos données montrent que l'extinction des PM25 induit de manière significative une réduction de taille pendant le remplissage de la graine. Ceci suggère que PM25 pourrait jouer un rôle important dans le développement de la graine. Cette hypothèse rejoint celle de (Manfre et al., 2006; Manfre et al., 2008) sur la protéine EM6 chez *A. thaliana*. Nos observations doivent maintenant être consolidées en étudiant la croissance des graines au cours de leur développement afin de préciser quand la mutation *Pm25⁻* prend effet. C'est une étape préliminaire indispensable qui permettra de déterminer si PM25 influence la durée ou la vitesse de remplissage. Chez les légumineuses, il a été montré que la variation de masse des graines est strictement corrélée avec des différences dans le nombre de cellules et non dans leur taille. Il apparaît donc nécessaire de tester si cette corrélation est vérifiée dans notre matériel. La composition et le transport en sucres solubles jouent un rôle fondamental dans la prolifération cellulaire au cours de la croissance de l'embryon et la synthèse des protéines de réserve (pour revue (Ohto et al., 2006)). Dans les phases précoces du développement de la graine, les hexoses sont la principale source de sucres venant de l'apoplaste. A ce stade, il a été montré qu'un rapport élevé hexose/saccharose est corrélé avec les divisions cellulaires (revu par (Ohto et al., 2006)). Ensuite, au début de la phase de remplissage, la conversion apoplastique du saccharose en hexoses diminue fortement et le saccharose s'accumule dans l'embryon. Le rapport

hexoses/saccharose diminue alors fortement et devient corrélé avec le remplissage des graines, quel que soit la nature des réserves carbonées. PM25 pourrait donc indirectement agir sur le transport des sucres, notamment en perturbant l'homéostasie de l'eau au sein des embryons. Cependant, nos analyses sur la teneur en sucres solubles ne favorisent pas cette hypothèse. A 28 JAP, le rapport Glucose/Saccharose n'est pas significativement différent entre graines mutantes et sauvages (respectivement 0.8 ± 0.1 et 0.73 ± 0.01). Il va chuter aux environs de 0.01 dans les graines sèches pour les graines mutantes et les sauvages. De plus, l'accumulation de PM25 semble coïncider avec la phase de remplissage (c'est à dire l'augmentation de taille de cellule) et non avec la phase de divisions mitotiques. Cependant, il est nécessaire de poursuivre l'analyse des sucres en regardant des stades plus précoces.

Au vu de ses propriétés anti-aggrégatives montrées dans le chapitre 2, nous pouvons penser que PM25 pourrait jouer un rôle sur les états d'association des protéines de réserve. Cependant, cette hypothèse n'est envisageable que si les données histochimiques contredisent nos observations montrant que PM25 est adressée dans le noyau des cellules d'oignon.

Enfin, nous savons que les stress thermiques et hydriques survenant au niveau de la plante-mère pendant le remplissage des graines peuvent provoquer une diminution du poids des graines (Bredan et Egli, 2003; Samarah et al., 2004). Il serait intéressant de tester si l'absence de PM25 serait perçue par la graine en développement comme un stress qui induirait l'arrêt du remplissage de la graine de manière plus précoce que les graines sauvages. Une étude transcriptomique au cours de la maturation pourrait apporter des éléments de réponse.

Procédures

Expérimentales

Matériels

Matériel végétal et bactérien

Deux génotypes de *Medicago truncatula* ont été utilisés pour ce travail : Les études physiologiques présentée dans le chapitre 1 et 3 ont été réalisée sur des graines issues du génotype R108 de type sauvage ou présentant des insertions d'un retrotransposon (*Tnt1*) de 5.3 kb issus du tabac (Ratet et al., 2006). Les graines des lignées *pm25-1*, *pm25-2* et *pm25-3* ont été gracieusement fournies par la Samuel Noble Foundation par le Dr. A Andriankaja et K Mysore. Ces graines ont été multipliées dans le laboratoire. Les études sur l'agrégation des protéines extraites de radicules germée sont issues de graines issues du génotype Paraggio. Les souches *Escherichia coli* utilisées sont DH5- α et BL21-AI de chez invitrogen.

Anticorps

Les anticorps ont été obtenus par J.boudet, Boudet et al., 2006.

Amorces

Liste des amorces nucléotidiques utilisées dans les différentes manipulations. Les amorces ont été dessinées avec le logiciel AmplifX 1.5.4 (<http://cm2m.univ-mrs.fr/AmplifX>)

TC	nom	amorces sens	amorces antisens
Tnt	PM25F TntR	AATGAGTCAAGAACAACCAAGG	CAGTGAACGAGCAGAACCTGTG
	PM25RTntF	ACAGTGCTACCTCCTCTGGATG	CCATCACCTTACAACACAAAACAC
RT-qPCR			
TC115138	PM25	ACGGAAACTCAAGTCCCTGGAAGA	CGCACCGGTTAGACCAACTTGAA
TC117045	D-34b	AGGGAGTGATTGGAGCAGAGCTT	CACACCGCCCGGTTTGTAGTTCT
TC 125472	PM24	CACAGGGCGCACTAACATCGT	TCACCGAGTTTGGTCTTGTCTCT
TC128491	D-34a	GTGCCATGAATCCTCGGTTT	ATCCACCTGTGTTTTTACAAG
TC135172	D-34c	AAAGATGGGCCTGCTTCACTCA	CTGTGATAACACGTTTGCCTCCAT
TC128648	ECP31	ATGTGTTAACGGATGCGACGGAT	TGGATGCAGCTATTCCACCAGGTT
TC106535	MSC27	GTTGAAGTAGACATTGGTGCTAAC	AGCTGTGTCATCAACACCCTCAT
GFP			
	For_attb1-PM25	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTAGAAGGAGATAGAACCATGAGT CAAGAACAACCAAGGCG	
	PM25AttB2NS_R		GGGGACCACTTTGTACA AGAAAGCTGGGTCCATT ACATTGCCACGTT

Méthodes

Culture des plantes pour la multiplication de graines.

Les graines de *M. truncatula* sont mises à germer en boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre, dans l'eau (4ml) sur papier Whatman n°1, à l'obscurité et à 20°C. Quand la radicule mesure environ 3 mm, les graines sont repiquées dans des jardinières contenant un mélange de tourbe et de perlite (Klasmann 15, Allemagne). Les plantes sont cultivées en chambre de culture à 23°C et 70 % d'humidité relative, en photopériode 16h de jour (250 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$). Pour les études en cours de maturation, les fleurs sont annotées dès que la corolle est visible, ce qui correspond à la phase de pollinisation, puis les gousses sont récupérées au stade désiré. Les gousses sont considérées comme mures lorsque elles sont tombées de la plante mère. Elles ont été récoltées tous les 3 jours et poolées chaque semaine pour constituer un lot homogène. Selon leur stade de maturité, les gousses seront disséquées à la main (graines non mures) ou à la batteuse (graines sèches).

Conditions standard de germination

Toutes les manipulations sont faites après scarification des graines avec du papier de verre (grain très fin 150).

Pour tester la germination en conditions optimales, les graines R108 sauvages et *pm25* sont mises à imbiber dans des boîtes de pétri en verre de 9 cm, sur papier Whatman n°1 imbibé avec 3.5 ml d'eau déminéralisée à 20°C et à l'obscurité. Les graines sont considérées comme germées lorsque la radicule perce le tégument.

Germination en conditions pénalisantes

Pour déterminer la sensibilité des graines mutantes *pm25* au stress salin, les graines (3x80) sont mises à imbiber en présence d'une solution de 4 ml de NaCl 60 mM à 15 ou 20°C et à l'obscurité. Pour déterminer la sensibilité des graines mutantes *pm25* au stress osmotique, les graines sont mises à imbiber à l'obscurité dans une solution de PEG 8000 (polyéthylène glycol) (Sigma) préparé pour obtenir un potentiel hydrique de $\psi: -0.3 \text{ MPa}$ à 15 ou 20°C selon la formule de Mitchel et Kauffman (Plant Physiol)

Analyse physiologiques

Levée de la dormance

Pour déterminer la vitesse de levée de dormance au cours du stockage à sec dans les conditions du laboratoire, 80 graines sauvages et *pm25* sont mises à imbiber comme décrit en conditions standard de germination, juste après récolte puis 1 et 3 mois après récolte à 23°C et en lumière blanche continue.

Vieillessement accéléré

Pour déterminer la sensibilité des mutants *pm25* au vieillissement, les graines (3x80) matures sont incubées à 35°C hermétiquement dans une enceinte contenant une solution saturée de NaCl correspondant à une humidité relative de 75 %. Après 0, 14 et 21 jours dans ces conditions, les graines des génotypes sauvages et *pm25* (3x80) sont retirées de l'enceinte puis mise à imbiber dans les conditions décrites en conditions standard de germination.

Mesure du poids frais et sec et des teneurs en eau

Les mesures de poids frais et sec sont effectuées sur une balance d'ultra-précision Balance ultra-précision: Perkin-Elmer, AD6 auto-balance controller. Les poids sec sont obtenus après séchage des graines pendant 39 h à 95°C. Les teneurs en eau sont déduites selon la formule suivante : $TE = \frac{PF - PS}{PS}$ en g d'eau par g de matière sèche. (TE : teneur en eau ; PF : poids frais ; PS : poids sec).

Analyses biochimiques

Extraction de protéines solubles

Les différents échantillons sont broyés dans un tampon d'extraction 50 mM HEPES, pH 8, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF dans un tube eppendorf, laissés 20 minutes à incuber sur la glace puis centrifugés 20 minutes à 14000 g à 4°C. Après clarification, l'échantillon est à nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Après centrifugation, le surnageant est récupéré.

Extraction des protéines de réserves

Les protéines de réserves, sont extraites de manière séquentielle dans des tampons contenant 0, 0.2 puis 1 M de NaCl, qui permettent respectivement de récupérer les albumines, vicilines, légumine. (Krochko et Bewley, 1988). Le culot obtenu lors de l'extraction des protéines solubles est lavé dans 1 ml de tampon d'extraction supplémenté par du NaCl 0.2 M. Après centrifugation 14000 g pendant 30 min à 4°C, le surnageant (fraction 0.2 M NaCl) est récupéré. Le culot obtenu est resuspendu dans le tampon d'extraction contenant NaCl 1 M.

Une nouvelle centrifugation est effectuée dans les mêmes conditions et le surnageant, (fraction 1 M NaCl) est récupéré.

Extraction de protéines natives

les échantillons sont broyés dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7.8 ; EDTA 1 mM ; EGTA 1mM ; DTT 1mM ; NaVO₄ 1 mM ; NaCl 150 mM ; 1% glycérol ; 1% Igepal ; 8 µl d'inhibiteur de protéases (Roche) Les échantillons sont ensuite centrifugés 20 minutes à 14000 g et à 4°C, le surnageant contenant les protéines est récupéré et dosé.

Extraction de protéines totales

Pour les extractions de protéines totales, les protéines sont extraites selon le protocole de Gallardo *et al.*, 2002.

Dosage des protéines

Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant comme référence l'albumine sérique bovine (BSA) (Sigma) et avec le réactif Bio-Rad protein ASSAY selon les recommandations du fabricant.

Electrophorèse de protéines

Les échantillons protéiques issus des différentes expériences sont repris dans un tampon de dépôt (Tris 12 mM pH 6,8 ; glycérol 10 % (v/v) ; SDS 0,4 % (m/v) ; bleu de bromophenol 0,02 % (m/v) ; DTT 0,8 mM) puis chauffés 5 min à 100°C avant dépôt sur gel. Des protéines de référence (BioRad) de masse moléculaire connue, traitées de la même manière sont également déposées sur gel pour la détermination des masses moléculaires des échantillons à analyser. Les électrophorèses sont réalisées sur gel de polyacrylamide 12 % en présence de 0,1 % de SDS (SDS-PAGE).

Les gels sont formés de deux phases :

- Phase supérieure dite de concentration : acrylamide 4,2 % (m/v), bisacrylamide 0,1% (m/v) ; Tris-HCl 0.125 M pH 6,8 ; SDS 0,1 % (m/v) ; persulfate d'ammonium 0,006 % (m/v), N,N,N',N'-tétraméthylethylènediamine 0,16% (v/v)
- Phase inférieure dite de séparation : acrylamide 12 % (m/v), bisacrylamide 0,32 % (m/v), Tris-HCl 0.125 M pH 8,8, glycérol 10% (v/v), SDS 0,4% (m/v), persulfate d'ammonium 0,06% (m/v), N,N,N',N'-tétraméthylethylènediamine 0,15% (v/v).

L'électrophorèse se déroule à température ambiante avec un prévoltagage de 15 minutes à 25 V puis 1 heure à 200 V dans un tampon de migration composé tel que : Tris 15,6 mM ; glycine 120 mM pH 8,0 additionné de SDS 0,1 % (m/v).

Pour les protéines extraites en conditions natives, le même protocole est suivi mais en l'absence de SDS. Après électrophorèse les protéines présentes dans le gel sont soit détectées par coloration en bleu colloïdal (sigma) selon les recommandations du fabricant soit transférées sur membrane de nitrocellulose pour immunodétection.

Immunodétection

Après électrophorèse, le gel est équilibré 2 x 10 min dans le tampon de transfert composé du tampon d'électrophorèse supplémenté de 20 % de méthanol (v/v). Les polypeptides sont transférés électriquement sur membrane de nitrocellulose (Protran Whatman 0.2 μ) 1h avec un voltage constant (100 V) dans le tampon de transfert supplémenté en SDS 0,01 % (m/v) (Towbin *et al.*, 1979). Après transfert, la membrane est rincée à l'eau milliQ 2x10 min. La saturation des sites de fixations libres est effectuée par incubation 1h à température ambiante sous agitation dans une solution saline tamponnée TBS (Tris 10 mM pH : 7,5 ; NaCl 0,15 M) additionné de Tween-20 1,5 % (v/v). Les lavages et les dilutions d'anticorps sont réalisés dans une solution de TBS-Tween-20 0,05% (v/v) (TBST). Après un rinçage de 2x5 min dans le TBST, la membrane est incubée 1 h avec l'anticorps anti-PM25 (dilution 1/10000) ou anti-EM6 (dilution 1/20000) à l'obscurité et à température ambiante. Après 2 nouveaux rinçages de 5 min dans du TBST la membrane est incubée avec un anticorps anti-IgG de lapin couplé à une peroxydase (Biosource International Camarillo, CA, USA) (dilution 1/50000). Après incubation avec l'anticorps secondaire la membrane est rincée 5 min dans du TBST et 2x5 min dans du TBS sous agitation. Le complexe antigène-anticorps est révélé par chemiluminescence avec le kit Biorad immune-star Western C selon les instructions du fabricant et visualisé au moyen d'un imageur (Molecular Imager ChemiDoc XRS system, Bio Rad).

Empreinte tissulaire

Une membrane de nitrocellulose Protran Whatman 0,2 μ est incubée pendant 30 min dans une solution de 0.2 M de CaCl₂ puis séchée. Des graines de *M.truncatula* R108 et *pm25-1* sont imbibées 3h à 20°C à l'obscurité puis sectionnées longitudinalement avec une lame de rasoir. Elles sont appliquées fermement en contact avec la membrane pendant environ 5 secondes. L'empreinte de travail est effectuée par un deuxième contact de 15 sec sur la

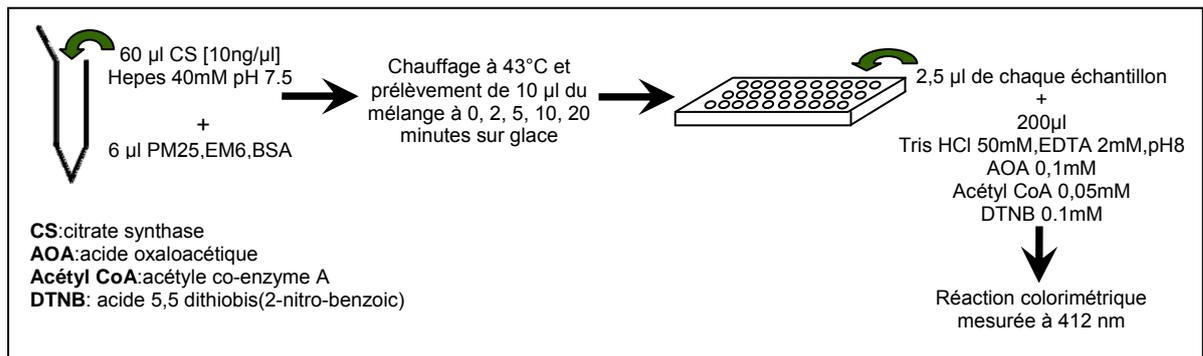


Figure M1 : Schéma de chauffage de la citrate synthase

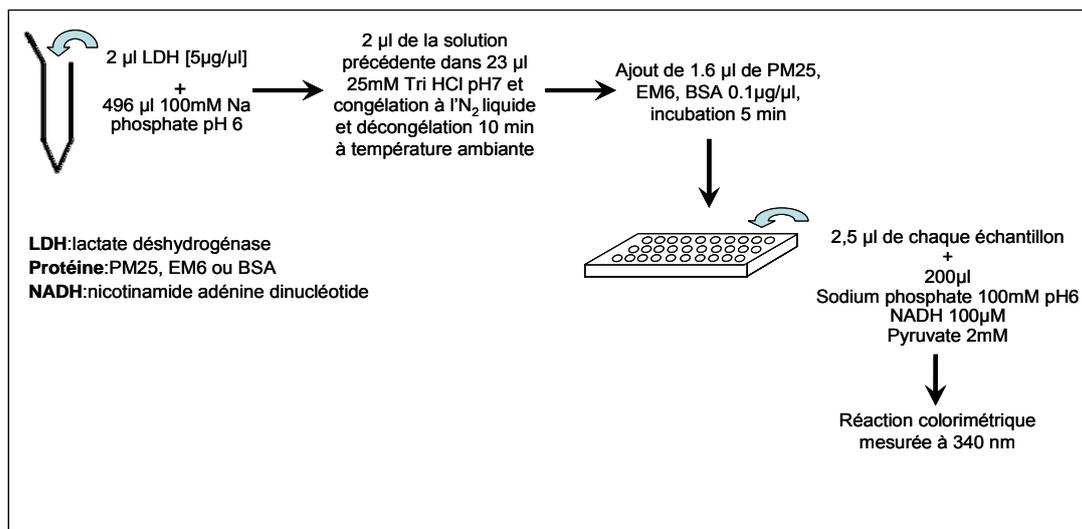


Figure M2 : Schéma de congélation de lactate déshydrogénase

membrane. La quantité de protéines déposées sur l’empreinte est vérifiée par rouge Ponceau. Après plusieurs lavages de décoloration à l’eau distillée, la membrane est hybridée avec l’anticorps dirigé contre PM25 comme décrit précédemment. Pour l’immunodétection le protocole présenté précédemment est utilisé. L’anticorps secondaire utilisé est un anticorps anti-lapin anti-IGg couplé à une phosphatase alcaline (1/5000). La révélation se fait en \approx 1 minute avec du BCIP-NBT -Blue liquid substrate system for membrane (Sigma-Aldrich).

Extraction de sucres solubles

Pour les dosages effectués au stade 28 JAP, les graines sont lyophilisées avant l’extraction. Pour les graines sèches ce traitement n’est pas nécessaire. Les graines sont pesées afin d’avoir 15 à 20 mg de matériel. Elles sont broyées au broyeur à billes (billes de 5mm, tissu lyser (Qiagen)), à une fréquence de 30/s pendant 2 minutes puis mélangées vigoureusement dans 1 ml de méthanol 80 % auquel nous avons ajouté 40 μ l de mélizitose (4g/l) qui servira de témoin interne lors des mesures. Le mélange est incubé 15 minutes à 76°C dans un bain marie, agiter au vortex puis, le méthanol est évaporé au speed-vac durant 2h. Les culots obtenus sont repris dans 1 ml d’eau milliQ puis centrifuger 5 minutes à 14000 g et à 4°C. Le surnageant est dilué 8 à 16 fois dans l’eau milliQ pour l’analyse en dionex.

Les oligosaccharides, le saccharose, et le glucose sont analysés par un système DIONEX BioLC équipé d’une précolonne AS11 ion exchanger et d’une colonne Dionex CarboPac PA1 (4 x 250 mm) et un solvant compatible avec la cellule de détection électrochimique (electrode de travail en or et electrode de référence Ag/AgCl) en utilisant de l’eau ultrapure comme solution E1 et du NaOH à 0,1M comme solution E2. Les sucres sont séparés avec 100 mM NaOH à 0.25 mL/min pendant 45 minutes, suivi par une étape de rinçage (150 mM NaAc, 850 mM NaOH) de 5 minutes avant de re-équilibrer la colonne avec 100 mM NaOH). Les temps de rétention de chaque sucre sont évalués par un standard qui permet également la quantification absolue des sucres.

Mesures de protection enzymatique

Préparation des solutions stock et dosage enzymatique

La citrate synthase (CS) EC 4.1.3.7 de cœur de porc (Sigma) est dialysée contre un tampon 50 mM Tris/HCl et 2 mM EDTA (pH 8.0) puis diluée dans 40 mM HEPES (pH 7.5) à la concentration finale de 10 μ g/ml. La lactate déshydrogénase (LDH) EC 1.1.1.27 de muscle de lapin (Roche) est diluée dans un tampon Tris/HCl 25 mM (pH 7.0) à la concentration finale de 10 μ g/mL (solution stock) 0.01 mg/ml.

