



**HAL**  
open science

# Expression du génome plastidial d'*Arabidopsis thaliana* pendant la formation des graines

Guillaume Allorent

► **To cite this version:**

Guillaume Allorent. Expression du génome plastidial d'*Arabidopsis thaliana* pendant la formation des graines. Autre [q-bio.OT]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV075 . tel-00680102

**HAL Id: tel-00680102**

**<https://theses.hal.science/tel-00680102v1>**

Submitted on 17 Mar 2012

**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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Biologie végétale

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Guillaume ALLORENT**

Thèse codirigée par Silva LERBS-MACHE et Florence COURTOIS

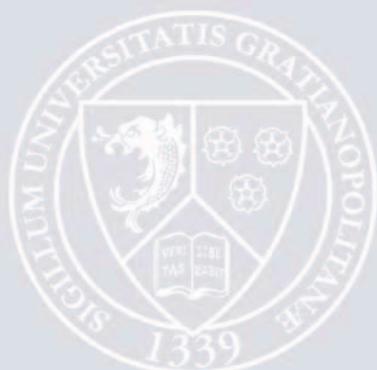
préparée au sein du Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale  
dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

**Expression du génome plastidial  
d'*Arabidopsis thaliana* pendant la  
formation des graines**

Thèse soutenue publiquement le 4 novembre 2011  
devant le jury composé de :

**Mme DEVIC Martine**  
**M. MACHEREL David**  
**M. JOB Dominique**  
**M. DELON Antoine**  
**Mme LERBS-MACHE Silva**  
**Mme COURTOIS Florence**

**Rapporteur**  
**Rapporteur**  
**Examineur**  
**Invité**  
**Directrice de thèse**  
**Co-directrice de thèse**









Expression  
du génome plastidial  
d'*Arabidopsis thaliana*  
pendant la formation  
des graines



## Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier Mme Martine Devic, M. David Macherel, M. Dominique Job et M. Antoine Delon d'avoir accepté de juger mon travail.*

*Je remercie Mme Maryline Vantard et M. Norbert Rolland de m'avoir accueilli dans leur laboratoire.*

*Je tiens à remercier Silva Lerbs-Mache pour son encadrement et ses conseils tout au long de ces trois années de thèse.*

*Un grand merci tout particulier à Florence Courtois, pour son encadrement, ses conseils et ses encouragements tout au long de ces (déjà !) cinq années.*

*Je remercie Giovanni Finazzi, Antoine Delon, Denis Falconet, Marcel Kuntz et Régis Mache pour leurs conseils et leur aide.*

*Merci à toutes les personnes de l'équipe pour tous les bons moments passés au quotidien : Livia, Frank, Fabien, Mustafa et David.*

*Un grand merci à toutes les personnes du laboratoire PCV et en particulier à Cécile, Daniel, Lucas, Manu, Matthieu et Morgane.*

*Je remercie également toutes les personnes du CERMO avec qui cette histoire a commencé : Fred, Edouard, Léa et tout particulièrement Emeline pour son aide lors du commencement de mes travaux de thèse.*

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABA	Acide abscissique	kpb	Kilopaires de bases
ADN	Acide DésoxyriboNucléotide	LB	Luria Broth
ADNc	ADN complémentaire	NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
ARN	Acide RiboNucléotide	NEP	Nuclear Encoded RNA Polymerase
ARNm	ARN messenger	NO	Nitric Oxide
ARNr	ARN ribosomique	PCR	Polymerase Chain Reaction
ARNt	ARN de transfert	PEP	Plastid Encoded RNA Polymerase
ATP	Adénosine TriPhosphate	PMSF	PhénylMethylSulfonyl Fluoride
BET	Bromure d'éthidium	PPR	PentratricoPeptide Repeat
BSA	Serum albumine bovine	PSI	Photosystème I
Chl	Chlorophylle	PSII	Photosystème II
Cyt b <sub>6</sub> /f	Cytochrome b <sub>6</sub> /f	p/v	poids / volume
DAF	Day After Fecondation	RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
DO	Densité Optique	SIG	Facteur Sigma
DTT	Dithiothreitol	TAG	TriAcylGlycérol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	TIRF(M)	Total Internal Reflection Fluorescence (Microscopy)
EDTA	Ethylène DiaminTetra- acetic Acid	UTR	UnTranslated Region
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy		
GA	Gibbérélines		
kDA	KiloDaltons		

# ***Table des matières***

---

---

INTRODUCTION	21
A - Physiologie de la graine en formation	22
I. Double fécondation	22
I-1. Pollinisation et formation du tube pollinique	23
I-2. Fécondation	24
II. Embryogenèse	24
II-1. Phase précoce de l'embryogenèse	25
II-2. Organogenèse de l'embryon	26
II-3. Développement de l'albumen	26
II-4. Régulation de l'embryogenèse	27
II-4-1. Régulations hormonales	27
II-4-2. Régulations transcriptionnelles	29
II-4-3. Contrôle maternel de l'embryogenèse	29
II-5. Transition vers la phase de maturation	30
III. Maturation	30
III-1. Accumulation des réserves	31
III-1-1. Glucides	31
III-1-2. Protéines	31
III-1-3. Lipides	31
III-2. Régulation de la teneur en oxygène dans les graines au cours de leur formation	33
III-3. La photosynthèse des graines	34
III-4. Fin de la maturation	35
III-4-1. Dessiccation	35
III-4-2. L'induction et le maintien de la dormance	36
III-5. Régulation hormonale et transcriptionnelle de la maturation de la graine	37
IV. Levée de dormance et germination	38

B - EXPRESSION GÉNIQUE DANS LES GRAINES EN FORMATION .....	40
I. Expression du génome nucléaire dans les graines en formation .....	40
I-1. Analyse globale .....	40
I-2. Expression des gènes nucléaires pendant l'embryogenèse .....	41
I-3. Expression des gènes nucléaires pendant la maturation .....	41
I-3-1. Transcrits liés aux réserves lipidiques .....	41
I-3-2. Transcrits liés aux protéines de réserve .....	42
I-3-3. Transcrits liés aux réserves glucidiques .....	42
I-3-4. Transcrits des gènes codant les fonctions photosynthétiques ..	42
II. Le génome plastidial .....	44
II-1. Structure du génome plastidial.....	44
II-1-1. De nombreux plastomes ont été séquencés .....	44
II-1-2. Les plastomes possèdent une séquence inversée-répétée de longueur variable .....	44
II-1-3. Le génome plastidial est présent en de nombreuses copies dans les plastes .....	45
II-1-4. Le génome plastidial n'est pas uniquement circulaire.....	46
II-1-5. Les plastomes sont regroupés en nucléoïdes attachés aux membranes plastidiales .....	47
II-2. Organisation fonctionnelle .....	47
II-2-1. Le génome plastidial est organisé en opérons .....	47
II-2-2. Régulation de l'expression du génome plastidial .....	48
II-2-3. Fonction des gènes plastidiaux.....	50
II-2-4. La communication entre le noyau et le plaste .....	51
II-3. Transcription du génome plastidial .....	52
II-3-1. Système transcriptionnel PEP .....	52
II-3-2. Système transcriptionnel NEP .....	58
II-3-3. Partage de la transcription du génome plastidial par les systèmes NEP et PEP .....	61

PRESENTATION DU PROJET	63
CHAPITRE I	
EXPRESSION DU GÉNOME PLASTIDIAL D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> PENDANT LA FORMATION DE LA GRAINE	67
I. Etablissement du système expérimental .....	69
I-1. Définition des stades de développement de la graine .....	69
I-1-1. Stade d'embryogenèse (DAF 1/4) .....	69
I-1-2. Stade de maturation (DAF 5/12) .....	69
I-1-3. Stade de dessiccation (DAF 13/17) .....	71
I-1-4. Stade graine sèche (stade 0) .....	71
I-2. Caractérisation biochimique et moléculaire des stades .....	71
II. Expression des composants de l'appareil transcriptionnel plastidial pendant la formation de la graine .....	73
II-1. Accumulation des transcrits .....	73
II-1-1. Transcrits NEP .....	73
II-1-2. Transcrits PEP et facteurs sigma .....	73
II-2. Accumulation des protéines .....	75
II-2-1. Accumulation des protéines NEP.....	75
II-2-2. Accumulation des protéines PEP et des facteurs sigma.....	75
II-2-3. Vérification du profil d'accumulation des protéines de l'appareil transcriptionnel plastidial .....	77
II-2-4. Corrélation entre l'accumulation des transcrits plastidiaux et l'accumulation de leur protéines au cours de la formation des graines .....	79
II-3. Analyse de l'expression de transcrits plastidiaux par extension d'amorce et RT-PCR semi quantitative .....	79
II-3-1. Activité des NEP pendant le développement de la graine .....	80
II-3-2. Activité de la PEP pendant le développement de la graine .....	81

III. Analyse globale du transcriptome plastidial pendant la formation des graines .....	83
III-1. Conditions expérimentales .....	84
III-2. Méthode d'analyse des données.....	85
III-3. Analyse globale de l'accumulation des transcrits plastidiaux .....	86
III-4. Expression des transcrits plastidiaux photosynthétiques .....	91
III-5. Expression des transcrits plastidiaux de la classe « Transcription ».....	93
III-6. Expression des transcrits plastidiaux de la classe « Traduction » .....	93
III-7. Expression des transcrits de la fonction de chlororespiration .....	94
III-8. Expression des autres transcrits plastidiaux.....	95
III-9. Expression des transcrits antisens plastidiaux .....	96
IV. Discussion et conclusion .....	97

CHAPITRE II
-------------

MISE AU POINT D'UNE MICROMÉTHODE DE DÉTECTION DES ADNc	103
--	-----

I. Présentation du projet .....	104
II. Principe de la technique optique utilisée.....	106
III. Mise au point de la méthode .....	106
III-1. Choix des gènes et design des amorces .....	106
III-2. Plan de dépôt des oligonucléotides .....	108
III-3. Marquage et hybridation .....	109
III-3-1. Choix du fluorophore pour le marquage .....	109
III-3-2. Détermination de la quantité optimale de fluorophore pour la rétro-transcription .....	109
III-3-3. Réaction de rétrotranscription, purification des ADNc néosynthétisés et hybridation sur les lames de quartz .....	110
IV. Résultats préliminaires .....	110
IV-1. Rendement d'incorporation des dCTP fluorescents.....	110

IV-2. Evaluation de la qualité de l'hybridation .....	111
IV-2-1. Calibration spatiale de la caméra et précision du spotting .....	111
IV-2-2. Forme des dépôts.....	111
IV-2-3. Quantification du signal .....	113
IV-3. Comparaison de la quantification des transcrits par hybridation sur macroarray, sur lame et par qRT-PCR .....	114
V. Discussion et conclusion .....	115

<p>CHAPITRE III</p> <p>CARACTÉRISATION DE LA PHOTOSYNTHÈSE EMBRYONNAIRE DE LA GRAINE D'<i>ARABIDOPSIS THALIANA</i></p>	119
--	-----

I. Spécificité anatomique des plastes dans les graines et conditions physicochimiques à l'intérieur de la silique .....	122
I-1. Morphologie des cellules photosynthétiques et des plastes de graines et de feuilles .....	122
I-2. Conditions lumineuses à l'intérieur de la silique.....	123
I-3. Disponibilité des gaz à l'intérieur de la silique .....	124
I-3-1. Oxygène .....	124
I-3-2. Dioxyde de carbone .....	125
II. Comparaison des transcriptomes plastidiaux des graines et des feuilles .....	125
II-1. Analyse globale du transcriptome .....	125
II-2. Expression des transcrits photosynthétiques plastidiaux .....	127
II-3. Expression des autres transcrits plastidiaux.....	129
III. Organisation des complexes photosynthétiques dans les graines et les feuilles .....	131
III-1. Accumulation des protéines des complexes photosynthétiques .....	131
III-2. Fonctionnalité des complexes photosynthétiques .....	132
III-2-1. Teneur en chlorophylles .....	132
III-2-2. Stœchiométrie des photosystèmes.....	134
III-2-3. Couplage des photosystèmes et des antennes collectrices .....	135

III-4. Mesure de l'activité photosynthétique .....	135	
III-4-1. Activité photosynthétique .....	135	
III-4-2. Mécanisme de photoprotection.....	137	
IV. Importance de la photosynthèse embryonnaire sur le développement de la graine et la vigueur germinative .....	138	
IV-1. Influence de l'inhibition de la photosynthèse embryonnaire sur la formation des graines et leur vigueur germinative .....	138	
IV-2. Influence de l'inhibition des photorécepteurs sur la vigueur germinative de la graine .....	141	
V. Discussion et conclusion .....	142	
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>CONCLUSION</td></tr></table> .....	CONCLUSION	145
CONCLUSION		
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>MATÉRIEL ET MÉTHODES</td></tr></table> .....	MATÉRIEL ET MÉTHODES	151
MATÉRIEL ET MÉTHODES		
I. Obtention du matériel végétal .....	152	
I-1. Stérilisation en surface des graines d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	152	
I-2. Culture sur terre d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	152	
I-3. Test de germination .....	152	
I-4. Récolte des graines.....	153	
I-5. Stockage des graines .....	153	
I-6. Préparation des échantillons pour observation en microscopie électronique .....	153	
II. Extraction et dosage des pigments .....	154	
II-1. Dosage rapide des chlorophylles .....	154	
II-2. Extraction des pigments .....	154	
III. Méthode d'analyse des acides nucléiques.....	154	
III-1. Séparation des acides nucléiques sur gel d'agarose.....	154	
III-2. Extraction rapide d'ADN génomique d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	155	
III-3. Extraction d'ARN.....	155	
III-3-1. Broyage du matériel végétal .....	155	

III-3-2. Extraction des ARN.....	155
III-3-3. Précipitation, lavage et dosage des ARN .....	156
III-4. Traitement des ARN à la DNase.....	157
III-5. Analyse des ARN par rétro-transcription et PCR semi-quantitative ....	157
III-5-1. Synthèse du premier brin d'ADNc .....	157
III-5-2. Amplification des ADNc par PCR semi-quantitative .....	158
III-6. Analyse des ARN par extension d'amorce .....	158
III-6-1. Marquage de l'oligonucléotide amorce et du produit PCR ....	158
III-6-2. Marquage du marqueur de taille .....	159
III-6-3. Réaction d'extension d'amorce.....	159
III-7. Analyse des ARN par hybridation sur macroarray .....	160
III-7-1. Synthèse des ADNc par rétrotranscription et marquage au <sup>32</sup> P	161
III-7-2. Purification des ADNc .....	161
III-7-3. Hybridation des ADNc sur les membranes.....	162
III-7-4. Analyse informatique des résultats de macroarray .....	162
IV. Méthode d'analyse des protéines .....	163
IV-1. Extraction de protéines.....	163
IV-2. Dosage de protéines .....	163
IV-3. Séparation monodimensionnelle des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) ..	164
IV-4. Coloration des protéines au bleu de Coomassie .....	164
IV-5. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose .....	164
IV-6. Immunodétection .....	165
V. Techniques de clonage et de surexpression de protéines – Gateway .....	165
V-1. Principe du clonage .....	166
V-2. Vecteurs et souches utilisés .....	166
V-2-1. Vecteur pDONR221 .....	166
V-2-2. Vecteur pDEST17.....	166
V-2-3. Souche <i>E.coli</i> DH5α.....	166
V-2-4. Souche <i>E.coli</i> BL21-AI .....	166

V-3. Préparation des fragments d'ADN .....	167	
V-3-1. Amplification par PCR du fragment à cloner .....	167	
V-3-2. Purification des produits amplifiés par PCR .....	167	
V-3-3. Séquençage .....	167	
V-4. Construction du vecteur d'expression .....	167	
V-4-1. Première recombinaison : produit PCR – vecteur d'entrée (pDONR21) .....	167	
V-4-2. Seconde recombinaison : clone d'entrée – vecteur d'expression (pDEST17) .....	168	
V-5. Transformation .....	168	
V-6. Préparation de plasmide .....	168	
V-7. Production de protéines recombinantes .....	169	
V-7-1. Préparation des extraits bruts .....	169	
V-7-2. Préparation de la protéine recombinante .....	169	
V-8. Obtention des anticorps .....	170	
V-9. Caractérisation des anticorps .....	170	
VI. Méthodes d'analyse de la photosynthèse.....	171	
VI-1. Mesure de l'activité de la chaîne de transfert d'électrons.....	171	
VI-2. Principe de l'Electro Chromic Shift (ECS) et utilisation .....	171	
VI-3. Enregistrement des spectres d'émission, d'absorption et des spectres à basse température .....	172	
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>RÉFÉRENCES</td></tr></table> .....	RÉFÉRENCES	173
RÉFÉRENCES		
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>ANNEXES</td></tr></table> .....	ANNEXES	193
ANNEXES		
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>PUBLICATIONS</td></tr></table> .....	PUBLICATIONS	199
PUBLICATIONS		



# ***Table des figures et des tableaux***

---

---

TABLE DES FIGURES
-------------------

Figure 1 : Représentation schématique des stades de développement de la graine d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	23
Figure 2 : Représentation schématique des étapes de l'embryogenèse de la graine d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	25
Figure 3 : Développement de l'albumen dans les graines de maïs en formation	27
Figure 4 : Régulation hormonale et transcriptionnelle de la maturation des graines .....	37
Figure 5 : Représentation schématique de l'organisation du génome plastidial d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	45
Figure 6 : Les deux systèmes de transcription du génome plastidial.....	53
Figure 7 : Modèles de mise en place des ARN polymérase plastidiales pendant le développement de la jeune plantule .....	62
Figure 8 : Observation morphologique des graines d' <i>Arabidopsis thaliana</i> du premier au seizième jour après fécondation (DAF) et coupe confocale d'une graine au stade DAF 9 .....	70
Figure 9 : Caractérisation des stades d'étude du développement de la graine d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	72
Figure 10 : Expression des ARNm codant les constituants des appareils transcriptionnels NEP et PEP pendant la formation de la graine .....	74
Figure 11 : Accumulation des protéines des constituants de l'appareil transcriptionnel NEP et PEP pendant la formation de la graine .....	76
Figure 12 : Profil protéique de la graine d' <i>Arabidopsis thaliana</i> au cours de son développement .....	78
Figure 13 : Accumulation des transcrits et des protéines de gènes plastidiaux pendant la formation de la graine d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	80
Figure 14 : Analyse de l'expression de transcrits plastidiaux par extension d'amorce et RT-PCR semi-quantitative .....	82
Figure 15 : Classes fonctionnelles des gènes plastidiaux présents sur le macroarray .....	85
Figure 16 : Analyse du transcriptome plastidial pendant la formation des graines par macroarray .....	87
Figure 17 : Valeur moyenne et proportion des transcrits, regroupés par classe fonctionnelle, détectés sur les macroarrays .....	89
Figure 18 : Expression du transcrit <i>RBCS</i> au cours de la formation de la graine	92

Figure 19 : Principe du TIRFM .....	106
Figure 20 : Localisation des transcrits <i>psbA</i> , <i>rbcL</i> , <i>psbK</i> et <i>ndhC</i> sur les macroarrays .....	107
Figure 21 : Taille attendue des transcrits <i>rbcL</i> s'hybridant sur lame et sur membrane de nitrocellulose .....	107
Figure 22 : Plan de dépôt des oligonucléotides sur la lame de quartz .....	108
Figure 23 : Images obtenues par TIRFM de la lame après hybridation.....	112
Figure 24 : Morphologie des cellules d'une graine photosynthétique au stade DAF 9 et d'une cellule de feuille d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en microscopie électronique .....	121
Figure 25 : Conditions lumineuses dans les siliques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	123
Figure 26 : Expression globale du génome plastidial des graines photosynthétiques et des feuilles par macroarray .....	126
Figure 27 : Proportion des transcrits, regroupés par classe fonctionnelle, détectés sur macroarray à partir d'ARN extraits de graines photosynthétiques et de feuilles .....	127
Figure 28 : Expression des transcrits des complexes plastidiaux photosynthétiques par macroarray .....	128
Figure 29 : Expression des constituants de la chaîne de transfert d'électrons.....	132
Figure 30 : Organisation des photosystèmes dans les graines photosynthétiques et les feuilles .....	133
Figure 31 : Mesure de l'activité photosynthétique et mise en évidence d'un mécanisme de photoprotection dans les graines photosynthétiques ..	136
Figure 32 : Effet de la lumière sur la morphologie et la vigueur germinative des graines. ....	139
Figure 33 : Vigueur germinative des graines cultivées sous lumière verte .....	141
Figure 34 : Accumulation des ARNm et des protéines des appareils NEP et PEP au cours de la formation de la graine d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	147
Figure 35 : Graine d' <i>Arabidopsis thaliana</i> germée.....	152
Figure 36 : Repérage du jour de fécondation .....	153
Figure 37 : Dosage et contrôle de la qualité des ARN .....	156
Figure 38 : Vérification de l'efficacité du traitement des ARN à la DNase par amplification .....	157
Figure 39 : Plan du macroarray utilisé pour l'analyse du transcriptome plastidial d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	161

Figure 40 : Design des amorces PCR utilisés pour le clonage par la méthode Gateway.....	167
Figure 41 : Principe de l'électrochromisme .....	172

TABLE DES TABLEAUX
--------------------

Tableau 1 : Mutants embryo-létaux d' <i>Arabidopsis thaliana</i> affectés dans l'expression de protéines plastidiales .....	43
Tableau 2 : Quelques exemples d'unités transcriptionnelles caractérisés sur le génome plastidial.....	47
Tableau 3 : Liste des gènes codés dans le génome plastidial d' <i>Arabidopsis thaliana</i> regroupés selon leur fonction .....	50
Tableau 4 : Abondance des transcrits plastidiaux de la classe photosynthèse .....	91
Tableau 5 : Abondance des transcrits plastidiaux de la classe transcription .....	92
Tableau 6 : Abondance des transcrits plastidiaux de la classe traduction .....	93
Tableau 7 : Abondance des transcrits plastidiaux de la classe chlororespiration..	94
Tableau 8 : Abondance des autres transcrits plastidiaux .....	95
Tableau 9 : Proportion relative des transcrits <i>ndhC</i> , <i>psbK</i> , <i>rbcL</i> et <i>psbA</i> détectés par hybridation sur membrane de nitrocellulose, par hybridation sur lame de quartz et par RT-PCR quantitative .....	115
Tableau 10 : Abondance des transcrits des complexes plastidiaux photosynthétiques par macroarray .....	130

# ***Introduction***

---

---

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire Physiologie Cellulaire et Végétale dans l'équipe n° 7 qui s'intéresse à la transcription du génome plastidial. Les plastes sont des organites semi-autonomes qui codent une partie de l'information génétique de la cellule végétale. Mon projet de thèse consiste à caractériser l'expression des composants de l'appareil transcriptionnel du chloroplaste au cours de la formation de la graine d'*Arabidopsis thaliana*. Cette étude vise à comprendre la régulation de l'activité de ces composants et ses conséquences pour la formation et le développement futur de la graine.

Dans une partie introductive, nous allons tout d'abord décrire les caractéristiques principales de la physiologie de la graine en formation. Nous décrirons ensuite les aspects majeurs de la transcription du génome plastidial avant de présenter les objectifs de notre projet.

## A - PHYSIOLOGIE DE LA GRAINE EN FORMATION

Chez les plantes supérieures, les graines assurent la dispersion de l'espèce. Elles procurent à l'embryon un milieu favorable à son développement en assurant sa protection en attendant la germination. Les réserves accumulées pendant la période de formation de la graine conditionnent une partie de la vigueur de plantule à venir. De la fécondation jusqu'à la fin de la maturation, le développement de la graine est sous le contrôle de nombreuses régulations génétiques, hormonales et environnementales.

Chez les angiospermes, famille botanique à laquelle appartient notre modèle d'étude *Arabidopsis thaliana*, le développement de la graine débute par la double fécondation qui conduit à la formation de deux zygotes. Le premier forme un tissu de réserve, l'albumen, tandis que le second génère l'embryon. Après une phase de divisions cellulaires, correspondant à l'histogenèse de l'embryon, la graine entre dans une période de maturation durant laquelle les réserves protéiques, lipidiques et glucidiques sont produites et stockées (**Figure 1**). La teneur en eau de la graine diminue ensuite fortement. Cette phase de dessiccation est un des facteurs de l'entrée en dormance de la graine et permet sa conservation jusqu'à sa germination.

### **A - I. Double fécondation**

Chez les plantes supérieures, la double fécondation a lieu dans la fleur, à l'intérieur du gamétophyte femelle, et donne naissance à deux zygotes. La double féconda-

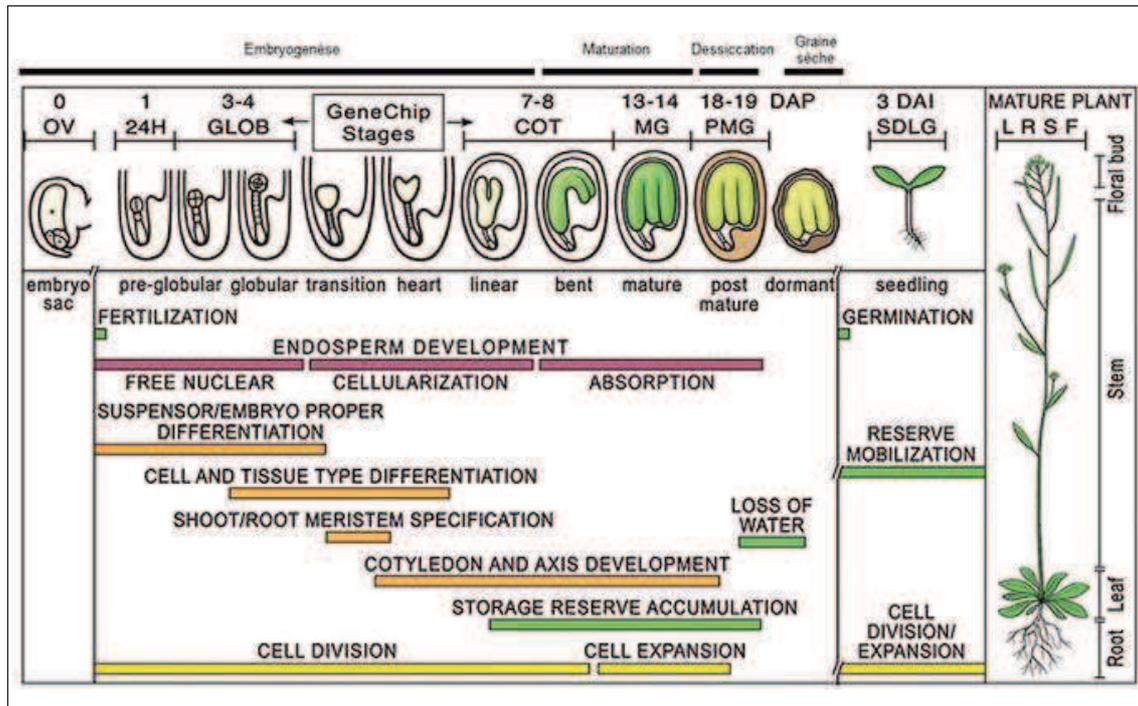


Figure 1. - Représentation schématique des stades de développement de la graine d'*Arabidopsis thaliana*. D'après Le et al., 2010.

Les représentations sont adaptées de Bowman et Mansfield, 1993, et ne sont pas dessinées à l'échelle. Les nombres correspondent au jour après fécondation (DAP) ou après imbibition (DAI).

OV	unfertilized ovule.	MG	mature-green-stage seed.	R	root.
24 h	24 h postpollination seed.	PMG	postmature-green-stage seed.	S	stem.
GLOB	globular-stage seed.	SDLG	seedling.	F	floral buds.
COT	cotyledon-stage seed.	L	leaf.		

tion se déroule en trois étapes successives (Dumas et Rogowsky, 2008) : la pollinisation, la germination du tube pollinique qui permet de transporter les gamètes mâles jusqu'à la cellule œuf et enfin la fusion des gamètes constituant la fécondation proprement dite.