Mesures de l'activité enzymatique

L'activité de la citrate synthase est mesurée selon la méthode de Srere (1966). 2,5 µl de solution contenant l'enzyme supplémentée ou non en protéines protectrices sont ajoutés dans 200 µl de solution réactionnelle composée de 50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA, 0.1 mM d'acide oxaloacétique, 15 mM d'acétyl CoA, 10 mM de DTNB. La citrate synthase en présence d'acétyl CoA 15 mM et d'acide oxaloacétique 0.1 mM va permettre la formation de citrate et de CoASH, ce dernier réagissant avec le DTNB 10 mM pour former un complexe détectable à 412 nm. La formation de ce complexe est suivie dans des plaques de 96 puits au moyen d'un spectrophomètre. L' A_{412} est enregistrée toutes les 3 secondes pendant 10 minutes. L'activité de la lactate déshydrogénase est suivi en ajoutant 2.5 µl de solution d'enzyme supplémenté ou non en protéines protectrices à 200 µl de solution réactionnelle composé de 100 mM NaPO₄ (pH6), 2 mM NaPyruvate, 100 µM NADH. Son activité est également suivie en spectrophotométrie à 340 nm. Les changements de A_{340} sont mesurés toutes les 3 secondes pendant 10 minutes. Toutes les mesures sont répétées 3 à 6 fois en triplicats techniques.

Test de protections

Chauffage de la citrate synthase

60 µl de solution de citrate synthase sont chauffés pendant différents temps dans un tube eppendorf de 1.5 ml dans un thermomixer eppendorf à 43°C, puis refroidi sur glace, en présence de 6 µl d'H₂O, ou de 6 µl de solution de PM25, EM6, BSA (sigma) (0.2 µg/µl) afin d'obtenir des ratios massique de 1 :1, 2 :1, 4 :1 (protectant : enzyme), ou en présence de glycérol 40 ou 60 %. 10 µl d'échantillon sont prélevés à différents temps de chauffage (Figure M1). L'apparition du complexe CoASH + DTNB reflétant l'activité enzymatique est mesuré.

Séchage de la citrate synthase

1 µl d'H₂O ou de solution de PM25, EM6, BSA (0.2µg/µl) est ajouté à 10 µl de citrate synthase afin d'obtenir le ratio massique voulu (protectant : enzyme). 2.5 µl de l'échantillon sont ensuite séché en plaque 96 puits pendant 4h à 20°C et à 43 % ou 75 % d'humidité relative, puis réhydraté dans 50 µl de 50 mM tris/HCl, 2 mM EDTA (pH 8.0) pendant 30 minutes, puis 150 µl de solution réactionnelle est ajoutée et l'activité résiduelle est mesurée.

Congélation de la lactate déshydrogénase

Pour les expériences de congélation, 20 µl de solution stocks de LDH sont congelés dans un tube eppendorf de 1.5 ml pendant une minute en présence d'azote liquide, puis décongelé 10 minutes à température ambiante. 2 µl d'H₂O milliQ, ou de solution de PM25, EM6, BSA ou lysozyme sont ajoutés pendant ou après le traitement afin d'obtenir des rapport massique de 1:1, 2:1, 4:1, 6:1, et. 10:1.

Séchage de la lactate déshydrogénase

Pour les expériences de séchage, on procède de la même manière que pour la citrate synthase, puis on réhydrate dans 50µl de NaPO₄ 100mM (pH 6.0), après 5 minutes 150 µl du milieu réactionnel est ajouté et l'activité est mesurée.

Tests de protection sur des extraits protéiques totaux

Les protéines solubles issues de 100 radicules disséquées dans des graines germées au stade 5 mm de *Medicago truncatula* sont extraites de manière conventionnelle (cf. extraction protéique) dans 500 µl de tampon. Après extraction, l'échantillon est dialysé 2 x 2 h dans 1 L d'eau milliQ ou de tampon citrate concentration à différents pH. Pour les tests de congélation, les protéines sont congelées à -20°C pendant 2h et décongelées 20 minutes à température ambiante, les cycles sont multipliés selon les besoins de l'expériences. Après décongélation, 15 µl de solution protéique sont mélangés à 15 µl d'eau milliQ ou de solution contenant PM25, EM6, BSA en 1 :1 ou 2 :1 (rapport massique PM25 : protéine). L'absorbance de l'échantillon à 280 et 340 nm est mesurée dans 2 µL. La turbidité de l'échantillon est estimée par le rapport A₃₄₀/A₂₈₀. Les échantillons sont ensuite centrifugés 20 min à 14000 g et à 4°C, le surnageant et le culot sont récupérés. Le culot est repris dans 25 µl de et le surnageant dans 5 µl de tampon de dépôt (5X DTT). Les culots et surnageant sont mis à migrer sur gel SDS-PAGE 1D. Pour tester l'effet du la dessiccation, les échantillons (15µl) après dialyse sont été séchés dans un tube eppendorf pendant 7 jours à 43 % d'humidité relative et 20°C, puis réhydraté avec 15 µl d'eau pendant 4 h. Ils sont soumis à la spectrophotométrie pour déterminer le rapport A₃₄₀/A₂₈₀ et ensuite centrifugés de la même façon que précédemment. Le culot et surnageant sont ensuite analysés sur gel SDS PAGE en 1 D

Techniques de biologie moléculaire

Extraction d'ADN

L'ADN de feuilles de *M.truncatula* est extrait selon un protocole adapté de Dellaporta et al., 1983. Un gramme de feuilles est broyé à l'azote liquide, puis la poudre est mélangée à 15 ml de tampon d'extraction (Tris-HCl 100mM pH 8.0, EDTA 50 mM, NaCl 500 mM, bisulfite de sodium 150 mM). 1ml de SDS 20% est ajouté, le mélange est vortexé puis incubé à 65°C pendant 10 minutes. 5 ml d'acétate de sodium 5 M sont ajoutés, mélanger en inversant le tube, puis la solution est laissée 15 min sur la glace. Le mélange est ensuite centrifugé à 12000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est récupéré, filtré sur gaze et les acides nucléiques sont précipités par ajout d'un volume d'isopropanol. Afin de sédimenter les acides nucléiques, la solution est centrifugée pendant 20 minutes à 12000 g et à 4°C. Le culot d'acides nucléiques est resuspendu dans 700 µl de tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1mM). La solution obtenue est traitée à la RNaseA 200 µg/ml. Un volume de mélange phénol-chloroforme saturé dans du tampon TE est ajouté, la solution est vortexée vigoureusement puis centrifugée 5 minutes à 14000 g et 4°C. La phase aqueuse est récupérée et additionnée d'un volume de chloroforme-isoamylalcool (24:1), l'ensemble est vortexé vigoureusement puis centrifugé pendant 5 minutes à 4°C et 14000 rpm. La phase aqueuse est récupérée, un volume d'isopropanol et 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5.8) sont ajoutés. Nous centrifugeons de nouveau 20 minutes à 4°C et 12000 g. Le surnageant est supprimé, le culot est remis en suspension dans 50 µl de tampon TE. La concentration d'ADN ainsi que sa pureté sont vérifiées en spectrophotomètre (nanodrop, Labtech international).

Extraction d'ARN

25 graines du génotype R108 sauvages et *pm25-1* sont broyées, à sec pour les graines sèches ou à l' N_2 liquide au broyeur à bille (2 billes de 5 mm) pour le matériel frais (graines 28 japs, radicules). Les ARN sont extraits selon la méthode de Verwoerd et al (1989). Sur la poudre obtenue, 1 ml de tampon constitué de phénol-tampon de lyse (1 :1) préchauffé à 80°C est ajouté. (Tampon de lyse : LiCl 0.1 M ; Tris 0.1 M pH 8.0 ; EDTA 10 mM ; SDS 1%). Le mélange est vortexé 30 secondes puis centrifugé 5 minutes à 14000 g et 4°C. La phase aqueuse est récupérée et additionnée de LiCl 4 M. Le mélange est laissé la nuit à 4°C, puis centrifugé 15 minutes à 14000 g et à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 250 µl d'eau milliQ. 25 µl d'acétate de sodium 3 M pH 5.2 est ajouté, nous mélangeons bien et nous rajoutons 2.5 volume d'éthanol 100 %. L'ensemble est mis pendant 2h à -20°C pour laisser précipiter les ARN, puis centrifuger 10 minutes à 14000 g et 4°C. Le surnageant est

éliminé, le culot est lavé avec 500 µl d'éthanol 70%, puis avec 500 µl d'éthanol 100%. Le culot est ensuite séché sous la hotte et dissous dans 50 µl d'eau milliQ, puis dosé au spectrophotomètre (Nanodrop), son intégrité est vérifiée sur gel d'agarose 1.2 % (m/v) préparé avec un tampon TAE 0,5x (20mM Tris acétate, 1mM EDTA pH 8.0) auquel est incorporé du SybrSafe au 1/10000^{ème}. La migration se déroule à 100V dans le tampon TAE 0,5x. Les acides nucléiques sont visualisés sous UV à 312 nm au Chemidoc (BioRad).

RT-qPCR

Transcription reverse

Pour la transcription reverse le kit Quantitect (Qiagen) est utilisé. Les ARNm des différents échantillons sont équilibrés à une concentration comprise entre 95 et 105 ng/µl. 10 µl de solution d'ARNm (100ng/µl) sont mélangés avec 4 µl de mix DNase (2 µl d'H₂O + 2 µl de DNA wipe out). L'ensemble est incubé 2 minutes à 42°C puis remis immédiatement sur glace. Le mix RT est alors ajouté : 4 µl de tampon RT 5X, 1 µl de Reverse transcriptase, 1 µl d'oligo-dT. Les tubes sont incubés 20 minutes à 42°C, 10 minutes à 95°C, puis remis sur glace.

PCR quantitative en temps réel

10 µl d'ADNc sont mélangés avec 6.5 µl d'H₂O milliQ stérile, 7 µl de SYBR® Green, 2 x 0.75 µl d'amorces à 10 µg/µl soit 25 µl final. Toutes les réactions sont faites en trois réplicats. Les amorces utilisées ont été dessinées grâce au logiciel AmplifX et possèdent toutes un T_m (temperature melting) entre 58 et 60°C. L'absence de variation de quantité d'ARNm entre les différents échantillons est déterminée et normalisée par le suivi de l'expression d'un gène dont l'expression est constitutive et invariante au cours de la germination, *Msc27* (Bouton et al., 2005). Les mesures sont effectuées en plaque 96 puits avec l'ABI PRISM 7100 Sequence Detection System. Le blanc est évalué sur les cycles compris entre 3 et 19 et le seuil à environ ¾ du maximum d'intensité de fluorescence. Le logiciel d'analyse des courbes de dissociation d'Applied Biosystems est utilisé pour s'assurer de la spécificité du produit de l'amplification. Le programme suivant est utilisé : 5 min à 94°C, 35 cycles 15 s à 94°C, 1 min à 59°C.

L'expression relative des gènes étudiés est calculée selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et Schmittgen, 2001)

Nous utilisons la formule suivante :

Expression relative = $2^{-((CT \text{ du gène au stade étudié} - CT \text{ du gène au stade de référence}) - (CT \text{ du gène de référence au stade étudié} - CT \text{ du gène de référence au stade de référence}))}$

Dans cette formule, la valeur de CT représente le nombre de cycles obtenu en Q-P-PCR, et le gène de référence Msc27.

La dilution des ADNc obtenus est adaptée pour obtenir un nombre de Ct compris entre 20 et 30.

Tests de protection bactérienne

Les bactéries BL21-AI (*E.coli*) transformées avec le plasmide pDEST17-PM25 obtenues par J. Boudet et al., (2006) sont utilisées pour les tests UV et séchage. Une pré-culture dans 5 ml de LB + carbénicilline (100 µg/ml) est faite à 37°C et 250 rpm, puis 150 ml de LB + carbénicilline (100 µg/ml) sontensemencés avec 2 ml de la pré-culture. Lorsque la DO₆₀₀ atteint ≈ 0,5, la solution est divisée en trois aliquots, 50 ml sans traitement, 50 ml avec induction de la production de PM25 par ajout de L-arabinose 0.2 % (m/v) et 50ml avec répression de PM25 par ajout de glucose 0.1 % (m/v). Les solutions bactériennes sont misent à 37°C, 250 rpm pendant 2h.

Tests de protection contre les UV

Après 2h, la DO₆₀₀ est mesurée, les bactéries sont centrifugées pendant 2 minutes à 4500 rpm, le surnageant est ôté, le volume approprié de LB + carbénicilline (100 µg/ml) est ajouté afin d'avoir une DO₆₀₀ de 0,7, après avoir décollé le culot et remis en culture les bactéries dix minutes à 250 rpm et 37°C. Les bactéries amenées à une DO de 0,7 sont soumises à des tests UV dans l'UV stratalinker 2400 (stratagène). Pour ce faire, 5 ml de la solution bactérienne est étalé sur boîte de Pétri vide, que l'on expose à différentes doses d'UV : 50 mJ.cm⁻² et 900 mJ.cm⁻². Nous ensemençons 10 ml de LB + carbénicilline (100 µg/ml) avec les 5 ml ainsi traité. La DO est suivie au cours du temps à 37°C et 250 rpm.

Test de protection face au séchage

Les bactéries sont traitées de la même façon qu'indiquée précédemment, la DO₆₀₀ est amenée à ≈ 1. 2 ml de chaque culture est centrifugé à 4500 rpm pendant 4 minutes, le surnageant est ôté et les culots sont séchés sur différentes solutions salines permettant d'obtenir des

humidités relatives (HR) spécifiques. Sels de NaCl : 75 % d'HR, sels de K₂CO₃ : 43 % d'HR et silicagel : moins de 10 % d'HR. Les culots sont laissés 1 semaine à 20 °C et à l'obscurité, puis repris précautionneusement dans 1 ml de LB + carbénicilline (100 µg/ml). Le taux de survie bactérien est évalué par dilution en série de 10⁻¹ à 10⁻⁷. 3 gouttes de 10 µl de chaque dilution sont déposées sur boîte de pétri LB solide + carbénicilline (100 µg/ml) et laissées incuber une nuit à 37°C.

Biolistique

Clonage de pMDC83-PM25

La technologie gateway s'appuie sur les propriétés de recombinaison homologue du bactériophage lambda au niveau de sites spécifiques *att* qu'il utilise naturellement pour s'intégrer dans le génome d'*E. coli* (Landy, 1989). Une PCR avec la taq Phusion high fidelity (Finnzyme) afin de récupérer la séquence d'ADNc pleine longueur de *PM25* est effectuée sur le plasmide pCR8 utilisé pour la surexpression. Les amorces utilisées contenant les séquences de recombinaison spécifique *AttB1* en amont et *AttB2* en aval sont présentées dans le tableau des amorces tel que :

Le fragment de PCR obtenu est purifié avec le kit Wizard® SV Gel an PCR Clean-Up System (Promega) selon les recommandations du fabricant. Le fragment est alors inséré dans le vecteur d'entrée pDONR207 (Invitrogen) par réaction de BP clonase selon les recommandations du fabricant. L'enzyme présente dans le kit BP clonase va reconnaître de manière spécifique les sites *attP1* et *attP2* présents dans pDONR207 ce qui va conduire à une recombinaison entre les sites *attB* et *attP* pour former les sites de recombinaison homologue *AttL1* et *AttL2* et l'insertion de *PM25*. Le produit de réaction BP est laissé incuber pendant la nuit à température ambiante. On procède à la réaction LR à partir de 10 µl de solution contenant produit de réaction BP. Pour ce faire on ajoute 2 µl du vecteur d'expression pMDC83 à 103 ng/µl et 3 µl de LR clonase enzyme Mix. Le mélange est mélangé brièvement puis laissé incuber 2 h à 25°C. La réaction est stoppée par ajout de 2 µl de protéinase K et incubation 10 minutes à 37°C. Les produits des réactions BP et LR sont introduits dans des bactéries chimio-compétentes DH5α selon les recommandations de Invitrogen. Les bactéries sont étalées sur du LB contenant de la gentamicine à 7 µg/ml afin de sélectionner les bactéries transformées avec pDONR207 pour la réaction BP, et étalées sur LB contenant de la kanamycine à 100 µg/ml pour sélectionner les bactéries transformées avec pMDC83 pour

la réaction LR. Une PCR est réalisée sur les colonies obtenues après la réaction LR afin de vérifier la présence de *PM25* avec les amorces :

MtPM25int_F TCCGCCGCTACACGAAATGA
MtPM25int_R CACGTTGACACTCAGCATTG
Taille attendue: 390pb

Une colonie présentant une insertion correcte de notre gène dans le plasmide pMDC83 est remise en culture puis une midi prep est réalisé avec le kit Nucleo-Bond (Macherey-Nagel). Le plasmide purifié obtenu est envoyé à séquencer afin de vérifier l'intégrité de notre gène d'intérêt avec les amorces suivantes :

pDONR_207_for :TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC
pDONR_207_Rev :GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC

Bombardement des cellules d'oignon

Le plasmide pMDC83 contenant l'insertion de *PM25* est précipité afin d'obtenir une concentration de 1µg/µl nécessaire au bombardement. Pour ce faire, l'ADN plasmidique issu de la midi-prep est mélangé à 1/10^{ème} d'acétate de sodium 3M pH 5,2 et 2,5 volumes d'éthanol 100%. L'ensemble est mélangé délicatement et laissé 2 h à -20°C. La solution est ensuite centrifugée 15 minutes à 14000 g et 4°C. Après avoir éliminé le surnageant, le culot est rincé à l'éthanol 70 % et centrifugé à nouveau pendant 5 min. Le culot est ensuite rincé à l'éthanol 100 %, puis séché et resuspendu dans un tampon TE (1 mM EDTA ; 100 mM Tris ; pH 7.5).

Les billes d'or sont préparées telle que nous pesons 60 mg de billes d'or. Ces 60 mg sont lavés dans 1 ml d'éthanol 70 %. L'ensemble est vortexé pendant 5 minutes puis laissé reposer 15 minutes. Les billes sont récupérées par centrifugation pendant 5 sec et lavées selon la même procédure en présence d'eau milliQ stérile. L'ensemble de ces étapes est répété 3 fois puis les billes sont suspendues dans 1 ml d'éthanol 50 %. Tout en vortexant, 10 µl sont prélevés auxquels on ajoute 2 µL d'une solution de plasmide pMDC83-PM25 (ADN= 1µg/ml) ; 10 µl de CaCl₂ 2,5 M ; 4 µl de spermidine 0,1 M. Après 3 min d'agitation en vortex et 1 min de décantation, l'échantillon est centrifugé 5 sec à 13000 g. Sans resuspendre les billes, le culot est lavé délicatement avec 50 µl d'éthanol successivement à 70 % et 100 %. Les billes sont ensuite resuspendues dans 13 µl d'éthanol. Cette préparation sera déposée sur un disque macrocarriers (Bio-Rad) selon les recommandations du fabricant et bombardé à une pression de 650 ψ sur un bulbe d'oignon écaillé. Après 48 h à 20 °C, à l'obscurité et à 100 % HR, l'épiderme d'oignon est prélevé, incubé 30 minutes dans du DAPI® (4',6-

diamidino-2-phenylindole) et observé avec les filtres nécessaires à l'observation pour le DAPI® : 310 nm et GFP (Green Fluorescent Protein) : 395 nm.

Techniques biophysiques

Dichroïsme circulaire

Les expériences de dichroïsme circulaire ont été réalisées au sein de l'unité de recherche Biopolymères Interactions Assemblage de l'INRA (centre Angers-Nantes) avec un dichrographe Jobin-Yvon CD6, en utilisant une cellule de mesure avec un trajet optique de 0,5 mm ou 0,2 mm. Toutes les expériences sont réalisées dans un tampon phosphate de sodium 5 mM pH 7,5. Les spectres obtenus ont été analysés par la méthode CDSTR développée par Sreerama et Woody (2000) en utilisant le programme DICHROWEB (Lobley et al, 2002).

Mesure de diffraction dynamique de la lumière

Le volume des agrégats formés par congélation de l'échantillon protéique de radicules 5 mm est mesuré à l'aide du Nanosizer (Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) selon Nigen et al., (2007). L'appareil va projeter un faisceau laser sur l'échantillon à 488 nm, la lumière va être plus ou moins réfléchiée par les particules, et le programme informatique intégré va déterminer la taille des particules. Les mesures ont été effectuées en présence ou en absence de PM25 à 25°C et 5°C.