### A - I.1. Pollinisation et formation du tube pollinique

La pollinisation correspond au transfert du gamétophyte mâle, le grain de pollen, jusqu'au pistil de la plante femelle. Elle s'effectue avec l'aide d'insectes (entomogamie), du vent (anémogamie), ou plus rarement de l'eau (hydrogamie). Chez *Arabidopsis thaliana*, il y a autopolinisation : le grain de pollen féconde un ovule de la même fleur. Après l'adhésion du grain de pollen au pistil, la croissance du tube pollinique permet le transport des cellules génératrices du grain de pollen jusqu'à la cellule œuf (Cheung et Wu, 2008). L'entrée du tube pollinique dans la cellule œuf s'effectue par une ouverture dans le tégument de l'ovule appelé micropyle.

## A - I.2. Fécondation

La double fécondation est caractéristique des angiospermes. Elle a été observée pour la première fois par microscopie chez le lis et les fritillaires à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle (Nawashin, 1898 ; Guignard, 1899 - Cités dans Dumas et Rogowsky, 2008). Elle résulte de la double fusion de deux noyaux mâles avec trois noyaux femelles contenus dans l'ovule. L'ovule est constitué de deux téguments, interne et externe, et d'un sac embryonnaire qui provient de la division mitotique d'une tétraspore. Le sac embryonnaire contient notamment l'oosphère et deux noyaux secondaires situés au centre du sac (Mansfield et al., 1991).

Pénétrant dans l'ovule par le micropyle, le tube pollinique libère alors les deux gamètes mâles. Le premier fusionne avec l'oosphère et donne le zygote diploïde à l'origine de l'embryon tandis que le second fusionne avec les deux noyaux secondaires du sac et forme un tissu triploïde de réserve appelé l'albumen. Les deux structures se développent alors à l'intérieur du sac embryonnaire, protégées par les téguments de l'ovule. Des études ont montré que le premier événement cellulaire qui suit cette double fécondation et qui initie le développement de l'embryon est une augmentation importante de la concentration en calcium cytosolique (Antoine et al., 2000) à l'image de ce qui se déroule dans le règne animal.

Chez la grande majorité des angiospermes, dont *Arabidopsis thaliana*, le plaste est d'origine maternelle. Les plastes et leur génome ne sont donc pas transmis par le pollen au cours de la fécondation. Le plaste d'origine paternelle peut être éliminé de différentes façons dont la plus répandue consiste à exclure le plaste lors de la première mitose du pollen (Hagemann, 2010). Quelques espèces d'angiospermes ont cependant un plaste d'origine biparentale (chez *Pelargonium* par exemple). A l'heure actuelle, le plaste d'*Actinidia deliciosa* (kiwi) est l'unique plaste d'origine paternelle découvert chez une angiosperme (Testolin et Cipriani, 1997).

## A - II. Embryogenèse

L'embryogenèse produit, à partir du zygote, un organisme pluricellulaire. A la suite de divisions cellulaires, plusieurs tissus se différencient et s'organisent selon un axe apico-basal présentant une symétrie radiale. On distingue deux phases dans l'embryogenèse : une phase précoce durant laquelle la polarité de l'embryon est définie, suivie d'une phase d'organogenèse. La différenciation des tissus au cours de l'embryogenèse délimite les différentes parties de la plante. Par exemple, les cotylédons, principal lieu de stockage des réserves chez *Arabidopsis*, se différencient au cours de cette période (Goldberg et al., 1994).

### A - II-1. Phase précoce de l'embryogenèse

Les différentes étapes de l'embryogenèse ont été étudiées et caractérisées, chez *Arabidopsis*, au début des années 90 (Mansfield et Briarty, 1991 ; Goldberg et al., 1994). L'embryogenèse débute par l'allongement du zygote qui, à la suite d'une division asymétrique, donne naissance à une cellule basale allongée et à une petite cellule apicale. La cellule apicale subit trois mitoses et forme une structure sphérique appelée embryon octant. Le développement de la moitié supérieure de cet embryon produit la partie aérienne de la plantule tandis que la partie inférieure se différencie en hypocotyle et radicule. La cellule basale conduit quant à elle à la formation d'un suspenseur.

Le suspenseur est constitué de cellules alignées, en nombre variable, allant par exemple de 7 cellules chez *Arabidopsis* à plus de 200 cellules chez certaines espèces de haricots utilisés comme modèle d'étude (Walbot et al., 1972 ; Sussex et al., 1973). Le rôle de cette structure cellulaire n'est pas seulement de maintenir physiquement l'embryon à l'intérieur de la graine mais également de contrôler son développement pendant l'embryogenèse en permettant le transfert de nutriments ou la synthèse d'hormones (Kawashima et Goldberg, 2010). Lors de la maturation de la graine, les cellules qui le composent rentrent dans un programme de mort cellulaire programmée (Bozhkov et al., 2005).

La couche cellulaire externe de l'embryon se différencie en protoderme formant le futur épiderme de l'embryon. Les cellules internes adoptent quant à elles un plan de division parallèle à l'axe apico-basal. L'embryon est alors au stade globulaire (**Figure 2**).

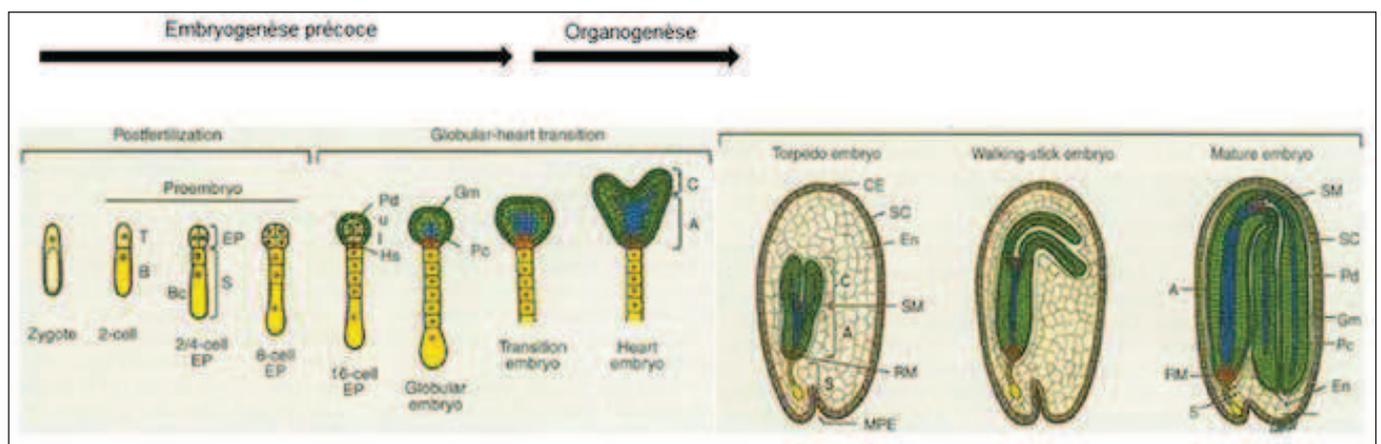


Figure 2. - Représentation schématique des étapes de l'embryogenèse de la graine d'*Arabidopsis thaliana*. D'après Goldberg et al., 1994.

T terminal cell	Pd prododerm	Gm ground meristem	SC seed coat
B basal cell	U upper tier	C Cotyledon	En endosperm
EP embryo proper	I lower tier	A Axis	SM shoot meristem
S suspensor	Hs hypophysis	MPE micropylar end	RM root meristem
Bc suspensor basal cell	Pc procambium	CE chalazal end	

## A - II-2. Organogenèse de l'embryon

La formation des organes débute avec l'organisation d'une symétrie bilatérale qui permet l'initiation de la formation des cotylédons. Cette symétrie est initiée par une croissance localisée aux deux pôles opposés de la région apicale conduisant ainsi au stade cœur (Mansfield et al., 1991) (**Figure 2**). Pendant la transition entre le stade globulaire et le stade cœur, l'expression des gènes nucléaires impliqués dans la production d'énergie augmente, comme par exemple ceux liés à la fonction photosynthétique (Spencer et al., 2007). Au stade cœur, les principaux organes de l'embryon sont formés. On distingue les cotylédons, l'hypocotyle, la racine ainsi que différents tissus vasculaires. Le méristème apical caulinaire est alors mis en place entre les deux cotylédons. L'organogenèse étant terminée, débute alors la croissance de l'embryon. Les stades «torpille» et «cotylédons retournés» qui sont franchis ensuite correspondent à des paliers morphologiques.

## A - II-3. Développement de l'albumen

L'albumen est le tissu de réserve de la graine. Il provient de la division du zygote accessoire triploïde (voir A-I-3). L'albumen contribue à l'apport de nutriments à l'embryon pendant son développement mais aussi parfois pendant la germination. Chez les graines albuminées, comme les céréales, il est le lieu de stockage des réserves et persiste pendant le développement de la graine. Au contraire, chez les graines ex-albuminées comme celles d'*Arabidopsis*, l'albumen est éphémère et est presque entièrement absorbé par les cotylédons qui constituent alors le principal lieu de stockage des réserves. L'albumen se développe parallèlement à l'embryon : il est tout d'abord syncytial au début de l'embryogenèse puis cellularisé à partir de l'initiation des cotylédons au stade cœur.

Après la double fécondation, les cellules de l'albumen sont transcriptionnellement plus actives que celles de l'embryon (Grimanelli et al., 2005). Lors des premières phases de l'embryogenèse, des études ont montré que l'activité mitotique du noyau de l'albumen précède celui de l'embryon. Ces mitoses se déroulent sans cytokinèse ce qui donne naissance, chez *Arabidopsis*, à l'albumen syncytial (Boisnard-Lorig et al., 2001) constitué d'une seule cellule contenant environ 200 noyaux localisés principalement à la périphérie de l'albumen (Brown et al., 2003) [**Figure 3**, exemple chez le maïs]. Le rythme des divisions mitotiques plus rapide dans l'albumen que dans l'embryon pourrait être relié à l'absence de cytokinèse qui évite la synthèse de nouvelles membranes cellulaires. Le mécanisme inhibant la cytokinèse n'est pas encore connu (Sabelli et al., 2009).

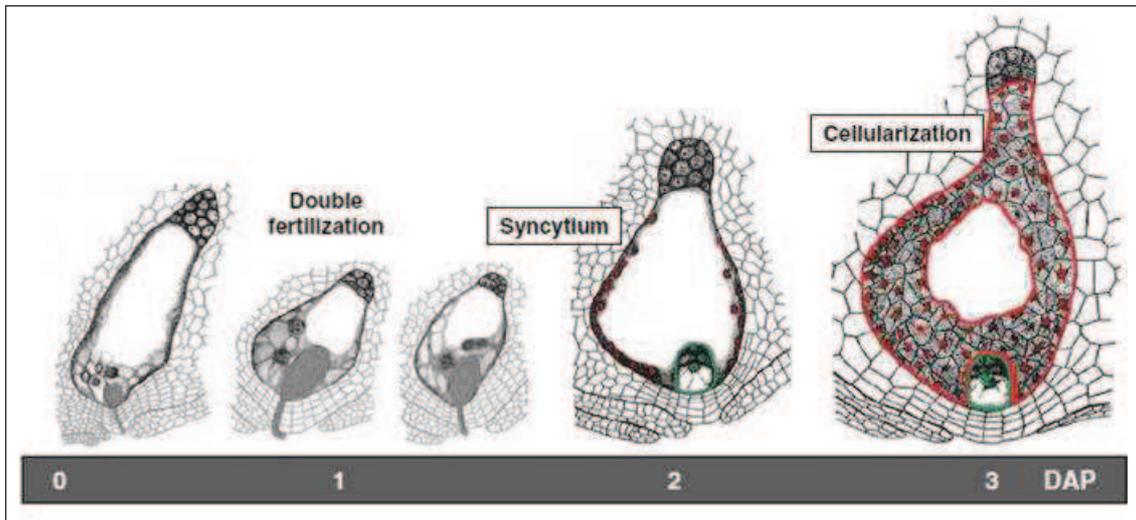


Figure 3. - Développement de l'albumen dans les graines de maïs en formation (extrait de Sabelli et Larkins, 29).

Les noyaux de l'albumen sont colorés en rouge. Les noyaux de la cellule œuf de l'embryon sont colorés en vert. Les limites de l'embryon et de l'albumen sont colorées respectivement en vert et en rouge. DAP : Day After Pollination.

La cellularisation de l'albumen syncytial débute par l'initiation de la polymérisation d'un réseau de microtubules qui subdivisent l'albumen en plusieurs domaines cytoplasmiques (Olsen, 2004). Ces structures, dont la formation débute au niveau du micropyle chez *Arabidopsis*, entourent peu à peu chaque noyau et compartimentent l'albumen. L'albumen est complètement cellularisé lorsque l'embryon est au stade torpille (Guitton et al., 2004) puis est progressivement « absorbé » par les cotylédons au fur et à mesure de leur croissance.

#### A - II-4. Régulation de l'embryogenèse

L'étude de la régulation de l'embryogenèse, au niveau hormonal et transcriptionnel, est particulièrement bien documentée chez *Arabidopsis thaliana* (Sun et al., 2010). C'est pourquoi la présentation qui suit est essentiellement consacrée aux données rassemblées dans cette espèce.

##### A - II-4-1. Régulations hormonales

Les phytohormones jouent un rôle essentiel dans le développement précoce de la graine. L'implication de l'acide abscissique (ABA), de l'auxine, des cytokinines, des gibbérellines et des brassinostéroïdes au cours de l'embryogenèse a en effet été démontrée.

Bien que depuis longtemps étudié pour son rôle dans l'induction de la dormance (voir A-IV), le potentiel rôle de l'ABA dans l'embryogenèse n'a été évoqué que plus récemment (Cheng et al., 2002). La quantité d'ABA accumulée pendant l'embryogenèse est très faible. L'hormone est tout d'abord produite par les tissus maternels puis seulement dans un second temps par l'embryon et l'albumen. L'ABA favorise la croissance de l'embryon et empêche les graines d'avorter. Il est donc indispensable au développement (Frey et al., 2004).

L'auxine est produite par l'embryon dans sa région apicale mais provient également du suspenseur. L'auxine migre via des transporteurs spécifiques (transporteurs PIN, Friml et Palme, 2002) jusqu'à l'hypophyse, partie supérieure du suspenseur, dans lequel elle s'accumule lors du stade globulaire. Cette migration contribue à la formation de la polarité apico-basale qui est responsable de la mise en place du méristème caulinaire (voir A-II-2). Le rôle clé de cette hormone dans l'embryogenèse a été révélé par l'étude des transporteurs de l'auxine (Tanaka et al., 2006) dont la mutation conduit à la formation d'un embryon morphologiquement anormal. Ainsi, l'inactivation du récepteur ABP1 (Auxin Binding Protein) provoque un arrêt du développement de l'embryon après le stade globulaire car les cellules ne peuvent pas s'allonger (Chen et al., 2001). La production et la distribution de l'auxine assure donc le développement normal de l'embryon.

Les graines issues de plantes dont les récepteurs à la cytokinine sont mutés sont plus grosses que la normale (Riefler et al., 2006) suggérant que les cytokinines inhibent la croissance de la graine, notamment pendant les premières étapes du développement de l'albumen (Day et al., 2008).

Les gibbérellines influent également sur le développement de l'embryon par l'intermédiaire des gènes de la famille *GASA* (Gibberellic Acid-Stimulated *Arabidopsis*) (Herzog et al., 1995). L'expression de certains de ces gènes, dont le gène *GASA4*, est détectée dans les racines, les fleurs et l'embryon (Roxrud et al., 2007). La surexpression de *GASA4* entraîne une augmentation de la taille et du poids de la graine. Les gibbérellines régulent donc positivement la croissance de la graine.

Enfin, l'effet des brassinostéroïdes a été démontré par l'étude des mutants *shrink1*-dominant (*shk1-D*) qui présentent une graine dont la taille est réduite. Ce phénotype est lié à la surexpression d'une protéine qui inactive certains brassinostéroïdes (Turk et al., 2003). Chez le riz, des mutants déficients dans la synthèse de brassinostéroïdes ou dans la voie de signalisation de ces hormones présentent le même phénotype (Tanabe et al., 2005). L'étude de ces plantes mutantes montre que les brassinostéroïdes stimulent également la croissance de la graine.

### A - II-4-2. Régulations transcriptionnelles

Les mécanismes transcriptionnels régulant la formation de la graine ont été étudiés chez *Arabidopsis thaliana* par l'intermédiaire de plusieurs mutants. Ces études ont mis en évidence de nombreux facteurs de transcription ayant un rôle dans le développement de la graine. On peut distinguer les effets sur l'albumen (Berger et al., 2006), sur le tégument de la graine et sur le développement de l'embryon (Sun et al., 2010).

Le gène *AP2* (*apetala2*) constitue un bon exemple de ces régulations. Il code un facteur de transcription spécifique des plantes. Étudié à l'origine pour son implication dans l'organisation du bourgeon floral (Bowman et al., 1989), le mutant *ap2* présente un phénotype au niveau de l'embryon et des cellules du tégument dont le nombre et la taille sont augmentés (Jofuku et al., 2005 ; Ohto et al., 2005). La mutation affecte aussi le développement de l'albumen en retardant et en prolongeant la cellularisation (Ohto et al., 2009).

Au même titre, les facteurs de transcription du groupe MADS-box sont impliqués dans le développement des fleurs et de la graine. Les membres de cette famille de gènes sont regroupés en cinq classes dont quelques membres régulent positivement le développement de l'albumen (Portereiko et al., 2006 ; Kang et al., 2008 ; Steffen et al., 2008).

Les gènes appartenant à la famille WRKY régulent eux aussi le développement de l'albumen. Des mutations du gène *MINI3*, appartenant à cette famille, conduisent à une cellularisation précoce de l'albumen entraînant une taille plus réduite de la graine (Luo et al., 2005). Le même phénotype est observé chez le mutant *iku2* qui code un récepteur kinase uniquement exprimé dans l'albumen (Garcia et al., 2003 ; Sun et al., 2010).

Des régulations épigénétiques ont aussi été mises en évidence via un groupe de protéines polycombe. Les mutations des gènes des protéines FIE (FERTILIZATION-INDEPENDANT ENDOSPERM), MEA (MEDEA), FIS2 (FERTILIZATION-INDEPENDANT SEED 2) et MSI1 (MULTICOPY SUPPRESOR OF IRA 1) entraînent le développement des graines sans fécondation. Ces protéines, similaires à celles présentes chez les mammifères ou la drosophile, inhibent le développement précoce de l'albumen. Leur fonction est contrôlée via la méthylation des histones (Wang et al., 2006).

### A - II-4-3. Contrôle maternel de l'embryogenèse

Dans les graines, la croissance précoce de l'embryon est principalement contrôlée par la plante mère (Weber et al., 2005). En plus du contrôle hormonal par l'ABA

vu précédemment (voir II-4-1), la régulation se fait également par le tégument de la graine, tissu d'origine maternelle.

Les jeunes téguments des graines de pois et de *Vicia faba* sont des organes transitoires de stockage. Ils accumulent de l'amidon et des protéines pendant les phases précoces du développement qui sont mobilisés pour la croissance de l'embryon avant que celui-ci ne débute son activité de stockage des réserves (Borisjuk et al., 1995). En effet, des mutants affectés dans cette activité présentent une perte en poids sec de 20 % entraînant mécaniquement une baisse du volume de l'albumen et donc de la graine (Rochat et al., 1995).

Les invertases, caractéristiques du développement précoce de la graine, sont localisées dans le tégument de la graine. Le saccharose produit dans les feuilles de la plante mère importé dans la graine doit être clivé par ces enzymes pour être utilisé dans le métabolisme ou la synthèse de produit de stockage (Weber et al., 1997). La création de cet environnement riche en hexose contribue à la croissance de l'embryon en favorisant l'activité mitotique des cellules. Les invertases affectent donc le développement précoce de l'embryon en régulant à la fois la concentration mais aussi la composition en sucre. Elles jouent aussi le rôle de senseur en adaptant le développement de la graine en fonction des ressources disponibles (Weber et al., 2005).

### **A - II-5. Transition vers la phase de maturation**

A la fin de l'embryogenèse, les contrôles maternels diminuent au profit d'un contrôle par l'embryon lui-même qui devient donc plus autonome. De nombreuses modifications accompagnent ce changement. Par exemple, l'import massif de saccharose dans l'embryon contribue à sa croissance par expansion du volume cellulaire (Weber et al., 2005). Ce saccharose participe également à la formation d'amidon et de lipides (Hills, 2004).

Au cours de la transition, on note l'initiation d'un système d'import de nutriments via des cellules de transfert. Ces nutriments sont importés pendant la maturation dans l'embryon où ils sont métabolisés puis stockés sous forme de réserves.

Ces exemples illustrent le changement d'orientation du métabolisme de l'embryon qui commence à partir de ce moment à accumuler et stocker des réserves.

### **A - III. Maturation**

Pendant la période de maturation, la graine synthétise et stocke des réserves sous forme de lipides, de sucres et de protéines. La proportion et la localisation de chaque

type de réserve varie selon les espèces. Par exemple, chez *Arabidopsis*, les réserves sont majoritairement constituées de lipides et de protéines. Ces réserves peuvent ensuite être remobilisées lors de la germination.

## **A - III-1. Accumulation des réserves**

### **A - III-1-1. Glucides**

Les réserves glucidiques dans les graines sont tout d'abord constituées de glucides solubles (comme le saccharose) et des oligosaccharides (comme le stachyose et le raffinose) qui s'accumulent pendant la maturation et participent notamment à la résistance à la dessiccation (voir III-4). Les glucides représentent également une source d'énergie rapidement mobilisable lors de la germination.

Cependant les réserves glucidiques dans les graines s'accumulent principalement sous forme de polymères insolubles comme l'amidon. Ces réserves sont très abondantes dans les céréales où elles représentent jusqu'à 75 % des réserves chez le blé par exemple et sont principalement stockées dans l'albumen. Comparativement aux céréales, la graine d'*Arabidopsis thaliana* contient peu de réserves glucidiques. En effet, pendant l'embryogenèse, l'amidon est transitoirement accumulé mais sa quantité diminue pendant la maturation. La dégradation de l'amidon servirait alors à fournir des squelettes carbonés pour la synthèse d'autres composés protéiques ou lipidiques (Hills, 2004 ; Gallardo et al., 2008).

### **A - III-1-2. Protéines**

Chez les plantes, les globulines sont les principales protéines de réserve et représentent jusqu'à 80 % du stock protéique de la graine. Chez les légumineuses, les globulines majoritaires sont la viciline (7S) et la légumine (11S) tandis que chez *Arabidopsis* la cruciférine (12S) et l'arabine (2S) sont les plus abondantes. Les protéines de réserves s'accumulent continuellement pendant la formation de la graine pour représenter finalement dans la graine sèche d'*Arabidopsis* environ 30 % des réserves stockées.

Les réserves protéiques des graines sont notamment importantes dans l'alimentation humaine ou animale car elles contiennent des acides aminés essentiels comme la lysine.

### **A - III-1-3. Lipides**

Les réserves des graines des crucifères comme *Arabidopsis thaliana* sont en

majorité constituées de lipides. L'importance économique liée à la teneur en lipides des graines, pour la production des biocarburants par exemple, a donné lieu à de nombreuses études visant à augmenter la teneur lipidique des graines (Cahoon et al., 2007 ; Napier, 2007 ; Kinney, 2006 ; Damude et Kinney, 2008 ; Graham et al., 2007 ; Kinney, 2009) ou bien à en comprendre le déterminisme génétique (Bourgis et al., 2011). Au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis thaliana*, la teneur en lipides augmente continuellement puis diminue lors de la fin de la maturation. Leur dégradation servirait à la synthèse de protéines de stockage. Dans la graine sèche d'*Arabidopsis thaliana*, les lipides représentent environ 35 % des réserves.

La régulation de la synthèse des lipides pendant la formation des graines se fait au niveau transcriptionnel (O'Hara et al., 2002). Des analyses de l'expression du génome nucléaire par microarray montrent en effet une activation de la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides pendant la maturation des graines (Ruuska et al., 2002).

La biosynthèse des lipides débute dès la fin de l'embryogenèse. Les lipides produits dans la graine sont généralement des triacylglycérols (TAGs) (Baud et Lepiniec, 2010). Les composants des acides gras des TAGs sont similaires à ceux des lipides membranaires. On retrouve ainsi principalement le palmitate, le stéarate, l'oléate, le linoléate et  $\alpha$ -linoléate (Voelker et Kinney, 2001). Les TAGs sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique (Bates et al., 2009) puis sont stockés à l'intérieur de corps lipidiques, ou oléosomes, structures intracellulaires dont la taille varie entre 0,2 et 2,5  $\mu\text{m}$  de diamètre (Murphy, 1990).

La synthèse des acides gras incorporés dans les TAGs a lieu à l'intérieur du plaste et requiert des quantités stœchiométriques d'ATP, de NADPH et de NADH pour chaque ajout d'une unité à la chaîne d'acides gras en cours de formation (Stumpf, 1981). L'origine de ces molécules est à la fois interne au plaste et externe. L'import de ces molécules à partir du cytosol ou de la mitochondrie nécessite des transporteurs spécifiques qui sont, pour le moment, encore mal caractérisés (Rawsthorne, 2002). Les sources possibles d'énergie à l'intérieur du plaste sont liées à l'oxydation des sucres par les enzymes glycolytiques : production de NADH via la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ou d'ATP via la phosphoglycérate kinase et la pyruvate kinase.

Le tégument de la graine limite les échanges de gaz avec le milieu extérieur créant parfois des conditions d'hypoxie. Cette hypoxie réduit le rapport ATP/ADP et ralentit donc les différentes voies de synthèse métaboliques pendant la phase de matu-

ration, en particulier celle de la synthèse des lipides (Baud et Lepiniec, 2010). Nous allons à présent examiner la régulation de la teneur en oxygène dans les graines en développement.

### ***A - III-2. Régulation de la teneur en oxygène dans les graines au cours de leur formation***

La teneur en oxygène à l'intérieur de la graine résulte à la fois de la diffusion à travers le tégument depuis l'atmosphère et de la balance entre production et consommation.

Chez les dicotylédones, le tégument ne possède pas de stomate fonctionnel (Geisler et Sack, 2002) contrairement aux monocotylédones où quelques stomates sont présents (Cochrane et Duffus, 1979). Le tégument limite donc les échanges des gaz entre la graine et le milieu extérieur. Une étude en tomographie de rayons X a montré qu'un réseau de canaux interconnectés à l'intérieur de la graine pourrait permettre le stockage transitoire d'oxygène (Cloetens et al., 2006).

La quantité d'oxygène à l'intérieur de la graine varie donc selon un gradient à partir du tégument jusqu'au centre de la graine. Ainsi, le niveau d'oxygène dans les graines de tournesol diminue progressivement dans l'albumen puis chute fortement dans l'embryon (Borisjuk et Rolletschek, 2009). Les biosynthèses fortement consommatrices d'oxygène, comme la synthèse des lipides par exemple, se déroulent donc dans la périphérie de la graine, là où l'oxygène est le plus présent (Rolletschek et al., 2005).

La plupart des études ont été menées chez le pois car la taille des graines est plus adaptée aux contraintes liées à ces techniques d'étude. Cependant, une hypoxie a également été mise en évidence chez *Arabidopsis* (Gibon et al., 2002) et chez *Brassica napus*.

Le tégument favorise à l'intérieur de la graine la création de condition d'hypoxie ou d'anoxie qui limitent la production d'ATP par les mitochondries. Chez la plupart des légumineuses et dans les graines oléagineuses des autres familles, l'embryon traverse une période photosynthétique transitoire (Rolletschek et al., 2005). Dans ces graines en formation, bien que la teneur en oxygène diminue graduellement du tégument à l'albumen, la teneur en oxygène à l'intérieur de l'embryon augmente lorsque la graine est éclairée (Rolletschek et al., 2002, 2003, 2005). Le niveau d'oxygène dans ces graines dépend donc des conditions extérieures (lumière, pression d'oxygène) mais

aussi du stade de développement. En absence de lumière, le niveau d'oxygène dans les graines photosynthétiques diminue fortement. La quantité d'oxygène disponible dans la graine en formation dépend alors uniquement des mécanismes de diffusion à travers le tégument. Cependant, un faible niveau d'oxygène est maintenu dans l'embryon. Ces observations suggèrent donc la mise en place de régulations pour empêcher l'anoxie. Par exemple, Vigeolas et al. (2003) ont montré que la consommation d'oxygène des graines en développement peut varier très rapidement. De plus, lorsque la teneur atmosphérique en oxygène diminue, une baisse de la respiration mitochondriale est observée (van Dongen et al., 2004). La graine contrôle donc à la fois son niveau d'oxygène mais aussi sa consommation (Borisjuk et Rolletschek, 2009).

Des études ont établi que l'oxyde nitrique (NO) participe dans les graines, comme chez les animaux, à la régulation de la consommation d'oxygène (Borisjuk et al., 2007 ; Benamar et al., 2008) en inhibant la respiration de la mitochondrie via sa fixation réversible à la cytochrome oxydase (COX). Le NO, synthétisé à partir des nitrites, limite donc le risque d'anoxie en modulant la quantité d'oxygène dans la graine (Borisjuk et al., 2007).

### **A - III-3. La photosynthèse des graines**

Chez la plupart des légumineuses et des graines à réserves oléagineuses, la maturation s'accompagne d'une période photosynthétique transitoire. La photosynthèse ne concerne pas nécessairement tous les tissus de la graine. Par exemple, chez le riz, le verdissement de la graine est localisé uniquement dans le tégument externe de la graine. Chez les dicotylédones, plus particulièrement chez les légumineuses et les graines à réserve lipidiques comme celles d'*Arabidopsis thaliana*, c'est l'embryon dans son intégralité qui devient vert et photosynthétiquement actif pendant le développement de la graine. La couleur verte d'une graine ou d'un de ses tissus n'est cependant pas toujours signe d'une activité photosynthétique. Par exemple chez le lotus sacré, aucune activité photosynthétique de l'axe de l'embryon, pourtant vert, n'est détectée (Tschiersch et al., 2011).

La photosynthèse participe à l'accumulation des réserves dans la graine. L'activité photosynthétique des graines requiert la mise en place de chloroplastes fonctionnels au cours du développement produisant des réserves (synthèse d'amidon par exemple) ou des métabolites intermédiaires qui sont ensuite utilisés ou stockés par l'embryon. Les chloroplastes dans la graine proviennent de la différenciation de proplastides d'origine maternelle. Au stade globulaire, les plastides contiennent seulement

quelques lamelles qui s'empilent au stade cœur et forment des grana au stade torpille (Mansfield et al., 1991). Chez *Arabidopsis thaliana*, le verdissement de l'embryon commence dès la fin de l'organogenèse (stade cœur). Il se développe progressivement de la périphérie de l'embryon jusqu'à son centre, entraînant l'acquisition de l'activité photosynthétique de la graine. Les graines sont donc totalement vertes pendant la phase de maturation (Ruuska et al., 2002 ; Borisjuk et al., 2003).

La photosynthèse ne permet pas à elle seule de fournir à l'embryon toute l'énergie nécessaire à son développement. La plante mère reste essentielle pour sa nutrition. La compréhension du rôle de la période photosynthétique est d'autant plus importante que la mise en place transitoire de l'appareil photosynthétique est très coûteuse d'un point de vue énergétique. La plupart des études ayant permis d'éclaircir certains mécanismes liés à la photosynthèse des graines (production de réserves, régulation de la teneur en oxygène dans la graine par exemple) ont été réalisées chez le pois. Cette espèce fourragère est issue de siècles de sélections visant à optimiser le contenu en réserves des graines. Les voies métaboliques mises en jeu et leurs régulations sont probablement éloignées des processus basiques. Au contraire, *Arabidopsis thaliana* n'a pas subi cette sélection et a conservé son caractère ancestral. L'architecture, l'activité et le rôle précis de la photosynthèse pendant son développement restent encore partiellement caractérisés et feront l'objet d'une étude dans le troisième chapitre de ce travail.

#### **A - III-4. Fin de la maturation**

La fin de la maturation est caractérisée par la dédifférenciation photosynthétique puis la dessiccation des tissus de la graine, nécessaire à sa conservation à long terme. Les chloroplastes se différencient alors en amyloplastés ou en éoplastes (Rolletschek et Borisjuk, 2005 ; Borisjuk et al., 2005)

##### **A -III-4-1. Dessiccation**

La perte en eau des graines orthodoxes consécutive à la dessiccation peut atteindre 95 %. Ces graines peuvent rester viables pendant la période de dormance et conserver leur pouvoir germinatif durant un stockage prolongé.

La dessiccation s'accompagne de modifications protéiques, métaboliques et transcriptomiques (Angelovici et al., 2010). L'acquisition de la tolérance à la dessiccation se traduit par l'accumulation de disaccharides ou d'oligosaccharides (raffinose, stachyose). Cette hausse est conjuguée à une baisse de la teneur en monosaccharides

(Bailly et al., 2001). L'accumulation de ces macromolécules a pour conséquence d'augmenter fortement la viscosité du cytoplasme causant la formation d'une phase vitreuse appelée bioglass. Des études suggèrent que ces bioglass pourraient empêcher la dégradation des macromolécules cytoplasmiques et favoriser ainsi la résistance à la dessiccation.

Des protéines exprimées lors de la fin du développement de la graine participent également à la résistance à la dessiccation. Ces protéines, nommées LEA (Late Embryogenesis Abundant), sont largement représentées chez les plantes (plus de 50 gènes chez *Arabidopsis* par exemple). Bien qu'intervenant dans de nombreux événements (chaperonnage des molécules, piégeage des ions, stabilisation des membranes par exemple), les mécanismes moléculaires à l'origine de la fonction de ces protéines restent encore inconnus (Tolletter et al., 2007 ; Shih et al., 2008).

Les protéines de réserve, les globulines (voir III-1-2), s'accumulent et sont stockées principalement dans les cotylédons (dicotylédones) ou dans l'endosperme (monocotylédone) (Shotwell et al, 1988). Leur quantité augmente pendant la fin de la maturation des graines et pendant leur dessiccation. On note également la synthèse de protéines de choc thermique et l'activation des défenses antioxydantes. Par exemple, l'activité de la catalase est augmentée dans les graines en fin de maturation (Bailly et al., 2004).

Pendant la phase de dessiccation, la limitation énergétique due à la structure de la graine devient encore plus problématique puisque le tégument s'épaissit et le contenu de la graine devient plus dense. Les échanges avec le milieu extérieur ou à l'intérieur de la graine sont donc plus difficiles. Cela est d'autant plus remarquable que la période photosynthétique transitoire des graines vertes est alors terminée

#### A - III-4-2. L'induction et le maintien de la dormance

La dormance est un état physiologique de la graine acquis au cours de sa maturation. En effet, des graines récoltées à la fin de l'embryogenèse peuvent germer. Elles perdent donc la capacité à germer précocement pendant la phase de maturation. La dormance permet de retarder la germination dans l'attente de conditions environnementales favorables. Cette dormance est appelée dormance primaire. On distingue la dormance tégumentaire induite par les enveloppes entourant la graine (les embryons isolés peuvent alors germer) de la dormance embryonnaire où les embryons isolés sont incapables de germer (Finch-Savage et Leubner-Metzger, 2006). La dormance secon-

daire résulte de mauvaises conditions de stockage (température, lumière) qui conduisent au blocage de la germination de la graine.

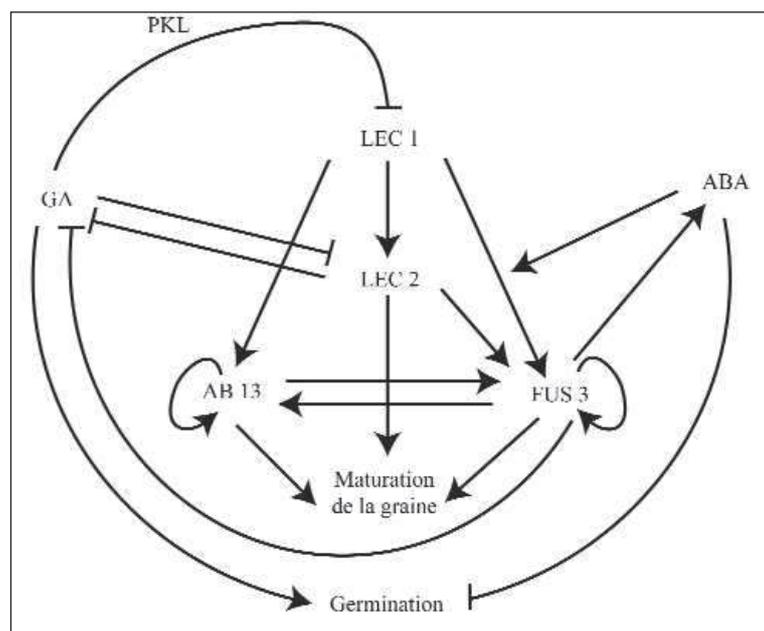
L'acteur principal de l'induction de la dormance est l'acide abscissique (ABA) (Finkelstein et al., 2008). L'ABA induit la dormance pendant la maturation de l'embryon et peut inhiber la germination. En effet, des mutants dont la voie de biosynthèse de l'ABA est modifiée ont une période de dormance réduite (Nambara et Marion-Poll, 2003). Cependant, l'ABA apporté de façon exogène ne suffit pas à induire la dormance, une production endogène par l'embryon est nécessaire à l'établissement du phénomène (Finkelstein et al., 2002).

### A - III-5. Régulation hormonale et transcriptionnelle de la maturation de la graine

La phase de maturation de la graine est génétiquement contrôlée par au moins quatre gènes majeurs : FUSCA3 (*FUS3*), ABSCISSIC ACID INSENSITIVE3 (*ABI3*), LEAFY COTYLEDON 1 (*LEC1*) et *LEC2* (To et al., 2006 ; Braybrook et Harada 2008) (**Figure 4**). *ABI3*, *FUS3* et *LEC2* codent des facteurs de transcription spécifiques des plantes possédant un domaine de liaison à l'ADN B3 (Stone et al., 2001 ; Luerssen et al., 1998) tandis que *LEC1* code un facteur de transcription de type CBF (Lotan et al., 1998 ; Kwong et al., 2003). Bien qu'exprimés dès l'embryogenèse, ces facteurs de transcription sont les régulateurs clés de la période de maturation. Leurs rôles ont été

**Figure 4. - Régulation hormonale et transcriptionnelle de la maturation des graines.**

La maturation de la graine est principalement contrôlée au niveau transcriptionnel par les gènes FUSCA3 (*FUS3*) ABSCISSIC ACID INSENSITIVE3 (*ABI3*), LEAFY COTYLEDON 1 (*LEC1*), LEAFY COTYLEDON 2 (*LEC2*) et PKL (PICKLE) et au niveau hormonal par l'acide abscissique (ABA) et les gibbérellines (GA). D'après To et al., 2006, et Braybrook et Harada, 2008.



précisés par l'étude de mutants nuls pour chacun de ces gènes. Ces mutants présentent une baisse de la production des protéines de réserve (mutants *abi3*, *lec1*, *lec2* et *fus3*), une absence de dégradation de la chlorophylle (*abi3*) ou bien encore une intolérance à la dessiccation (Harada, 2001). Ces phénotypes confirment leur rôle clé lors de la maturation de la graine.

Les gènes impliqués dans la synthèse des protéines de réserve sont les cibles directes de ces facteurs de transcription. *LEC2* et *FUS3* se lient spécifiquement avec le motif RY présent dans les régions 5' de ces gènes et induisent leur surexpression (Reidt et al., 2000 ; Monke et al., 2004). *ABI3* participe également, avec ces deux facteurs, à l'activation de ces gènes (Kroj et al., 2003) tandis que l'effet de *LEC1* semble être indirect et dépendant des facteurs *LEC2*, *FUS3* et *ABI3*. En effet, l'expression ectopique de *LEC1* active les gènes *LEC2*, *FUS3* et *ABI3* (Kagaya et al., 2005). Ces régulations ne s'exercent pas de la même manière dans tous les tissus de la graine (To et al., 2006).

La régulation de la maturation de la graine par ces facteurs de transcription est réalisée en collaboration avec un contrôle hormonal dirigé par les GA et l'ABA. Ces deux hormones ont un profil d'accumulation particulier au cours de la maturation. En effet, le niveau d'ABA augmente dès le début de la phase de maturation puis reste à un niveau élevé avant de baisser dans les phases tardives. L'ABA contribue à créer des conditions propices à la maturation de la graine en stimulant, via *FUS3* et *LEC1*, la transcription des gènes des protéines de réserve (Kagaya et al., 2005). Ainsi, les mutants déficients dans la réponse à l'ABA présentent une baisse de la quantité de protéines de réserves (Penfield et al., 2006 ; Carles et al., 2002). Parallèlement, l'ABA est aussi stimulé par le gène *FUS3* (Gazzarrini et al., 2004) suggérant l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positive entre ces deux participants. Contrairement à l'ABA, le niveau de GA diminue pendant la phase de maturation. Les GA sont en effet inhibées par les gènes *FUS3* et *LEC2* (Curaba et al., 2004). Le maintien d'un faible taux de GA au cours de la maturation de la graine permettrait d'inhiber la division cellulaire et la germination (Gazzarrini et al., 2004). Les mécanismes d'interaction moléculaire entre les facteurs de transcription et les hormones restent encore à déterminer.

#### **A - IV. Levée de dormance et germination**

La levée de dormance précède la germination et implique des changements dans l'expression des gènes, dans l'activité enzymatique ou dans l'accumulation d'hormones. Ceci suggère que des événements biologiques tels que la transcription ou la traduction peuvent se dérouler dans la graine sèche (Cadman et al., 2006 ; Finch-Savage et al., 2007 ; Leubner-Metzger, 2005).

La levée de dormance est le fruit de la balance entre les taux d'acide abscissique et de gibbérellines. Tandis que l'acide abscissique tend à maintenir la graine en état de dormance (voir A - III-IV-2), les gibbérellines ont l'effet inverse. D'autres molécules participent également à la levée de dormance comme les espèces réactives de l'oxygène et les composés nitrogénés (Finkelstein et al., 2008). Par exemple, l'oxydation spécifique de certains transcrits pourrait permettre la levée de dormance de la graine d'*Helianthus annuus* (Bazin et al., 2011).

Le mode d'action des gibbérellines dans la levée de la dormance repose sur l'induction d'enzymes fragilisant le tégument et stimulant ainsi la germination. Elles induisent aussi la mobilisation des réserves de la graine et stimulent donc la croissance de l'embryon (Bewley et Black, 1994). L'action seule des gibbérellines n'est cependant pas suffisante pour lever la dormance des graines, elle doit être accompagnée par une baisse du niveau d'acide abscissique (Jacobsen et al., 2002). Les brassinostéroïdes (Leubner-Metzger, 2001) ainsi que l'éthylène (Beaudoin et al., 2000) participent également à la levée de dormance en inhibant la signalisation de l'ABA. La dormance peut également être levée par stratification, c'est-à-dire en plaçant les graines dans un environnement humide à 4 °C et à l'obscurité pendant 24 °C. La stratification augmente entre autre l'expression des gènes de la biosynthèse des GA (Yamauchi et al., 2004).

Afin de permettre la germination, l'activité des facteurs de transcription ABI3, LEC1, LEC2 et FUS3 (voir III-5) est réprimée par le gène *PKL* (Ogas et al., 1997 ; Rider et al., 2003). En effet, des mutants nuls pour ce gène continuent d'accumuler des réserves. Le gène *PKL* code une protéine intervenant dans le remodelage de la chromatine (Heng et al., 2008) qui conduirait à une inactivation des facteurs LEC (Tanaka et al., 2008). L'inactivation de ces facteurs de transcription permet ainsi de bloquer l'accumulation des réserves et favorise donc la germination.

La germination débute lors de la réhydratation de la graine sèche et se termine lorsque la radicule a percé le tégument (Bewley, 1997). L'activité respiratoire augmente et les réserves accumulées pendant la phase de maturation sont dégradées.

D'un point de vue macroscopique, l'absorption de l'eau est le principal événement initiant la germination. La réhydratation ne se fait pas de façon homogène, la région micropylaire est le lieu principal de l'entrée de l'eau dans la graine (Manz et al., 2005). L'existence de réseaux interconnectés à l'intérieur de la graine sèche d'*Arabidopsis* (Cloetens et al., 2006) pourrait faciliter la distribution de l'eau. L'absorption de l'eau se déroule en plusieurs étapes. Après une phase d'absorption initiale très rapide permettant la reprise des activités cellulaires (imbibition), d'impor-

tantes modifications des parois et des membranes s'effectuent afin de préparer l'émergence de la radicule. Enfin, une nouvelle entrée massive d'eau permet l'élongation des cellules de l'axe radicaire qui perce alors le tégument au niveau du micropyle.

D'un point de vue moléculaire, les protéines de réserve sont dégradées (Gallardo et al., 2001), de même que les lipides. Certaines protéines stockées comme les LEA ou les HSP disparaissent. L'augmentation de l'activité des enzymes impliquées dans le catabolisme de ces réserves au cours de la germination indique leur conversion en sucres alimentant le métabolisme respiratoire. En parallèle, le cycle cellulaire est lui aussi réactivé.

## B - EXPRESSION GÉNIQUE DANS LES GRAINES EN COURS DE FORMATION

L'expression génique dans les graines en cours de formation a fait l'objet de nombreuses études (Girke et al., 2000 ; Ruuska et al., 2002 ; Hennig et al., 2004 ; Sreenivasulu et al., 2004 ; Spencer et al., 2007 ; Le et al., 2010 ; Xiang et al., 2011). L'objectif de ces études est de comprendre comment sont régulées les étapes cruciales du développement de la graine.

### **B - I. Expression du génome nucléaire dans les graines en formation**

#### ***B - I-1. Analyse globale***

L'analyse globale de l'activité des gènes nucléaires au cours de la formation de la graine d'*Arabidopsis thaliana* a été réalisé par GeneChip (Le et al., 2010). Cette analyse a permis de mesurer les variations d'expression de 9 000 à 14 000 gènes et de 700 à 1 000 facteurs de transcription en fonction du stade de développement de la graine.

Le nombre d'ARNm détectés varie très peu après la fécondation et pendant les premiers stades d'embryogenèse mais diminue à partir du début de la maturation et lorsque la graine prépare son entrée en dormance. La même cinétique est observée pour les facteurs de transcription.

Chaque stade de développement est caractérisé par une population d'ARNm spécifique. De plus, la répartition de ces transcrits n'est pas homogène à l'intérieur de la graine. Par exemple, les ARNm spécifiques du stade globulaire de l'embryon sont

localisés dans l'albumen ou le tégument de la graine tandis que ceux spécifiques du stade de maturation sont principalement localisés dans l'embryon.

La comparaison de ces ARNm avec ceux d'une plante mature a permis de définir 289 gènes, dont 48 codant des facteurs de transcription (dont les gènes *LEC* et *FUS3*) qui sont spécifiques des graines en formation mais dont le rôle exact reste encore à préciser.

### ***B - I-2. Expression des gènes nucléaires pendant l'embryogenèse***

Les études de l'expression du génome nucléaire réalisées à partir d'embryons isolés montrent que jusqu'à 80 % des gènes du génome d'*Arabidopsis thaliana* sont exprimés pendant l'embryogenèse (Spencer et al., 2007 ; Xiang et al., 2011). Le profil et la fonction des gènes exprimés varient en fonction du stade de développement de l'embryon. Lors du passage du zygote au stade globulaire puis au stade cœur, les gènes les plus exprimés sont successivement ceux liés à l'auxine puis à la morphogenèse et au contrôle du cycle cellulaire. Dès le stade cœur, on note une augmentation de l'expression des gènes liés au métabolisme énergétique. Aux stades «torpille» et «cotylédons retournés», les gènes du cycle cellulaire sont réprimés alors que les gènes liés à la croissance cellulaire et aux protéines de stockage sont activés.

### ***B - I-3. Expression des gènes nucléaires pendant la maturation***

Lors de la période de maturation, la graine accumule et stocke des réserves lipidiques, protéiques et glucidiques. L'analyse de l'expression des gènes participant aux voies de synthèse de ces différents composés réalisée par microarray chez *Arabidopsis thaliana* (Ruuska et al., 2002) a révélé que le profil d'accumulation de chaque groupe de gènes est lié à leur fonction.

#### **B - I-3-1. Transcrits liés aux réserves lipidiques**

Seuls 40 % des gènes nucléaires liés au métabolisme lipidique varient significativement pendant la formation des graines. On peut classer ces gènes en deux groupes en fonction de leur profil d'expression. L'expression des gènes du premier groupe augmente entre l'embryogenèse et la maturation avant de diminuer pendant la fin de la maturation. Ce profil concerne par exemple l'expression de trois sous-unités plastidiales de l'acétyl-CoA carboxylase [la BCCP (Biotin Carboxyl Carrier Protein), la BC (Biotin Carboxylase), et l' $\alpha$ -CT ( $\alpha$ -carboxyltransférase)]. L'expression des gènes du

second groupe augmente progressivement au cours du développement de la graine. Contrairement aux gènes du premier groupe, l'expression de ces gènes ne diminue donc pas pendant les phases tardives du développement. Par exemple, l'accumulation des transcrits des gènes *FAD3* (Fatty Acid Desaturase) ou *FAE1* (Fatty Acid Elongase) est faible pendant l'embryogénèse et augmente au tout début de la phase de maturation jusqu'à la fin la formation de la graine.

### B - I-3-2. Transcrits liés aux protéines de réserve

Les protéines majeures accumulées au cours de la formation de la graine sont les globulines 2S et 12S. L'accumulation des transcrits de ces deux classes de protéines varie différemment. En effet, les transcrits des globulines 2S sont déjà très abondants pendant le début de la maturation puis leur quantité est doublée jusqu'à la fin de la maturation. L'expression des gènes des globulines 12S est plus faible au début du développement mais est multipliée par 10 pendant la période de maturation.

### B - I-3-3. Transcrits liés aux réserves glucidiques

Les réserves glucidiques sont présentes principalement sous forme d'amidon dans les graines. Les gènes liés à la synthèse ou à la dégradation d'amidon sont très exprimés pendant les phases précoces du développement. En effet, l'expression des gènes codant les enzymes responsables de la dégradation de l'amidon, comme la  $\beta$ -amylase, présente un pic d'accumulation entre la fin de l'embryogénèse et le début de la maturation avant de diminuer rapidement. Ceci est concordant avec la cinétique d'accumulation de l'amidon décrite précédemment (voir A-III-1-1).

### B - I-3-4. Transcrits des gènes codant les fonctions photosynthétiques

Dans les graines possédant un stade photosynthétique, comme la graine d'*Arabidopsis thaliana*, les gènes nucléaires codant les fonctions photosynthétiques (par exemple les gènes du photosystème II ou du complexe LHC) sont très peu exprimés pendant l'embryogénèse puis passent par un maximum au cours de la maturation. Ce profil se rapproche de celui observé pour l'expression des transcrits codant certaines réserves lipidiques.

Toutes les études transcriptomiques menées jusqu'à présent se focalisent donc exclusivement sur le génome nucléaire. Aucune d'entre elles ne s'est jusqu'à présent

intéressée à l'expression du génome plastidial. Pourtant, un grand nombre de mutants embryo-létaux décrits affectent des protéines plastidiales (**Tableau 1**) soulignant l'importance de l'expression génique plastidiale dans le développement de la graine. Nous allons donc maintenant nous intéresser au génome plastidial et à sa transcription.

Gène	Locus	Fonction	Stade d'arrêt du développement	Référence
CLPP5	At1g02560	Sous-unité de la protéase Clp	Globulaire	Kim et al., 2009
EMB 2394	At1g05190	Protéine ribosomique L6	Préglobulaire ou globulaire	Tzafrir et al., 2004
TIC 110	At1g06950	Import des protéines dans le chloroplaste	Globulaire	www.seedgenes.org / Myouga et al., 2010
EMB 2784	At1g07320	Protéine ribosomique L4	Globulaire	www.seedgenes.org / Myouga et al., 2010
EMB 3146	At1g12410	Sous-unité de la protéase Clp	Cotylédon	Kim et al., 2009
FUG 1	At1g17220	Facteur d'initiation de la traduction (cpIF2)		www.seedgenes.org
TGD 1	At1g19800	Protéine de l'enveloppe du chloroplaste	Cotylédon	www.seedgenes.org
AtCAF 2	At1g23400	Epissage des introns	Stade cœur	www.seedgenes.org
EMB 3003	At1g34430	Complexe pyruvate décarboxylase	Préglobulaire	www.seedgenes.org
EMB 3105	At1g48350	Protéine ribosomique L18	Préglobulaire	Bryant et al., 2011
SCO 1	At1g62750	Facteur d'élongation G	Globulaire	www.seedgenes.org / Myouga et al., 2010
EMB 2184	At1g75350	Protéine ribosomique L31	Stade cœur	Tzafrir et al., 2004
EMB 1473	At1g78630	Protéine ribosomique L13	Globulaire	Tzafrir et al., 2004
EMB 1047	At1g79560	Protease FtsH-Like	Stade cœur ou cotylédon	Tzafrir et al., 2004
EMB 93	At2g03050	mTERF related protein	Stade cœur	Babiyhuk et al., 2009
TRZ 2	At2g04530	Biosynthèse des ARNt plastidiaux	Globulaire	Canino et al., 2009
EMB 2289	At2g31530	Translocase (SECY2)	Globulaire	Skalitzky et al., 2011
EMB 3113	At2g33800	Protéine ribosomique 5S	Préglobulaire	Bryant et al., 2011
EMB 3117	At2g47940	Protease DegP2	Préglobulaire	Bryant et al., 2011
AtCFM 2	At3g01370	Epissage des introns		www.seedgenes.org
AtNAP 7	At3g10670	SufC-Like ABC/ATPase	Globulaire	Xu et al., 2004
EMB 1865	At3g18390	Epissage des introns (CFM1)	Globulaire	Tzafrir et al., 2004
PL E2	At3g25860	Sous-unité E2 de la pyruvate décarboxylase	Stade cœur	Tzafrir et al., 2004
TOC 75	At3g46740	Import des protéines dans le chloroplaste	Préglobulaire	Baldwin et al., 2005
EDD	At3g48110	Glycyl ARNt synthétase	Globulaire ou stade cœur	Berg et al., 2005
EMB 2360	At3g54660	Glutathion réductase	Préglobulaire ou globulaire	Belmonte et al., 2010
EMB 3126	At3g63490	Protéine ribosomique L1	Préglobulaire	Bryant et al., 2011
EMB 1374	At4g26500	Activateur des désulfurases (AtSufE)	Préglobulaire	Xu et Moller., 2006
EMB 3136	At5g13510	Protéine ribosomique L10	Préglobulaire	Bryant et al., 2011
EMB 3137	At5g14320	Protéine ribosomique S13	Préglobulaire	Bryant et al., 2011
EMB 1241	At5g17710	Protéine GrpE	Préglobulaire	Tzafrir et al., 2004
EMB 3138	At5g18570	Obg-Like GTPase	Préglobulaire ou globulaire	Bang et al., 2009
OEP 80	At5g19620	Protéine de l'enveloppe du chloroplaste	Globulaire	Patel et al., 2008
CRL	At5g51020	Protéine de l'enveloppe du chloroplaste	Cotylédon	Asano et al., 2004
PKPI	At5g52920	Sous-unité B1 de la pyruvate kinase	Cotylédon	www.seedgenes.org
EMB 1629	At5g57930	Complexe Fer-Soufre	Globulaire	Tzafrir et al., 2004

**Tableau 1. - Mutants embryo-létaux d'*Arabidopsis thaliana* affectés dans l'expression de protéines plastidiales.**

## B - II. Le génome plastidial

Les plastes sont issus de l'endosymbiose secondaire d'une cyanobactérie avec une cellule proto-eucaryote contenant une mitochondrie il y a environ un milliard d'années (Dyall et al., 2004). Cette endosymbiose a donné naissance aux plastes primaires des algues, des plantes et des glaucophytes. La dissémination des plastes a eu lieu à la suite d'une endosymbiose secondaire où ce nouvel eucaryote a été phagocyté par un eucaryote non photosynthétique. Cet événement s'est accompagné d'une perte ou d'un transfert d'une partie de l'information génétique vers le noyau. Les plastes ont toutefois conservé une partie de leur génome ancestral et sont donc considérés comme des organismes semi-autonomes.