Les particules de grandes tailles dépassant la résolution de l'appareil ont été observées à température ambiante sous microscope optique (Olympus BX51TF) à un agrandissement 65X. 2 µl d'échantillon ayant subi un cycle de congélation/décongélation en présence de PM25 ou non est étalé sur lame de verre en triplicats. Des échantillons non congelés sont également observés comme témoin. 5 à 10 images par réplicats sont prises et analysées grâce au programme ImageJ, version 1.41o (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

Références Bibliographique

- Alamillo, J., Almoguera, C.n., Bartels, D., and Jordano, J.** (1995). Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular Biology* **29**, 1093-1099.
- Allagulova, C.R., Gimalov, F.R., Shakirova, F.M., and Vakhitov, V.A.** (2003). The Plant Dehydrins: Structure and Putative Functions. *Biochemistry (Moscow)* **68**, 945-951.
- Alban, C., Job, D., and Douce, R.** (2000). BIOTIN METABOLISM IN PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 17-47.
- Allison, S.D., Chang, B., Randolph, T.W., and Carpenter, J.F.** (1999). Hydrogen Bonding between Sugar and Protein Is Responsible for Inhibition of Dehydration-Induced Protein Unfolding. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **365**, 289-298.
- Alpert, P.** (2005). The Limits and Frontiers of Desiccation-Tolerant Life. *Integr. Comp. Biol.* **45**, 685-695.
- Alsheikh, M.K., Heyen, B.J., and Randall, S.K.** (2003). Ion Binding Properties of the Dehydrin ERD14 Are Dependent upon Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 40882-40889.
- Arenas-Mena, C.s., Raynal, M., Borrell, A., Varoquaux, F., Cruz Cutanda, M., Stacy, R.A.P., Pages, M., Delseny, M., and Cuiñanez-Macia, F.A.** (1999). Expression and cellular localization of Atrab28 during *Arabidopsis* embryogenesis. *Plant Molecular Biology* **40**, 355-363.
- Artus, N.N., Uemura, M., Steponkus, P.L., Gilmour, S.J., Lin, C., and Thomashow, M.F.** (1996). Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 13404-13409.
- Bailey, P.C., Lycett, G.W., and Roberts, J.A.** (1996). A molecular study of dormancy breaking and germination in seeds of *Trollius ledebouri*. *Plant Molecular Biology* **32**, 559-564.
- Bailly, C.** (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* **14**, 93-107.
- Bailly, C., Leymarie, J., Lehner, A., Rousseau, S., Come, D., and Corbineau, F.** (2004). Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. *J. Exp. Bot.* **55**, 475-483.
- Bailly, C., Audigier, C., Ladonne, F., Wagner, M.H., Coste, F., Corbineau, F., and Come, D.** (2001). Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *J. Exp. Bot.* **52**, 701-708.
- Baker, J., dennSteele, C., and Dure, L.** (1988). Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology* **11**, 277-291.
- Bartels, D., Singh, M., and Salamini, F.** (1988). Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. *Planta* **175**, 485-492.
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Etwiller, L., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Howe, K.L., Marshall, M., and Sonnhammer, E.L.L.** (2002). The Pfam Protein Families Database. *Nucl. Acids Res.* **30**, 276-280.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garciarrubio, A., Campos, F., and Covarrubias, A.A.** (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology* **148**, 6-24.
- Battista, J.R., Park, M.-J., and McLemore, A.E.** (2001). Inactivation of Two Homologues of Proteins Presumed to Be Involved in the Desiccation Tolerance of Plants Sensitizes

- Deinococcus radiodurans* R1 to Desiccation. *Cryobiology* **43**, 133-139.
- Beere, H.M., and Green, D.R.** (2001). Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends in Cell Biology* **11**, 6-10.
- Benedito, V., Torez-Jerez, I., Murray, J., 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, P., Tang, Y., and Udvardi, M.** (2008). A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* **55**, 504-513.
- Bentsink, L., Alonso-Blanco, C., Vreugdenhil, D., Tesnier, K., Groot, S.P.C., and Koornneef, M.** (2000). Genetic Analysis of Seed-Soluble Oligosaccharides in Relation to Seed Storability of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **124**, 1595-1604.
- Ben-Zvi, A.P., and Goloubinoff, P.** (2001). Review: Mechanisms of Disaggregation and Refolding of Stable Protein Aggregates by Molecular Chaperones. *Journal of Structural Biology* **135**, 84-93.
- Bewley, J.D.** (1979). Physiological Aspects of Desiccation Tolerance. *Annual Review of Plant Physiology* **30**, 195-238.
- Bewley, J.D.** (1997). Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* **9**, 1055-1066.
- Bewley, J.D., and Black, M.** (1994). *Seeds: Physiology of development and germination*. New York: Plenum Press.
- Bies-Ethève, N., Gaubier-Comella, P., Debures, A., Lasserre, E., Jobet, E., Raynal, M., Cooke, R., and Delseny, M.** (2008). Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **67**, 107-124.
- Blackman, S.A., Obendorf, R.L., and Leopold, A.C.** (1992). Maturation Proteins and Sugars in Desiccation Tolerance of Developing Soybean Seeds. *Plant Physiol.* **100**, 225-230.
- Blackman, S.A., Obendorf, R.L., and Leopold, A.C.** (1995). Desiccation tolerance in developing soybean seeds: The role of stress proteins. *Physiologia Plantarum* **93**, 630-638.
- Borrell, A., Cutanda, M.C., Lumberras, V., Pujal, J., Goday, A., Culiáñez-Macià, F.A., and Pagès, M.** (2002). *Arabidopsis thaliana* Atrab28: a nuclear targeted protein related to germination and toxic cation tolerance. *Plant Molecular Biology* **50**, 249-259.
- Boubriak, I., Kargiolaki, H., Lyne, L., and Osborne, D.J.** (1997). The requirement for DNA repair in desiccation tolerance of germinating embryos. *Seed Science Research* **7**, 97-106.
- Boudet, J., Buitink, J., Hoekstra, F.A., Rogniaux, H., Larre, C., Satour, P., and 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.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Bravo, L.A., Gallardo, J., Navarrete, A., Olave, N., Martínez, J., Alberdi, M., Close, T.J., and Corcuera, L.J.** (2003). Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. *Physiologia Plantarum* **118**, 262-269.
- Bray, E.A.** (1994). *Stress-induced gene expression in plants*, Harwood Academic Publishers.
- Bray, E.A.** (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* **2**, 48-54.
- Bray, E.A.** (2000). Responses to abiotic stress. Buchanan RB, Gruissem W, Jones RL (eds) *Biochemistry and molecular biology of plants*. The American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 1158-1203.

- Brevedan, R.E., and Egli, D.B.** (2003). Short periods of water stress during seed filling, leaf senescence, and yield of soybean. *Crop science* **43**, 2083-2088.
- Brini, F., Hanin, M., Lumbreras, V., Amara, I., Khoudi, H., Hassairi, A., Pages, M., and Masmoudi, K.** (2007). Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* **26**, 2017-2026.
- Browne, J.A., Dolan, K.M., Tyson, T., Goyal, K., Tunnacliffe, A., and Burnell, A.M.** (2004). Dehydration-Specific Induction of Hydrophilic Protein Genes in the Anhydrobiotic Nematode *Aphelenchus avenae*. *Eukaryotic Cell* **3**, 966-975.
- Bruni, F., and Leopold, A.C.** (1991). Glass Transitions in Soybean Seed : Relevance to Anhydrous Biology. *Plant Physiol.* **96**, 660-663.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M., and Stefani, M.** (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* **416**, 507-511.
- Buitink, J., and Leprince, O.** (2004). Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. *Cryobiology* **48**, 215-228.
- Buitink, J., Hemminga, M.A., and Hoekstra, F.A.** (2000a). Is There a Role for Oligosaccharides in Seed Longevity? An Assessment of Intracellular Glass Stability. *Plant Physiol.* **122**, 1217-1224.
- Buitink, J., Dzuba, S.A., Hoekstra, F.A., and Tsvetkov, Y.D.** (2000b). Pulsed EPR Spin-Probe Study of Intracellular Glasses in Seed and Pollen. *Journal of Magnetic Resonance* **142**, 364-368.
- Buitink, J., Leger, J.J., Guisle, I., Vu, B.L., Wuillème, S., Lamirault, G., Bars, A.L., Meur, N.L., Becker, A., Küster, H., and Leprince, O.** (2006). Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. *The Plant Journal* **47**, 735-750.
- Cadman, C.S.C., Toorop, P.E., Hilhorst, H.W.M., and Finch-Savage, W.E.** (2006). Gene expression profiles of *Arabidopsis Cvi* seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *The Plant Journal* **46**, 805-822.
- Campbell, S.A., and Close, T.J.** (1997). Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytol.* **137**, 61-74.
- Campos, F., Zamudio, F., and Covarrubias, A.A.** (2006). Two different late embryogenesis abundant proteins from *Arabidopsis thaliana* contain specific domains that inhibit *Escherichia coli* growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **342**, 406-413.
- Carjuzaa, P., Castellion, M., Distéfano, A.J., del Vas, M., and Maldonado, S.** (2008). Detection and subcellular localization of dehydrin-like proteins in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) embryos. *Protoplasma* **233**, 149-156.
- Carpenter, J.F., and Crowe, J.H.** (1989). An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* **28**, 3916-3922.
- Carpenter, J.F., Crowe, J.H., and Arakawa, T.** (1990). Comparison of Solute-Induced Protein Stabilization in Aqueous Solution and in the Frozen and Dried States. *J. Dairy Sci.* **73**, 3627-3636.
- Carpenter, J.F., Martin, B., Crowe, L.M., and Crowe, J.H.** (1987). Stabilization of phosphofructokinase during air-drying with sugars and sugar/transition metal mixtures. *Cryobiology* **24**, 455-464.
- Chakrabortee, S., Boschetti, C., Walton, L.J., Sarkar, S., Rubinsztein, D.C., and Tunnacliffe, A.** (2007). Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences **104**, 18073-18078.
- Chaves, M.M., and Oliveira, M.M.** (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *J. Exp. Bot.* **55**, 2365-2384.
- Cheng, Z., Targolli, J., Huang, X., and Wu, R.** (2002). Wheat LEA genes, PMA80 and PMA1959, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding* **10**, 71-82.
- Clerkx, E.J.M., El-Lithy, M.E., Vierling, E., Ruys, G.J., Blankestijn-De Vries, H., Groot, S.P.C., Vreugdenhil, D., and Koornneef, M.** (2004). Analysis of Natural Allelic Variation of Arabidopsis Seed Germination and Seed Longevity Traits between the Accessions Landsberg erecta and Shakdara, Using a New Recombinant Inbred Line Population. *Plant Physiol.* **135**, 432-443.
- Close, T.J.** (1996). Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum* **97**, 795-803.
- Collada, C., Gomez, L., Casado, R., and Aragoncillo, C.** (1997). Purification and in Vitro Chaperone Activity of a Class I Small Heat-Shock Protein Abundant in Recalcitrant Chestnut Seeds. *Plant Physiol.* **115**, 71-77.
- Collins, C.H., and Clegg, J.S.** (2004). A small heat-shock protein, p26, from the crustacean *Artemia* protects mammalian cells (Cos-1) against oxidative damage. *Cell Biology International* **28**, 449-455.
- Colmenero-Flores, J.M., Moreno, L.P., Smith, C.E., and Covarrubias, A.A.** (1999). Pvlea-18, a Member of a New Late-Embryogenesis-Abundant Protein Family That Accumulates during Water Stress and in the Growing Regions of Well-Irrigated Bean Seedlings. *Plant Physiol.* **120**, 93-104.
- Concannon, C.G., Gorman, A.M., and Samali, A.** (2003). On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* **8**, 61-70.
- Corbineau, F., and Côme, D.** (1988). Storage of recalcitrant seeds of four tropical species. *seed science and technology* **16**, 97-103.
- Crowe, J.H., Spargo, B.J., and Crowe, L.M.** (1987). Preservation of dry liposomes does not require retention of residual water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 1537-1540.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., and Crowe, L.M.** (1989). Membrane phase transitions are responsible for imbibitional damage in dry pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 520-523.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., and Crowe, L.M.** (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* **54**, 579-599.
- Crowe, J.H., Oliver, A.E., Hoekstra, F.A., and Crowe, L.M.** (1997). Stabilization of Dry Membranes by Mixtures of Hydroxyethyl Starch and Glucose: The Role of Vitrification. *Cryobiology* **35**, 20-30.
- Cuming, A.C.** (1999). LEA proteins in seed proteins. (eds Shewry PR and Casey R) Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, 753-780.
- Dalal, M., Tayal, D., Chinnusamy, V., and Bansal, K.C.** (2009). Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance. *Journal of Biotechnology* **139**, 137-145.
- Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N., and Sarhan, F.** (1998). Accumulation of an Acidic Dehydrin in the Vicinity of the Plasma Membrane during Cold Acclimation of Wheat. *Plant Cell* **10**, 623-638.
- Daws, M.I., Davies, J., Vaes, E., van Gelder, R., and Pritchard, H.W.** (2007). Two-hundred-year seed survival of *Leucospermum* and two other woody species from the Cape Floristic region, South Africa. *Seed Science Research* **17**, 73-79.

- De Bernardez Clark, E., Schwarze, E., and Rudolph, R.** (1999). Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods in enzymology* **309**, 217-236.
- Delouche, J., and Baskin, C.** (1973). Accelerated ageing techniques for predicting the relative storability of seed lots. *seed science and technology* **2**, 427-452.
- Dickinson, E.** (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids* **17**, 25-39.
- Drinkwater, L.E., Wagoner, P., and Sarrantonio, M.** (1998). Legume-based cropping systems have reduced carbon and nitrogen losses **396**, 262-265.
- Dure3rd, L.** (1993). A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant Journal* **3**, 363-369.
- Dure, L., Crouch, M., Harada, J., Ho, T.-H.D., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T., and Sung, Z.R.** (1989). Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology* **12**, 475-486.
- Ellis, R.H., Hong, T.D., and Roberts, E.H.** (1990). An Intermediate Category of Seed Storage Behaviour?: I. COFFEE. *J. Exp. Bot.* **41**, 1167-1174.
- Eom, J., Baker, W.R., Kintanar, A., and Wurtele, E.S.** (1996). The embryo-specific EMB-1 protein of *Daucus carota* is flexible and unstructured in solution. *Plant Sci.* **115**, 17-24.
- Faria, J.M.R., Buitink, J., van Lammeren, A.A.M., and Hilhorst, H.W.M.** (2005). Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. *J. Exp. Bot.* **56**, 2119-2130.
- Feurtado, J., Yang, J., Ambrose, S., Cutler, A., Abrams, S., and Kermode, A.** (2007). Disrupting Abscisic Acid Homeostasis in Western White Pine (*Pinus monticola* Dougl. Ex D. Don) Seeds Induces Dormancy Termination and Changes in Abscisic Acid Catabolites. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 46-54.
- Finch-Savage, W.E., and Clay, H.A.** (1994). Water relations of germination in the recalcitrant seeds of *Quercus robur* L. *Seed Science Research* **4**, 315-322.
- Finch-Savage, W.E., and Leubner-Metzger, G.** (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* **171**, 501-523.
- Finch-Savage, W.E., Hendry, G.A.F., and Atherton, N.M.** (1994a). Free radical activity and loss of viability during drying of desiccation tree seeds. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* **102B**, 257-260.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., and Steber, C.** (2008). Molecular Aspects of Seed Dormancy. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 387-415.
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S.L., and Rock, C.D.** (2002). Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. *Plant Cell* **14**, S15-45.
- Fischer, W., Bergfeld, R., Plachy, C., Schäfer, R., and Schopfer, P.** (1988). Accumulation of storage materials, precocious germination and development of desiccation tolerance during seed maturation in mustard (*Sinapis alba* L.). *Botanica acta* **101**, 344-354.
- Franks, F., Hartley, R., and Mathias, S.** (1991). Materials science and the production of shelf-stable biologicals. *BioPharm* **4**, 38-42.
- Franz, G., Hatzopoulos, P., Jones, T.J., Krauss, M., and Sung, Z.R.** (1989). Molecular and genetic analysis of an embryonic gene, DC 8, from *Daucus carota* L. *Molecular and General Genetics MGG* **218**, 143-151.
- Galau, G.A., Hughes, D.W., and Dure, L.** (1986). Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. *Plant Molecular Biology* **7**, 155-170.
- Gallardo, K., Le Signor, C., Vandekerckhove, J., Thompson, R.D., and Burstin, J.** (2003). Proteomics of *Medicago truncatula* Seed Development

- Establishes the Time Frame of Diverse Metabolic Processes Related to Reserve Accumulation. *Plant Physiol.* **133**, 664-682.
- Gallardo, K., Lesignor, C., Darmency, M., Burstin, J., and Thompson, R.** (2006). Seed biology of *Medicago truncatula*. *Medicago truncatula Handbook*
- Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J.M., Garcarrubio, A., and Covarrubias, A.A.** (2000). Highly Hydrophilic Proteins in Prokaryotes and Eukaryotes Are Common during Conditions of Water Deficit. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 5668-5674.
- Garczarska, M., Zalewski, T., and Wojtyla, L.** (2008). A comparative study of water distribution and dehydrin protein localization in maturing pea seeds. *Journal of Plant Physiology* **165**, 1940-1946.
- Gill, R.R., Gbur, J., Charles J., Fisher, B.J., Hess, M.L., Fowler, I., Alpha A., Kukreja, R.C., and Sholley, M.M.** (1998). Heat Shock Provides Delayed Protection against Oxidative Injury in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **30**, 2739-2749.
- Goday, A., Jensen, A.B., Culianez-Macia, F.A., Alba, M.M., Figueras, M., Serratos, J., Torrent, M., and Pages, M.** (1994). The Maize Abscisic Acid-Responsive Protein Rab17 Is Located in the Nucleus and Interacts with Nuclear Localization Signals. *Plant Cell* **6**, 351-360.
- Golovina, E.A., Wolkers, W.F., and Hoekstra, F.A.** (1997). Long-Term Stability of Protein Secondary Structure in Dry Seeds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **117**, 343-348.
- Goyal, K., Walton, L.J., and Tunnacliffe, A.** (2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal* **388**, 151-157.
- Goyal, K., Tisi, L., Basran, A., Browne, J., Burnell, A., Zurdo, J.s., and Tunnacliffe, A.** (2003). Transition from Natively Unfolded to Folded State Induced by Desiccation in an Anhydrobiotic Nematode Protein. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 12977-12984.
- Greenfield, N.J., and Fasman, G.D.** (2002). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**, 4108-4116.
- Greggains, V., Finch-Savage, W.E., Quick, W.P., and Atherton, N.M.** (2000). Metabolism-induced free radical activity does not contribute significantly to loss of viability in moist-stored recalcitrant seeds of contrasting species. *New Phytol.* **148**, 267-276.
- Greiff, D., and Kelly, R.** (1966). Cryotolerance of enzymes. I. Freezing of lactic dehydrogenase. *Cryobiology* **2**, 335-341.
- Grelet, J., Benamar, A., Teyssier, E., Avelange-Macherel, M.-H., Grunwald, D., and Macherel, D.** (2005). Identification in Pea Seed Mitochondria of a Late-Embryogenesis Abundant Protein Able to Protect Enzymes from Drying. *Plant Physiol.* **137**, 157-167.
- Gulden, R.H., Thomas, A.G., and Shirtliffe, S.J.** (2004). Relative contribution of genotype, seed size and environment to secondary seed dormancy potential in Canadian spring oilseed rape *Brassica napus*. *Weed Research* **44**, 97-106.
- Haaning, S., Radutoiu, S., Hoffmann, S.V., Dittmer, J., Giehm, L., Otzen, D.E., and Stougaard, J.** (2008). An Unusual Intrinsically Disordered Protein from the Model Legume *Lotus japonicus* Stabilizes Proteins in Vitro. *J. Biol. Chem.* **283**, 31142-31152.
- Hara, M., Terashima, S., and Kuboi, T.** (2001). Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*.