### B - II-1. Structure du génome plastidial

Le génome plastidial a conservé certaines particularités structurales et fonctionnelles du génome des cyanobactéries. Ainsi, la transcription de ce génome circulaire regroupé sous forme de nucléoïdes, est assurée par un système d'origine procaryotique. Les gènes sont également organisés sous forme de 38 unités transcriptionnelles (Bock, 2007).

#### B - II-1-1. De nombreux plastomes ont été séquencés

Depuis les premiers séquençages de plastome réalisés chez le tabac (Shinozaki et al., 1986) et chez *Marchantia polymorpha* (Ohyama et al., 1986), on compte en juin 2011 plus de 220 plastomes séquencés (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). L'obtention des séquences des plastomes a participé à la compréhension des mécanismes génétiques et moléculaires des plastes.

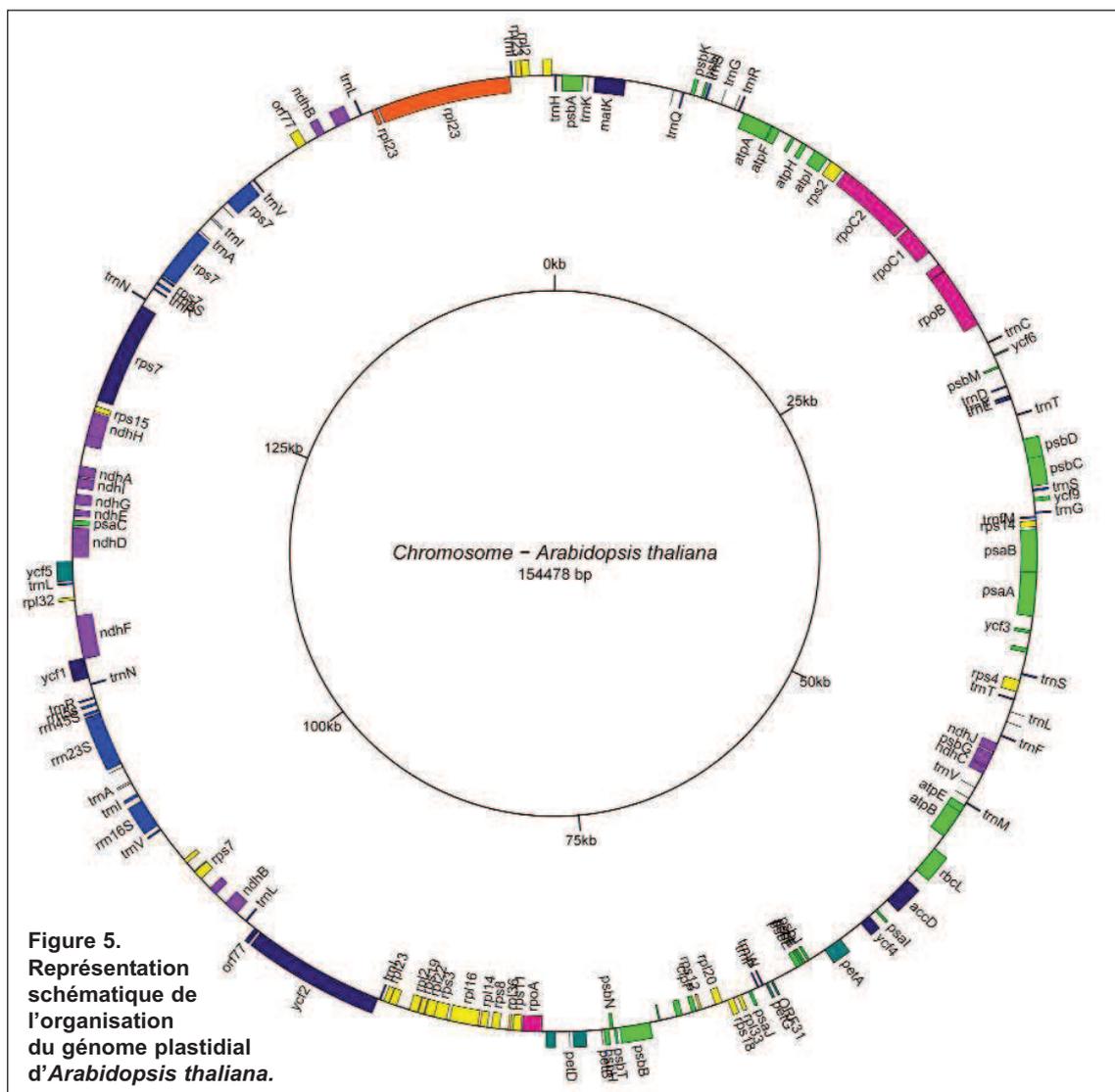
#### B - II-1-2. Les plastomes possèdent une séquence inversée-répétée de longueur variable

Le génome plastidial est divisé en deux parties simple copie séparées par deux régions inversées-répétées (pour revue voir Bock, 2007) lesquelles sont identiques dans leur séquence nucléotidique mais sont orientées antiparallèlement (**Figure 5**). La taille du plastome est conditionnée par la longueur de cette région qui chez *Pelargonium* peut atteindre 150 kb de longueur, soit le triple de la longueur moyenne (Chumley et al., 2006).

L'intérêt de la présence d'une région inversée-répétée est pour le moment peu clair. Elle pourrait permettre l'augmentation de la présence des ARN ribosomiques largement représentés dans cette région. D'autres études suggèrent un rôle dans la stabilité du génome (Palmer et Thompson, 1982). Cependant, l'absence d'une séquence répétée chez quelques algues (Reith, 1995) ou plantes supérieures (Palmer et Thompson, 1982) semble démontrer que cette répétition n'est pas essentielle au fonctionnement du plastome.

### B - II-1-3. Le génome plastidial est présent en de nombreuses copies dans les plastes

La cellule végétale contient plusieurs plastes et chaque plaste contient plusieurs centaines de copies du génome. Le génome plastidial est présent sous la forme d'un ADN double brin circulaire dont la taille varie de 120 à 160 kpb (**Figure 5**). Ces copies



sont identiques dans tous les types de plastomes, du proplaste au chloroplaste. Ainsi, contrairement au génome nucléaire où chaque gène est présent en deux copies, chaque gène du plastome peut être présent en plus de 10 000 copies par cellule. Ce nombre varie en fonction de l'espèce, du tissu, du stade de développement et des conditions environnementales (Bendich, 1987). Chez les plantes, ce nombre de copies est en général plus important dans les chloroplastes des cellules photosynthétiques. Les autres types de plastomes, comme ceux des racines, possèdent un nombre de copies inférieur (Isono et al., 1997). La différenciation des proplastomes ou étioplastomes en chloroplastes au cours du verdissement s'accompagne donc d'une augmentation du nombre de copies du génome. Le nombre de copies passe par exemple de 2 000 à 8 000 copies chez l'orge (Baumgartner et al., 1989).

La modification du nombre de copies du plastome par cellule au cours du développement résulte généralement de la combinaison de l'augmentation du nombre de plastomes par cellule et de l'augmentation du nombre de copies du génome par plastome (Bock, 2007). Au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis thaliana*, le nombre de plastomes augmente continuellement avant de diminuer pendant la fin de la maturation et la dessiccation (Mansfield et al., 1991). Au contraire, dans les feuilles de l'orge, le nombre de copies du plastome reste très constant après la différenciation des plastomes en chloroplastes (Li et al., 2006 ; Zoschke et al., 2007).

#### B - II-1-4. Le génome plastidial n'est pas uniquement circulaire

Contrairement aux premières observations du plastome, seule une petite partie du génome plastidial serait présent sous la forme d'un ADN double brin circulaire (25 à 45 % dans les feuilles en développement par exemple, Lilly et al., 2001). Le plastome est également présent sous forme linéaire et concaténée (Bendich, 2004). Les coupures dans le plastome sous forme linéaire ne sont pas aléatoires et correspondent généralement à des origines de réplication connues (Scharff et Koop, 2006). De plus, dans les cas où le génome est circulaire, il est quelquefois (30 % des cas chez le tabac, Lilly et al., 2001) présent sous forme concaténée.

La fonction de ces arrangements reste pour le moment largement inconnue. Certaines formes peuvent simplement représenter des intermédiaires de la réplication de l'ADN tandis que d'autres n'ont peut-être aucune signification fonctionnelle (Bock, 2007). Seules des expériences menées chez *Chlamydomonas reinhardtii* ont pour l'instant démontré l'influence de ces structures sur l'activité transcriptionnelle (Salvador et al., 1998).

## B - II-1-5. Les plastomes sont regroupés en nucléoïdes attachés aux membranes plastidiales

Le génome plastidial n'est pas libre dans le stroma. En effet, plusieurs copies se rassemblent et forment des paquets denses appelés nucléoïdes (Kuroiwa, 1989 ; Kuroiwa, 1991). Le nombre, la forme et la taille des nucléoïdes varient selon les espèces et selon la différenciation du plaste. En effet, tandis que les proplastides ne contiennent qu'un seul nucléoïde, on en dénombre plusieurs douzaines dans les chloroplastes.

Les nucléoïdes sont liés aux membranes. Chez les plantes supérieures, des attaches à la fois à la membrane thylacoïdienne et à l'enveloppe du chloroplaste ont été démontrées (Liu et Rose, 1992 ; Sato et al., 1993 ; Azevedo et al., 2008). On sait, grâce à des études sur des mutants de *Chlamydomonas reinhardtii*, que la taille des nucléoïdes est contrôlée par le génome nucléaire (Ikehara et al., 1996 ; Misumi et al., 1999). Plusieurs protéines de liaison à cette structure ont été identifiées et caractérisées (Nakano et al., 1997 ; Cannon et al., 1999 ; Sekine et al., 2002 ; Jeong et al., 2003).

## **B - II-2. Organisation fonctionnelle**

### B - II-2-1. Le génome plastidial est organisé en opérons

Comme chez les bactéries, le génome est organisé en unités transcriptionnelles polycistroniques. On dénombre 35 unités qui sont constituées de gènes ayant une fonction parfois différente (**Tableau 2**). Seuls quelques gènes du plastome sont transcrits

Unité transcriptionnelle	Espèce	Référence
rps16 – trnK5' – matK – tmK3'	<i>Sinapsis alba</i>	Neuhaus et Link, 1990
psbK – psbI – tmS	<i>Sinapsis alba</i>	Neuhaus et Link, 1990
psaA – psaB – rps14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Liere et Börner, 2007
ndhC – ndhK – ndhJ	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Meurer et al., 1996
petL – petG – <u>trnW</u> – <u>trnP</u> – psaJ – rpl33 – rps18	<i>Zea mays</i>	Haley et Bogorad, 1990
psbB – psbT – <u>psbN</u> – psbH – petB – petD	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Meurer et al., 1996
ndhH – ndhA – ndhI – ndhG – ndhE – psaC – ndhG – ndhE – psaC – ndhD	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Meurer et al., 1996

**Tableau 2. - Quelques exemples d'unités transcriptionnelles caractérisés sur le génome plastidial.** Les gènes transcrits sous la forme d'un antisens à l'intérieur d'une unité transcriptionnelle sont soulignés.

indépendamment comme par exemple *rbcL*, *psbA* ou *clpP*. L'existence de promoteurs internes au sein de l'opéron permet néanmoins le découplage de la transcription d'un ou plusieurs gène(s) au sein de l'unité transcriptionnelle (par exemple au sein de l'opéron constitué des gènes *rps2-atpI-atpH-atpF-atpA* (Zghidi-Abouzid et al., 2011) ou au sein de l'opéron *atpB-atpE* (Kapoor et al., 1994 ; Ghulam et al., non publié).

## B - II-2-2. Régulation de l'expression du génome plastidial

### B - II-2-2-1. Topologie de l'ADN

Comme chez les bactéries, la topologie de l'ADN peut influencer sur l'expression du génome plastidial (Salvador et al., 1998). En effet la transcription requiert que l'ADN soit sous une forme super-enroulée. Les topoisomérases, qui ajustent la forme du brin d'ADN, participent donc à la régulation de la réplication et de la transcription. Par exemple, les plantes mutées dans les gyrases, permettant la relaxation ou l'enroulement de l'ADN, présentent un phénotype altéré sévère ou létal chez *Arabidopsis* (Wall et al., 2004).

### B - II-2-2-2. Maturation des transcrits

Après transcription, l'ARN plastidial subit plusieurs événements de maturation permettant la modulation de l'expression génique (pour revue voir Stern et al., 2010). Par exemple, lors de la transcription d'une unité polycistronique, le clivage en unité monocistronique est obligatoire pour permettre la traduction des messagers. La maturation des extrémités 5' et 3' est initiée par la reconnaissance et le clivage de ces extrémités par des enzymes (endo- ou exoribonucléase par exemple). Contrairement aux transcrits nucléaires, les transcrits plastidiaux ne possèdent pas de coiffe à l'extrémité 5' ; la polyadénylation à l'extrémité 3' est quant à elle un signal de dégradation. En revanche, des structures de type épingle à cheveux sont fréquemment retrouvées à ces extrémités et sont impliquées dans la stabilité des transcrits et leur capacité à être traduits.

Certains transcrits possèdent un ou plusieurs introns et subissent donc un épissage (par exemple le messager *rps12* ou *clpP* chez *Arabidopsis*). Ces événements d'épissage sont contrôlés par les maturases comme MATK, codée par le génome plastidial, qui permet l'épissage du transcrit correspondant à l'ARN de transfert *trnK* chez le maïs (Jenkins et al., 1997).

Les ARN peuvent aussi être édités par le remplacement d'une base cytidine par une uridine comme par exemple les transcrits *accD* et *ndhF* chez *Arabidopsis* (Tseng et al., 2010). Le nombre de bases éditées varie très fortement d'une lignée à l'autre (de 900 chez certains bryophytes à une quarantaine chez les plantes vascularisées) et entre les espèces de chaque lignée (30 % de sites d'édérations conservés parmi 18 gènes entre le riz et *Arabidopsis* ; Tsudzuki et al., 2001). Une séquence cis localisée dans les 50 nucléotides proches du site d'édition permet la reconnaissance du nucléotide à éditer (Stern et al., 2010).

### B - II-2-2-3. Les protéines PPR

Les protéines PPR (pentatricopeptide repeat) interviennent dans la majorité des processus de contrôle de l'expression génique post-transcriptionnelle. Ces protéines sont codées dans le noyau et adressées au plaste et à la mitochondrie (Lurin et al., 2004). Elles sont constituées d'un motif de 35 acides aminés répété jusqu'à 30 fois (Small et Peeters, 2000). Ces protéines sont des adaptateurs capables de se lier à l'ARN dans les régions 5' UTR (Schmitz-Linneweber et al., 2005), dans les introns (Beick et al., 2008) ou dans les régions intergéniques (Kazama et al., 2008). Même si pour le moment la manière dont ces protéines reconnaissent ces domaines reste inconnue, leur implication dans les différents événements de maturation des transcrits a été largement analysée.

Les protéines PPR contribuent à la stabilité des transcrits (par exemple du transcrit *atpH* (Prikryl et al., 2011) ou du transcrit *psaJ* (Pfalz et al., 2009). Elles interviennent également dans l'édition. Par exemple, la protéine CCR4 permet l'édition du codon d'initiation de *ndhD* (Kotera et al., 2005). La protéine CLB19 permet quant à elle l'édition de sites spécifiques des transcrits *clpP* et *rpoA* (Chateigner-Boutin et al., 2008). En 2008, 7 PPR ont été identifiés et sont impliqués dans l'épissage des ARN (Schmitz-Linneweber et Small, 2008) comme par exemple la protéine PPR531-11 pour le gène *clpP* chez *Physcomitrella patens* (Hattori et al., 2007) ou la protéine HCF152 pour les messagers *psbB-psbT-psbH-petB-petD* (Meierhoff et al., 2003).

Certaines protéines PPR ont un rôle dans la régulation de la traduction des messagers. La protéine CRP1 est par exemple requise pour initier la traduction des transcrits *petA* et *psaC* (Fisk et al., 1999).

### B - II-2-3. Fonction des gènes plastidiaux

Les gènes codés par le plastome peuvent être regroupés en 7 catégories fonctionnelles (**Tableau 3**). On distingue les gènes liés aux fonctions photosynthétiques (PSI, PSII, ATP synthase, cytochrome), de transcription (gènes *rpo*, voir B - II-3-1), de traduction (protéines ribosomiques), de chlororespiration (complexe NDH), les gènes codant les ARN de transfert (ARNt) et certains ARN ribosomiques (ARNr) ainsi que finalement quelques gènes n'appartenant à aucune de ces catégories.

Le génome plastidial code environ 120 gènes alors que le plaste contient en moyenne plus de 2 000 protéines différentes (Leister, 2003). Les gènes codés directement dans le plaste ne permettent pas de synthétiser tous les composants nécessaires à son expression et à son fonctionnement. Ces derniers sont donc sous la dépendance des gènes nucléaires, transcrits dans le noyau, traduits dans le cytoplasme puis importés

Classes fonctionnelles									
Photosynthèse		Transcription	Traduction		Chlororespiration	Autres	ARNt		ARNr
atpA	atpB	rpoA	rpl2	rpl14	ndhA	accD	trnA	trnC	ARNr16S
atpE	atpF	rpoB	rpl16	rpl20	ndhB	cemA	trnD	trnE	ARNr23S
atpH	atpI	rpoC1	rpl22	rpl23	ndhC	clpP	trnF	trnG	ARNr5S
petA	petB	rpoC2	rpl32	rpl33	ndhD	matK	trnH	trnI	ARNr4,5S
petD	petG		rpl36		ndhE	orf77	trnK	trnL	
petL	petN		rps2	rps3	ndhF	ycf1	trnM	trnN	
psaA	psaB		rps4	rps7	ndhG	ycf2	trnP	trnQ	
psaC	psaI		rps8	rps11	ndhH	ycf3	trnR	trnS	
psaJ			rps12	rps14	ndhI	ycf4	trnT	trnV	
psbA	psbB		rps15	rps16	ndhJ	ycf5	trnW	trnY	
psbC	psbD		rps18	rps19	ndhK				
psbE	psbF								
psbH	psbI								
psbJ	psbK								
psbL	psbM								
psbN	psbT								
psbZ									
rbcl									

Tableau 3. - Liste des gènes codés dans le génome plastidial d'*Arabidopsis thaliana* regroupés selon leur fonction.

dans le plaste. Le chloroplaste importe plus de 95 % des protéines nécessaires à son fonctionnement (Bock, 2007). L'expression des deux génomes, nucléaire et plastidial, doit donc être coordonnée.

#### B - II-2-4. La communication entre le noyau et le plaste

Au cours de l'évolution, la taille du génome plastidial a été réduite et de nombreux gènes ont été transférés au noyau (Strand et al., 2007). La plupart des protéines utilisées dans le plaste sont traduites dans le cytoplasme de la cellule végétale. Ces protéines possèdent un peptide de transit N-terminal qui permet sa redirection vers les différents compartiments du chloroplaste (Bruce, 2000). Des transporteurs spécifiques présents sur les deux membranes de l'enveloppe du chloroplaste, appartenant aux systèmes Tic et Toc, permettent leur import à l'intérieur du plaste (Jarvis et Soll, 2002). Les protéines sont ensuite clivées par des peptidases, sont adressées au sous-compartiment plastidial, puis acquièrent leur configuration finale à l'aide de protéines chaperonnes (Keegstra et Cline, 1999). Cette communication du noyau vers le plaste (contrôle antérograde) est indispensable au fonctionnement de l'organite.

L'exemple le plus étudié de cette communication nécessaire entre le noyau et le plaste concerne l'appareil photosynthétique qui est à la fois composé de protéines plastidiales et de protéines nucléaires. Par exemple, les sous-unités cœur de la chaîne de transport d'électrons des thylacoïdes sont codées par le génome plastidial (gène *psbA* ou *psbB* par exemple) tandis que les sous-unités périphériques sont codées par le noyau (gènes *LHCA* ou *LHCB* par exemple). De même, la ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase (RubisCO) est formée de deux sous-unités, la grande codée dans le plaste par le gène *rbcL* tandis que la petite est codée dans le noyau par le gène *RBCS*.

##### B - II-2-4-1. Le contrôle rétrograde

La communication entre les deux compartiments est également régulée par un contrôle du plaste vers le noyau. Ce contrôle, appelé rétrograde, a été révélé par l'étude de nombreux mutants qui présentent des chloroplastes morphologiquement anormaux (pour revue voir Strand et al., 2007). Ces mutants présentent une diminution de l'expression des gènes nucléaires dirigés vers le plaste lorsque la morphologie plastidiale est altérée. Chez *Arabidopsis*, les mutants *cla1* (codant une protéine adressée au plaste à fonction inconnue) et *alb3* (codant une protéine adressée au plaste qui participerait à l'assemblage du complexe cytochrome oxydase) présentent ainsi une diminution de l'expression des gènes photosynthétiques nucléaires (Estevez et al., 2000 ; Mandel et

al., 1996). Cette même diminution est aussi observée chez des mutants déficients en caroténoïdes, pigments synthétisés dans le plaste (Wetzel et al., 1994). Toutes les mutations du plaste n'affectent cependant pas l'expression des gènes nucléaires suggérant qu'une anomalie de la morphologie plastidiale et le contrôle rétrograde ne sont pas toujours corrélés (Strand et al., 2007).

#### B - II-2-4-2. Nature du signal rétrograde

De nombreuses études ont cherché à déterminer la nature du signal plastidial rétrograde. Des mutants d'*Arabidopsis thaliana gun* (Genome Uncoupled Mutants) ont été identifiés en criblant des plantes transformantes exprimant la protéine GUS sous contrôle du promoteur LHCB1 en présence de norflurazon qui mime une déficience en caroténoïdes. Quatre protéines (GUN2 à GUN5) essentielles à la voie de synthèse des tétrapyrolles ont été identifiées dans des plantes présentant un phénotype vert pâle (Mochizuki et al., 2001 ; Larkin et al., 2003). Le gène *GUN4* a été cloné et code une protéine plastidiale se liant à la protoporphyrine IX (ProtoIX) et à la Mg-protoporphyrine IX (Mg-ProtoIX) et initiant ainsi le contrôle rétrograde (Strand et al., 2003). Cependant, des études récentes (Mochizuki et al., 2008) ont infirmé ce résultat si bien qu'à l'heure actuelle, la nature concrète de ce signal n'a pas encore été clairement identifiée. De nombreuses hypothèses sont émises, comme l'intervention d'une signature métabolique faisant participer les trois génomes de la cellule végétale à la création de ce signal (pour revue voir Pfannschmidt, 2010).

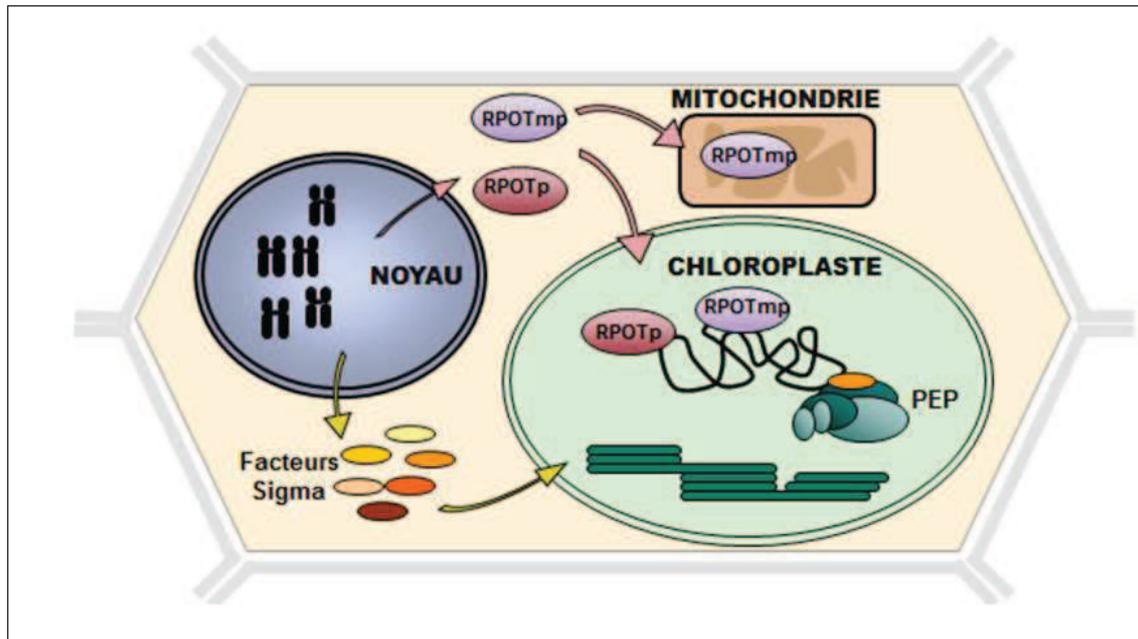
### ***B - II-3. Transcription du génome plastidial***

La transcription du génome plastidial nécessite, à l'image de nombreuses autres fonctions du plaste, la participation de protéines d'origine nucléaire. Deux systèmes se partagent la transcription du plastome : on distingue le système PEP (Plastid Encoded RNA Polymerase) représenté par une polymérase multimérique codée directement dans le plaste, du système NEP (Nuclear Encoded RNA Polymerase) représenté par deux polymérases de type phagique d'origine nucléaire appelées RPOTp et RPOTmp (**Figure 6**).

#### B - II-3-1. Système transcriptionnel PEP

##### B - II-3-1-1. Structure et organisation

La PEP est une polymérase d'origine bactérienne constituée, comme l'ARN



**Figure 6. - Les deux systèmes de transcription du génome plastidial.**

Les deux NEP plastidiales RpoTp et RpoTmp sont synthétisées dans le noyau, traduites dans le cytoplasme de la cellule végétale puis importées dans le plaste. Elles transcrivent alors la plupart des gènes de ménage dont les sous-unités RPOA, RPOB, RPOC1 et RPOC2 forment la seconde polymérase appelée PEP. La PEP s'associe ensuite à des facteurs de transcription sigma nucléaires afin d'initier principalement la transcription des gènes photosynthétiques.

polymérase d'*E. coli*, d'un core enzyme  $\alpha 2\beta\beta'$  auquel sont associés des facteurs sigma (SIG1 à SIG6) responsables de la reconnaissance du promoteur et de l'initiation de la transcription. Les sous-unités du core enzyme sont codées dans le génome plastidial par les gènes *rpo* (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* et *rpoC2*). Comme chez les cyanobactéries, la sous-unité catalytique  $\beta'$  des plantes est divisée en deux parties : un domaine N-terminal  $\beta'$  et un domaine C-terminal  $\beta''$ .