- Journal of Plant Physiology **158**, 1333-1339.
- Hara, M., Fujinaga, M., and Kuboi, T.** (2004). Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 657-662.
- Hara, M., Shinoda, Y., Tanaka, Y., and Kuboi, T.** (2009). DNA binding of citrus dehydrin promoted by zinc ion. *Plant, Cell & Environment* **32**, 532-541.
- Harrison, R.** (2004). Computational modeling of pH-dependant protein structures.
- Hays, L.M., Crowe, J.H., Wolkers, W., and Rudenko, S.** (2001). Factors Affecting Leakage of Trapped Solutes from Phospholipid Vesicles during Thermotropic Phase Transitions. *Cryobiology* **42**, 88-102.
- Hendry, G.A.F.** (1993). Oxygen, free radical processes and seed longevity. *Seed Science Research* **3**, 141-153.
- Hendry, G.A.F., Finch-Savage, W.E., Thorpe, P.C., Atherton, N.M., Buckland, S.M., Nilsson, K.A., and Seel, W.E.** (1992). Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. *New Phytol.*, 273-279.
- Heydecker, W., and Coolbear, P.** (1977). Seed treatments for improved performance-survey and attempted prognosis. *seed science and technology* **5**, 353-425.
- Heyen, B.J., Alsheikh, M.K., Smith, E.A., Torvik, C.F., Seals, D.F., and Randall, S.K.** (2002). The Calcium-Binding Activity of a Vacuole-Associated, Dehydrin-Like Protein Is Regulated by Phosphorylation. *Plant Physiol.* **130**, 675-687.
- Higgins, D., Thompson, J., and Gibson, T.** (1994). Using CLUSTAL for multiple sequence alignment. *Methods in enzymology* **266**, 383-402.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., and Buitink, J.** (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* **6**, 431-438.
- Hoekstra, F.A., Haigh, A.M., Tetteroo, F.A.A., and van Roekel, T.** (1994). Changes in soluble sugars in relation to desiccation tolerance in cauliflower seeds. *Seed Science Research* **4**, 143-147.
- Hoekstra, F.A., Wolkers, W.F., Buitink, J., Golovina, E.A., Crowe, J.H., and Crowe, L.M.** (1997). Membrane Stabilization in the Dry State. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **117**, 335-341.
- HONG, T.D., and ELLIS, R.H.** (1996). A protocol to determine seed storage behaviour. IPGRI Technical Bulletin No.1. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 64.
- Honjoh, K.-i., Oda, Y., Takata, R., Miyamoto, T., and Hatano, S.** (1999). Introduction of the hiC6 gene, which encodes a homologue of a late embryogenesis abundant (LEA) protein, enhances freezing tolerance of yeast. *Journal of Plant Physiology* **155**, 509-512.
- Honjoh, K.-i., Matsumoto, H., Shimizu, H., Ooyama, K., Tanaka, K., Oda, Y., Takata, R., Joh, T., Suga, K., Miyamoto, T., Iio, M., and Hatano, S.** (2000). Cryoprotective Activities of Group 3 Late Embryogenesis Abundant Proteins from *Chlorella vulgaris* C-27. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1656-1663.
- Horbowicz, M., and Obendorf, R.L.** (1994). Seed desiccation tolerance and storability: Dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols, review and survey. *Seed Science Research* **4**, 385-405.
- Houde, M., Daniel, C., Lachapelle, M., Allard, F., Laliberté, S., and Sarhan, F.** (1995). Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *The Plant Journal* **8**, 583-593.
- Hughes, D.W., and Galau, G.A.** (1989). Temporally modular gene expression

- during cotyledon development. *Genes & Development* **3**, 358-369.
- Hundertmark, M., and Hinch, D.K.** (2008). LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* **9**, 118.
- Iljin, W.S.** (1957). Drought Resistance in Plants and Physiological Processes. *Annual Review of Plant Physiology* **8**, 257-274.
- Illing, N., Denby, K.J., Collett, H., Shen, A., and Farrant, J.M.** (2005). The Signature of Seeds in Resurrection Plants: A Molecular and Physiological Comparison of Desiccation Tolerance in Seeds and Vegetative Tissues. *Integr. Comp. Biol.* **45**, 771-787.
- Imai, T., Harano, Y., Kinoshita, M., Kovalenko, A., and Hirata, F.** (2007). Theoretical analysis on changes in thermodynamic quantities upon protein folding: Essential role of hydration. *J. Chem. Phys.* **126**, 225102-225109.
- Ingram, J., and Bartels, D.** (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 377-403.
- Ismail, A.M., Hall, A.E., and Close, T.J.** (1999). Purification and Partial Characterization of a Dehydrin Involved in Chilling Tolerance during Seedling Emergence of Cowpea. *Plant Physiol.* **120**, 237-244.
- Iturriaga, G., Schneider, K., Salamini, F., and Bartels, D.** (1992). Expression of desiccation-related proteins from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* **20**, 555-558.
- Ivanov, I., Tsacheva, I., Stoyanova, V., Nikolov, M., Tchorbadjieva, M.I., Petrova, S., Christov, L., Georgieva, V., and Georgiev, G.** (2009). Chaperone-like effect of polyzwitterions on the interaction of C1q with IgG. *Z. Naturforsch.* **64c**, 149-154.
- Jepson, S.G., and Close, T.J.** (1995). Purification of a Maize Dehydrin Protein Expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **6**, 632-636.
- Jewett, A.I., and Shea, J.-E.** (2006). Folding on the Chaperone: Yield Enhancement Through Loose Binding. *Journal of Molecular Biology* **363**, 945-957.
- Jitsuvara, Y., Toyoda, T., Itai, T., and Yamaguchi, H.** (2002). Chaperone-Like Functions of High-Mannose Type and Complex-Type N-Glycans and Their Molecular Basis. *J Biochem* **132**, 803-811.
- Kaye, C., Neven, L., Hofig, A., Li, Q.-B., Haskell, D., and Guy, C.** (1998). Characterization of a Gene for Spinach CAP160 and Expression of Two Spinach Cold-Acclimation Proteins in Tobacco. *Plant Physiol.* **116**, 1367-1377.
- Kazuoka, T., and Oeda, K.** (1994). Purification and Characterization of COR85-Oligomeric Complex from Cold-Acclimated Spinach. *Plant Cell Physiol.* **35**, 601-611.
- Kermode, A.R.** (2005). Role of Abscisic Acid in Seed Dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation* **24**, 319-344.
- Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Higashi, K., Satoh, S., Kamada, H., and Harada, H.** (1992). Isolation and characterization of a cDNA that encodes ECP31, an embryogenic-cell protein from carrot. *Plant Molecular Biology* **19**, 239-249.
- Koag, M.-C., Fenton, R.D., Wilkens, S., and Close, T.J.** (2003). The binding of Maize DHN1 to Lipid Vesicles. Gain of Structure and Lipid Specificity 10.1104/pp.011171. *Plant Physiol.* **131**, 309-316.
- Koster, K.L., and Leopold, A.C.** (1988). Sugars and Desiccation Tolerance in Seeds. *Plant Physiol.* **88**, 829-832.
- Kovacs, D., Agoston, B., and Tompa, P.** (2008a). Disordered plant LEA proteins as molecular chaperones. *Plant Signal Behav* **3**, 710-713.
- Kovacs, D., Kalmar, E., Torok, Z., and Tompa, P.** (2008b). Chaperone activity of ERD10 and ERD 14, two disordered

- stress-related plant proteins. *Plant Physiology* **147**, 381-390.
- Kranner, I., Beckett, R.P., Wornik, S., Zorn, M., and Pfeifhofer, H.W.** (2002). Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. *The Plant Journal* **31**, 13-24.
- Krochko, J.E., and Bewley, J.D.** (1988). Use of electrophoretic techniques in determining the composition of seed storage proteins in alfalfa. *Electrophoresis* **9**, 751-763.
- Kruger, C., Berkowitz, O., Stephan, U.W., and Hell, R.** (2002). A Metal-binding Member of the Late Embryogenesis Abundant Protein Family Transports Iron in the Phloem of *Ricinus communis* L. *J. Biol. Chem.* **277**, 25062-25069.
- Kypr, J., Kejnovska, I., Renciuik, D., and Vorlickova, M.** (2009). Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucl. Acids Res.* **37**, 1713-1725.
- Lapinski, J., and Tunnacliffe, A.** (2003). Anhydrobiosis without trehalose in bdelloid rotifers. *FEBS Letters* **553**, 387-390.
- Lark, L., Berzofsky, J., and Gierasch, L.** (1989). T-cell antigenic peptides from sperm whale myoglobin fold as amphipathic helices: a possible determinant for immunodominance? *Pept Res.* **2**, 314-321.
- Leopold, A.C.** (1986). *Membranes, Metabolism, and Dry Organisms*. Cornell University Press, New York 374p.
- Leprince, O., Bronchart, R., and Deltour, R.** (1990a). Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. *Plant, Cell and Environment* **13**, 539-546.
- Leprince, O., Hendry, G.A.F., and McKersie, B.D.** (1993). The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research* **3**, 231-246.
- Leprince, O., Atherton, N.M., Deltour, R., and Hendry, G.** (1994). The Involvement of Respiration in Free Radical Processes during Loss of Desiccation Tolerance in Germinating *Zea mays* L. (An Electron Paramagnetic Resonance Study). *Plant Physiol.* **104**, 1333-1339.
- LEPRINCE, O., Colson, P., Houssier, C., and Deltour, R.** (1995). Changes in chromatin structure associated with germination of maize and their relation with desiccation tolerance. *Plant, Cell and Environment* **18**, 619-629.
- Leprince, O., Deltour, R., Thorpe, P.C., Atherton, N.M., and Hendry, G.A.F.** (1990b). The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). *New Phytol.* **116**, 573-580.
- Leprince, O., Harren, F.J.M., Buitink, J., Alberda, M., and Hoekstra, F.A.** (2000). Metabolic Dysfunction and Unabated Respiration Precede the Loss of Membrane Integrity during Dehydration of Germinating Radicles. *Plant Physiol.* **122**, 597-608.
- Lerman, J.C., and Cigliano, E.M.** (1971). New Carbon-14 Evidence for Six Hundred Years Old *Canna compacta* Seed. *Nature* **232**, 568-570.
- Leymarie, J., Robayo-Romero, M.E., Gendreau, E., Benech-Arnold, R.L., and Corbineau, F.** (2008). Involvement of ABA in Induction of Secondary Dormancy in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Seeds. *Plant Cell Physiol.* **49**, 1830-1838.
- Li, B., and Foley, M.E.** (1995). Cloning and characterization of differentially expressed genes in imbibed dormant and afterripened *Avena fatua* embryos. *Plant Molecular Biology* **29**, 823-831.
- Lin, C., and Thomashow, M.F.** (1992). DNA Sequence Analysis of a Complementary DNA for Cold-Regulated Arabidopsis Gene *cor15* and Characterization of the COR 15 Polypeptide. *Plant Physiol.* **99**, 519-525.

- Lobley, A., Whitmore, L., and Wallace, B.A.** (2002). DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* **18**, 211-212.
- López, M., Herrera-Cervera, J.A., Iribarne, C., Tejera, N.A., and Lluch, C.** (2008). Growth and nitrogen fixation in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* under NaCl stress: Nodule carbon metabolism. *Journal of Plant Physiology* **165**, 641-650.
- Ma, X., Jamil, K., MacRae, T.H., Clegg, J.S., Russell, J.M., Villeneuve, T.S., Euloth, M., Sun, Y., Crowe, J.H., Tablin, F., and Oliver, A.E.** (2005). A small stress protein acts synergistically with trehalose to confer desiccation tolerance on mammalian cells. *Cryobiology* **51**, 15-28.
- Manfre, A.J., Lanni, L.M., and Marcotte, W.R., Jr.** (2006). The Arabidopsis Group 1 LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT Protein ATEM6 Is Required for Normal Seed Development. *Plant Physiol.* **140**, 140-149.
- Manfre, A.J., LaHatte, G.A., Climer, C.R., and Marcotte, W.R., Jr.** (2008). Seed dehydration and the establishment of desiccation tolerance during seed maturation is altered in the Arabidopsis thaliana mutant *atem6-1*. *Plant Cell Physiol.* **50** (2), 243-53
- McCubbin, W.D., Kay, C.M., and Lane, B.G.** (1985). Hydrodynamic and optical properties of the wheat germ Em protein. *Biochemistry and cell biology* **63**, 803-811.
- Marttila, S., Tenhola, T., and Mikkonen, A.** (1996). A barley (*Hordeum vulgare* L.) LEA3 protein, HVA1, is abundant in protein storage vacuoles. *Planta* **199**, 602-611.
- Mishra, R., Seckler, R., and Bhat, R.** (2005). Efficient Refolding of Aggregation-prone Citrate Synthase by Polyol Osmolytes: HOW WELL ARE PROTEIN FOLDING AND STABILITY ASPECTS COUPLED?. *J. Biol. Chem.* **280**, 15553-15560.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van Breusegem, F.** (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**, 490-498.
- Miura, Miura, K., Lin, Lin, S., Yano, Yano, M., Nagamine, and Nagamine, T.** (2002). Mapping quantitative trait loci controlling seed longevity in rice (*Oryza sativa* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics* **104**, 981-986.
- Mouillon, J.-M., Gustafsson, P., and Harryson, P.** (2006). Structural Investigation of Disordered Stress Proteins. Comparison of Full-Length Dehydrins with Isolated Peptides of Their Conserved Segments. *Plant Physiol.* **141**, 638-650.
- Mowla, S.B., Cuypers, A., Driscoll, S.P., Kiddle, G., Thomson, J., Foyer, C.H., and Theodoulou, F.L.** (2006). Yeast complementation reveals a role for an Arabidopsis thaliana late embryogenesis abundant (LEA)-like protein in oxidative stress tolerance. *The Plant Journal* **48**, 743-756.
- Mundy, J., and Chua, N.H.** (1988). Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* **7**, 2279-2286.
- Müntz, K., Bassüner, R., Lichtenfeld, C., Scholtz, G., and Weber, E.** (1985). Proteolytic cleavage of storage proteins during embryogenesis and germination of legume seeds. *Physiologie végétale* **23**, 74-94.
- Nakayama, K., Okawa, K., Kakizaki, T., and Inaba, T.** (2008). Evaluation of the protective activities of a late embryogenesis abundant (LEA) related protein, Cor15am, during various stress *in vitro*. *Bioscience, Biotechnology, and biochemistry* **72**, 1642-1645.
- Nakayama, K., Okawa, K., Kazizaki, T., and Inaba, T.** (2008). Evaluation of the Protective Activities of a Late Embryogenesis Abundant (LEA) Related Protein, Cor15am, during Various Stresses *in Vitro*. *Bioscience,*

- Biotechnology, and Biochemistry **72**, 1642-1645.
- Nambara, E., and Marion-Poll, A.** (2003). ABA action and interactions in seeds. *Trends in Plant Science* **8**, 213-217.
- NDong, C., Danyluk, J., Wilson, K.E., Pocock, T., Huner, N.P.A., and Sarhan, F.** (2002). Cold-Regulated Cereal Chloroplast Late Embryogenesis Abundant-Like Proteins. Molecular Characterization and Functional Analyses. *Plant Physiol.* **129**, 1368-1381.
- Nejedlý, K., Chládková, J., and Kypr, J.** (2007). Photochemical probing of the B-A conformational transition in a linearized pUC19 DNA and its polylinker region. *Biophysical Chemistry* **125**, 237-246.
- Nejedlý, K., Chládková, J., Vorlickova, M., Hrabcova, I., and Kypr, J.** (2005). Mapping the B-A conformational transition along plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **33**.
- Neven, L.G., Haskell, D.W., Hofig, A., Li, Q.-B., and Guy, C.L.** (1993). Characterization of a spinach gene responsive to low temperature and water stress. *Plant Molecular Biology* **21**, 291-305.
- Nigen, M., Croguennec, T., Renard, D., and Bouhallab, S.** (2007). Temperature Affects the Supramolecular Structures Resulting from Lactalbumine-Lysozyme Interaction. *Biochemistry* **46**, 1248-1255.
- Niogret, M.F., Culiáñez-Macià, F.A., Goday, A., Albà, M.M., and Pagès, M.** (1996). Expression and cellular localization of rab28 mRNA and Rab28 protein during maize embryogenesis. *The Plant Journal* **9**, 549-557.
- Nylander, M., Svensson, J., Palva, E.T., and Welin, B.r.V.** (2001). Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **45**, 263-279.
- Ohto, M.-a., Stone, S.L., and Harada, J.** (2006). Genetic control of seed development and seed mass. (*Annual Plant Reviews*).
- Oliver, M.J., and Wood, A.J.** (1997). Desiccation tolerance in mosses. In: Koval, T.M (ed.) *Stress induced process in higher eukariotic cells*. Plenum Press, New York, 1-26.
- O'Mahony, P.J., and Oliver, M.J.** (1999). The involvement of ubiquitin in vegetative desiccation tolerance. *Plant Molecular Biology* **41**, 657-667.
- Page, R.D.M.** (1996). Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**, 357-358.
- Pammenter, N.W., and Berjak, P.** (1999). A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* **9**, 13-37.
- Parker, W., and Song, P.S.** (1992). Protein structures in SDS micelle-protein complexes. *Biophysical Journal* **61**, 1435-1439.
- Parker, W., and Stezowski, J.** (1996). The surface of beta-sheet proteins contains amphiphilic regions which may provide clues about protein folding. *proteins.* **25**, 253-260.
- Pasta, P., Carrea, G., Longhi, R., and Zetta, L.** (1990). Circular dichroism and proteolysis of human [beta]-endorphin in surfactant and lipid solutions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1039**, 1-4.
- Pay, A., Heberlebers, E., and Hirt, H.** (1992). An Alfalfa Cdna Encodes a Protein with Homology to Translationally Controlled Human Tumor Protein. *Plant Molecular Biology* **19**, 501-503.
- Popova, A.V., and Hinch, D.K.** (2005). Effects of the sugar headgroup of a glycolipid on the phase behavior of phospholipid model membranes in the dry state. *Glycobiology* **15**, 1150-1155.
- Potts, M.** (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **58**, 755-805.

- Pouchkina-Stantcheva, N.N., McGee, B.M., Boschetti, C., Tolleter, D., Chakrabortee, S., Popova, A.V., Meersman, F., Macherel, D., Hinch, D.K., and Tunnacliffe, A.** (2007). Functional divergence of former alleles in ancient asexual invertebrate. *Science* **318**, 268-271.
- Powers, J.-P.S., and Hancock, R.E.W.** (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides Antimicrobial Peptides II* **24**, 1681-1691.
- Prestrelski, S.J., Tedeschi, N., Arakawa, T., and Carpenter, J.F.** (1993). Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophysical Journal* **65**, 661-671.
- Prieto-Dapena, P., Castano, R., Almoguera, C., and Jordano, J.** (2006). Improved Resistance to Controlled Deterioration in Transgenic Seeds. *Plant Physiol.* **142**, 1102-1112.
- Prusiner, S.B.** (1998). Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 13363-13383.
- Puhakainen, T., Hess, M.W., Mäkelä, P., Svensson, J., Heino, P., and Palva, E.T.** (2004). Overexpression of Multiple Dehydrin Genes Enhances Tolerance to Freezing Stress in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* **54**, 743-753.
- Radford, S.J., and Dickinson, E.** (2004). Depletion flocculation of caseinate-stabilised emulsions: what is the optimum size of the non-adsorbed protein nano-particles? *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **238**, 71-81.
- Rajjou, L., and Debeaujon, I.** (2008). Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus Biologies Les graines de la vie / The seeds of life* **331**, 796-805.
- Rajjou, L., Lovigny, Y., Groot, S.P.C., Belghazi, M., Job, C., and Job, D.** (2008). Proteome-Wide Characterization of Seed Aging in Arabidopsis: A Comparison between Artificial and Natural Aging Protocols. *Plant Physiol.* **148**, 620-641.
- Ratet, P., Porcedu, A., Tadege, M., and Mysore, K.S.** (2006). Insertional mutagenesis in *Medicago truncatula* using Tnt1 retrotransposon. (*Medicago truncatula Handbook*)
- Reyes, J.L., Campos, F., Wei, H., Arora, R., Yang, Y., Karlson, D.T., and Covarrubias, A.A.** (2008). Functional dissection of Hydrophilins during in vitro freeze protection. *Plant, Cell & Environment* **31**, 1781-1790.
- Reyes, J.L., Rorigo, M.-J., Colmenero-Flores, J.M., Gil, J.-V., Garay-Arroyo, A., Campos, F., Salamini, F., Bartels, D., and Covarrubias, A.A.** (2005). Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant, Cell & Environment* **28**, 709-718.
- Riera, M., Figueras, M., Leopez, C., Goday, A., and Pages, M.** (2004). Protein kinase CK2 modulates developmental functions of the abscisic acid responsive protein Rab17 from maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9879-9884.
- Rinne, P.i.L.H., Kaikuranta, P.i.L.M., van der Plas, L.H.W., and van der Schoot, C.** (1999). Dehydrins in cold-acclimated apices of birch (*Betula pubescens* Ehrh.): production, localization and potential role in rescuing enzyme function during dehydration. *Planta* **209**, 377-388.
- Roberts, E.H.** (1973). Predicting the storage life of seeds. *Seed science and technology* **1**, 499-514.
- Roberts, J.K., DeSimone, N.A., Lingle, W.L., and Dure III, L.** (1993). Cellular Concentrations and Uniformity of Cell-Type Accumulation of Two Lea Proteins in Cotton Embryos. *Plant Cell* **5**, 769-780.
- Russouw, P.S., Farrant, J., Brandt, W., and Lindsey, G.G.** (1997). The most

- prevalent protein in a heat-treated extract of pea (*Pisum sativum*) embryos is an LEA group I protein; its conformation is not affected by exposure to high temperature. *Seed Science Research* **7**, 117-124.
- Sallon, S., Solowey, E., Cohen, Y., Korchinsky, R., Egli, M., Woodhatch, I., Simchoni, O., and Kislev, M.** (2008). Germination, Genetics, and Growth of an Ancient Date Seed. *Science* **320**, p.1464.
- Samarah, N., Mullen, R., and Cianzio, S.** (2004). Size distribution and mineral nutrients of soybean seeds in response to drought stress. *Journal of Plant Nutrition* **27**, 815-835.
- Sanchez-Ballesta, M., Rodrigo, M., Lafuente, M., Granell, A., and Zacarias, L.** (2004). Dehydrin from Citrus, which confers in vitro dehydration and freezing protection activity, is constitutive and highly expressed in the flavedo of fruit but responsive to cold and water stress in leaves. *J Agric Food Chem* **52**, 1950-1957.
- Sanhewe, A.J., and Ellis, R.H.** (1996). Seed development and maturation in *Phaseolus vulgaris* L. Ability to germinate and to tolerate desiccation. *J. Exp. Bot.* **47**, 949-958.
- Sattler, S.E., Gilliland, L.U., Magallanes-Lundback, M., Pollard, M., and DellaPenna, D.** (2004). Vitamin E Is Essential for Seed Longevity and for Preventing Lipid Peroxidation during Germination. *Plant Cell* **16**, 1419-1432.
- Senaratna, T., McKersie, B.D., and Borochoy, A.** (1987). Desiccation and Free Radical Mediated Changes in Plant Membranes. *J. Exp. Bot.* **38**, 2005-2014.
- Setlow, P.** (2007). I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in Microbiology* **15**, 172-180.
- Shen-Miller, J., Schopf, J.W., Harbottle, G., Cao, R.-j., Ouyang, S., Zhou, K.-s., Southon, J.R., and Liu, G.-h.** (2002). Long-living lotus: germination and soil {gamma}-irradiation of centuries-old fruits, and cultivation, growth, and phenotypic abnormalities of offspring. *Am. J. Bot.* **89**, 236-247.
- Shih, M.-d., Lin, S.-c., Hsieh, J.-s., Tsou, C.-h., Chow, T.-y., Lin, T.-p., and Hsing, Y.-i.C.** (2004). Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max* L.) LEA protein, GmPM16. *Plant Molecular Biology* **56**, 689-703.
- Shiota, H., Satoh, R., Watabe, K.-i., Harada, H., and Kamada, H.** (1998). C-ABI3, the Carrot Homologue of the Arabidopsis ABI3, is Expressed during Both Zygotic and Somatic Embryogenesis and Functions in the Regulation of Embryo-Specific ABA-Inducible Genes. *Plant Cell Physiol.* **39**, 1184-1193.
- Sinniah, U.R., Ellis, R.H., and John, P.** (1998). Irrigation and Seed Quality Development in Rapid-cycling Brassica: Soluble Carbohydrates and Heat-stable Proteins. *Ann Bot* **82**, 647-655.
- Sivamani, E., Bahieldin, A., Wraith, J.M., Al-Niemi, T., Dyer, W.E., Ho, T.-H.D., and Qu, R.** (2000). Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Science* **155**, 1-9.
- Skriver, K., and Mundy, J.** (1990). Gene Expression in Response to Abscisic Acid and Osmotic Stress. *Plant Cell* **2**, 503-512.
- Slade, L., and Levine, H.** (1991). Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **30**, 115-360.
- Soeda, Y., Konings, M.C.J.M., Vorst, O., van Houwelingen, A.M.M.L., Stoopen, G.M., Maliepaard, C.A., Kodde, J., Bino, R.J., Groot, S.P.C., and van der Geest, A.H.M.** (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.
- Soulages, J.L., Kim, K., Walters, C., and Cushman, J.C.** (2002). Temperature-Induced Extended Helix/Random Coil Transitions in a Group 1 Late Embryogenesis-Abundant Protein from Soybean. *Plant Physiol.* **128**, 822-832.
- Sreedhar, L., Wolkers, W.F., Hoekstra, F.A., and Bewley, J.D.** (2002). In vivo Characterization of the Effects of Abscisic Acid and Drying Protocols Associated with the Acquisition of Desiccation Tolerance in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Somatic Embryos. *Ann Bot* **89**, 391-400.
- Srere, P.A.** (1966). Citrate-condensing Enzyme-Oxalacetate Binary Complex. STUDIES ON ITS PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES. *J. Biol. Chem.* **241**, 2157-2165.
- Stan, G., Brooks, B.R., and Thirumalai, D.** (2005). Probing the "Annealing" Mechanism of GroEL Minichaperone using Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Molecular Biology* **350**, 817-829.
- Sun, W.Q., and Leopold, A.C.** (1993). The glassy state and accelerated aging of soybeans. *Physiologia Plantarum* **89**, 767-774.
- Sun, W.Q., Irving, T.C., and Leopold, A.C.** (1994). The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. *Physiologia Plantarum* **90**, 621-628.
- Swire-Clark, G.A., and Marcotte, W.R.** (1999). The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Molecular Biology* **39**, 117-128.
- Tolteer, D., Jaquinod, M., Mangavel, C., Passirani, C., Saulnier, P., Manon, S., Teyssier, E., Payet, N., Avelange-Macherel, M.-H., and Macherel, D.** (2007). Structure and Function of a Mitochondrial Late Embryogenesis Abundant Protein Are Revealed by Desiccation. *Plant Cell* **19**, 1580-1589.
- Tompa, P., Szász, C., and Buday, L.** (2005). Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 484-489.
- Tsikaris, V.M., Sakarellos-Daitsiotis, E., Panou-Pomonis, C., Sakarellos, C., and M, M.** (1989). Circular dichroism studies on sequential polypeptides (Arg-X-Gly) when X= L-Ala, Val, Leu, Ile, Nva, Nle in amphiphilic environments. *Int. J. Pept. Protein Res.* **33**, 195-201.
- Tunnacliffe, A., and Wise, M.J.** (2007). The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften* **94**, 791-812.
- Ukaji, N., Kuwabara, C., Takezawa, D., Arakawa, K., and Fujikawa, S.** (2001). Cold Acclimation-Induced WAP27 Localized in Endoplasmic Reticulum in Cortical Parenchyma Cells of Mulberry Tree Was Homologous to Group 3 Late-Embryogenesis Abundant Proteins. *Plant Physiol.* **126**, 1588-1597.
- Uversky, V.N., Gillespie, J.R., and Fink, A.L.** (2000). Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **41**, 415-427.
- Vicient, C.M., Hull, G., Guillemot, J., Devic, M., and Delseny, M.** (2000). Differential expression of the Arabidopsis genes coding for Em-like proteins. *J. Exp. Bot.* **51**, 1211-1220.
- Voet, D., and Voet, J.G.** (2004). *Biochimie*, 1107-1135.
- Walters, C.** (1998). Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Science Research* **8**, 223-244.
- Walters, C., Hill, L.M., and Wheeler, L.J.** (2005). Dying while Dry: Kinetics and Mechanisms of Deterioration in Desiccated Organisms. *Integr. Comp. Biol.* **45**, 751-758.
- Walters, C., Reilley, A.A., Reeves, P.A., Baszczak, J., and Richards, C.M.** (2006). The utility of aged seeds in DNA banks. *Seed Science Research* **16**, 169-178.

- Wang, L., Li, X., Chen, S., and Liu, G.** (2009). Enhanced drought tolerance in transgenic *Leymus chinensis* plants with constitutively expressed wheat TaLEA 3. *Biotechnology Letters* **31**, 313-319.
- Wehmeyer, N., and Vierling, E.** (2000). The Expression of Small Heat Shock Proteins in Seeds Responds to Discrete Developmental Signals and Suggests a General Protective Role in Desiccation Tolerance. *Plant Physiol.* **122**, 1099-1108.
- Wehmeyer, N., Hernandez, L.D., Finkelstein, R.R., and Vierling, E.** (1996). Synthesis of Small Heat-Shock Proteins Is Part of the Developmental Program of Late Seed Maturation. *Plant Physiol.* **112**, 747-757.
- Weijers, M., Broersen, K., Barneveld, P.A., Cohen Stuart, M.A., Hamer, R.J., De Jongh, H.H.J., and Visschers, R.W.** (2008). Net Charge Affects Morphology and Visual Properties of Ovalbumin Aggregates. *Biomacromolecules* **9**, 3165-3172.
- Wise, M.J., and Tunnacliffe, A.** (2003). Popp the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Science* **9**, 13-17.
- Wisniewsk, M., Webb, R., Balsamo, R., Close, T.J., Yu, X., and Griffith, M.** (1999). Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: a dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiol. Plant.* **105**, 600-608.
- Wolkers, W.F., van Kilsdonk, M.G., and Hoekstra, F.A.** (1998a). Dehydration-induced conformational changes of poly-lysine as influenced by drying rate and carbohydrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1425**, 127-136.
- Wolkers, W.F., Bochicchio, A., Selvaggi, G., and Hoekstra, F.A.** (1998). Fourier Transform Infrared Microspectroscopy Detects Changes in Protein Secondary Structure Associated with Desiccation Tolerance in Developing Maize Embryos. *Plant Physiol.* **116**, 1169-1177.
- Wolkers, W.F., McCready, S., Brandt, W.F., Lindsey, G.G., and Hoekstra, F.A.** (2001). Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1544**, 196-206.
- Wu, J.-Y., and Yang, J.T.** (1970). Physicochemical Characterization of Citrate Synthase and Its Subunits. *J. Biol. Chem.* **245**, 212-218.
- Wu, R., Sun, Y., Lei, L., and Xie, S.** (2008). Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (HSC 70) in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Molecular Biology* **42**, 234-242.
- Xiao, B., Huang, Y., Tang, N., and Xiong, L.** (2007). Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **115**, 35-46.
- Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T., and Wu, R.** (1996). Expression of a Late Embryogenesis Abundant Protein Gene, HVA1, from Barley Confers Tolerance to Water Deficit and Salt Stress in Transgenic Rice. *Plant Physiol.* **110**, 249-257.
- Zhang, L., Ohta, A., Takagi, M., and Imai, R.** (2000). Expression of Plant Group 2 and Group 3 lea Genes in *Saccharomyces cerevisiae* Revealed Functional Divergence among LEA Proteins. *J Biochem* **127**, 611-616.

Annexes

1 **MtPM25 is an atypical hydrophobic late embryogenesis-abundant**
2 **protein that dissociates cold and desiccation-aggregated proteins**

3
4 Running title: MtPM25 dissolves cold- and dried-induced aggregated proteins

5
6 VIRGINIE BOUCHER¹, JULIA BUITINK¹, XIAODONG LIN^{1*}, JULIE BOUDET^{1§},
7 FOLKERT A HOEKSTRA², MICHAELA HUNDERTMARK¹, DENIS RENARD³ &
8 OLIVIER LEPRINCE¹

9
10 ¹*Université d'Angers, INRA, Agrocampus-Ouest, UMR1191 Physiologie Moléculaire des*
11 *Semences, 16 Bd Lavoisier, F-49045 Angers, France,* ²*Department of Plant Physiology,*
12 *Wageningen University, 6703BD Wageningen, The Netherlands and* ³*UR Biopolymères,*
13 *Interactions, Assemblages, INRA, Rue de la Géraudière, BP 71627, F-44316 Nantes, France*

14
15 Corresponding author: Olivier Leprince, UMR 1191 Physiologie Moléculaire des Semences
16 16 Bd Lavoisier, F-49045 Angers cedex 01, France
17 Tel : +33 241 22 55 16, Fax : +33 241 22 55 49
18 E-mail : olivier.leprince@agrocampus-ouest.fr

19
20 * *Present address: Department of Biology and Biotechnology, School of Life Sciences,*
21 *Zhongshan University, 510275 Guangzhou, P.R. China*

22 § *Present address: Université Blaise Pascal, UMR 1095 Génétique, Diversité et*
23 *Ecophysiologie des Céréales, F-63177 Aubière, France*

24
25 **ABSTRACT**

26 **Late embryogenesis abundant (LEA) proteins are thought to be one of the components**
27 **involved in desiccation tolerance (DT) by maintaining cellular structures in the dry**
28 **state. Among them, MtPM25, a member of the group 5 LEA proteins is specifically**
29 **associated with DT in *Medicago truncatula* seeds. Its function is unknown and its**
30 **classification as a LEA protein remains elusive. Here, evidence is provided that**
31 **MtPM25 is a hydrophobic, intrinsically disordered protein that shares the**
32 **characteristics of canonical LEA proteins. Screening protective activities by testing**
33 **various substrates (liposomes, enzymes) against freezing, heating and drying indicates**

1 that MtPM25 is unable to protect membranes but able to prevent aggregation of
2 proteins during stress. Prevention of aggregation was also found for the water soluble
3 proteome of desiccation-sensitive radicles. This inhibition was significantly higher than
4 that of MtEM6, one of the most hydrophilic LEA protein associated with DT. Moreover,
5 when added after the stress treatment, MtPM25 is able to rapidly dissolve aggregates in
6 a non specific manner. Sorption isotherms show that when it is unstructured, MtPM25
7 absorbs up to 3 -fold more water than MtEM6, despite its relative hydrophobicity.
8 MtPM25 is likely to act as a protective molecule during drying and plays an additional
9 role as a repair mechanism compared to other LEA proteins.

10

11 *Key-words:* freezing stress; desiccation tolerance; *Medicago truncatula*; LEA proteins;
12 protein aggregation;

1 INTRODUCTION

2

3 Certain seeds, pollens and the so-called resurrection plants, together with a variety of lower
4 animals and micro-organisms are able to dry out completely and yet remain viable in a state
5 of suspended animation, a phenomenon known as anhydrobiosis. This challenges the
6 paradigm according to which water is necessary for life because water affects the structural
7 attributes of macromolecules. As desiccation of anhydrobiotes such as seeds proceeds, there
8 is no evidence of large structural changes in their membranes and proteins (Hoekstra,
9 Golovina & Buitink 2001). Also, dry anhydrobiotes are able to sustain extreme
10 environmental conditions such as temperatures ranging from -196 °C to temperatures at least
11 above 65°C (Hoekstra et al., 2001; Buitink & Leprince 2004). In contrast, in the hydrated
12 state these stress induce misfolding and aggregation of proteins (Ben-Zvi & Goloubinoff
13 2001; Zhou, Liu & Labuzza, 2008) with major damaging consequences for the cells
14 (Bucciantini *et al.* 2002). This suggests that the prevention or repair of major conformational
15 changes in macromolecules in the dry state is an important characteristic of desiccation
16 tolerance (DT).

17 To cope with the physical and biochemical challenges accompanying the desiccation
18 process, anhydrobiotes are endowed with an array of protective mechanisms that act
19 synergistically (Hoekstra *et al.* 2001). However, the only known genetic requirement for
20 anhydrobiotes that is phylogenetically widespread among kingdoms is genes that code for
21 proteins known as late embryogenesis abundant (LEA) proteins (Tunnacliffe & Wise 2007).
22 Initially discovered during maturation of orthodox seeds, LEA proteins are present in
23 bacteria, anhydrobiotic pro- and eukaryotes, ranging from lower invertebrates (rotifers) to
24 plant seeds (Tunnacliffe & Wise 2007). They form a loose group of stress-related proteins
25 comprising several families. The lack of complexity and their classification in various groups
26 is still a matter of debate. Unifying and outstanding characteristics are their high
27 hydrophilicity, high content in glycine and largely unstructured conformation in the hydrated
28 state (Wise & Tunnacliffe 2004; Battaglia *et al.* 2008). Group 1 (PFAM LEA_5), 2 (PFAM
29 dehydrins) and 3 (PFAM LEA_4) are considered as “true” LEA proteins. Among them, 6
30 were identified in a proteomic study on *Medicago truncatula* seeds for which their abundance
31 was associated with DT rather than drought tolerance (Boudet *et al.* 2006). This study also
32 identified MtPM25 (PM25), a member of the D-34 family (PFAM_SMP, group 5). The D-34
33 family is the least characterised group of LEA proteins. The overexpression of *AtRab28*, an
34 homologue of PM25, led to an increase in germination speed both in normal conditions and in

1 the presence of 100 mM NaCl whereas it increased survival percentage of transgenic plants
2 grown in the presence of 14 mM LiCl (Borrell *et al.* 2002). In *M. truncatula*, all the genes
3 belonging to the D-34 family were found to be upregulated with the induction of DT during
4 seed development (Buitink *et al.* 2006), supporting a role for this family against the total loss
5 of water. Thus, the functionality of the D-34 family and PM25 in particular in DT remains to
6 be understood.

7 The D-34 family is an intriguing group of proteins because they present important
8 dissimilarities compared to canonical LEA proteins. The plot of mean net charge vs. mean
9 hydrophobicity of *A. thaliana* LEA genes places D-34 members apart from LEA genes of
10 group 1-3, suggesting that D-34 proteins are natively folded (Hundertmark & Hinch 2008).
11 Other bioinformatics predictions reached similar conclusions (Battaglia *et al.* 2008). Cuming
12 (1999) and Battaglia *et al.* (2008) reported that D-34 members are apparently not heat stable,
13 a hallmark of LEA proteins. An additional peculiarity of the D-34 family is their relatively
14 high hydrophobicity (Tunnacliffe & Wise 2007). Also, FTIR spectroscopy shows that they
15 contain a significant amount of β -sheet structures in the hydrated state (Boudet *et al.* 2006).
16 Doubts are mounting as to whether the D-34 family should be considered as LEA proteins
17 (Cuming 1999; Tunnacliffe & Wise 2007; Battaglia *et al.* 2008). In addition, the fact that this
18 family and other minor groups have been assigned to various groups following nomenclature
19 revisions over the years attests of the difficulty to draw any definitive conclusion on their
20 function from *in silico* analyses (Wise & Tunnacliffe 2004).

21 The causative link between various LEA proteins (Tunnacliffe & Wise 2007) including a
22 member of the D-34 family (Borrell *et al.* 2002) and tolerance against salt and water stress is
23 now secured. At the molecular level, the precise protective function in DT is progressively
24 documented mostly on dehydrins and group 3 LEA proteins. So far, they exhibit a great
25 diversity of functions against abiotic stress, including ion binding (Krüger *et al.* 2002),
26 antioxidant (Hara, Fujinaga & Kuboi 2004), hydration buffer (Mc Cubbin, Kay & Lane 2005;
27 Tompa *et al.* 2006; Manfre *et al.* 2009), membrane protectant (Pouchkina-Stantcheva *et al.*
28 2007; Tolleter *et al.* 2007) and protein stabilisers (Goyal, Walton & Tunnacliffe, 2005;
29 Chakrabortee *et al.* 2007; Gilles *et al.* 2007; Kovacs *et al.* 2008; Reyes *et al.* 2008).
30 Typically, representatives of LEA group 1, 2, 3 significantly protect *in vitro* enzyme activities
31 against freezing, heating and drying but to various extents depending on the concentration of
32 target protein and the strain and type of stress. The structural plasticity brought about by their
33 intrinsically disordered structure in the hydrated state together with their ability to undergo

1 disorder-to-a mostly α -helix conformation upon drying may contribute to their
2 multifunctional protective capacity (Tunacliffe & Wise 2007).

3 Accumulating evidence shows that the protein stabilization conferred by LEA proteins is
4 to prevent stress-induced denaturation and aggregation of proteins both in the hydrated state
5 and after drying or freezing (Goyal *et al.* 2005; Chakrabortee *et al.* 2007; Kovacs *et al.* 2008;
6 Reyers *et al.* 2008). Two molecular mechanisms, which may not be mutually exclusive have
7 been proposed to account for these observations. On the one hand, *in vitro* data on dehydrins
8 suggest that LEA proteins may act as molecular chaperones with a wide substrate specificity
9 (Kovacs *et al.* 2008). On the other hand, based on data obtained mostly with group 3 proteins,
10 the LEA anti-aggregative properties may simply be a space filling activity that prevent those
11 interactions leading to protein aggregation via steric hindrance, a mechanism described as
12 “molecular shielding” (Chakrabortee *et al.* 2007; Wise & Tunacliffe 2007). As a first step
13 towards the elucidation of the functions of MtPM25 (PM25), we screened known protection
14 functions by benchmarking biochemical and protective characteristics of PM25 against
15 MtEM6 (EM6), a group 1 LEA protein which is well characterized in the literature and also
16 associated with DT.

17 18 **MATERIALS AND METHODS**

19 20 **Recombinant proteins and protein extraction**

21 Recombinant PM25 and EM6 were overexpressed in *E coli* BL21-AI and purified to
22 homogeneity as described in Boudet *et al.* (2006). Samples were desalted, lyophilized and
23 redissolved in MilliQ water at concentration of 10 mg/mL. Porcine heart citrate synthase (CS,
24 Sigma) was dialyzed against 50 mM Tris (pH 8.0), 2 mM EDTA for 24 h at 4°C then diluted
25 in 40 mM HEPES (pH 7.5) to a concentration of 10 μ g/mL (stock solution of 0.12 μ M).
26 Rabbit muscle lactate dehydrogenase (LDH, Roche Molecular) was diluted in 25 mM Tris,
27 pH 7.0 to 10 μ g/mL (stock solution 0.07 μ M tetramer). Chicken egg white lysozyme (Sigma)
28 and BSA (fraction V, Sigma) were dissolved in MilliQ water.

29 Proteins were extracted from 100 radicles dissected from 6 h-imbibed seeds or germinated
30 seeds at the desiccation-sensitive stage (emerged radicle of 5 mm length) at 4°C in 500 μ L of
31 buffer (50 mM HEPES, pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1mM PMSF) and centrifuged twice at
32 13,000g at 4°C (referred to as water soluble proteome, SP). To study aggregation, the
33 resulting supernatant (\pm 1 mL) was dialyzed twice against 5 L of MilliQ water at 4°C and
34 immediately used for freeze-thawing or drying experiments (protein concentrations were 3-5

1 mg/mL). The average Mw of the soluble proteins was fixed at 50,000 as in Chakrabortee *et*
2 *al.* (2007). PM25 was detected by western blot analysis as described in Boudet *et al.* (2006).

4 **Analysis of secondary structure and prediction programs**

5 CD spectra were recorded using a Jobin-Yvon CD6 dichrograph at 20°C at a protein
6 concentration of 1 mg/mL in 5 mM NaH₂PO₄ buffer (pH 7.5) according to Tolleter *et al.*
7 (2007). The relative content of secondary structure elements was estimated from the CD
8 spectra using the CONTILL, SELCON3 and CDSSTR algorithms available at the
9 DICROWEB server (Whitmore & Wallace 2004). Secondary structures were also derived
10 from the shape of the amide-I absorption band of the FTIR spectrum of PM25 (20 mg/mL in
11 D₂O) and the contribution of each elements was calculated using the settings and curve fitting
12 procedure described in Boudet *et al.* (2006).