L'organisation des gènes *rpo* est conservée entre les plastes et les cyanobactéries. Le gène *rpoA* codant la sous-unité  $\alpha$  fait partie d'un opéron contenant plusieurs gènes ribosomiques (Purton et Gray, 1989). Chez certaines mousses, *rpoA* est absent du plaste mais a été transféré dans le génome nucléaire (Sugiura et al., 2003). *rpoB*, *rpoC1* et *rpoC2* codant respectivement les sous-unités  $\beta$ ,  $\beta'$  et  $\beta''$  sont situés dans la même unité transcriptionnelle (Hudson et al., 1988). Le haut degré de conservation entre la polymérase bactérienne et plastidiale a été confirmé par le remplacement fonctionnel chez *E.coli* des sous-unités  $\beta$  et  $\beta'$  par leurs équivalentes plastidiales (Severinov et al., 1996). De plus, l'activité de la PEP peut être inhibée par des antibiotiques bloquant la transcription bactérienne comme la tagétine (Mathews et Durbin, 1990 ; Demarsy et al., 2006).

Les promoteurs reconnus par la PEP sont analogues aux promoteurs bactériens d'*E.coli*. Ils contiennent les séquences consensus -10 (TATAAT) et -35 (TTGACA) indispensables à la reconnaissance par les facteurs SIG1 à SIG6 codés dans le noyau et importés dans le plaste (Sugiura et al., 1998 ; Hess et Börner, 1999 ; Hakimi et al., 2000 ; Liere et Maliga, 1999).

#### B - II-3-1-2. Les facteurs sigma

Les facteurs sigma des plantes sont des orthologues du facteur  $\sigma_{70}$  d'*E.coli*. Tandis que *Chlamydomonas* ne possède qu'un seul facteur sigma (Carter et al., 2004), l'existence d'une famille multigénique a été mise en évidence chez de nombreuses plantes supérieures dont *Arabidopsis thaliana* (pour revue voir Lysenko, 2007). Le séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* a permis de découvrir l'existence de 6 facteurs sigma participant à la transcription du génome plastidial (pour revue voir Schweer et al., 2010 ; Lerbs-Mache, 2011).

L'obtention de mutants nuls pour chacun des six facteurs sigma a permis de caractériser la spécificité et le rôle de chacun d'entre eux dans la régulation de l'activité de la PEP. Parmi les facteurs sigma, on distingue les facteurs 1, 2 et 6, essentiels, des facteurs 3, 4 et 5 dont le rôle est plus spécialisé.

### LES FACTEURS SIGMA ESSENTIELS

#### [Sigma 1]

L'identification du facteur SIG1 a été réalisée par des études de transcription *in vitro* et par gel retard. Les facteurs SIG1 d'*Arabidopsis* et de la moutarde reconnaissent *in vitro* les promoteurs des gènes *rbcL* et *psbA* (Hakimi et al., 2000 ; Homann et Link, 2003 ; Privat et al., 2003). La faible reconnaissance par SIG1 des promoteurs de ces gènes a également été montrée *in vivo* par l'analyse des mutants *sig1* du riz (Tozawa et al., 2007). En revanche, chez ces mêmes mutants, une forte diminution de l'accumulation des transcrits de l'opéron *psaA* et dans une moindre mesure des opérons *psbB* et *psbE* a été observée. Ces diminutions s'accompagnent d'une réduction de l'expression du photosystème I et d'une diminution de l'efficacité du transfert d'électron entre les deux photosystèmes. SIG1 aurait donc un rôle dans la régulation de l'expression et l'activité du photosystème I.

SIG1 est exprimé pendant la germination et le développement de la jeune plantule chez *Arabidopsis* (Demarsy et al., 2006) mais s'accumule plus fortement dans les stades plus tardifs du développement (Ishizaki et al., 2005). Chez les plantes plus

âgées, des études ont révélé une hausse de l'accumulation des transcrits *SIG1* lorsqu'elles sont éclairées en lumière bleue ou rouge (Onda et al., 2008). Ces changements interviennent après seulement 2 à 3 heures d'exposition à cette lumière.

Plus récemment, une régulation de l'activité ou de la spécificité de SIG1 par phosphorylation a été mise en évidence (Shimizu et al., 2010). Cette phosphorylation permettrait, en réponse à des changements lumineux, un ajustement de la stœchiométrie des photosystèmes en inhibant la transcription du gène *psaA*. Dans une étude menée par double hybride, ce facteur de transcription pourrait également interagir avec la protéine SIB1 liée à la réponse au jasmonate et au salicylate (Narusaka et al., 2008 ; Xie et al., 2010).

## [Sigma 2]

Les mutants nuls pour SIG2 présentent un phénotype albinos correspondant à une déficience dans la synthèse de chlorophylle pendant les phases précoces du développement de la plante (Kanamaru et al., 2001 ; Privat et al., 2003). Le facteur SIG2 reconnaît spécifiquement les promoteurs des gènes *psaJ*, *psbA*, un des promoteurs de *psbD* et les promoteurs de plusieurs ARNt dont le *trnV* (Kanamaru et al., 2001 ; Privat et al., 2003 ; Hanaoka et al., 2003 ; Tsunoyama et al., 2004 ; Nagashima et al., 2004). Avec SIG6, il reconnaît également les promoteurs des gènes *psbA* et *trnE*. Des études ont également montré que SIG2 régulerait la transcription des gènes *psbA* et *rbcL* (Homann et Link, 2003 ; Privat et al., 2003 ; Tsunoyama et al., 2004).

SIG 2 est exprimé très tôt au cours du développement de la plante, dès l'imbibition, et son activité semble osciller selon un cycle de 24 h (Kanamaru et al., 1999 ; Demarsy et al., 2006). La déficience en chlorophylle des plantes mutantes nulles pour SIG2 a été attribuée à l'absence de synthèse du *trnE*, précurseur de la synthèse de chlorophylle. D'autres études ont cependant montré que le phénotype de ces mutants pourrait être dû à la baisse de l'accumulation du transcrit *psaJ*. En effet, des mutants du gène *psaJ* chez le tabac sont également affectés dans la synthèse de chlorophylle (Hansson et al., 2007). Le gène *psaJ* étant indispensable au transfert des électrons et à la stabilisation du photosystème I, son absence chez les mutants SIG2 pourrait également expliquer le phénotype observé.

## [Sigma 6]

Les mutants nuls pour SIG6 (par insertion d'un ADN-T dans le gène correspondant) présentent une déficience en chlorophylle particulièrement visible dans les cotylédons (Ishizaki et al., 2005 ; Loschelder et al., 2006). Dans les stades de développe-

ment précoces, de nombreuses modifications transitoires sont détectées dans les plantes mutantes. On constate en effet la diminution de l'accumulation des transcrits *rbcL*, de ceux de nombreux gènes du photosystème II, de certains ARNt et de l'ARNr 16S, c'est-à-dire des transcrits plastidiaux majoritaires. Ces modifications sont transitoires et limitées aux premiers jours de développement de la plantule. Dans le cas de l'opéron *atpB-atpE*, ces variations ne sont pas détectables durant les trois premiers jours de développement, un ou plusieurs autres facteurs sigma remplacent alors certainement SIG6. Après 3 jours de développement ces modifications deviennent visibles et persistantes (Schweer et al., 2006).

Un troisième mutant d'*Arabidopsis* affecté dans SIG6, appelé *soldat8* (Single Oxygen-Linked Death Activator), a été identifié (Coll et al., 2009). Ce mutant présente une mutation dans le septième exon du gène SIG6 engendrant l'apparition d'un codon stop. Le phénotype décrit pour ce mutant est moins sévère que pour les deux autres. Très peu de changements ont en effet été révélés par qRT-PCR et par macroarray. Cependant, la quantité de la protéine D1 (codée par *psbA*) est fortement réduite. Cette diminution affecte l'activité du photosystème II et donc la réponse de la plante à un stress lumineux. L'ensemble de ces observations suggère que SIG6 est un facteur de transcription général dans les plastes des plantes supérieures.

## LES FACTEURS SIGMA NON GÉNÉRAUX

### [Sigma 3]

Les mutants *sig3* ne présentent aucun phénotype apparent et les conséquences de la mutation du gène correspondant sur la transcription plastidiale sont limitées (Zghidi et al., 2007).

L'étude de la fonction de SIG3 par transcription *in vitro* et retard sur gel indique que ce facteur reconnaît les promoteurs de *psbA*, de *rbcL* et des deux promoteurs de l'opéron ribosomique *rrn* chez l'épinard (Hakimi et al., 2000 ; Homann et Link, 2003 ; Privat et al., 2003). Cependant, *in vivo*, aucune baisse de l'accumulation de ces transcrits n'a été observée dans les mutants nuls SIG3 (Zghidi et al., 2007).

Les différences observées entre les expérimentations *in vitro* et *in vivo*, comme pour SIG1 et SIG2 reflètent certainement la capacité des facteurs à pouvoir reconnaître *in vitro* des promoteurs pour lesquels leur affinité est trop faible *in vivo*. Ces promoteurs sont donc reconnus *in vivo* par d'autres facteurs sigma qui possèdent une meilleure affinité. Depuis, il a été démontré que le facteur SIG3 assure *in vitro* la transcription d'un grand nombre de gènes. Il pourrait donc permettre, en cas d'absence du fac-

teur sigma spécifique du promoteur d'un gène, de le remplacer et d'assurer la production du transcrit à un faible niveau.

Contrairement aux autres facteurs sigma, l'expression de SIG3 est indépendante de la lumière (Homann et Link, 2003 ; Privat et al., 2003). De plus, de façon singulière, un clivage protéolytique de SIG3 semble être nécessaire à son activation (expériences *in vitro* ; Hakimi et al., 2000 ; Homman et Link, 2003).

*In vivo*, SIG3 assure spécifiquement la transcription du gène *psbN* et participe à la transcription d'*atpH* (Zghidi et al., 2007). La transcription d'*atpH* par le facteur SIG3 permet également la synthèse des transcrits *atpF* et *atpA* situés en aval sur la même unité transcriptionnelle. Le transcrit *atpH* est également synthétisé lors de sa cotranscription avec *atpI* et *rps2*, deux gènes situés en amont de *atpH* sur le génome plastidial et sous le contrôle d'un promoteur reconnu par la PEP (Stahl et al., 1993).

La transcription de *psbN* a fait l'objet de plusieurs études au sein de l'équipe (Zghidi et al., 2007 ; Zgidi-Abouzid et al., 2011). Le gène *psbN* est localisé dans l'opéron *psbB*, entre *psbT* et *psbH* mais sur le brin opposé. La transcription de *psbN* peut être prolongée au-delà de la fin normale du gène générant un transcrit plus long correspondant à un ARN antisens du gène *psbT*. En s'hybridant avec le transcrit sens de *psbT*, cet ARN antisens pourrait réguler la traduction de *psbT* (Zghidi-Abouzid et al., 2011).

#### [Sigma 4]

Le facteur de transcription SIG4 n'est pas présent chez toutes les espèces végétales dont le génome a été séquencé. Les plantes mutantes SIG4 ont un phénotype discret qui se traduit au niveau moléculaire uniquement par une forte diminution du transcrit *ndhF* (Favory et al., 2005). Ce gène code une sous-unité du complexe NDH qui est ainsi déstabilisé et inactivé.

#### [Sigma 5]

Le rôle du facteur SIG5 et son importance dans la physiologie du chloroplaste sont encore discutés. En effet, trois mutants d'insertion du facteur Sigma 5 ont été identifiés. L'un d'entre eux (SALK049021) ne présente aucun phénotype visible (Tsunoyama et al., 2004) alors qu'un autre (*sig5-1* dans Yao et al., 2003) a été caractérisé comme embryo-létal. Enfin le mutant *sig5-2* a été décrit comme embryo-létal par un groupe (Yao et al., 2003) et viable par un autre groupe (Nagashima et al., 2004).

L'étude des mutants viables montrent que SIG5 reconnaît spécifiquement le promoteur de *psbD* en réponse à la lumière bleue (Nagashima et al., 2004 ; Tsunoyama et

al., 2004). *In vitro*, SIG5 reconnaît également le promoteur de *psbA* (Tsunoyama et al., 2004 ; Kubota et al., 2007). L'expression du transcrite *SIG5* est induite par la lumière bleue et sous l'effet de différents stress comme une forte intensité lumineuse (Tsunoyama et al., 2002 ; Nagashima et al., 2004). En cas de stress lumineux, SIG5 pourrait donc participer à la réparation du centre réactionnel du photosystème II via la transcription de *psbD*.

## B - II-3-2. Système transcriptionnel NEP

### B - II-3-2-1. Mise en évidence du système NEP

L'existence d'une ou plusieurs polymérases codées dans le noyau (appelées NEP pour Nuclear Encoded RNA Polymerase) a été initiée par l'étude de plantes dont la machinerie traductionnelle plastidiale est déficiente et ne produit pas de PEP. Dans les plastides de ces plantes, généralement albinos, la synthèse des ARN plastidiaux se poursuit (expériences menées chez le riz, Bünger et Feierabend, 1980, et chez l'orge, Siemenroth et al., 1981). Le séquençage du génome plastidial (Shinozaki et al., 1986) a par la suite révélé qu'aucune autre polymérase que la PEP n'était codée dans le plastome. La purification d'un polypeptide de 110 kDa (Lerbs-Mache, 1993) préparé à partir de chloroplastes d'épinards et montrant une activité transcriptionnelle différente de la PEP a confirmé l'existence d'une autre polymérase monomérique plastidiale. Ce polypeptide pouvait en effet initier la transcription d'un gène à partir d'un promoteur de type T7 mais pas à partir du promoteur PEP de *rbcL* (Lerbs-Mache, 1993). Cette polymérase était donc de type phagique. L'implication des polymérases de type phagique dans la transcription eucaryote n'est pas nouvelle puisque la polymérase RPOTm assure la transcription du génome mitochondrial de tous les eucaryotes.

Des analyses de séquences du génome nucléaire de certaines dicotylédones comme *Arabidopsis* ont révélé la présence de trois gènes *RPOT* (Hedtke et al., 1997). La séquence N-terminale de ces trois polymérases a été fusionnée à la GFP et leur adressage au plaste (*RPOTp*), à la mitochondrie (*RPOTm*), ou bien aux deux organites (*RPOTmp*) a été observé (Hedtke et al., 1999). Selon une hypothèse encore discutée, le double adressage de *RPOTmp* proviendrait d'une initiation alternative de la traduction (Kobayashi et al., 2001). La protéine la plus longue est adressée aux deux organites tandis que la plus courte serait adressée spécifiquement à la mitochondrie. Chez les plantes monocotylédones, il existe seulement deux gènes *RPOT*, codant respectivement la polymérase adressée à la mitochondrie (*RPOTm*) et au plaste (*RPOTp*) (Chang et al., 1999).

### B - II-3-2-2. Promoteurs reconnus par les NEP

La majorité des gènes plastidiaux sont précédés par des régions promotrices multiples contenant des promoteurs de type NEP et/ou PEP. La caractérisation des promoteurs NEP a donc nécessité la réduction ou l'élimination de l'activité transcriptionnelle de la PEP à l'aide des mutants transplastomiques  $\Delta rpo$  chez le tabac (Allison et al., 1996 ; Hajdukiewicz et al., 1997 ; Serino et Maliga, 1998), par l'action de la spectinomycine, antibiotique bloquant la synthèse des protéines plastidiales et donc celle de la PEP (Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007), ou par l'utilisation de mutants nuls pour l'une des NEP (Baba et al., 2004 ; Courtois et al., 2007). Ces études ont montré que les gènes *accD*, *ycf2*, *rpl23*, *clpP* et l'opéron *rpoB* sont transcrits uniquement à partir d'un promoteur NEP. Il est intéressant de noter que l'abondance des transcrits de la PEP est sous contrôle du système NEP. D'autres gènes de ménage, par exemple ceux codant des protéines ribosomiques, sont également transcrits par le système NEP, au moins dans les phases précoces du développement.

La comparaison bioinformatique des séquences promotrices des gènes transcrits par les NEP a révélé la présence d'une séquence consensus d'une dizaine de nucléotides (Allison et al., 1996 ; Hajdukiewicz et al., 1997 ; Hübschmann et Börner, 1998). Le site d'initiation de la transcription proprement dit comporte un motif conservé YRTA similaire à celui des promoteurs mitochondriaux. Ce motif a été identifié en analysant la séquence promotrice de l'unité transcriptionnelle *rpoB-rpoC1-rpoC2*. Des expériences de transcription *in vitro* à partir des mutants  $\Delta rpoB$  ont permis de définir la séquence YRTA comme le core promoteur de la polymérase NEP (Liere et Maliga, 1999). D'autres promoteurs, comme celui du gène *atpB*, possèdent un motif conservé additionnel GAA situé 18 à 20 nucléotides en amont du site YRTA (Kapoor et al., 1997 ; Kapoor et Sugiura, 1999 ; Xie et Allison, 2002). Cette catégorie de promoteurs représente les promoteurs de type I à l'intérieur desquels on distingue les promoteurs de type Ia qui ont seulement le motif YRTA des promoteurs de type Ib qui contiennent le motif GAA en amont du motif YRTA. La plupart des promoteurs NEP de type I sont inactifs pendant les stades de développement tardifs de la plante dans les chloroplastes matures où la PEP assure alors la transcription de la plupart des gènes (Shiina et al., 2005).

Cependant, certains promoteurs NEP, comme celui du gène *clpP* situé à - 53 ou le promoteur Pc du gène *rrn* (Courtois et al., 2007) ne répondent pas au consensus des promoteurs de type I. Ces promoteurs représentent les promoteurs NEP de type II.

Contrairement aux facteurs sigma qui régulent l'activité de la PEP, aucun facteur

de transcription associés aux NEP chez les végétaux ni aucun homologue n'ont été identifiés. Toutefois chez les plantes, le facteur CDF2, caractérisé uniquement de manière biochimique, participe à l'activité de la NEP RPO<sub>Tmp</sub> pour la transcription de l'opéron *rrn* à partir du promoteur PC chez l'épinard (Baeza et al., 1991 ; Iratni et al., 1994 ; Iratni et al., 1997).

Il existe donc deux types de promoteurs NEP, et deux NEP plastidiales. Comment ces deux polymérases se partagent-elles donc la transcription des gènes de type NEP ? La question a été résolue par l'étude de mutants du système NEP.

### B - II-3-2-3. Etudes des mutants du système NEP

#### [RpoTp]

Le mutant *ΔrpoTp* est affecté dans la transcription de nombreux gènes plastidiaux dont les sous-unités de la PEP. Le mutant possède un phénotype anormal sévère (Hricova et al., 2006) qui touche de nombreux organes de la plante (comme les feuilles et les racines par exemple). Ce phénotype est observé tout au long du développement de la plante, il n'existe donc pas de redondance fonctionnelle complète entre les deux NEP : la NEP RPO<sub>Tmp</sub> ne compense pas l'activité de RPO<sub>Tp</sub>.

L'analyse transcriptomique globale par hybridation sur macroarray des transcrits plastidiaux extraits de plantules de deux jours ne montre aucune différence spécifique entre les plantes sauvages et les plantes mutantes *ΔrpoTp*. On remarque toutefois que le génome plastidial est peu transcrit par rapport au génome nucléaire et donc que la proportion des ARN plastidiaux parmi les ARN totaux est fortement diminuée. En effet, 5 à 10 fois moins de radioactivité est détectée sur la membrane du macroarray (résultats de Florence Courtois, non publiés). Ces résultats coïncident avec les analyses du génome nucléaire par microarray de Hricova et al. (2006) montrant une baisse de 85 % des gènes nucléaires adressés au plaste chez le mutant *sca3-2* nul pour RPO<sub>Tp</sub>.

Ces résultats indiquent que RPO<sub>Tp</sub> est la polymérase principale du chloroplaste qui transcrit la majorité des promoteurs NEP de type Ia ou Ib (Courtois et al., 2007 ; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007).

#### [RpoTmp]

Le mutant d'insertion nul *ΔrpoTmp* d'*Arabidopsis* présente un phénotype précoce qui disparaît lors des stades plus tardifs du développement (Baba et al., 2004). La croissance de la plantule est altérée, plus particulièrement au niveau des tissus non photosynthétiques comme les racines. De plus, on observe chez les mutants une hausse de

l'activité de RPOTp qui compense le rôle de la NEP déficiente pendant la croissance de la plante. L'activité et le rôle essentiel de RPOTmp se situeraient donc dans les phases précoces du développement (Emanuel et al., 2006).

Notre équipe a précisé ce rôle lors des premières phases de développement en montrant que RPOTmp permet la transcription spécifique de l'opéron ribosomique *rrn* à partir du promoteur PC (Courtois et al., 2007).

### B - II-3-3. Partage de la transcription du génome plastidial par les systèmes NEP et PEP

Le génome plastidial est transcrit par deux systèmes enzymatiques différents. Tandis que la NEP transcrit la plupart des gènes de ménage, la PEP transcrit les gènes photosynthétiques. Afin de comprendre comment ces deux systèmes se partagent la transcription du plastome au cours du développement, plusieurs études ont caractérisé les cinétiques d'activité des deux systèmes enzymatiques dans la jeune plantule.

Ces observations et les caractéristiques des deux systèmes transcriptionnels avaient conduit Mullet en 1993 à émettre un modèle de fonctionnement séquentiel des polymérases (**Figure 7**). Ainsi, dans les premières phases de développement, le système NEP est actif et transcrit la plupart des gènes de ménage dont les sous-unités de la PEP. Dans les stades plus tardifs du développement, lors de l'apparition des tissus verts, la PEP devient active et transcrit alors les gènes liés à la fonction photosynthétique. Ce modèle ne rend cependant pas compte de toutes les observations. En effet, des études ont montré que dans des plantes dépourvues de PEP, tous les transcrits plastidiaux sont présents (Krause et al., 2000 ; Legen et al., 2002). Ces études révèlent donc que les NEP sont capables de transcrire tout le génome plastidial, peut-être par diminution de la spécificité des promoteurs PEP ou bien par la synthèse de très longs transcrits qui subissent ensuite une maturation. De plus, le modèle de Mullet a depuis été contredit par les résultats obtenus dans notre équipe par Emilie Demarsy (Demarsy et al., 2006) démontrant que la PEP est présente et active pendant les phases précoces de la germination (**Figure 7**). En effet, l'inhibition spécifique de la PEP par la tagétine entraîne un retard de germination des graines traitées.

La compréhension des mécanismes du partage de l'activité transcriptionnelle entre les différents systèmes enzymatiques reste un point crucial. Il a été ainsi suggéré que le facteur de transcription SIG2 est un acteur de la transition entre l'activité NEP et l'activité PEP au cours du développement. En effet, *in vitro* le transcrit *trnE*, dépendant du complexe enzymatique PEP-SIG2, peut se lier directement à la NEP RPOTP

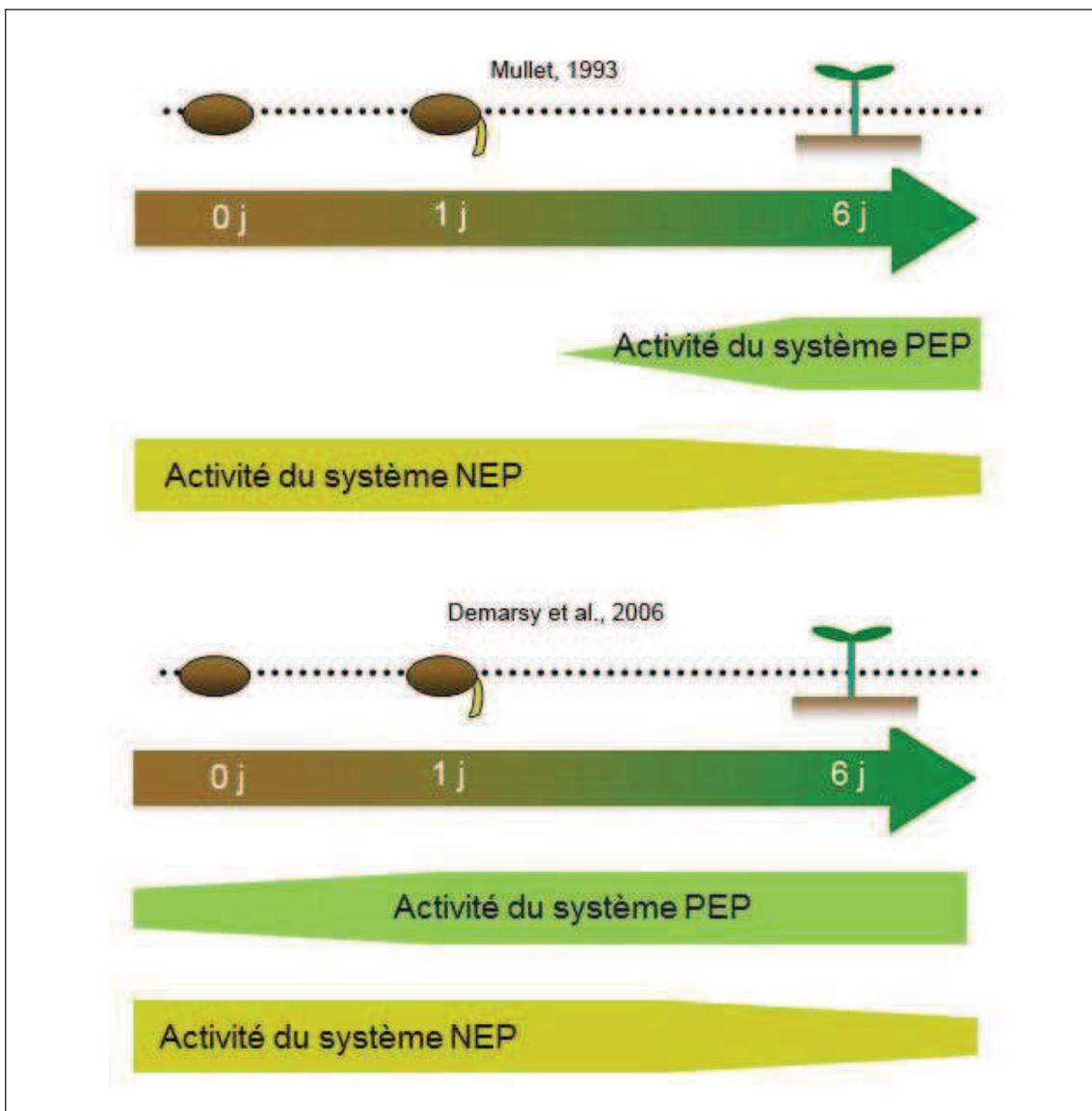


Figure 7. - Comparaison de la représentation du modèle de mise en place des ARN polymérase plastidiales pendant le développement de la jeune plantule. La surface est représentative de l'expression mais n'est pas quantitative. D'après Mullet, 1993, et Demarsy et al., 2006.

et inhiber son activité. L'activité de la NEP pourrait donc être stoppée ou diminuée dès la synthèse de cet ARNt dans les premiers stades de développement (Hanaoka et al., 2005).

Cependant, la spécificité du *trnE* vis-à-vis de la NEP RPOTp a été remise en cause car d'autres ARNt peuvent aussi se lier à la NEP et contrôler son activité (Bohne et al., 2009). Ces résultats soulignent la complexité de la régulation du génome plastidial.

# ***Présentation du projet***

---

---

Le projet de ma thèse repose sur des expériences menées dans l'équipe montrant que les polymérases PEP et NEPs sont présentes et actives au cours de l'imbibition, c'est-à-dire dans les phases extrêmement précoces de la germination. Les protéines de la plupart des composants de l'appareil transcriptionnel plastidial (RPOTp, RPOTmp, PEP, facteur de transcription SIG3) sont présentes dans les graines sèches (Demarsy et al., 2006). L'inhibition de la PEP par la tagétine entraîne un retard de germination, suggérant que l'activité PEP est requise pour cette étape (Demarsy et al., 2006). De même, le développement du double mutant des polymérases plastidiales RPOTp et RPOTmp s'arrête après la germination (Hricova et al., 2006), soulignant le rôle précoce des NEPs, dans leur ensemble, pour la germination. Les mutants d'*Arabidopsis* affectés dans l'activité de l'une ou l'autre des NEP RPOTp ou RPOTmp présentent un fort retard de germination et de développement (Courtois et al., 2007, et Courtois, résultats non publiés). Ces résultats montrent que l'activité spécifique de chaque NEP est également requise dans les étapes précoces du développement. Ces observations ont remis en cause le modèle séquentiel de la mise en place des polymérases plastidiales selon lequel l'activité des NEP précède celle de la PEP (Mullet, 1993). Nous avons donc souhaité expliquer la présence des appareils transcriptionnels plastidiaux dans la graine sèche.