14 **Enzyme protection assays**

15 *Thermal inactivation of citrate synthase*

16 Six µL of H₂O or a stock solution of PM25, EM6 or BSA were added to 60 µL of CS
17 stock solution in a microfuge tube (final concentrations of test proteins ranging from 5-40
18 µg/mL). Samples were placed at 43°C in a preheated thermostated sample holder
19 (Eppendorf). At indicated times, aliquots of 10 µL were collected, rapidly cooled on ice for 2
20 min. They were directly used to assay the enzyme activity in 96-well microtiter plates as
21 described in Srere (1966). To those aliquots heated without addition of proteins, 6 µL of H₂O
22 or a solution of test proteins was added (final concentration of 5-40 µg/mL), incubated on ice
23 for 2 min before assaying enzyme activity.

25 *Freeze-thawing inactivation of lactate dehydrogenase*

26 Two µL of H₂O or a stock solution of PM25, EM6 or BSA were added to 20 µL of LDH
27 stock solution in a microfuge tube (final concentration of test proteins ranging from 10-100
28 µg/mL). Samples were thrown in liquid N₂, left for 1 min and thawed for 10 min at ambient
29 temperature. This constituted one freeze-thaw cycle. Alternatively, the test proteins or water
30 control were added to samples after thawing using the same volumes and concentrations as
31 above. Enzyme activity was determined in triplicates using aliquots of 2.5 µL in 200 µL of
32 100 mM NaH₂PO₄ buffer (pH 6), 2 mM pyruvate, 100 µM NADH. The decrease in A₃₄₀ was
33 monitored in 96-well microtiter plates.

1 *Desiccation-induced loss of CS and LDH activity*

2 One μL of H_2O or stock solutions of PM25, EM6 or BSA was added to 10 μL of stock
3 solution of CS or LDH (final concentrations of test proteins ranging from to 10-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
4 For each concentration, an aliquot of 2.5 μL were placed in a microfuge tube and dried at
5 20°C in an air stream at 40% RH for 6 h. After drying, the samples were rehydrated by
6 adding respectively for the CS assay, 50 μL of 50 mM Tris buffer (pH 7.5), 2 mM EDTA and
7 for the LDH assay 100 mM NaH_2PO_4 buffer (pH 6). After incubation for 30 min at ambient
8 temperature, 150 μL of the enzyme activity buffer was added and activity was measured as
9 described above.

11 **Aggregation assay**

12 Aliquots of 15 μL containing the dialyzed SP was submitted to drying or up to 8 freeze-
13 thawing cycles in the presence or absence of test proteins as described above. Test proteins
14 were added before or after stress as described above. Care was taken that the volumes
15 remained constant among the different treatments. UV-Vis spectroscopy was used to assess
16 the turbidity by measuring the ratio A_{340}/A_{280} . For gel analysis, rehydrated or thawed samples
17 were centrifuged at 13,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant was removed and the pellet
18 was dissolved in 15 μL of water. 15 μL of each fraction were separated on 12.5% SDS
19 PAGE. Gels were stained with Coomassie Blue R-250. The size of the coacervates formed
20 after the dialysis of the water SP was assessed by laser dynamic light scattering using a
21 Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) according to Nigen et al. (2007).
22 Measurements were performed in the presence or absence of 10 mg/mL of PM25 at 25°C and
23 5°C. Large structures that were out of range of the Zetasizer were observed at room
24 temperature using an optical microscope (Olympus BX51TF) at a magnification of 65X. 2 μl
25 of freeze-thawed samples containing or not PM25 were laid down in triplicates between glass
26 slides. As control, unfrozen samples containing the coacervates were also observed. Five to
27 10 digital pictures per replicate were taken and analyzed using the public domain image
28 analysis program ImageJ, version 1.41o (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). The image contrast was
29 first enhanced using the tools “sharpen” and “find edges”. Then the drawing tools were used
30 to trace the perimeter of the structures. Based on the calibration image of a micrometer, the
31 program automatically calculated the surface area of the structure.

33 **Liposome studies**

1 Liposome from 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) or 1,2-di-
2 oleoyl-*sn*-glycero-3-(phospho-*rac*-(1-glycerol)), (DOPG) (Avanti Polar Lipids) were
3 prepared and leakage assays were performed according to Hoekstra *et al.* (1997). Liposomes
4 were mixed with sugars (Pfanstiehl Laboratories; mass ratio 1:5) or PM25 (mass ratio 1:2),
5 rapidly dried under an air stream of 3% RH for 2 h, then resuspended in 1 mL of 1mM TES
6 (pH 7.5), 0.1 mM EDTA buffer. Leakage of carboxyfluoresceine was measured before and
7 after drying as the increase in fluorescence at 515 nm (excitation at 470 nm) in the presence
8 and absence of Triton X-100. PM25-lipid interaction was studied by FTIR spectroscopy using
9 a Perkin-Elmer model 1725 as described in Hoekstra *et al.* (1997). Shortly sonicated POPC or
10 DOPG were dried in the absence or presence of PM25 (mass ratio lipids/protein 1:2) on
11 ionized CaF₂ windows at 3% RH for 20-72 h. Each sample was hermetically sealed in a cabin
12 continuously purged with dry air to prevent rehydration of dry samples. The sample was
13 rapidly cooled until the spectral characteristics of gel phase phospholipids appeared. Spectra
14 were recorded during heating at a warming rate of 1.5°C/min. Phase change was followed
15 using the position of the symmetric CH₂-stretch vibration band.

16

17 **Water sorption isotherms**

18 Lyophilized recombinant protein samples (3-10 mg) and lysozyme powder were
19 equilibrated in triplicates at 25°C over 7 days at different relative humidities (RH) maintained
20 by saturated salt solutions in sealed containers. Isotherms were determined as sorption curves
21 from two independent experiments. Water contents were assayed gravimetrically by weighing
22 the water-protein mixture before and after heating at 96°C for 38 h, a time sufficient to
23 achieve a constant dry weight.

24

25 **RESULTS**

26

27 **PM25 is an atypical LEA protein**

28 Based on observations by FTIR spectroscopy in D₂O, the intrinsically disordered character
29 of PM25 in the hydrated state had been suggested (Boudet *et al.* 2006) but this observation
30 was in contrast to *in silico* predictions (Cuming 1999, Hundertmark & Hinch, 2008).
31 Moreover, PM25 in solution exhibited a significant secondary structure, which is also in
32 contrast to the results from other workers on a range of LEA proteins. Thus, for a definitive
33 conclusion, circular dichroism (CD) measurements were performed to assess the secondary
34 structure of PM25 in the hydrated state. Inspection of the spectrum in distilled water (Fig. 1a)

1 shows a negative peak at 200 nm, which is indicative of a highly unfolded protein in a
2 random coil structure. It is very similar to genuine LEA proteins from group 1 (Soulages *et al.*
3 *et al.* 2002), 2 (Mouillon, Gustafsson & Harryson *et al.* 2006) and 3 (Tollet *et al.* 2007) and
4 indicates that PM25 is largely disordered in the hydrated state. The relative contribution of
5 turns and random coils that were calculated from FTIR and CD measurements was 46% and
6 65-79%, respectively (Table 1).

7
8 *[Table 1 around here]*

9 The heat stable character of PM25, which is a characteristic of unordered proteins is
10 established in Figure 1b. For this purpose, soluble proteins extracted from 6 h-imbibed
11 radicles containing PM25 were submitted to increasing temperatures for 10 min. Aggregates
12 formed during heating were separated by low-speed centrifugation and separated on a 1D
13 SDS-gel. The presence of PM25 in both supernatant and pellet containing aggregates was
14 investigated by western blotting using an antibody against the recombinant PM25. Fig.1b
15 shows that no aggregate involving PM25 is formed when the protein extract was heated at
16 95°C. A similar result was observed for EM6, a group 1 LEA protein (data not shown). Using
17 the known LEA amino acid sequences for *A. thaliana* and *M. truncatula*, we compared the
18 hydrophilic character of the D-34 family with the various groups of LEA proteins for which
19 their intrinsically unordered character has been verified experimentally (Fig. 1c). Clearly, this
20 family contains members that are on average more hydrophobic than the rest of LEA groups.
21 However, *in silico* predictions indicate that the hydrophobic regions are not found in the most
22 conserved regions of the D-34 family members (data not shown).

23 **PM25 does not interact or stabilize phospholipid membranes in the dry state**

24 An important feature of the survival in the dry state is the ability to protect membranes
25 from undergoing phase transition and/or fusion leading to loss of integrity (Hoekstra *et al.*
26 2001). Since such a role has been attributed to dehydrins and group 3 LEA proteins, we
27 assessed whether it was also the case for PM25 using vesicles made of POPC and DOPG,
28 respectively uncharged and negatively charged. Interactions of PM25 with liposomes made of
29 POPC were analyzed before and after drying by monitoring the temperature dependence of
30 the CH₂ symmetric vibrational freedom using FTIR (Fig. 2a). Drying POPC vesicles in the
31 absence of the protein led to an increase in the transition temperature (T_m) from gel phase to
32 liquid crystalline phase from 0°C to 60°C, as previously observed (Hoekstra *et al.* 1997). The
33 presence of PM25 did not influence the T_m of dried POPC vesicles in the heating scans. At

1 room temperature, dried membranes were in the gel phase regardless of whether PM25 was
2 added (Fig. 2a), indicating an absence of interaction.

3 We assessed whether PM25 could offer membrane protection by mechanisms other than
4 suppression of T_m . Liposome leakage assays were performed by measuring the amount of the
5 fluorescent dye carboxyfluorescein that is retained in the POPC liposomes before and after
6 drying. Known protective compounds such as trehalose and Suc are able to maintain vesicle
7 integrity after drying (Fig 2b). In contrast, PM25 partially destabilizes vesicles in the
8 hydrated state since less than 50% of retention is observed. After drying, the vesicles are
9 totally destroyed in the presence of PM25. The above experiments were repeated using
10 DOPG, a phospholipid with less motional freedom of the fatty acid chains. Again, the
11 percentage retention in the presence of PM25 was only 23 ± 10 %, in the hydrated state and no
12 protection was offered in the dry state.

14 **PM25 stabilizes proteins in aggregation assays more efficiently than EM6**

15 LEA proteins confer *in vitro* stabilization of several enzymes against freezing, heating and
16 drying. Therefore, we tested the ability of PM25 to prevent the loss of LDH activity after
17 freezing and drying at ambient pressure and the loss of CS activity after heating. Both models
18 are well known to form aggregates resulting in the loss of activity via different mechanisms
19 yet not fully understood (Goyal *et al.* 2005). EM6, lysozyme, and water were used
20 respectively as positive and negative controls. Physiologically relevant mass excess of test
21 protectants were used based on the observation that PM25 and EM6 represent each 2-4% of
22 the water soluble proteome (SP) of *M. truncatula* radicles (Boudet *et al.* 2006). Fig. 3a shows
23 that PM25 is a potent stabiliser of LDH during 3 cycles of freezing/thawing in a
24 concentration dependent fashion. The enzyme activity is completely recovered at a mass ratio
25 (PM25:enzyme) of 6:1. In contrast, EM6 was mildly efficient regardless as to whether data
26 were expressed on mass ratio (Fig. 3a) or molar ratio (EM6 being *ca.* half the weight of
27 PM25) whereas lysozyme is almost ineffective. Next, we assessed whether PM25 behaved
28 like a chaperone using a standard thermally-induced unfolding assay with CS. The
29 inactivation kinetics experiment shows that during heating at 43°C CS lost virtually all
30 activity within 20 min, whereas the presence of PM25 significantly retarded the loss of the
31 activity early during heating (Fig. 3b). In contrast, EM6 or BSA were not able to exert this
32 effect. Figure 3c shows that the stabilisation effect by PM25 early during heating is
33 concentration dependent. The recovery yield was maximum at a mass ratio PM25:CS of 4:1
34 irrespective of the heating time. It was 1.8- and 2.4 -fold higher in the presence of PM25 than

1 in water controls after 2 and 5 min heating, respectively. This suggests that PM25 stabilizes
2 CS against heating by acting on certain intermediates that are transiently formed during
3 heating but not on the denatured enzyme.

4 To test the protective activity of PM25 against desiccation, we dried a LDH and CS
5 solution at 40% RH. Such *in vitro* desiccation was found to be very harsh since very little
6 LDH and CS activity could be recovered upon rehydration after drying (Fig. 3d, e). The
7 presence of PM25 at a mass ratio 2:1 or 10:1 allowed 15% recovery of LDH activity upon
8 rehydration (Fig. 3d). Albeit this low recovery, the significance of this observation is
9 underscored by the fact that EM6 or lysozyme is far from achieving such yields even at high
10 mass excess ratio (10:1). Fig. 3e shows that both PM25 and EM6 could offer a partial
11 protection to CS against drying in a concentration dependent manner, as previously described
12 for other LEA proteins (Goyal *et al.* 2005; Gilles *et al.* 2007). Again, PM25 was more
13 efficient at protecting CS from drying than EM6.

14 Goyal *et al.* (2005) argued that assaying protective efficiency of enzyme activity might not
15 be sufficient to understand the function of LEA proteins because protein aggregates might be
16 toxic rather than non functional. Hence, we assessed whether PM25 could prevent the
17 formation of aggregates formed upon freezing or drying using a more complex set of test
18 proteins. This consisted of the water SP that was extracted from germinated radicles
19 harvested at a stage when they had become desiccation-sensitive and both PM25 and EM6
20 had disappeared (Boudet *et al.*, 2006). The level of aggregation was assessed by measuring
21 the turbidity of the protein extract. Fig. 4a shows that in the presence of PM25 the cold-
22 aggregation of the complex seedling SP was inhibited even after 8 freeze-thaw cycles. Drying
23 of the SP in the presence of PM25 or EM6 (mass ratio protectant: SP 2:1) also prevented the
24 formation of aggregates induced by the water loss compared to water and BSA controls.
25 However, PM25 appeared to be significantly more efficient than EM6.

27 **PM25 dissolves stress-induced aggregates of water-soluble proteins upon thawing and** 28 **rehydration.**

29 The above findings suggest that PM25 can act as a molecular chaperone by passively
30 preventing the formation of protein aggregates in agreement with previous observations
31 (Chakrabortee *et al.* 2007, Kovacs *et al.* 2008). We addressed further the possibility that this
32 functional analogy with heat shock proteins could be extended to the recovery of stress-
33 induced protein aggregates by rapidly dissolving them upon thawing or rehydration. Thus, in
34 the following set of experiments (Fig. 5), test proteins were added after inducing the

1 formation of aggregates in the water SP of germinated radicles by freezing or drying. It was
2 verified that the aggregates did not spontaneously disappear once the SP was brought back to
3 ambient hydrated conditions or were not sensitive to dilutions in water. Figure 5a shows that
4 the addition of PM25 to the water SP after thawing leads to a significant decrease in turbidity
5 compared to water controls, suggesting that PM25 is able to dissolve aggregates formed after
6 two successive freeze thawing cycle. To validate this observation and to determine whether
7 PM25 dissolved a subset of the aggregated proteome, the aggregates formed after freezing
8 were separated from the soluble fraction by centrifugation. Each fraction was then separated
9 on a SDS gel electrophoresis. In the control experiment, adding water had no effect on
10 aggregate dissociation: most proteins are found in the pellet, suggesting that freezing/thawing
11 had induced a non specific aggregation of the SP (Fig. 5b). Consistent with the turbidity
12 measurements, adding PM25 (mass ratio 2:1) upon thawing after freezing completely
13 dissolves the aggregates in a non preferential manner: all proteins are found in the
14 supernatant. We further documented the efficiency of PM25 to dissolve aggregates by
15 establishing a dose response curve (Fig. 5c). The quantity of PM25 required to significantly
16 reduce the amount of aggregates upon thawing is low: a significant effect is already observed
17 at a 0.5 PM25:SP mass ratio. Since the number of freeze-thawing cycles had a significant
18 effect on the turbidity measurements (Fig. 4a), we ascertained that PM25 was still efficient in
19 reducing the turbidity after 8 cycles of freeze-thawing (Fig. 5d).

20 The pathway leading to the formation of aggregates depends on the way that the stabilizing
21 action of water on protein structure is perturbed by freezing or drying. Hence, we tested
22 whether PM25 exerted a similar disaggregating effect during rehydration of the dried SP.
23 The addition of PM25 during rehydration of the dried seedling SP (mass ratio 2:1) led to a
24 significant decrease in the turbidity of the solution (Fig. 5e), whereas adding water alone did
25 not dissolve the aggregates. The significance of this result is again highlighted by the fact that
26 EM6 and BSA were not as efficient as PM25 at equivalent mass ratio. Unlike the
27 freezing/thawing treatment, some desiccation-induced aggregates were not stable since the
28 rehydration process could resolubilize a small fraction of them. This can be seen on the 1D
29 gel where proteins exhibiting a wide range of M_w are found in the supernatant after drying
30 (Fig. 5f, lane 1). PM25 was able to induce the disappearance of aggregates, particularly those
31 involving proteins of $M_w < 50$ kDa (Fig. 5f, lane 4).

32 Next, we tested whether PM25 was also restoring CS and LDH activity when the protein
33 was added at physiologically relevant concentrations after heating and freezing-thawing,
34 respectively. A significant increase in activity recovery was observed when PM25 was added

1 to CS submitted to incipient 2 min of heating whereas EM6 had no effect (Supporting
2 Information, Table 1). After longer heating time, PM25 had no effect on the recovery of CS.
3 Likewise, it could not restore the enzyme activity of LDH after freeze-thawing (Supporting
4 Information, Table 1).

6 **PM25 targets specifically stress-induced aggregates**

7 The morphology of aggregates and other proteic macromolecular assemblies widely varies
8 depending on amino-acid sequence and environmental factors and exhibit various potentials
9 to impair the cell (Bucciantini *et al.* 2002; Nigen *et al.* 2007; Weijers *et al.* 2008). Therefore,
10 we wanted to know how the turbidity measurements and 1D gel analysis after centrifugation
11 reflected the macrostructural organisation of aggregates in solution before and after freezing
12 in the absence and presence of PM25 using microscopy and size polydispersity
13 measurements. Phase contrast micrographs shows that the dialyzed seedling proteome
14 exhibits numerous small spherical and regular shaped structures (Fig. 6a). These structures
15 were identified as coacervates (i.e. liquid droplets). They are the result of a liquid-liquid
16 phase separation of charged proteins giving rise to a dense protein-rich concentrated phase in
17 equilibrium with a protein-poor diluted phase (Nigen *et al.* 2007). Dynamic light scattering
18 analysis shows that at 25°C, the average diameter of coacervates were of 250 nm (Fig. 6b).
19 Adding PM25 to the solution did not affect the morphology and the size distribution of the
20 coacervates. In contrast, freezing had a profound effect on this colloidal dispersion. In the
21 absence of PM25, the thawed solution exhibited no coacervates but instead large amorphous
22 aggregates (Fig. 6c). Adding PM25 upon thawing resulted in the disappearance of the
23 aggregates, those remaining being much smaller and of different morphology (Fig. 6d). Also,
24 no coacervate was observed in the thawed solution in the presence of PM25. We assayed the
25 effect of PM25 on the size distribution of the aggregates using light microscopy because they
26 were too large to be analysed by light scattering. Figure 6e confirms that PM25 is able to
27 reduce both the average surface area and the size distribution by a 1 and 7 orders of
28 magnitude, respectively.

30 **The unstructured PM25 absorbs water at high relative humidities**

31 Another feature of disordered proteins and LEA proteins is their high hydration capacity in
32 comparison with globular proteins (Bokor *et al.* 2005; Tompa *et al.* 2006). Thus, we assessed
33 whether PM25 was able to bind water comparably to EM6 which exhibits a relatively high
34 “hydration potential” (Mc Cubbin *et al.* 1985). The solutions of purified recombinant protein

1 were dialyzed against water, dried under vacuum and then equilibrated at different RH at
2 25°C in order to construct a water sorption isotherm (Fig. 7). As a control, lysozyme was
3 used as its molecular weight is close to that of PM25 and its sorption properties are well
4 characterized. Below 60% RH, the three proteins absorb similar amounts of water whereas
5 above 60%, both LEA proteins “bind” much more water than lysozyme. For example at 85%
6 RH, EM6 is able to absorb 2- fold more water than lysozyme. Interestingly, PM25 has an
7 even higher capacity to absorb water, i.e. 5-fold more.

9 **DISCUSSION**

11 After establishing that PM25 exhibits all the described structural, biochemical and
12 functional features that characterize canonical LEA proteins (Tunnacliffe & Wise, 2007), this
13 study describes the comparative functional analysis of PM25 and EM6, two LEA proteins
14 with contrasted hydrophilicity but each associated with DT in *M. truncatula* seeds (Boudet *et al.*
15 *et al.* 2006). The demonstration that PM25 is able to stabilize model enzymes or a complex set
16 of water soluble proteins from germinated radicles after freezing and to some extent, drying is
17 consistent with previous observations made on other LEA proteins from group 1 (Gilles *et al.*
18 2007), 2 (Reyes *et al.* 2008) and 3 (Goyal *et al.* 2005; Chakrabortee *et al.* 2007). It is
19 noteworthy that the prevention of freeze-induced LDH inactivation by PM25 is also
20 consistent with the recent findings obtained for LjDP1 belonging to another unusual group
21 (i.e. Lea5 group, Haaning *et al.* 2008). LjDP1 also shows a hydrophobic character, albeit not
22 as strong as PM25 and forms β -sheet structures. The stabilization effect of PM25 is also
23 evident in the thermal inactivation experiment in which the presence of PM25 delayed the
24 loss of CS activity early during heating. Collectively, a comparison of Figures 3-5 with the
25 literature makes it safe to assume that a first protective function of PM25 is to prevent protein
26 from aggregating during stress. The avoidance of protein aggregation is crucial for the
27 preservation of biological function (Ben-Zvi & Goloubinoff 2001; Bucciantini *et al.* 2002).
28 Our results support the hypothesis that the prevention of protein aggregates during drying and
29 rehydration might be a key feature for DT, not only in animal anhydrobiotes (Chakrabortee *et al.*
30 *et al.* 2007) but also in seeds.