L'importance du plaste dans les différentes étapes de la formation de la graine a déjà été mise en évidence. (1) De nombreux mutants affectés dans l'expression de protéines plastidiales, d'origine nucléaire ou plastidiale et concernant les activités métaboliques comme d'expression génique, sont embryo-létaux (Hsu et al., 2010 ; Bryant et al., 2010). Ceci montre une importance primordiale des plastes lors de la formation des graines. (2) Au cours de la formation de la graine, le plaste est transitoirement différencié en chloroplaste fonctionnel. Cette période de photosynthèse embryonnaire est importante pour l'accumulation des réserves lipidiques (Ruuska et al., 2002). (3) La recherche à grande échelle de mutants d'insertion nucléaires générant l'arrêt de la croissance de plantules a montré que la majorité d'entre eux sont affectés dans la fonction plastidiale (Budziszewski et al., 2001). Ces observations soulignent l'importance des plastes pour la vigueur germinative.

Par ailleurs, il est connu que pendant la dessiccation de la graine, les chloroplastes se différencient en éoplastes non photosynthétiques et que le nombre de plastes par cellule diminue (Mansfield et Briarty, 1991). Ces observations conduisent à s'interroger sur la manière dont les ARN polymérases arrivent dans la graine sèche. Est-ce qu'il s'agit seulement de reliquats qui persistent après la période de la dessiccation ? Pour répondre à cette question et pour mieux comprendre les étapes de la différencia-

tion et dé-différenciation des plastes, nous avons analysé l'expression du génome plastidial et de l'appareil transcriptionnel au cours de la formation de la graine.

Le premier volet de mon travail (Chapitre I) concerne l'expression du génome plastidial au cours de la formation de la graine. Nous avons analysé les transcrits et les protéines de l'appareil transcriptionnel plastidial. Ensuite, l'activité des systèmes transcriptionnels a été détectée en examinant l'expression de gènes « marqueurs » de l'activité de chacune des polymérases. Cette étude a été complétée en établissant le profil transcriptomique global dans les graines en formation à l'aide d'un macroarray spécifique des plastes. Des analyses transcriptomiques au cours de l'embryogénèse et du développement de la graine ont été menées ces dernières années, toutes dirigées sur des produits plastidiaux de gènes nucléaires (Ruuska et al., 2002 ; Spencer et al., 2007 ; Day et al., 2008 ; Le et al., 2010 ; Hsieh et al., 2011). A ce jour, aucune analyse globale de l'expression des gènes plastidiaux n'a été entreprise. Nos analyses complètent donc ces analyses globales.

Le deuxième volet de mon travail (Chapitre II) a été plutôt d'ordre technique. L'approche globale par macroarray nécessite la récolte d'une grande quantité de matériel biologique, difficile à obtenir à partir de graines en formation. Le seuil de détection permis par cette technique est souvent insuffisant pour l'analyse des transcrits faiblement exprimés. Pour faciliter ce travail, nous avons tenté de développer une méthode de détection des ADNc hybridés sur microarray basée sur des techniques d'imagerie TIRF. Cette technique permet de révéler des molécules uniques et ainsi d'abaisser considérablement la quantité de matériel biologique nécessaire aux analyses.

Le troisième volet de mon travail (Chapitre III) concerne la caractérisation de la photosynthèse pendant la période de maturation de la graine. Comme déjà mentionné, au cours de la formation de la graine, l'embryon transite par une période photosynthétique qui se déroule à l'intérieur de la silique. Les fonctions potentielles de cette activité photosynthétique sont d'augmenter la teneur en oxygène dans les graines et l'énergie pour la synthèse des réserves. Cependant, les conditions spécifiques (hypoxie et filtration de la lumière par la silique) dans lesquelles se déroule cette photosynthèse conduisent à s'interroger sur son fonctionnement et sur les éventuelles adaptations à ces conditions particulières. Pour cette raison, nous avons caractérisé la photosynthèse embryonnaire et évalué son rôle potentiel dans la vigueur germinative de la graine d'*Arabidopsis thaliana*.



# **Chapitre I**

## **Expression du génome plastidial d'*Arabidopsis thaliana* pendant la formation des graines**

---

---

La formation des graines chez les plantes supérieures débute par une double fécondation. La graine franchit ensuite trois étapes de développement définies en fonction du jour après fécondation (DAF) : l'embryogenèse, la maturation et la dessiccation puis atteint le stade graine sèche (Debeaujon et al., 2007 ; Le et al., 2010). Chez *Arabidopsis*, le développement de la graine dure de 18 à 21 jours selon les conditions de culture.

Pendant l'embryogenèse, les plastes restent indifférenciés jusqu'à la fin du stade globulaire. Au stade torpille, les structures membranaires typiques des plastes sont présentes et le verdissement de l'embryon débute (Mansfield et al., 1991). A la fin de la maturation, les chloroplastes se différencient en plastes non photosynthétiques appelés éoplastes. La dessiccation de la graine s'accompagne également d'une réduction du nombre de plastes probablement due à leur destruction (Mansfield et al., 1991), ce qui laisse supposer que la fonction des plastes n'est pas indispensable dans les graines sèches et pendant la germination. Cependant, ces observations contredisent plusieurs résultats soulignant l'importance de l'expression du génome plastidial dans l'efficacité de la germination des graines. Par exemple, des plantules mutantes dont le développement est arrêté précocement sont pour la plupart affectées dans la fonction plastidiale (Budziszewski et al., 2001). De plus, le traitement des graines par la tagétine, un inhibiteur d'un des systèmes transcriptionnel plastidiaux, retarde la sortie de la radicule confirmant l'importance de l'expression du génome plastidial au cours de la germination des graines (Demarsy et al., 2006). Le paradoxe entre ces résultats et la destruction des plastes pendant la période de dessiccation soulève la question de l'importance réelle des plastes et de la transcription plastidiale au cours de la formation de la graine.

L'étude du génome nucléaire au cours du développement des graines d'*Arabidopsis* et de l'orge montre une régulation temporelle de l'expression des gènes photosynthétiques pendant les trois stades de développement (Ruuska et al., 2002 ; Hennig et al., 2004 ; Sreenivasulu et al., 2004 ; Spencer et al., 2007). Cependant, ces analyses se focalisent uniquement sur les gènes codés par le génome nucléaire dont les protéines sont ensuite importées dans le chloroplaste. Aucune étude n'a pour le moment caractérisé l'expression des gènes plastidiaux au cours de la formation de la graine.

Afin de mieux comprendre l'implication des plastes et en particulier le rôle de l'expression de leur génome pendant la phase photosynthétique et dans l'efficacité de la germination des graines, nous avons analysé les variations du niveau d'expression des transcrits et des protéines plastidiales ainsi que les changements d'expression des trans-

crits et des protéines composant la machinerie transcriptionnelle plastidiale pendant les trois périodes de formation de la graine.

## I. Etablissement du système expérimental

### I-1. Définition des stades de développement de la graine

Chez *Arabidopsis thaliana*, le développement de la graine débute juste après la fécondation qui a lieu au moment de l'ouverture du bourgeon floral. Les graines se développent ensuite à l'intérieur d'une silique (40 à 50 graines par silique) pendant 18 jours.

La durée de la formation de la graine dépend fortement des conditions de culture. Des variations de température ou d'intensité lumineuse peuvent modifier considérablement la durée de développement de la graine. Par exemple, nous avons observé que la diminution de l'intensité lumineuse de 80 à 50  $\mu\text{E}$  allonge le temps de développement de la graine d'environ une semaine.

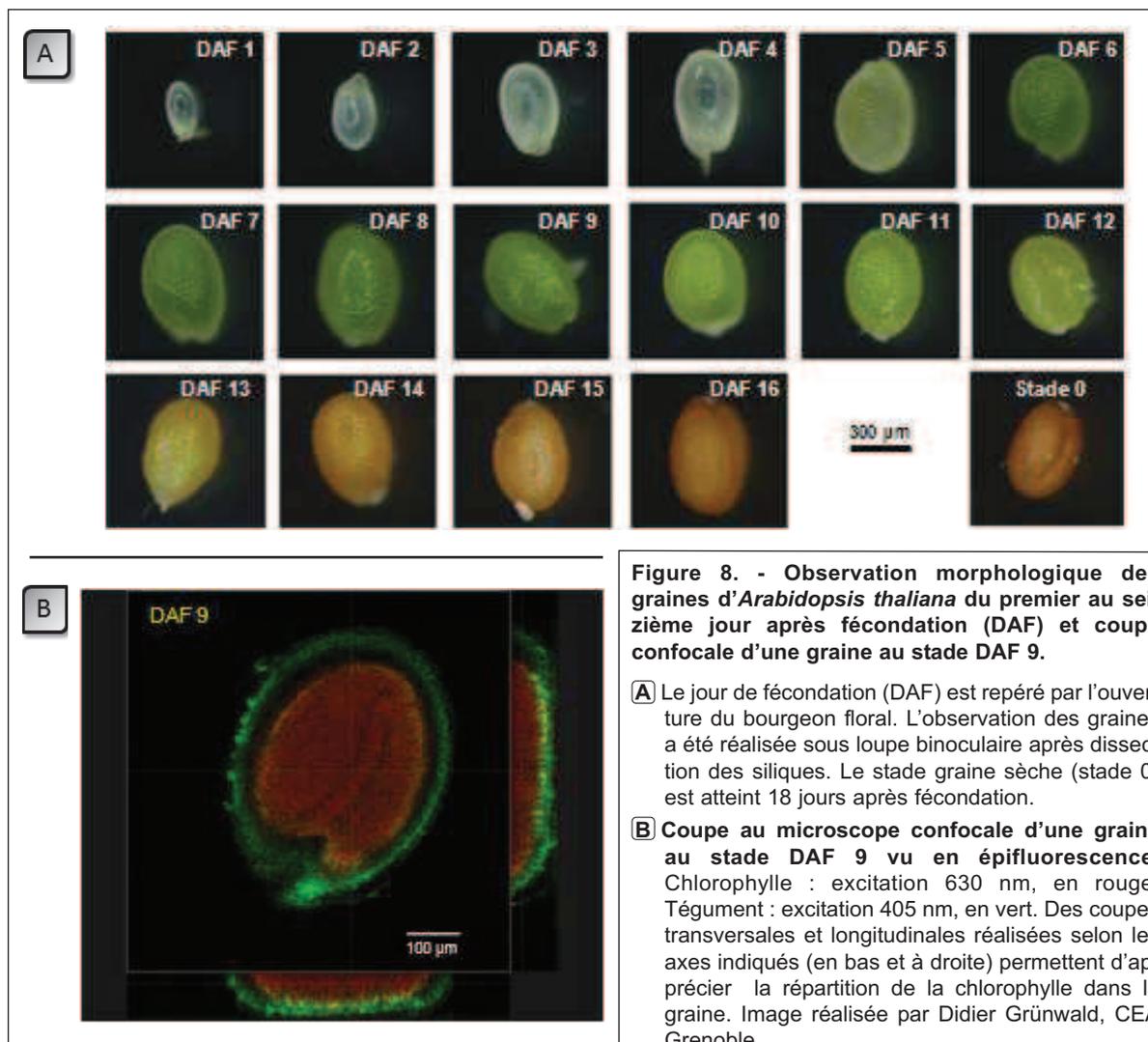
Dans les conditions de culture utilisées (voir Matériel et Méthodes), la morphologie externe de la graine, observée en loupe binoculaire, permet de définir les trois périodes de développement (**Figure 8A**). Ces trois phases ont été caractérisées selon deux nomenclatures dans la littérature : stade d'embryogenèse, d'accumulation des réserves et de maturation (Côme et Corbineau, 2006) ou bien stade d'embryogenèse, de maturation et de dessiccation (Debeaujon et al., 2007). Nous avons choisi d'utiliser la seconde nomenclature pour cette étude.

#### I-1-1. Stade d'embryogenèse (DAF 1/4)

Au cours de l'embryogenèse, le tégument est translucide (**Figure 8A**) et l'embryon passe par les états globulaire, cœur puis torpille (voir Introduction). Bien qu'à ce stade la majeure partie du volume de la graine soit occupée par l'albumen, la taille de la graine augmente fortement pour atteindre 400  $\mu\text{m}$ . Au premier jour après fécondation, la taille de la silique et des graines limitent considérablement la récolte. Nous avons donc écarté le stade DAF 1 de l'étude. Les graines récoltées du stade DAF 2 à DAF 4 (DAF 2/4) ont été regroupées et définies comme « stade d'embryogenèse ».

#### I-1-2. Stade de maturation (DAF 5/12)

Entre DAF 5 et DAF 12, la graine a atteint sa taille maximale et l'embryon est alors complètement formé. La graine est verte, le tégument est encore transparent et l'embryon est photosynthétique (**Figure 8A**). L'existence d'une phase transitoire pho-



**Figure 8. - Observation morphologique des graines d'*Arabidopsis thaliana* du premier au seizième jour après fécondation (DAF) et coupe confocale d'une graine au stade DAF 9.**

- A** Le jour de fécondation (DAF) est repéré par l'ouverture du bourgeon floral. L'observation des graines a été réalisée sous loupe binoculaire après dissection des siliques. Le stade graine sèche (stade 0) est atteint 18 jours après fécondation.
- B** Coupe au microscope confocale d'une graine au stade DAF 9 vu en épifluorescence. Chlorophylle : excitation 630 nm, en rouge. Tégument : excitation 405 nm, en vert. Des coupes transversales et longitudinales réalisées selon les axes indiqués (en bas et à droite) permettent d'apprécier la répartition de la chlorophylle dans la graine. Image réalisée par Didier Grünwald, CEA Grenoble.

tosynthétique est caractéristique de la plupart des légumineuses et des graines à réserves oléagineuses. Pendant cette période, la graine accumule la plupart des réserves (lipides, protéines, sucres) qui sont stockées par la suite dans la graine sèche en vue de la germination (voir Introduction).

Une graine au stade DAF 9 a été observée par microscopie confocale (**Figure 8B**) dans deux canaux par émission due à la fluorescence de la chlorophylle (excitation à 630 nm) et par émission après excitation aux UV (405 nm). L'image est reconstituée par superposition des différentes coupes focales réalisées et permet de vérifier que seul l'embryon est photosynthétique. En effet, aucune fluorescence due à la chlorophylle n'est détectée dans les cellules du tégument, seule la fluorescence due aux composés du tégument (polyphénols) est détectée. Cette observation est confirmée par deux coupes longitudinales et transversales de la graine qui montrent l'absence de fluorescence associée à la chlorophylle dans le tégument.

Les graines à DAF 5, stade de transition entre la période d'embryogenèse et la période de maturation, et les graines à DAF 12, stade de transition entre la période photosynthétique et la période de dessiccation ont été volontairement écartées de notre étude. Les graines récoltées du stade DAF 6 à DAF 11 (DAF 6/11) ont été regroupées et définies comme « stade de maturation ».

### I-1-3. Stade de dessiccation (DAF 13/17)

Au treizième jour après fécondation, la déhiscence de la silique débute, le tégument s'opacifie et la graine devient brune (**Figure 8A**). La dessiccation de la graine débute alors et se poursuit durant quelques jours (dans nos conditions de culture jusqu'à DAF 18 ou DAF 19) jusqu'à ce que la silique libère les graines. Il est probable que la dessiccation continue une fois la graine libérée, lors du stockage par exemple. Les graines récoltées du stade DAF 13 à DAF 15 (DAF 13/15) ont été regroupées et définies comme « stade de dessiccation ».

### I-1-4. Stade graine sèche (stade 0)

Dans cette étude, le stade 0, ou stade graine sèche, correspond à la graine récoltée à DAF 18, c'est-à-dire après libération de la graine de la silique, puis stockée pendant 15 jours à 16 °C afin de s'assurer que la dessiccation de la graine soit complète.

## ***I-2. Caractérisation biochimique et moléculaire des stades***

Les trois stades de développement de la graine étudiés ont été caractérisés d'un point de vue biochimique par leur teneur en chlorophylle (**Figure 9A**). Par de simples observations à la loupe binoculaire, il est en effet difficile de déterminer avec précision la durée de la phase photosynthétique. L'opacification du tégument de la graine au cours du temps ne permet pas d'observer clairement l'embryon.

La quantité de chlorophylle est multipliée par 3 entre le stade d'embryogenèse (DAF 2/4) et le stade photosynthétique (DAF 6/11) puis diminue pendant la dessiccation de la graine (DAF 13/15) pour revenir au niveau initial. L'augmentation de la synthèse de chlorophylle pendant le stade DAF 6/11 est concordante avec la hausse de l'accumulation du transcrit *HEMA1* à cette période (voir ci-dessous).

La quantité absolue de chlorophylles mesurée pendant le stade photosynthétique DAF 6/11 est environ trois fois inférieure à celle mesurée dans des feuilles. Ces variations seront étudiées et commentées plus en détails au cours du troisième chapitre.

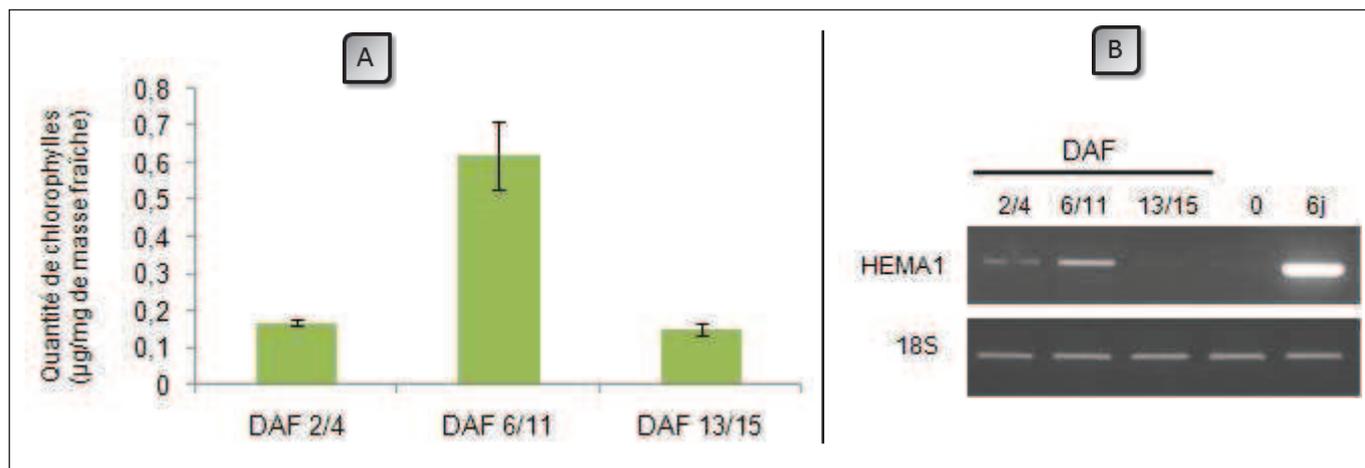


Figure 9. - Caractérisation des stades d'étude du développement de la graine d'*Arabidopsis thaliana*.

- A) Dosage des chlorophylles (a et b)** aux stades d'embryogenèse (DAF 2/4), de maturation (DAF 6/11) et de dessiccation (DAF 13/15) par dosage au spectrophotomètre après extraction des pigments dans l'acétone 80 % (p/v).
- B) Accumulation du transcrit *HEMA1* par RT-PCR semi-quantitative.** Les ARN ont été extraits à partir des graines récoltées aux stades DAF 2/4, DAF 6/11, DAF 13/15, 0 et à partir de feuilles de rosette de 6 jours (6j). Le nombre de cycles d'amplification a été ajusté pour rester dans la phase exponentielle. La quantité d'ADNc (estimée à 15 ng par réaction PCR) est contrôlée par l'amplification du gène 18S d'expression constitutive. La réaction PCR se déroule dans 25 µL de volume réactionnel. 10 µL de chaque réaction de PCR sont déposés sur gel d'agarose 2% (p/v) puis visualisés par coloration au BET après séparation électrophorétique.

De façon à confirmer ces observations, nous avons complété cette caractérisation biochimique par la mesure de l'accumulation par RT-PCR semi-quantitative du transcrit du gène *HEMA1* (Figure 9B). L'expression de ce gène, codant la glutamyl tRNA transférase, marque la biosynthèse de la chlorophylle. Le transcrit *HEMA1* est détecté dans les quatre stades de développement étudiés mais son niveau d'accumulation est maximal pendant le stade de maturation. La hausse transitoire de l'accumulation d'*HEMA1* coïncide comme attendu avec la phase photosynthétique. Le niveau d'accumulation plus élevé du transcrit *HEMA1* pendant le stade DAF 2/4 par rapport au stade DAF 13/15 résulte probablement d'une différenciation photosynthétique qui débute, au niveau moléculaire, pendant l'embryogenèse. Ces résultats confirment les observations montrant que la photosynthèse débute au stade cœur (voir Introduction). L'accumulation du transcrit est cependant plus faible au stade de maturation que dans un stade photosynthétique typique (feuilles de six jours). Cette différence résulte probablement du nombre de chloroplastes par cellule entre les deux phases. En effet, une cellule de graine comporte au maximum une vingtaine de chloroplastes au cours de son développement (Mansfield et al., 1991) alors que l'on peut en dénombrer 50 dans une cellule de feuille.

Néanmoins, les analyses biochimiques et moléculaires confirment les observations morphologiques (voir I-1-2) et donc la pertinence des délimitations des stades de développement de la graine étudiés.

## II. Expression des composants de l'appareil transcriptionnel plastidial pendant la formation de la graine

### II-1. Accumulation des transcrits

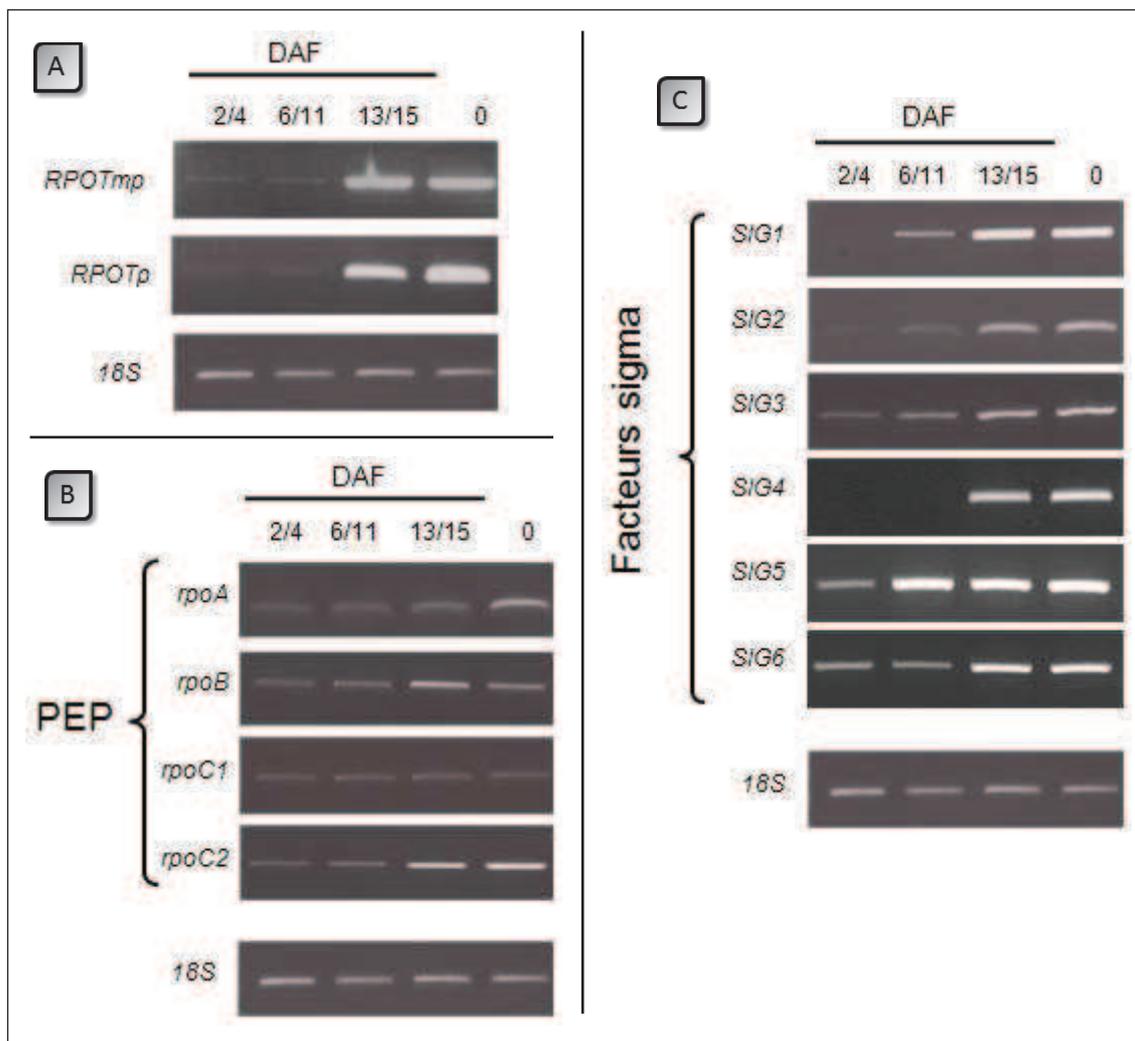
L'accumulation des transcrits codant le système transcriptionnel plastidial PEP, les facteurs de transcription associés (facteurs sigma) et les polymérases NEP, a été analysée par RT-PCR semi quantitative (**Figure 10**) à partir des ARNm extraits des graines (voir section Matériel et Méthodes) du stade d'embryogenèse (DAF 2/4), du stade photosynthétique (DAF 6/11), du stade de dessiccation (DAF 13/15) et des graines sèches (stade 0).

#### II-1-1. Transcrits NEP

Nos résultats montrent que les transcrits de RPOTp et RPOTmp sont détectés dans tous les stades du développement de la graine étudiés (**Figure 10A**). Ils sont très faiblement présents pendant l'embryogenèse (DAF 2/4) et la période de maturation (DAF 6/11) mais s'accumulent très fortement pendant la phase de dessiccation des graines (DAF 13/15) et restent très abondants dans la graine sèche (Stade 0). Ceci indique que les transcrits sont synthétisés pendant le stade de dessiccation puis stockés dans la graine sèche. Aucune différence dans les profils d'accumulation des transcrits des deux NEP n'est observée. La présence accrue de ces ARN dans la graine sèche pourrait permettre leur traduction immédiate pendant la stratification puis la transcription des gènes de ménage pendant la germination. Ces résultats traduisent également une activité métabolique liée aux plastes durant la dessiccation.

#### II-1-2. Transcrits PEP et facteurs sigma

Les transcrits des sous-unités de la PEP (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2*) sont détectés dès la phase d'embryogenèse de la graine (DAF 2/4) (**Figure 10B**). Aucune augmentation de l'accumulation de ces transcrits n'est observée ensuite durant la phase photosynthétique (DAF 6/11). Lors du stade de dessiccation (DAF 13/15), on observe une légère hausse de l'accumulation des transcrits des sous-unités *rpoA*, *rpoB* et *rpoC2*. La différence d'accumulation du transcrit *rpoC1*, par rapport aux transcrits *rpoB* et *rpoC2* situés à l'intérieur de la même unité transcriptionnelle, suggère une stabilité différente des transcrits de l'opéron comme observé par Cahoon (Cahoon et al., 2004). Tous les ARNm codant le core enzyme PEP sont ensuite stockés dans la graine sèche (Stade 0). Nos résultats confirment, avec des couples d'amorces et une technique d'ex-



**Figure 10. - Expression des ARNm codant les constituants des appareils transcriptionnels NEP (A) et PEP (B et C) pendant la formation de la graine.**

Accumulation des transcrits par RT-PCR semi-quantitative. Les ARN ont été extraits à partir des graines récoltées aux stades d'embryogenèse (DAF 2/4), de maturation (DAF 6/11), de dessiccation (DAF 13/15) et du stade 0 (graine sèche). Le nombre de cycles d'amplification a été ajusté pour rester dans la phase exponentielle. La quantité d'ADNc (estimée à 15 ng par réaction PCR) est contrôlée par l'amplification du gène 18S d'expression constitutive. La réaction PCR se déroule dans 25 µL de volume réactionnel. 10 µL de chaque réaction de PCR sont déposés sur gel d'agarose 2% (p/v) puis visualisés par coloration au BET après séparation électrophorétique.

traction d'ARN différents, les résultats de Demarsy et al. (2006) montrant que les sous-unités de la polymérase PEP sont détectées dans la graine sèche.

Les transcrits des facteurs de transcription sigma ne sont pas (facteurs sigma 1 et 4) ou peu (facteurs sigma 2, 3, 5 et 6) détectables pendant la phase d'embryogenèse puis commencent à s'accumuler pendant le stade de maturation (Figure 10C). A ce stade, seul le facteur sigma 4 reste peu détectable. L'accumulation des transcrits de tous les facteurs sigma augmente pendant la dessiccation de la graine. Le profil d'accumulation des messagers semble néanmoins découplé de la fonction principale de la PEP, puisque ceux-ci s'accumulent principalement après la phase photosynthétique

(DAF 6/11). Tous les transcrits des facteurs de transcription sigma sont ensuite stockés dans la graine sèche.

L'accumulation des transcrits de l'appareil transcriptionnel plastidial pendant la fin de la maturation laisse supposer une augmentation de la quantité des protéines correspondantes lors de la fin du développement de la graine. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons donc analysé le taux d'accumulation des protéines composant la machinerie transcriptionnelle plastidiale par immunodétection.

## ***II-2. Accumulation des protéines***

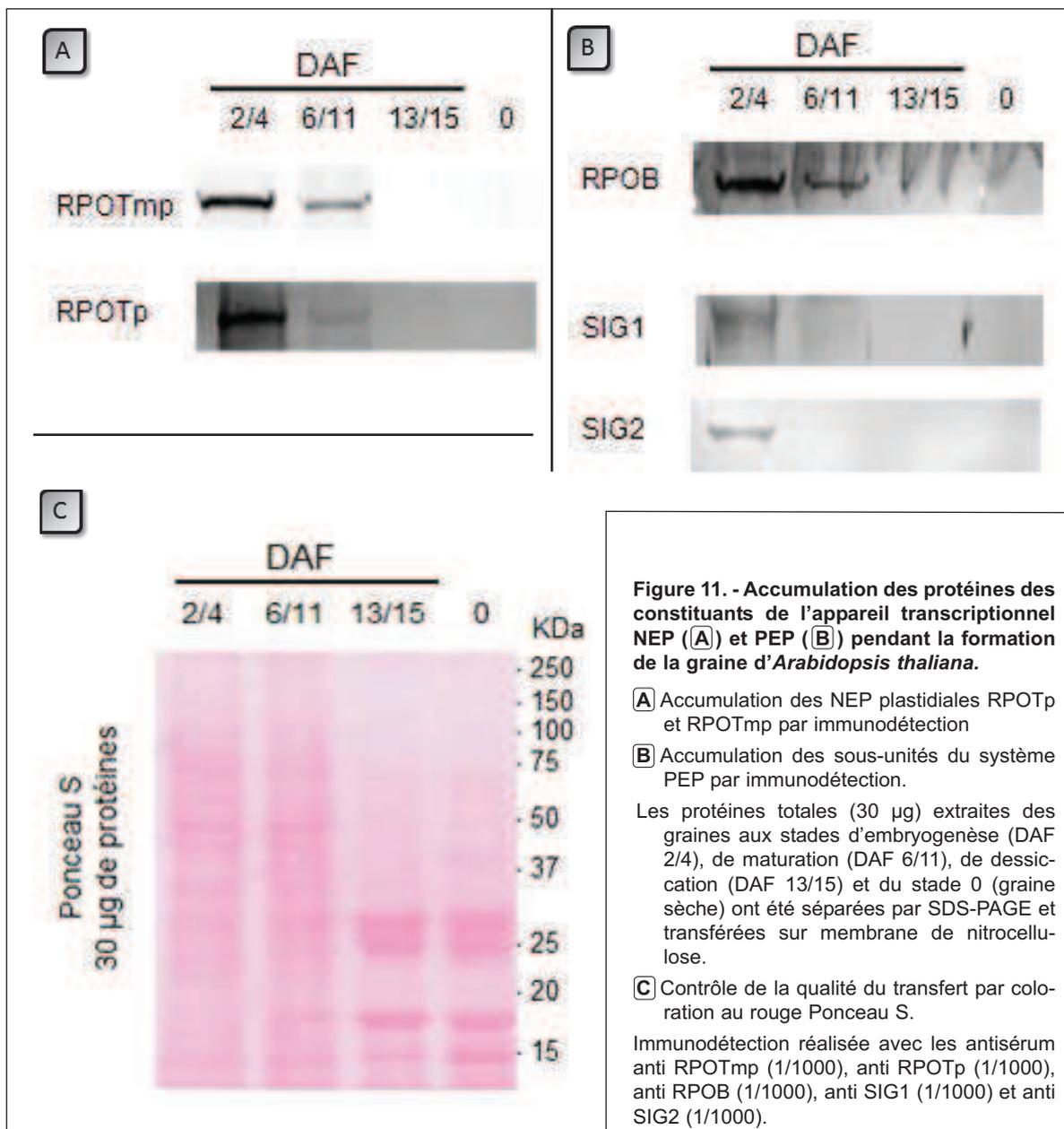
Le laboratoire dispose d'anticorps dirigés contre la majorité des protéines des systèmes transcriptionnels du plaste. Après séparation électrophorétique puis transfert sur membrane (voir Matériel et Méthodes), ces anticorps sont utilisés pour détecter la présence des polypeptides d'intérêt dans les graines au cours de leur formation.

### **II-2-1. Accumulation des protéines NEP**

RPOTmp est présente à tous les stades de développement mais est beaucoup plus abondante pendant la période embryonnaire (DAF 2/4) et de maturation (DAF 6/11) que pendant la dessiccation (DAF 13/15) et dans la graine sèche (Stade 0) (**Figure 11A**). RPOTp possède le même profil d'expression. Les protéines NEP sont donc accumulées préférentiellement pendant les stades précoces de développement au moment où les ARNm correspondants sont encore très faiblement présents. En revanche, très peu de protéines RPOTp et RPOTmp sont accumulées pendant le stade de dessiccation et dans la graine sèche quand le niveau des transcrits augmente (comparer **Figure 10A** et **Figure 11A**). Ces résultats indiquent une forte régulation de l'expression des NEP au niveau post-transcriptionnel.

### **II-2-2. Accumulation des protéines PEP et des facteurs sigma**

L'expression des protéines du système transcriptionnel PEP est similaire à celle des NEP. En effet, la sous-unité RPOB de la PEP est présente dans les stades d'embryogenèse (DAF 2/4) et de maturation de la graine (DAF 6/11) mais, dans nos conditions, n'est pas détectable pendant le stade de dessiccation (DAF 13/15) ni dans la graine sèche (Stade 0) (**Figure 11B**). Les protéines des SIG1 et SIG2 sont également préférentiellement accumulées pendant les phases précoces du développement. Ces observations montrent que l'expression protéique des sous-unités de l'enzyme cœur et des facteurs de transcription de type sigma semble coordonnée.



La qualité du transfert lors de l'immunodétection a été contrôlée par coloration au rouge ponceau (**Figure 11C**). Le profil protéique obtenu en chargeant la même quantité de protéines totales sur le gel montre un profil identique entre les graines aux stades embryonnaire (DAF 2/4) et de maturation (DAF 6/11). Cependant, au moment de la dessiccation de la graine, on observe l'accumulation de protéines de réserve. Ces protéines sont principalement l'albumine 2S (arabine) à 17 kDa et la globuline 12S (cruciférine) à 29 kDa qui sont utilisées pendant la germination de la graine et le développement de la jeune plantule. Pendant le stade de dessiccation et dans la graine sèche, ces protéines deviennent largement majoritaires parmi les protéines des graines. En consé-

quence, le signal des protéines de haut poids moléculaire est très fortement dilué dans l'échantillon protéique. Ce profil particulier pose la question de savoir si la diminution des protéines de l'appareil transcriptionnel au cours de la dessiccation des graines observée dans les **Figures 11A** et **11B** n'est pas liée à cette forte accumulation des protéines de réserve.

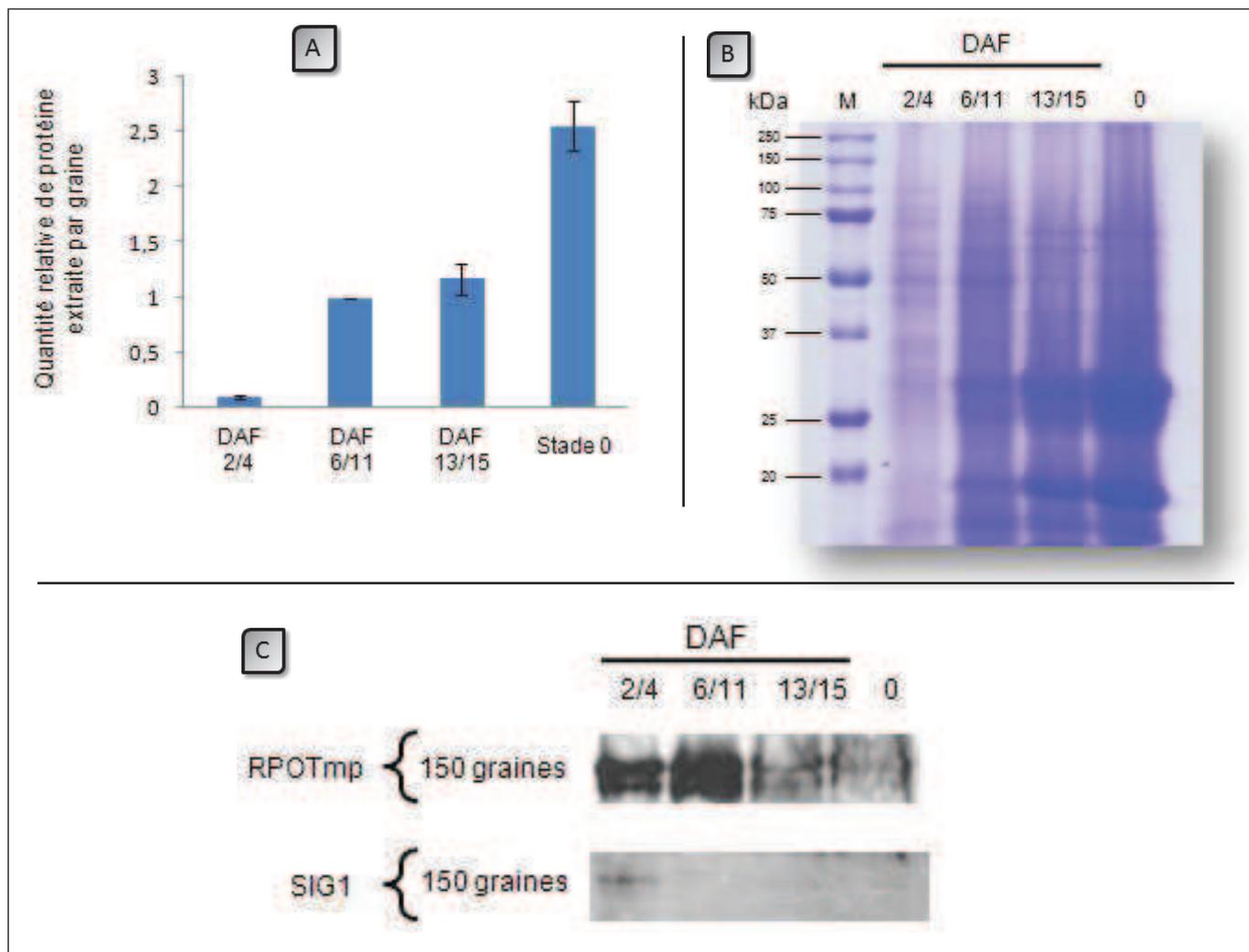
### II-2-3. Vérification du profil d'accumulation des protéines de l'appareil transcriptionnel plastidial

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons comparé le profil électrophorétique des polypeptides extraits des graines pendant les stades embryonnaire (DAF 2/4), de maturation (DAF 6/11), de dessiccation (DAF 13/15) et du stade graine sèche (Stade 0) en chargeant le gel en fonction de la quantité de protéines extraites d'un même nombre de graines pour chaque stade (**Figure 12**).

Pour cela, nous avons tout d'abord quantifié le contenu protéique d'une graine en fonction de son stade de développement. Les polypeptides ont été extraits des graines contenues dans 10 siliques. En considérant le nombre de graines à l'intérieur de chaque silique relativement constant (entre 40 et 50), nous avons déterminé la quantité de protéines par silique et donc par graine.

Les quantités de protéines de chaque stade, normalisées par rapport au stade de maturation (DAF 6/11) (**Figure 12A**), et le profil protéique du gel coloré au bleu de Coomassie obtenu en chargeant les protéines extraites de dix siliques, soit environ 500 graines (**Figure 12B**), montrent une augmentation constante de la quantité de protéines par graine au cours du développement. Ces résultats confirment les observations précédentes (Weber et al., 2005). De plus, contrairement au profil protéique obtenu en chargeant la même quantité de protéines totales pour chaque stade (**Figure 11C**), les protéines de haut poids moléculaires sont facilement détectables pendant les stades de dessiccation et dans la graine sèche. Ces polypeptides ne sont donc plus sous-représentés dans l'extrait protéique.

Nous avons ensuite vérifié certains résultats d'immunodétection obtenus précédemment en chargeant le gel en fonction de la quantité de protéines par graine (**Figure 12C**). De cette manière nous chargeons entre 13 et 25 fois plus de protéines des stades de dessiccation et de graine sèche, permettant aux protéines de haut poids moléculaires d'être dans des proportions équivalentes au stade d'embryogenèse (DAF 2/4) et de maturation (DAF 6/11). Dans ces conditions, RPOTMP est majoritairement accumulée pendant le stade de maturation plutôt qu'au stade embryonnaire.



**Figure 12. - Profil protéique de la graine d'*Arabidopsis thaliana* au cours de son développement.**

L'extraction des protéines a été réalisée simultanément à partir de lots de graines extraites des différents stades de développement de la graine d'*Arabidopsis thaliana*.

**A** **Quantité de protéines par graine.** Les résultats représentent la moyenne des résultats obtenus pour trois manipulations indépendantes. Les quantités sont normalisées par rapport au stade DAF 6/11.

**B** **Profil électrophorétique.** Les protéines contenues dans environ 500 graines de chaque stade sont séparées par SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie.

**C** **Accumulation de la NEP plastidiale RPOtmP et du facteur de transcription SIG1 de la PEP par immunodétection.** Les protéines totales extraites d'environ 150 graines aux stades d'embryogenèse (DAF 2/4), de maturation (DAF 6/11), de dessiccation (DAF 13/15) et du stade 0 (graine sèche) ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur membrane de nitrocellulose.

Immunodétection réalisée avec les antisérum anti RPOtmP (1/1000), anti SIG1 (1/1000) et anti SIG2 (1/1000).

Cependant, la baisse de la NEP à partir du stade de dessiccation est toujours observable. Le profil d'accumulation de SIG1 n'est quant à lui pas modifié.

Ces résultats confirment le profil d'expression protéique de l'appareil transcriptionnel plastidial et soulignent donc une opposition entre l'accumulation des messagers des NEP et des facteurs de transcription sigma à partir du stade de dessiccation de la graine et l'accumulation des protéines correspondantes qui est majoritaire pendant

l'embryogenèse et la maturation de la graine. Ces observations mettent en évidence des régulations post-transcriptionnelle, traductionnelle ou de la stabilité des protéines de l'appareil transcriptionnel plastidial au cours du développement de la graine. Nous avons ensuite voulu vérifier si cette opposition concerne également l'expression d'autres gènes du plastome.

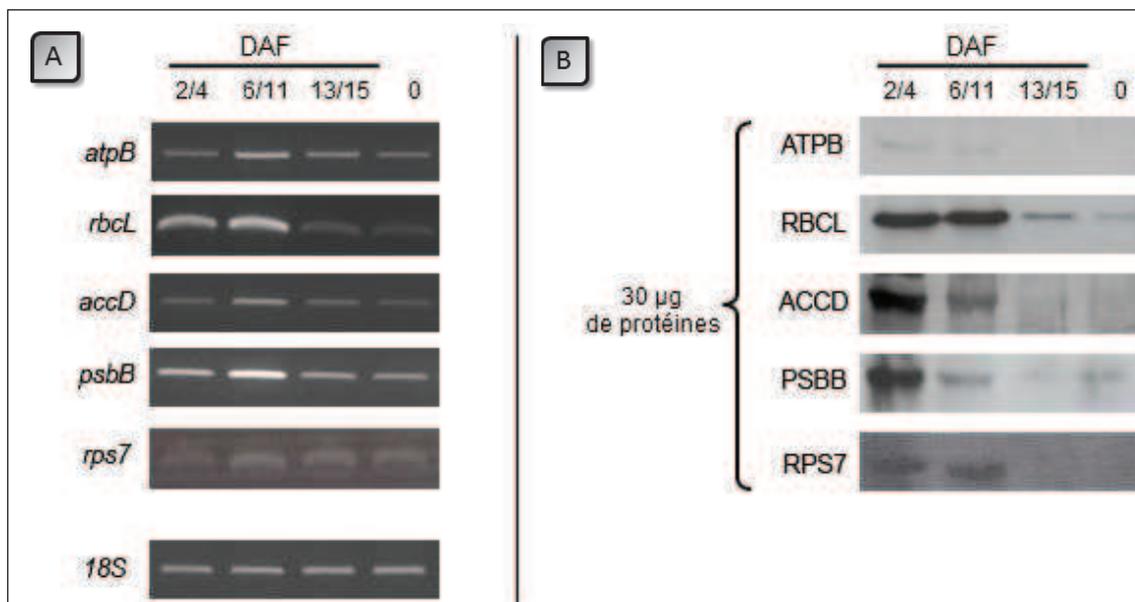
#### II-2-4. Corrélation entre l'accumulation des transcrits plastidiaux et l'accumulation de leurs protéines au cours de la formation des graines

Afin de comparer la cinétique d'expression de l'appareil transcriptionnel plastidial au cours de la formation de la graine à celle d'autres gènes plastidiaux, nous avons analysé l'accumulation des transcrits et des protéines de plusieurs gènes du plastome participant aux fonctions photosynthétiques (*rbcL*, *atpB*, *psbB*), de traduction (*rps7*) ou participant à la synthèse lipidique (*accD*). Les messagers de ces gènes sont détectés pendant tous les stades de formation de la graine (**Figure 13A**) mais s'accumulent tous préférentiellement pendant la période photosynthétique DAF 6/11 avant de diminuer pendant la dessiccation et dans la graine sèche. Le profil protéique obtenu offre une cinétique similaire (**Figure 13B**) : les protéines sont détectées principalement pendant les stades précoces du développement (DAF 2/4 et DAF 6/11) puis leur quantité diminue. Contrairement aux gènes de l'appareil transcriptionnel plastidial, l'accumulation des transcrits plastidiaux est donc corrélée à l'accumulation des protéines. En effet, aucune hausse de l'accumulation des messagers pendant la dessiccation et dans la graine sèche n'est observée. Ces résultats montrent la spécificité de l'expression de l'appareil transcriptionnel plastidial au cours de la formation de la graine.

Nous avons voulu ensuite caractériser l'activité transcriptionnelle des ARN polymérase plastidiales, en analysant spécifiquement l'expression de trois messagers dont la transcription est réalisée par RPOTmp, par RPOTp ou par la PEP.

#### ***II-3. Analyse de l'expression de transcrits plastidiaux par extension d'amorce et RT-PCR semi quantitative***

Afin d'estimer l'activité des polymérase au cours du développement de la graine, nous avons analysé l'accumulation de transcrits plastidiaux marqueurs de l'activité des polymérase PEP ou NEP. Deux méthodes ont été utilisées et permettent de quantifier l'accumulation des transcrits d'un gène et donc l'activité de la polymérase le synthétisant. L'extension d'amorce est une méthode semi-quantitative qui permet la séparation des différents transcrits (primaire ou mature) d'un même gène et la détermi-



**Figure 13. - Accumulation des transcrits (A) et des protéines (B) de gènes plastidiaux pendant la formation de la graine d'*Arabidopsis thaliana*.**

- A) Accumulation des transcrits par RT-PCR semi-quantitative.** Les ARN ont été extraits à partir des graines récoltées aux stades d'embryogenèse (DAF 2/4), de maturation (DAF 6/11), de dessiccation (DAF 13/15) et du stade 0 (graine sèche). Le nombre d'amplification pour chaque couple d'amorce a été déterminé afin de se situer dans la phase exponentielle de l'amplification. La quantité d'ADNc est contrôlée par l'amplification du gène 18S d'expression constitutive. La réaction PCR se déroule dans 25 µl de volume réactionnel. 10 µl de chaque réaction de PCR sont déposés sur gel d'agarose 2 % (p/v) puis visualisés par coloration au BET.
- B) Accumulation des protéines par immunodétection.** Les protéines totales (30 µg) extraites des graines aux stades d'embryogenèse (DAF 2/4), de maturation (DAF 6/11), de dessiccation (DAF 13/15) et du stade 0 (graine sèche) ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur membrane de nitrocellulose.

nation de leur région 5'UTR (UnTranslated Region). Cette technique permet l'identification, au nucléotide près, du ou des promoteurs utilisés pour transcrire le gène. Elle nécessite cependant une grande quantité d'ARN (10 µg en moyenne pour analyser un seul gène). Elle n'est donc utilisée que pour les gènes fortement exprimés. La RT-PCR semi-quantitative est une technique qui nécessite seulement 1 µg d'ARN et qui permet d'amplifier à partir d'une même réaction les transcrits correspondant à plusieurs gènes. Cependant, la résolution offerte par le gel d'agarose lors de la séparation des fragments après amplification ne permet pas de caractériser précisément les différents transcrits d'un même gène, sauf à choisir judicieusement les amorces (cas de l'opéron ribosomique *rrn* au promoteur PC par exemple, voir ci-dessous).

### II-3-1. Activité des NEP pendant le développement de la graine

Afin d'évaluer l'activité de la polymérase RPOTp, nous avons sélectionné le gène *clpP*, marqueur de l'activité de cette polymérase (Serino et Maliga, 1998 ; Swiatecka-Hagenbuch et al., 2007 ; Courtois et al., 2007). Le transcrit *clpP* est majoritairement transcrit à partir d'un promoteur NEP situé à la position -59 par rapport au

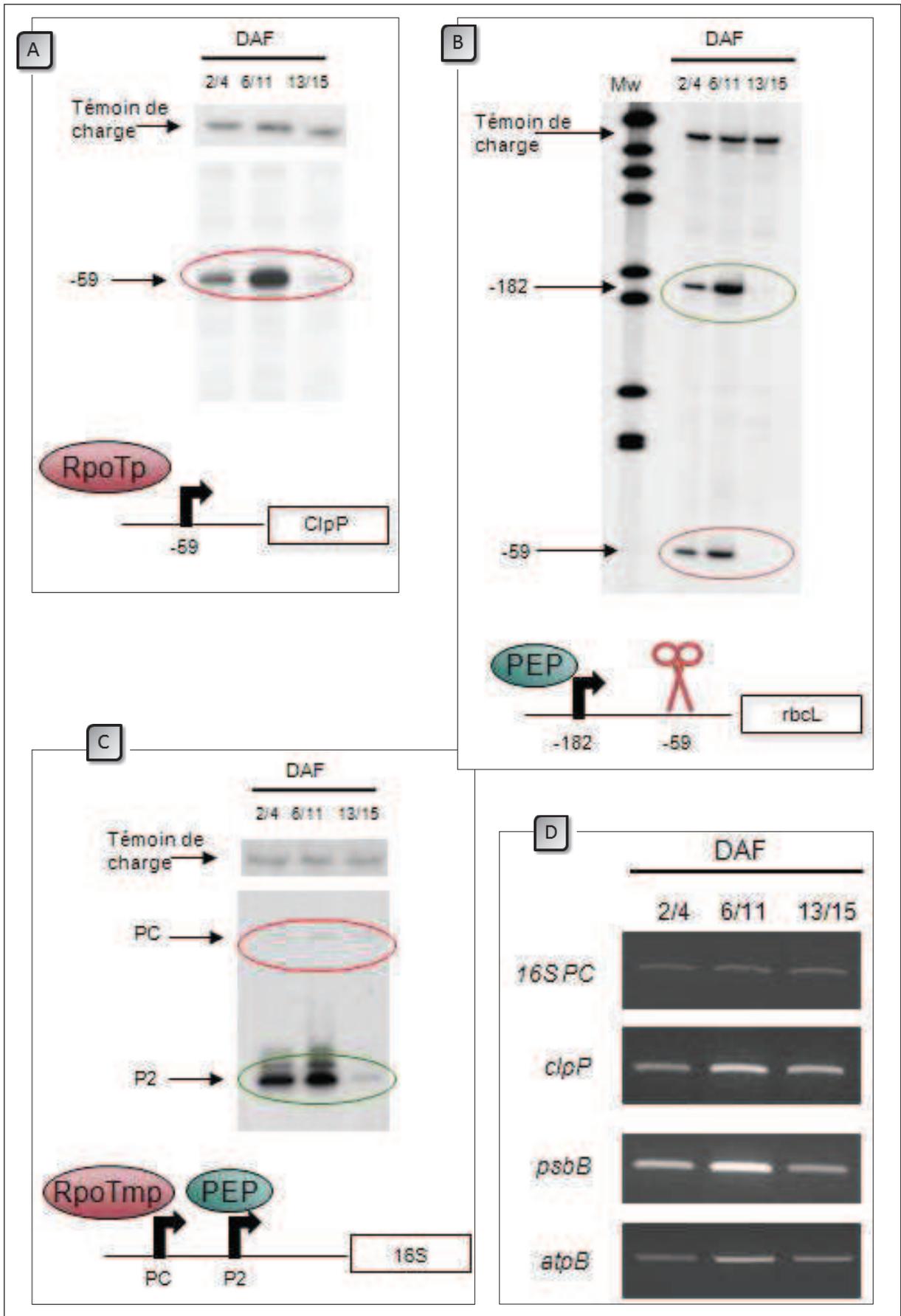
codon d'initiation de la traduction (ATG) mais possède également un promoteur de type PEP, situé à – 114. Ce promoteur PEP est cependant très faiblement utilisé et a seulement été mis en évidence par des expériences d'extension d'amorce chez le tabac et l'épinard. L'activité de la polymérase NEP RPO<sub>Tmp</sub> a été évaluée par l'analyse de l'opéron ribosomique 16S (Courtois et al., 2007). L'initiation de la transcription de cet opéron est réalisée à partir de deux promoteurs. Tandis que le promoteur P2 est sous la dépendance de la PEP, la NEP RPO<sub>Tmp</sub> transcrit spécifiquement l'opéron ribosomique à partir du promoteur PC pendant les phases précoces du développement.