31 Of particular significance towards a new anti-aggregative function is the demonstration
32 that *in vitro*, PM25 is very effective at rapidly scavenging stable aggregates within a water SP
33 that were formed during drying or freezing in the absence of the protein. It is also able to
34 significantly improve the recovery of CS activity when it is added after a 2 min heat stress.

1 These findings are underscored by the observation that EM6 is far less effective throughout
2 the various assays. Also, when EM6 shows a significant effect compared to water controls, in
3 most cases it is as effective as BSA or lysozyme. The implications of these observations
4 further extend those of Chakrabortee *et al.* (2007) on AAvLEA1. This nematode LEA protein
5 from group 3 was able to reduce the aggregation of proteins that occurred progressively
6 during rehydration of a dried proteome from animal cells. In contrast here, the water SP of
7 germinated radicles did not form further aggregates during rehydration or after thawing,
8 indicating that PM25 dissociates aggregates formed specifically during stress. Also, from the
9 curve response determining the amount of PM25 necessary to induce disaggregation after
10 thawing (Fig. 5c), it is calculated that PM25 is very efficient. The N terminal amino-acid
11 sequence of PM25 exhibits a QPRRP motif which is conserved among members of the D-34
12 family and corresponds to a known conserved nuclear localization signal (Borrell *et al.* 2002).
13 Therefore, considering its nuclear localization, PM25 might be essential to ensure that no
14 aggregates will remain upon rehydration that could jeopardize the nuclear activities during
15 resumption of metabolism upon imbibition. In this respect, it is noteworthy that the
16 reversibility of desiccation-induced chromatin condensation upon rehydration is a property
17 associated with DT in imbibed seeds (Leprince *et al.* 1995). Therefore, by dissolving
18 aggregates when added after stress, the action of PM25 could then be related to a protein
19 repair process. A significant protecting role of PM25 during rehydration also fits our current
20 understanding of DT since the importance of this step for survival after drying has been
21 documented (Hoekstra *et al.* 1997; 2001). Although our *in vitro* data implies some limitations
22 to our understanding of the function of PM25, they offer an interesting lead for further *in vivo*
23 experiments.

24 The anti-aggregative functions of LEA protein are explained by two molecular
25 mechanisms, namely the chaperone function (Kovacs *et al.* 2008) and the molecular shield
26 function (Tunnacliffe & Wise, 2007). Very recently Kovacs *et al.* (2008) argued that the
27 distinction between both models may not be tenable. Our data support this contention because
28 they satisfy both models. The chaperone-like activity could be explained by the hydrophobic
29 nature of PM25 together with its disordered conformation, both facilitating or inducing
30 transient hydrophobic interactions with exposed surfaces of the aggregates as suggested by
31 Haaning *et al.* (2008). In reminiscence of the classical chaperone systems (Ben-Zvi &
32 Goloubinoff 2001), PM25 would act to disentangle large aggregates after stress, thereby
33 facilitating the action of other folding enzymatic or molecular chaperones. This could explain
34 why PM25 alone is so poorly effective at recovering CS and LDH activity when it has been

1 denatured by heating and freezing, respectively (Supporting Information, Table 1). A
2 chaperone-like activity which does not require ATP during rehydration is an attractive model
3 because ATP is absent in dry seeds and will progressively be synthesized during the
4 imbibition (Leprince *et al.* 2000 and references therein). However, the protective action
5 offered by PM25 to the entire soluble proteome does not support evidence that a particular
6 kind of proteins is targeted (Fig. 5). According to Kovacs *et al.* (2008), this unspecific
7 protection action goes against the idea that the term chaperone is used for a specific
8 interaction with a client protein.

9 Alternatively, the molecular shield theory is derived from the knowledge on the
10 mechanism of steric stabilization of colloidal dispersions by polymers (Tunnacliffe & Wise
11 2007). Accordingly, PM25 would coat unspecifically native proteins during stress via a steric
12 stabilization effect, thereby preventing them from aggregating during stress. However, such a
13 stabilization mechanism can not entirely explain why PM25 is able to efficiently dissolve
14 aggregates after stress in the hydrated state. It cannot explain either the significant difference
15 in efficiency between PM25 and LEA proteins such as EM6 and AAvLEA1. Apart from
16 steric stabilization effects, “depletion flocculation” is another factor affecting the stability of
17 colloidal suspensions to which coacervates can be assimilated (Dickinson 2003; Radford &
18 Dickinson 2004). When the colloidal coacervates come closer together, solvent between
19 particles tends to diffuse out under the influence of a local osmotic pressure gradient, causing
20 the colloidal coacervates to transform into aggregates (Dickinson, 2003; Radford &
21 Dickinson, 2004; Nigen *et al.* 2007). In the light of the increased water binding capacity of
22 PM25 in the disordered state (Fig. 7), PM25 could destabilize stable and large aggregates by
23 interfering with the interfacial water around the hydrophilic and hydrophobic moieties of the
24 proteins that were adsorbed to each other as a consequence of the close approach during the
25 incipient freezing and drying. This mechanism can also explain why PM25 destabilizes *in*
26 *vitro* liposomes made of two kinds of phospholipids in the hydrated state. As previously
27 reported for two group LEA 3 proteins (the nematode AAvLEA1 and the bdelloid rotifer
28 ArLEA1A (Pouchkina-Stantcheva *et al.* 2008), we found no evidence for an interaction
29 between PM25 and both phospholipids. According to Borrell *et al.* (2002), the PM25
30 homologue Atrab28 was not located near nuclear membranes. Therefore, the reasons as to
31 why PM25 has a negative impact of membranes were not further investigated in this study.

32 The proposed anti-aggregative action of PM25 developed above relies on its capacity to
33 modify the water solvent properties. This was experimentally validated using water sorption
34 isotherms (Fig. 7). At high RH, PM25 was found to bind significantly more water than

1 lysozyme. Previously, FTIR measurements showed that at 85% RH, PM25 is still largely
2 unordered (Boudet *et al.* 2006). At RH below 65% which allows PM25 to adopt a structured
3 conformation (Boudet *et al.*, 2006), there was no difference in water binding compared to
4 lysozyme. Thus, the increased water binding capacity of PM25 compared to lysozyme is
5 attributable to the intrinsic disordered nature of the protein which retains a large surface area.
6 Previous observations on the hydration capacity of dehydrins (Bokor *et al.* 2005; Mouillon *et*
7 *al.* 2006; Tompa *et al.* 2006) were related to water molecules in the vicinity of the proteins
8 (or “tightly bound” water in the easiest conceptualization) rather than bulk water. Here, the
9 increased binding capacity of PM25 and EM6 is related rather to the surrounding water layers
10 that are considered as “weakly” adsorbed. Therefore, if we tentatively extrapolate to a drying
11 biological system, the water molecules around PM25 would be more “energetically” available
12 to act as a hydration buffer than tightly bound water molecules. Based on the understanding
13 of the role of hydration water in protein unfolding (Robinson & Cho 1999; Harano, Roth &
14 Kinoshita 2006), an elaboration of the hydration function model could be that water
15 molecules hold by PM25 upon drying could easily provide a large number of hydrogen bonds
16 to prevent protein unfolding induced by desiccation. In addition, the hydration function could
17 be to alter the water structure and properties around the aggregates to destabilize them during
18 rehydration or thawing.

19 In conclusion, our results offer new insights into the protective functions of LEA proteins
20 whereby they can exert multiple functions, namely performing hydration functions most
21 likely by long range interactions during drying, and rescuing proteins from aggregates during
22 rehydration. By benchmarking the protective efficiency of PM25 against EM6, we suggest
23 that the protective efficiency of PM25 might lie in the combination of its unusual
24 characteristics such as its hydrophobicity and the high water sorption capacity of the
25 disordered conformation.

26

27 **ACKNOWLEDGMENTS**

28 This work was supported by the Région des Pays-de-la Loire (program COSAVE and
29 postdoctoral fellowships to X. Lin and M. Hundertmark).

30

31

1 REFERENCES

- 2 Battaglia M., Olvera-Carrillo Y., Garcarrubio A., Campos F. & Covarrubias A.A. (2008) The
3 enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology* **148**, 6-24.
- 4 Ben-Zvi A.P. & Goloubinoff P. (2001) Mechanisms of disaggregation and refolding of stable
5 protein aggregates by molecular chaperones. *Journal of Structural Biology* **135**, 84-93.
- 6 Bokor M., Csizs m r V., Kov acs D., B nki P., Friedrich P., Tompa P. & Tompa K. (2005)
7 NMR relaxation studies on the hydrate layer of intrinsically unstructured proteins.
8 *Biophysical Journal* **88**, 2030-2037.
- 9 Boudet J., Buitink J., Hoekstra F.A., Rogniaux H., Larre C., Sator P. & Leprince O. (2006)
10 Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula*
11 seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with
12 desiccation tolerance. *Plant Physiology* **140**, 1418-1436.
- 13 Borrell A., Cutanda M.C., Lumberras V., Pujal J., Goday A., Culi a nez-Macia F.A. & Pag s
14 M. (2002) Arabidopsis thaliana Atrab28: a nuclear targeted protein related to germination
15 and toxic cation tolerance. *Plant Molecular Biology* **50**, 249-259.
- 16 Bucciantini M., Giannoni E., Chiti F., Baroni F., Formigli L., Zurdo J., Taddel N., Ramponi
17 G., Dobson C.M. & Stefani M. (2002) Inherent toxicity of aggregates implies a common
18 mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* **416**, 507-511.
- 19 Buitink J., Leger J.J., Guisle I., Ly-Vu B., Wuilleme S., Lamirault G., Le Bars A., Le Meur
20 N., Becker A., Kuester H. & Leprince O. (2006) Transcriptome profiling uncovers
21 metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-
22 sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. *The Plant Journal*
23 **47**, 735-750.
- 24 Buitink J. & Leprince O. (2004) Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry
25 state. *Cryobiology* **48**, 215-228.
- 26 Chakrabortee S., Boschetti C., Walton L.J., Sarkar S., Rubinsztein D.C. & Tunnacliffe A.
27 (2007) Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein
28 stabilization function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*
29 *States of America* **104**, 18073-18078.
- 30 Cuming A.C. (1999) LEA proteins. In: Seed Proteins (eds P.R. Shewry & R. Casey), pp 753-
31 780. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands,
- 32 Dickinson E. (2003) Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of
33 dispersed systems. *Food Hydrocolloids* **17**, 25-39.

- 1 Gilles G.J., Hines K.M., Manfre A.J. & Marcotte W.R. (2007) A predicted N-terminal helical
2 domain of a Group 1 LEA protein is required for protection of enzyme activity from
3 drying. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**, 389-399.
- 4 Goyal K., Walton L.J. & Tunnacliffe A. (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due
5 to water stress. *Biochemical Journal* **388**, 151-157.
- 6 Haaning S., Radutoiu S., Hoffmann S.V., Dittmer J., Giehm L., Otzen D.E. & Stougaard J.
7 (2008) An unusual intrinsically disordered proteins from the model legume *Lotus*
8 *japonicus* stabilizes proteins *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 31142-31152.
- 9 Hara M., Fujinaga M. & Kuboi T. (2004) Radical scavenging activity and oxidative
10 modification of citrus dehydrin. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 657-662.
- 11 Harano Y., Roth R., Kinoshita M. (2006) On the energetics of protein folding in aqueous
12 solution. *Chemical Physics Letters* **432**, 275-280.
- 13 Hoekstra F.A., Wolkers W.F., Buitink J., Golovina E.A., Crowe J.H. & Crowe L.M. (1997)
14 Membrane stabilization in the dry state. *Comparative Biochemistry and Physiology*
15 **117A**, 335-341.
- 16 Hoekstra F.A., Golovina E.A. & Buitink J. (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance.
17 *Trends in Plant Sciences* **6**, 431-438.
- 18 Hundertmark M. & Hinch D.K. (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and
19 their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* **9**, 118.
- 20 Kovacs D.S., Kalmar E., Torok Z. & Tompa P. (2008) Chaperone activity of ERD10 and
21 ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiology* **147**, 381-390.
- 22 Krüger C., Berkowitz O., Stephan U.W. & Hell R. (2002) A metal-binding member of the
23 late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus*
24 *communis* L. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 25062-25069.
- 25 Leprince O., Colson P., Houssier C. & Deltour R. (1995) Changes in chromatin structure
26 associated with germination of maize and their relation with desiccation tolerance. *Plant,*
27 *Cell and Environment* **18**, 619-629.
- 28 Leprince O., Harren F.J.M., Buitink J., Alberda M. & Hoekstra F.A. (2000) Metabolic
29 dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during
30 dehydration of germinating radicles. *Plant Physiology* **122**, 597-608.
- 31 Manfre A.J., LaHatte G.A., Climer C.R. & Marcotte W.R. Jr (2009) Seed dehydration and the
32 establishment of desiccation tolerance during seed maturation is altered in the
33 *Arabidopsis thaliana* mutant *atem6-1*. *Plant Cell Physiology* **50**, 243-253.

- 1 Mc Cubbin W.D., Kay C.M. & Lane B.G. (1985) Hydrodynamic and optical properties of the
2 wheat germ Em protein. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* **63**, 803-
3 811.
- 4 Mouillon J-M., Gustafsson P. & Harryson P. (2006) Structural investigation of disordered
5 stress proteins. Comparison of full-length dehydrins with isolated peptides of their
6 conserved segments. *Plant Physiology* **141**, 638-650.
- 7 Nigen M., Croguennec T., Renard D. & Bouhallab S. (2007). Temperature affects the
8 supramolecular structures resulting from α -lactalbumin-lysozyme interactions.
9 *Biochemistry* **46**, 1248-1255.
- 10 Pouchkina-Stantcheva N.N., McGee B.M., Boschetti C., Tolleter D., Chakrabortee S., Popova
11 A.V., Meersman F., Macherel D., Hinch D.K. & Tunnacliffe A. (2007) Functional
12 divergence of former alleles in an ancient asexual invertebrate. *Science* **318**, 268-271.
- 13 Radford S.J. & Dickinson E. (2004) Depletion flocculation of caseinate-stabilised emulsions:
14 what is the optimum size of the non-adsorbed protein nano-particles. *Colloids and*
15 *Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects* **238**, 71-81.
- 16 Reyes J.L., Campos F., Wei H., Arora R., Yang Y., Karlson D.T. & Covarrubias A.A. (2008)
17 Functional dissection of hydrophilins during *in vitro* freeze protection. *Plant, Cell and*
18 *Environment* **31**, 1781-1790.
- 19 Robinson G.W. & Cho C.H. (1999) Role of hydration water in protein unfolding. *Biophysical*
20 *Journal* **77**, 3311-3318.
- 21 Soulagés J.L., Kim K., Walters C. & Cushman J.C. (2002) Temperature-induced extended
22 helix/random coil transitions in a group 1 late embryogenesis-abundant protein from
23 soybean. *Plant Physiology* **128**, 822-832.
- 24 Srere P.A. (1966) Citrate-condensing enzyme-oxalacetate binary complex. Studies on its
25 physical and chemical properties. *Journal of Biological Chemistry* **241**, 2157-2165.
- 26 Tunnacliffe A. & Wise M.J. (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins.
27 *Naturwissenschaften* **94**, 791-812.
- 28 Tolleter D., Jacquino M., Mangavel C., Passirani C., Saulnier P., Manon S., Teyssier E.,
29 Payet N., Avelange-Macherel M-H. & Macherel D. (2007) Structure and function of a
30 mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. *Plant*
31 *Cell* **19**, 1580-1589.
- 32 Tompa P., Bokor M., Kamasa P., Kovacs D., Lasanda G. & Tompa K. (2006) Protein-water
33 and protein buffer interactions in the aqueous solution of an intrinsically unstructured
34 plan dehydrin: NMR intensity and DSC aspects. *Biophysical Journal* **91**, 2243-2249.

- 1 Weijers M., Broersen K., Barneveld P.A., Cohen Stuart M.A., Hamer R.J., De Jongh H.H.J.
2 & Visschers R.W. (2008) Net charge affects morphology and visual properties of
3 ovalbumin aggregates. *Biochemistry* **9**, 3165-3172.
- 4 Wise M.J. & Tunnacliffe A. (2004) POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in*
5 *Plant Sciences* **9**, 13-17.
- 6 Whitmore L. & Wallace B.D. (1994) DICHROWEB, an online server for protein secondary
7 structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acid Research* **32**,
8 668-673.
- 9 Zhou P., Liu X. & Labuzza T.P. (2008) Moisture-induced aggregation of whey proteins in a
10 protein/buffer model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 2048-2054.
11

1 **Table 1.** Secondary structure predictions of hydrated PM25 in D₂O obtained from FTIR and
2 CD spectra in 5 mM NaH₂PO₄ buffer (pH 7.5). The secondary structure from CD
3 measurements was predicted using different Dicroweb software packages (Whitmore and
4 Wallace, 2004). FTIR data are from Boudet et al. (2006)

5

Spectroscopy, algorithm	Secondary structure (% of contribution)			
	Helix	Strand	Turn	Unordered
FITR, peak fitting	33.0	18.0	23.0	26.0
CD, CONTINLL	14.5	12.8	10.3	62.4
CD, SELCON3	13.0	22.0	15.0	50.0
CD, CDSSTR	8.0	13.0	9.0	70.0

6

7

1 **Figure legends**

2

3 **Figure 1.** Hydrophobic and unstructured character of PM25 and other members of the D-34
4 family. (a) CD spectrum of the full-length PM25 in phosphate buffer at 20°C. (b) PM25
5 remains soluble upon heating. Proteins extracted from 6h-imbibed radicles containing PM25
6 were heated for 10 min at indicated temperatures, then sedimented with centrifugation. The
7 pellet (P) and supernatant (S) were run on SDS-PAGE and analysed by western blotting using
8 an antibody against PM25. (c) The cumulative distribution of GRAVY values among the
9 major groups of LEA proteins from *M. truncatula* and Arabidopsis (group 1, (◇) ; dehydrin
10 (Δ); group 3 (□); group 4(∇) (D113), D-34 (●)). Values were obtained using the Protparam
11 tool (www.expasy.ch).

12

13 **Figure 2.** PM25 does not protect liposomes. (a) Wavenumber versus temperature plot (FTIR)
14 of POPC liposomes dried at 3% RH in the presence (●) or absence (○) of PM25 (mass ratio
15 lipid:protein 1:2). The data points represent the symmetric CH₂ stretching vibration of POPC
16 and show that PM25 does not influence the lipid phase transition, indicated by the shift in
17 wavenumber. Hydrated control (grey symbols) is also shown. (b) Retention of
18 carboxyfluorescein by POPC liposomes before (controls) or after drying at 3% RH in the
19 presence and absence of Trehalose (Tre), Suc and Fru (mass ratio lipid:sugar 1:5) and PM25
20 (mass ratio lipid:protein 1:2). Data are average of 3-4 replicates.

21

22 **Figure 3.** PM25 protects LDH and CS activity against freezing (a), heating (b-c) and drying
23 (d-e). (a) Recovery of LDH activity following 3 freeze-thawing cycles in the absence (water
24 controls, grey triangles) and the presence of test proteins (PM25, ●; EM6, ○; lysozyme,
25 (LYZ) grey squares) at the indicated mass ratios. (b) Kinetics experiment showing the
26 recovery of CS activity during heating at 43°C for the indicated times. Test proteins (mass
27 ratio protein:CS 2:1) were added before heating. (c) Recovery of CS activity after 2 min (●)
28 and 5 min (○) heating at 43°C as a function of PM25:CS mass ratio. (d) The recovery of LDH
29 activity after drying at 40 % RH in the presence of PM25 (black bars), EM6 (white bars),
30 lysozyme (light grey) and water as a function of the mass ratio protein:LDH. (e) The recovery
31 of CS activity after drying at 40% RH in the presence of PM25 (●), EM6 (○) and water (grey
32 triangles) as a function of protein:CS mass ratio. Throughout the experiments, water was used
33 as controls to assess the dilution effect. Data are expressed as % of activity measured before
34 the stress in the presence of the corresponding protein. They are the average (± SE) of 3-5

1 replicates from 2 independent experiments. Different letters shown above the bars represent
2 significant differences after multiple comparisons of the means ($P < 0.05$). The broken line
3 indicates the level of turbidity before stress.

4
5 **Figure 4.** PM25 inhibits aggregates formation during freezing and drying of the water soluble
6 proteome (SP) of desiccation-sensitive *M. truncatula* radicles. (a) Effect of 2 and 8 freezing-
7 thawing cycles on the turbidity of the solution measured by the absorbance ratio A_{340}/A_{280} in
8 water controls (white bars) and with PM25 (black bars, mass ratio PM25:SP 2:1). (b) Effect
9 of test proteins (mass ratio test protein:SP 2:1) on the turbidity of the solution after drying at
10 40% RH. Data are the average (\pm SE) of 3-5 replicates of a representative experiment.
11 Different letters shown above the bars represent significant differences after multiple
12 comparisons of the means ($P < 0.05$).

13
14 **Figure 5.** PM25 dissolves aggregates formed in the water soluble proteome (SP) of *M.*
15 *truncatula* radicles after freezing-thawing (a-d) and drying at 40% RH (e-f). (a, e) The effect
16 of adding various test proteins (mass ratio protein:SP 2:1) or water (controls) on the turbidity
17 of the solution obtained after 2 cycles of freeze-thawing or drying. (b, f) Representative
18 polyacrylamide gel of soluble (sup.) and insoluble fractions (pel.) of the SP obtained after two
19 freeze-thawing cycles (b) or drying (f). Water (controls) or PM25 (mass ratio protein:SP 2:1)
20 was added after stress before separating soluble and insoluble fractions. The gel was loaded
21 so that the sum of the amounts of the proteins present in the soluble and insoluble fractions
22 was equal between the control and PM25-treated samples. (c), The effect of increasing
23 quantities of PM25 (●) or water (○) added after 2 cycles of freeze-thawing on the solution
24 turbidity. Volumes added to the SP solution were kept constant. (d) The effect of 2 and 8
25 freezing-thawing cycles on the turbidity of the solution after adding water (controls, white
26 bars) or PM25 (mass ratio PM25:SP 2:1, black bars). (e) Data are the average (\pm SE) of 3-5
27 replicates of a representative experiment. Different letters shown above the bars represent
28 significant differences after multiple comparisons of the means ($P < 0.05$).

29
30 **Figure 6.** PM25 disaggregates freezing-induced large stable aggregates but not coacervates.
31 (a) Micrograph of the dialyzed water soluble proteome (SP) of *M. truncatula* radicles taken at
32 25°C show coacervates. (b) Size distribution of coarcevates formed from the SP in the
33 presence (●) and absence (○) of PM25 (mass ratio protein:SP 2:1) at 25°C. (c-d),
34 Micrographs of the water SP that was submitted to freeze-thawing: (c) water controls; (d)

1 after adding PM25 (mass ratio protein:SP 2:1). E, Surface area distribution of the aggregates
2 calculated from panel (c) and (d). Curves were fitted as an aid to the eye.

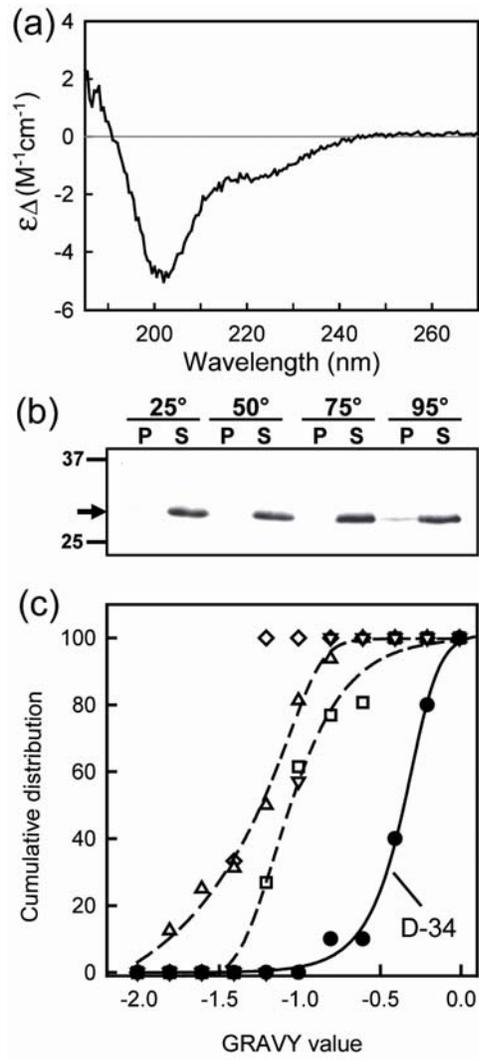
3

4 **Figure 7.** Water sorption isotherm of PM25 (●), EM6 (○) and lysozyme (LYZ, Δ) at 25°C.

5 Data are the average of 2-6 replicates obtained from two independent experiments.

6

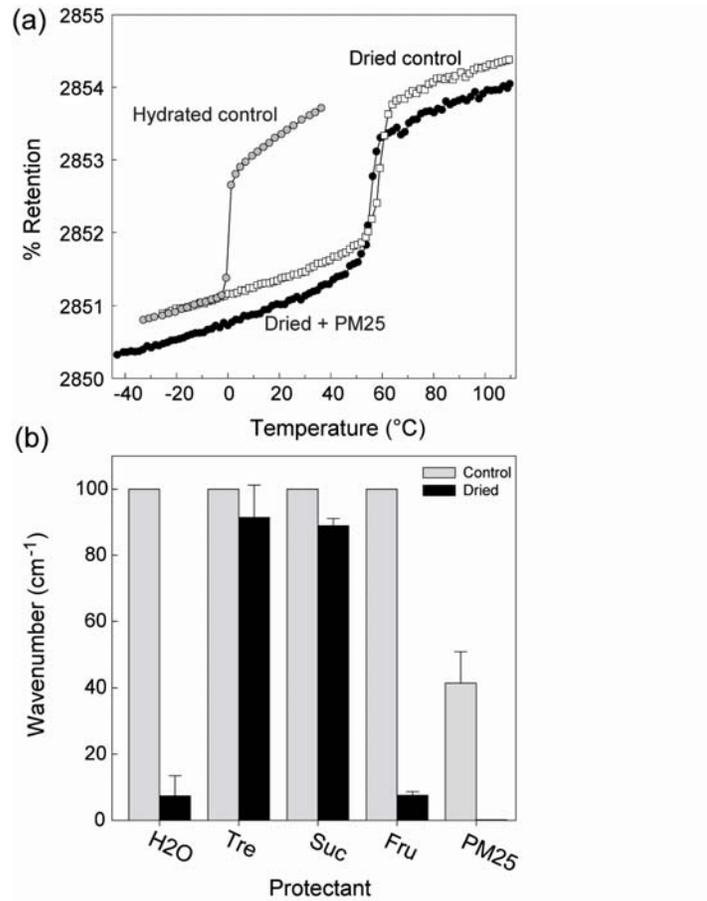
1
2



3
4

FIGURE 1

1



2

3

4

FIGURE 2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

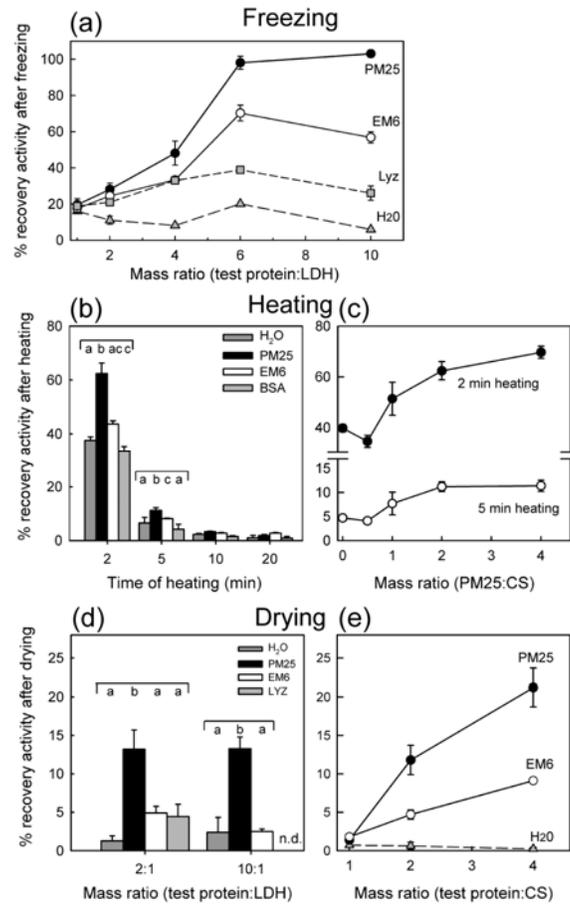
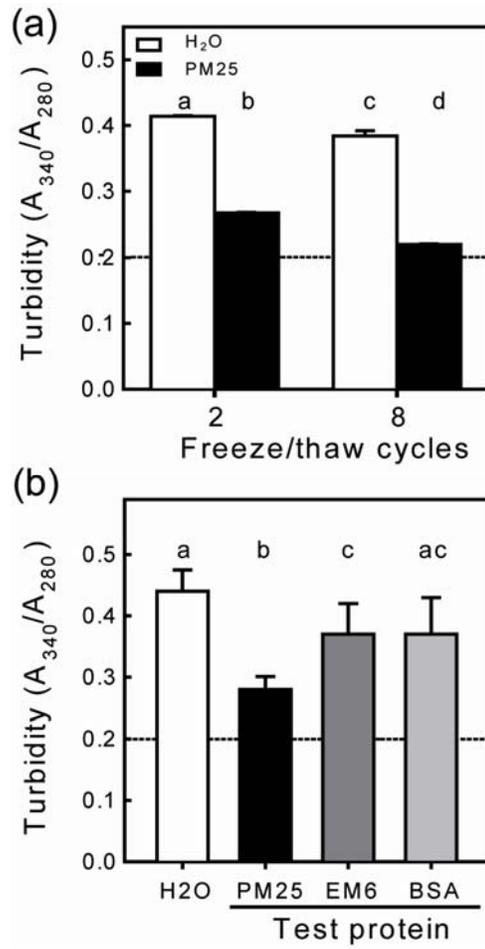
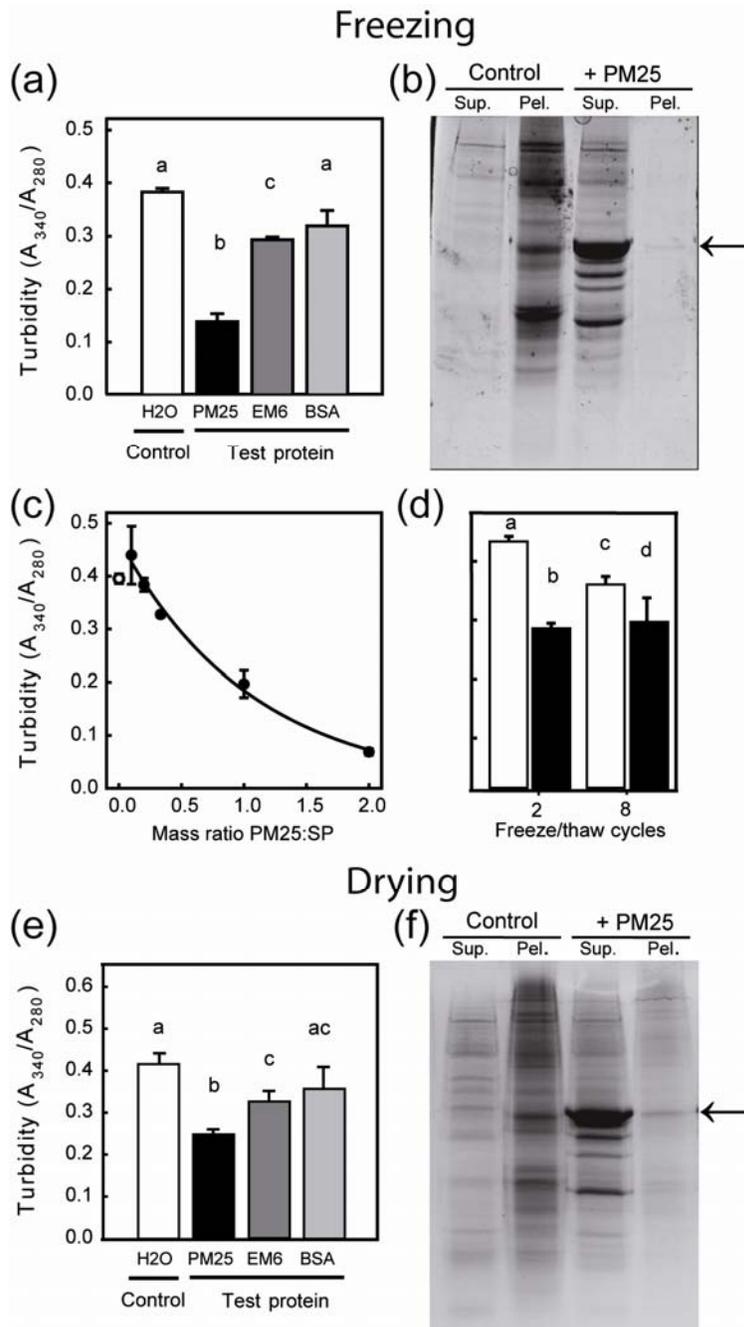


FIGURE 3



1
2
3

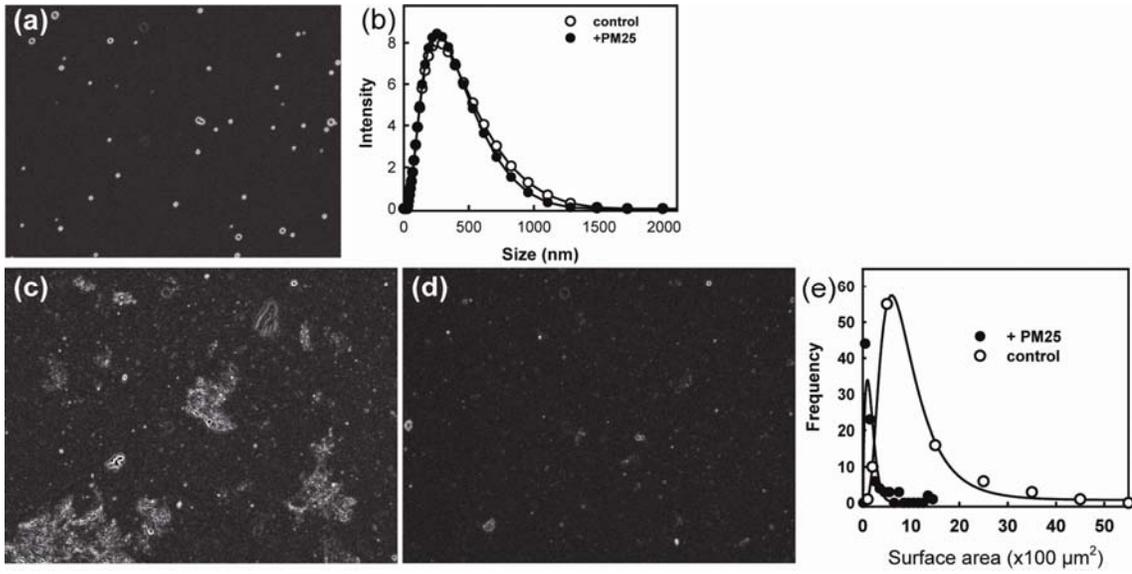
FIGURE 4



1
2
3
4

FIGURE 5

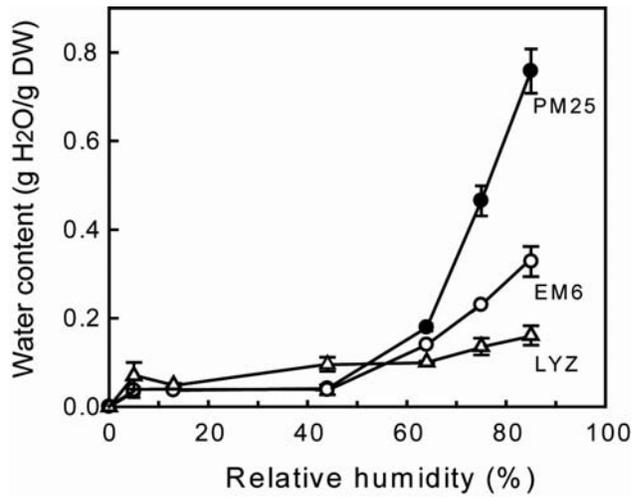
1
2
3



4
5
6
7
8
9

FIGURE 6

1
2



3
4
5
6
7

FIGURE 7

SUPPORTING INFORMATION

Table 1. The effects of adding PM25 or EM6 on the activities of aggregation-prone enzymes that were first submitted to aggregation stress.

Citrate synthase (0.012 μ M) was heated at 43°C for 2 or 5 min then cooled on ice for 2 min whereas lactate dehydrogenase (0.007 μ M) was submitted to 2 cycles of snap freezing in liquid N₂ followed by thawing for 10 min. PM25, EM6 or BSA controls was added (mass ratio protectant:enzyme 2:1). Water was also used as control to assess the dilution effect. Details of the enzyme assay are described in Material and Methods section. Data are the average (\pm SE) of 3-6 replicates and are expressed as % of activity measured in the presence of the corresponding protein before drying. When significant (P value < 0.05), different letters indicate significant differences after multiple comparisons of the means

Enzyme	Aggregation stress	% recovery after adding				P value
		H ₂ O	PM25	EM6	BSA	
Citrate synthase	2 min at 43°C	45.4 \pm 1.6 (a)	56.2 \pm 1.5 (b)	47.3 \pm 1.5 (a)	35.9 \pm 1.8 (c)	0.001
	5 min at 43°C	5.1 \pm 0.1	6.1 \pm 0.4	6.8 \pm 0.4	5.6 \pm 0.	0.058
Lactate dehydrogenase	Freeze-thawing	5.6 \pm 0.6	5.7 \pm 1.2	5.4 \pm 0.8	5.7 \pm 0.5	0.710

15

La tolérance à la dessiccation correspond à la propriété de résister sans dommage à la perte totale de l'eau cellulaire. Il s'agit d'un phénomène multifactoriel qui repose notamment sur l'accumulation de protéines de stress telles que les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant). Ces protéines hydrophiles et largement désordonnées à l'état natif appartiennent à plusieurs familles sur la base de leurs séquences primaires, et sont exprimées de façon abondante en fin de maturation des graines. On leur attribue une multitude de fonctions telles que remplacement de l'eau, pièges à ions, stabilisation des protéines et membranes. Parmi cette famille de protéine, le laboratoire a identifié et cloné chez *Medicago truncatula*, PM25, une protéine LEA spécifiquement exprimée dans la graine. L'objectif de ce travail a été de mieux comprendre sa fonction au sein de la graine. Deux approches ont été employées : une approche physico-chimique de caractérisation de la fonction de PM25 *in vitro* et une approche de génétique inverse impliquant *E. coli* et des mutants d'insertion *Tnt1* de *M. truncatula* déficients en PM25. Nous avons montré que PM25 est une protéine LEA nucléaire atypique présentant des caractéristiques hydrophobes. De plus, non seulement elle empêche l'agrégation de protéines lors de la dessiccation ou la congélation, mais elle est aussi capable de dissoudre de manière très efficace ces agrégats lors de la réhydratation ou de la décongélation. Cependant, le phénotypage des graines *pm25* n'a pas permis de mettre en évidence une sensibilité accrue des graines à la dessiccation, au vieillissement accéléré ou aux stress salins et osmotiques. Ce résultat peut être expliqué par le fait que plusieurs homologues de PM25 sont surexprimés dans les graines mutantes, ce qui indique un phénomène de redondance pour cette famille de gène. Par ailleurs, les graines *pm25* présentent une masse et une taille réduite alors que la composition en sucres solubles et protéines de réserve n'est pas affectée. L'ensemble de nos travaux suggère que PM25 serait soumis à des phénomènes de régulation complexe et pourrait réguler le remplissage de la graine.

Caractérisation fonctionnelle de MtPM25, une protéine LEA (Late Embryogenesis Abundant), et implication dans la qualité germinative des graines de *Medicago truncatula*

The term desiccation tolerance describes the capacity to undergo total water loss without fatal damage of cellular components. The tolerance to desiccation is dependent on multiple traits but especially depends on the accumulation of stress proteins such as LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins. Primary sequence analysis suggests that these hydrophilic and natively unstructured proteins belong to different gene families. They are abundantly expressed in the late maturation stages of seeds. Different functional roles for these proteins have been proposed: the replacement of water, ion scavenging or stabilisation of proteins or membranes. In the laboratory, a LEA protein from *Medicago truncatula*, PM25, which is specifically expressed in seeds was identified and cloned. The aim of this work was to better understand the function of PM25 in seeds. To reach this goal, two strategies were applied: one physico-chemical approach to characterize the protein *in vitro* and a reverse genetic approach including *Tnt1* insertion mutants of *M. truncatula* as well as transgenic *E. coli*. We could show that PM25 is an atypical LEA protein with nuclear localization exhibiting a rather hydrophobic character. *In vitro*, PM25 is not only capable to prevent protein aggregation during freezing or drying, but is also efficient in dissolving protein aggregates after these stresses were applied. In contrast to that, the physiological characterization of the seeds of the *pm25* mutant did not show a reduced desiccation tolerance nor an enhanced susceptibility to artificial ageing or germination under stress conditions. The lack of a desiccation-sensitive phenotype could be due to the fact that several homologues of PM25 show an enhanced expression in mutant seeds which indicates a certain redundancy between the members of this gene family. Interestingly, the seeds of the *pm25* mutant were reduced in both mass and size although the composition of soluble sugars and reserve proteins was unaffected. Our work suggests that PM25 is subjected to complex regulation mechanisms but could itself be involved in the regulation of seed filling.

Mots clés: Graine, *M. truncatula*, tolérance à la dessiccation, protéine LEA, agrégation

**Virginie Boucher-Thèse de doctorat, spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale
UMR Physiologie Moléculaire des Semences Université d'Angers, (Agrocampus Ouest, INRA)
16 Blvd Lavoisier 49045 Angers CEDEX 01**