Par extension d'amorce, nous observons uniquement le transcrit majoritaire *clpP* initié par RPO<sub>Tp</sub> à –59. L'accumulation de ce transcrit augmente pendant le stade de maturation de la graine (DAF 6/11) puis diminue très fortement au cours de la dessiccation (DAF 13/15) (**Figure 14A**). Au contraire, le niveau d'accumulation des transcrits de l'opéron ribosomique 16S au promoteur PC reste faible et stable au cours du développement (**Figure 14B**). Ces observations sont confirmées par RT-PCR semi-quantitative (**Figure 14D**). La baisse de la quantité de transcrit *clpP* pendant la dessiccation peut être due à une baisse de l'activité de l'enzyme et/ou à une baisse de la stabilité des transcrits. Comme la quantité de RPO<sub>Tp</sub> diminue fortement pendant la dessiccation, il est plus probable que cette baisse soit liée à une diminution de l'activité enzymatique de la polymérase. La présence des transcrits *clpP*-59 et *rrn*-PC aux stades d'embryogenèse et de maturation suggère néanmoins que les deux NEP sont actives durant l'embryogenèse et la maturation de la graine.

### II-3-2. Activité de la PEP pendant le développement de la graine

L'activité de la PEP a été caractérisée en analysant l'accumulation du transcrit *rbcL* et le transcrit de l'opéron ribosomique 16S au promoteur P2. Le messager *rbcL* est en général présent sous deux formes. Il existe un transcrit primaire issu du promoteur situé à –182 de l'ATG et un transcrit plus court issu d'un processing à la position –59 (Swiatecka et Sugiura, 1982).

Les deux transcrits *rbcL* (primaire et issu de la maturation nucléolytique) et le transcrit de l'opéron ribosomique 16S initié au promoteur P2 sont détectés dès la phase d'embryogenèse (DAF 2/4) (**Figure 14B et 14C**). Ils s'accumulent fortement pendant le stade de maturation (DAF 6/11) puis diminuent pendant la dessiccation de la graine (DAF 13/15). Ce profil d'expression est également retrouvé par RT-PCR semi-quantitative pour les transcrits *psbB* et *atpB*, autres messagers possédant un promoteur PEP (**Figure 14D**). La cinétique d'accumulation de ces transcrits montre que la PEP est



◀ **Figure 14. - Analyse de l'expression de transcrits plastidiaux par extension d'amorce et RT-PCR semi-quantitative.**

**Accumulation des transcrits par extension d'amorce (A, B et C) et par RT-PCR semi-quantitative (D).** Les ARN ont été extraits à partir des stades d'embryogenèse (DAF 2/4), de maturation (DAF 6/11), de dessiccation (DAF 13/15) et du stade 0 (graine sèche) .

- A B C** L'extension d'amorce a été réalisée sur des gènes marqueurs de l'activité des NEP RPOTp [gène *CipP* (A)] et RPOTmp [opéron ribosomique 16S (C)] et de la PEP [opéron ribosomique 16S (C) et *rbcL* (B)]. Un témoin de charge (produit PCR marqué) permet de contrôler la quantification. Les cartes schématiques de chaque gène sont représentées en dessous des photos.
- D** Le nombre de cycles d'amplification a été ajusté pour rester dans la phase exponentielle. La quantité d'ADNc (estimée à 15 ng par réaction PCR) est contrôlée par l'amplification du gène 18S d'expression constitutive. La réaction PCR se déroule dans 25 µL de volume réactionnel. 10 µL de chaque réaction de PCR sont déposés sur gel d'agarose 2 % (p/v) puis visualisés par coloration au BET.

active pendant le développement de la graine et que son pic d'activité semble concorder avec la période photosynthétique.

Les polymérases PEP et NEP sont donc présentes et actives pendant le développement de la graine. Leur cinétique d'activité est corrélée avec le profil d'accumulation des protéines des deux systèmes détectées précédemment. L'activité des deux polymérases semble maximale lors de la période de maturation (DAF 6/11) puis diminue lors de la dessiccation (DAF 13/15). Cependant, les analyses d'extension d'amorce ou de RT-PCR semi-quantitative permettent de mesurer uniquement le niveau d'accumulation d'un transcrit à un moment donné et non pas sa néosynthèse et/ou sa dégradation. Ainsi, une hausse du niveau d'un transcrit entre deux stades témoigne d'une activité de la polymérase. La baisse d'un stade à l'autre peut être la cause d'une diminution de l'activité de la polymérase et/ou d'une augmentation de la dégradation du messenger. Afin de faire la distinction entre ces deux cas, il faudrait réaliser des expériences de run-on. Ces analyses consistent à figer le génome *in vivo* dans un état transcriptionnel donné par l'ajout d'inhibiteur de l'initiation de la transcription comme l'héparine par exemple. Les transcrits en devenir sont ensuite terminés *in vitro* dans un mélange transcriptionnel contenant un nucléotide marqué. Cette méthode permet ainsi de visualiser les transcrits néosynthétisés. Il est cependant techniquement impossible de préparer des chloroplastes à partir des graines d'*Arabidopsis* et donc de réaliser ces expériences. Toutefois, nos résultats montrent que l'augmentation de la dégradation des messagers lors de la dessiccation dépend de chaque gène. En effet, l'expression du transcrit de l'opéron ribosomique initié au promoteur PC reste stable au cours de la formation des graines.

### III. Analyse globale du transcriptome plastidial pendant la formation des graines

Nous avons montré dans les paragraphes précédents que les deux machineries

transcriptionnelles plastidiales sont présentes et actives pendant la formation de la graine. Tandis que les transcrits codant l'ARN polymérase PEP restent stables, les transcrits codant les NEP s'accumulent fortement à partir de la dessiccation de la graine (DAF 13/15) et sont stockés dans la graine sèche (Stade 0). Les quantités de transcrits produits par les ARN polymérases varient de la même façon que celles des protéines de l'appareil transcriptionnel, au moins pour les gènes analysés précédemment. L'accumulation des protéines des polymérases ainsi que l'activité associée semblent quant à elles maximales pendant la période photosynthétique et diminuent pendant la dessiccation de la graine. Nous allons à présent analyser l'expression de la totalité des ARNm plastidiaux au cours de la formation de la graine. L'importance de la fonction plastidiale par sa contribution à la photosynthèse, à la production d'énergie ou bien encore par sa communication avec le noyau (voir Introduction) laisse envisager un rôle prépondérant de la régulation de l'expression du génome plastidial au cours du développement de la graine. Afin de caractériser son expression dans sa globalité, nous avons effectué une étude transcriptomique globale du plastome par macroarray pour étudier les variations d'accumulation des transcrits plastidiaux au cours du développement de la graine.

### ***III-1. Conditions expérimentales***

L'expression du génome plastidial a été analysée au cours du développement de la graine. Les expériences ont été réalisées en triplicat à partir de trois lots différents de graines recueillis indépendamment. Pour chaque répétition, toutes les étapes d'analyse des stades d'embryogenèse (DAF 2/4), de maturation (DAF 6/11) et de dessiccation (DAF 13/15) ont été effectuées simultanément et strictement dans les mêmes conditions expérimentales et l'exposition contre les écrans photosensibles a été de même durée.

Les 79 sondes représentées sur la membrane de macroarray (FR/04.08.06/FRA0607168) correspondent à des gènes qui peuvent être classés en cinq grandes catégories fonctionnelles (**Figure 15**). On trouve ainsi 33 gènes codant les sous-unités des composants de l'appareil photosynthétique (photosystème I et II, cytochrome *b<sub>6</sub>/f*, ATP synthase et le gène *rbcL*), 21 gènes impliqués dans la fonction de traduction et codant des protéines ribosomiques, 4 gènes impliqués dans la fonction de transcription du génome plastidial codant les sous-unités de la PEP, 11 gènes impliqués dans la fonction de chlororespiration (complexe NDH) et 10 gènes n'appartenant à aucune de ces classes fonctionnelles. Parmi ces derniers, on retrouve par exemple le gène *accD* codant une sous-unité de l'AcétylCoA carboxylase, catalysant la première

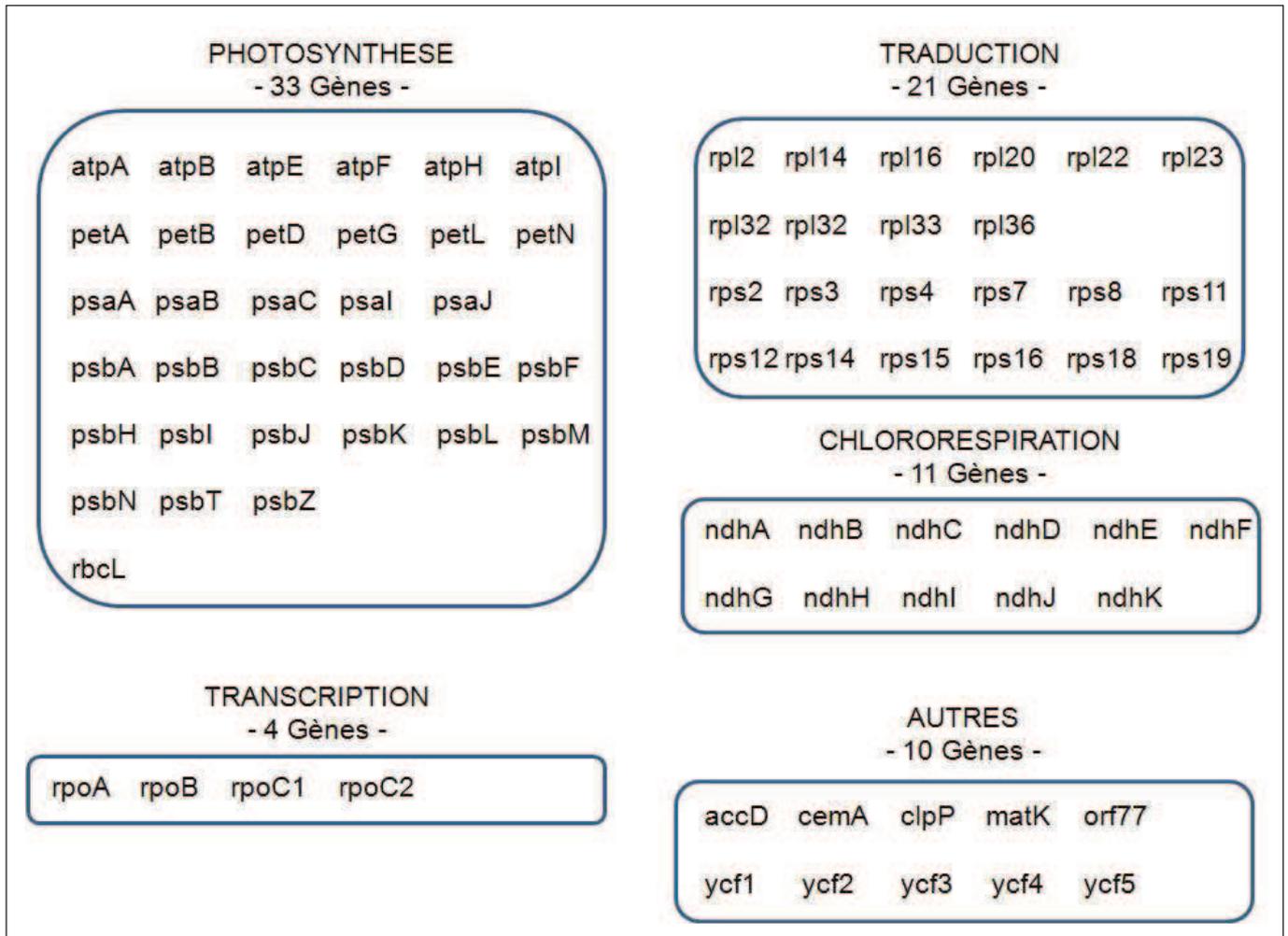


Figure 15. - Classes fonctionnelles des gènes plastidiaux présents sur le macroarray.

Les oligonucléotides déposés sur la membrane de macroarray représentent des gènes classés en 5 catégories fonctionnelles : photosynthèse, transcription, traduction, chlororespiration et autres.

étape de la voie de biosynthèse des lipides. Les sondes sont des oligos 60-mers permettant l'analyse des transcrits sens et anti-sens d'un gène.

### III-2. Méthode d'analyse des données

Après numérisation des écrans photosensibles (voir section Matériel et Méthodes), on obtient tout d'abord pour chaque transcrit des valeurs correspondant au niveau de gris de chaque dépôt quantifié par le logiciel ArrayGauge. Le bruit de fond a été déterminé indépendamment pour chaque dépôt en mesurant l'intensité d'un plot de la même taille directement à côté du dépôt. Après soustraction du bruit de fond, les valeurs arbitraires sont ensuite analysées de deux façons différentes. Tout d'abord, on peut comparer les valeurs d'intensité d'un même transcrit en fonction du stade de déve-

loppement. Ceci nous permet d'apprécier l'évolution de l'abondance de ces messagers par rapport à l'ARN total en fonction du stade de formation des graines. Pour cela, chaque série de macroarray (une série est composée d'un macroarray de chaque stade de formation de la graine) doit avoir été réalisée en parallèle et dans les mêmes conditions, c'est-à-dire avec la même quantité d'ARN, de radioactivité utilisée pour le marquage et l'hybridation et le même temps d'exposition contre les écrans photosensibles. Les valeurs provenant des répétitions biologiques sont ensuite normalisées en prenant les valeurs d'une des séries comme référence.

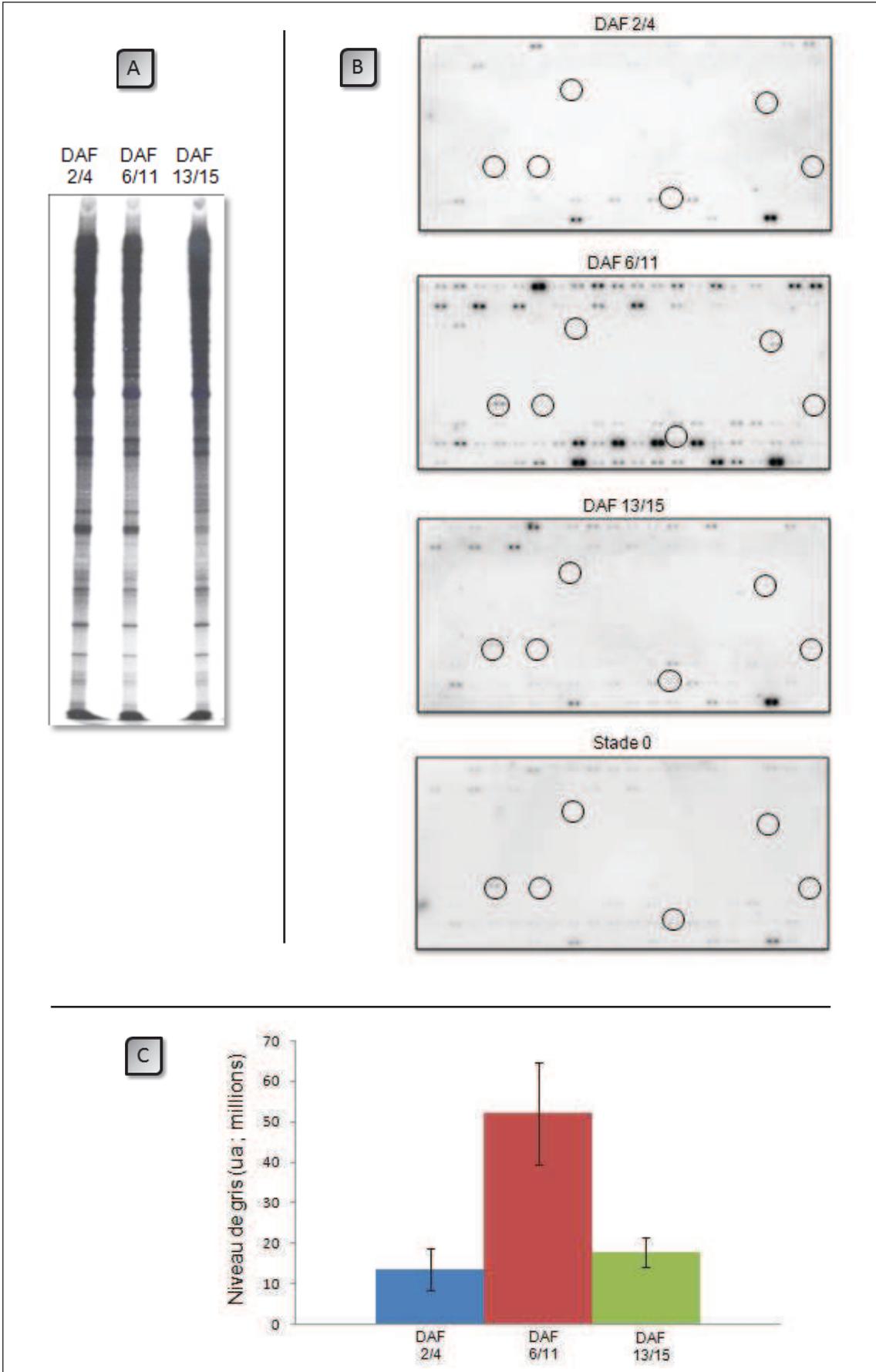
On peut également effectuer le rapport de la valeur attribuée à un seul ARNm sur la somme des valeurs attribuées à la totalité des transcrits d'un macroarray. Ceci permet d'apprécier l'évolution de l'abondance de ce messager, à l'intérieur des transcrits plastidiaux, en fonction du stade de développement. Pour ce type d'analyse, la normalisation préalable des valeurs entre chaque série n'est pas nécessaire. Ces deux types d'analyses ont été réalisés pour chaque ARNm présent sur le macroarray

### ***III-3. Analyse globale de l'accumulation des transcrits plastidiaux***

Le profil d'accumulation des ARNm plastidiaux par hybridation sur macroarray a été établi au cours du développement de la graine (**Figure 16A et 16B**). De nombreux transcrits plastidiaux sont détectés dès le stade embryonnaire (DAF 2/4). La quantification de l'ensemble des valeurs par macroarray (**Figure 16C**) montre que l'accumulation des transcrits augmente fortement pendant le stade de maturation (DAF 6/11). Pendant la dessiccation (DAF 13/15), la quantité de transcrits présents dans la graine diminue à un niveau comparable à celui observé au stade d'embryogenèse (DAF 2/4). Ce profil se retrouve dans plus de 80 % des gènes présents sur le macroarray (voir Annexe III) et est conservé dans chaque classe fonctionnelle à l'exception de la classe transcription, uniquement composée des quatre sous-unités de la PEP (**Figure 17A**).

**Figure 16. - Analyse du transcriptome plastidial pendant la formation des graines par macroarray.**

- A** Profil des sondes marquées radioactivement après séparation électrophorétique des ADNc marqués sur acrylamide en conditions dénaturantes (voir Matériel et Méthodes). 6 µL par puits correspondant à 3000 cpm sont déposés pour chaque échantillon. La visualisation est effectuée par autoradiographie.
- B** Profil d'expression des ARNm plastidiaux pendant la formation de la graine. Les membranes de macroarray sont hybridées avec les ADNc marqués (300 000 cpm) synthétisés à partir de 4 µg d'ARN total extraits des graines aux stades d'embryogenèse (DAF 2/4), de maturation (DAF 6/11), de dessiccation (DAF 13/15) et du stade 0 (graine sèche). Après exposition contre des écrans photosensibles, l'image est numérisée. L'image du macroarray au stade 0 a été obtenue indépendamment des trois autres. Les principaux transcrits antisens détectés sont encerclés.
- C** Quantification du signal des transcrits sens incorporé sur les macroarrays. Après hybridation et exposition contre des écrans photosensibles, les signaux sont quantifiés par le logiciel ArrayGauge. Les valeurs présentées ici sont les moyennes de trois expérimentations indépendantes.



De façon complémentaire, les données issues des macroarrays ont été analysées en comparant, pour un stade de développement de la graine donné, la proportion des transcrits de chaque classe par rapport à la totalité des transcrits détectés (**Figure 17B**). Dans cette analyse, nous avons donc pu inclure les résultats obtenus précédemment par Emilie Demarsy (Demarsy, 2006) pour la graine sèche, puisque cette méthode d'analyse ne nécessite pas d'avoir réalisé les séries de macroarrays dans les mêmes conditions expérimentales. Les gènes codant les protéines liées à la fonction photosynthétique sont les plus représentés sur le macroarray (33 gènes sur 79) et, avec les ARNt, sur le génome plastidial. Ces transcrits sont les plus abondants à tous les stades étudiés (**Figure 17B**). Ils représentent plus de 90 % du signal total des transcrits sens détectés au stade embryonnaire (DAF 2/4). Cette proportion reste importante pendant le stade de maturation (DAF 6/11) et de dessiccation (entre 80 et 90 %). En revanche, les transcrits photosynthétiques ne représentent plus que 60 % des messagers stockés dans la graine sèche (Stade 0).

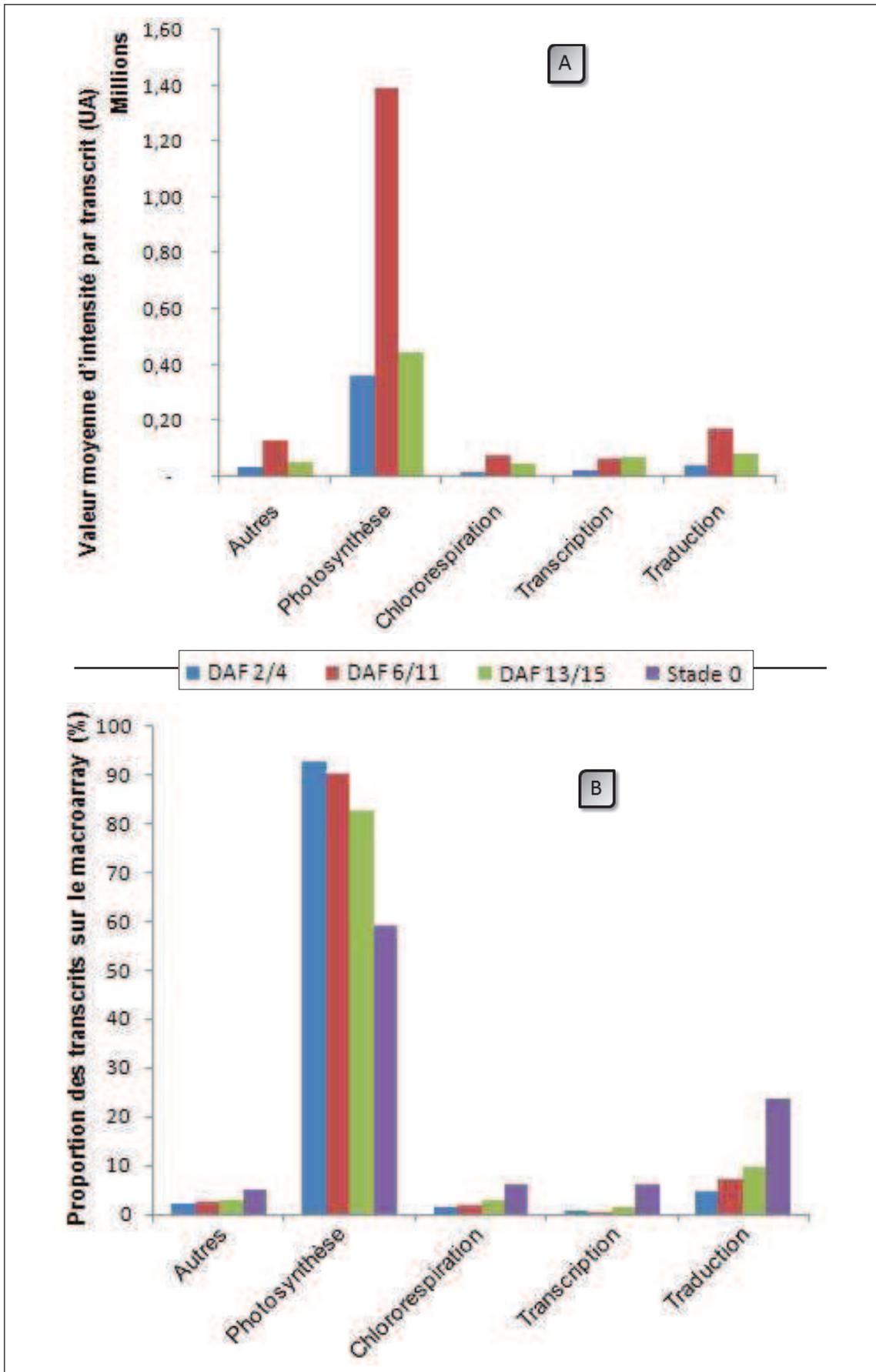
La plupart des transcrits des autres catégories fonctionnelles ont un profil d'accumulation diamétralement opposé. Le taux d'accumulation des transcrits appartenant aux catégories fonctionnelles « chlororespiration », « transcription », « traduction » et « autres » est très faible et relativement stable au cours de la formation de la graine. Contrairement aux transcrits photosynthétiques, la proportion de ces transcrits est augmentée entre le stade de dessiccation et le stade graine sèche. Ces observations soulignent que le turnover des messagers est affecté différemment selon le type de transcrit au cours de la dessiccation et du stockage de la graine. Ces résultats peuvent aussi s'expliquer par l'existence d'une synthèse *de novo* dans les graines sèches comme cela a été mis en évidence pour la  $\beta$ -glucanase (Leubner-Metzger, 2005). Bien qu'il s'agisse dans ce cas d'une expression locale, dans un tissu maternel (le tégument de la graine), d'une enzyme ayant une fonction dans la germination, on ne peut pas exclure qu'il existe également d'autres synthèses de protéines dans la graine sèche.

Nous avons affiné cette étude globale en analysant l'expression différentielle des transcrits de chaque classe.

**Figure 17. - Valeur moyenne (A) et proportion (B) des transcrits, regroupés par classe fonctionnelle, détectés sur les macroarrays.**

Après hybridation et exposition contre des écrans photosensibles, le signal est quantifié par le logiciel ArrayGauge. Les transcrits sont ensuite regroupés par classe fonctionnelle (voir **Figure 15**).

- (A) La valeur moyenne d'intensité des transcrits est obtenue en divisant la somme des valeurs des transcrits d'une classe fonctionnelle par le nombre de gènes de cette classe.
- (B) La proportion des transcrits de chaque classe fonctionnelle est calculée en divisant les valeurs de chaque transcrit par la somme des valeurs détectée sur le macroarray. Cette proportion est donc relative au génome plastidial. Les pourcentages des transcrits d'une classe fonctionnelle sont ensuite additionnés. Les valeurs présentées ici sont les moyennes de trois expérimentations indépendantes.



### III-4. Expression des transcrits plastidiaux photosynthétiques

La classe fonctionnelle « Photosynthèse » comprend les sous-unités codées dans le génome plastidial des photosystèmes, de l'ATP synthase, du cytochrome  $b_6/f$  ainsi que le transcrit *rbcL*.

La plupart des transcrits des sous-unités plastidiales de l'ATP synthase sont très peu abondants au cours de la formation de la graine (moins de 2 % des transcrits plastidiaux) (**Tableau 4**). Le transcrit *atpH* est le transcrit du complexe de l'ATP synthase le plus abondant, il représente entre 4 et 12 % du signal accumulé selon les stades étudiés. Bien que localisée sur le même opéron, l'accumulation des transcrits *atpI*, *atpF* et *atpA* est nettement moins importante. La présence d'un promoteur supplémentaire, sous contrôle de SIG3, permettant d'augmenter la transcription d'*atpH* à l'intérieur de son opéron (Zghidi et al., 2007) et sa stabilisation spécifique par les protéines PPR (Prikryl et al., 2011) pourraient expliquer ce profil particulier.

Les transcrits du photosystème I sont également peu abondants à l'exception de *psaI* et *psaJ*. Ces derniers ont d'ailleurs un profil comparable puisque l'abondance de leurs transcrits diminue lors de la dessiccation de la graine (DAF 13/15). L'abondance du transcrit *psaJ* (jusqu'à 10 % du signal des transcrits plastidiaux) peut être corrélée, comme celle du transcrit *atpH*, à sa stabilisation par les protéines PPR (voir Introduction). La proportion du transcrit *psaB* augmente jusqu'au stade de dessiccation. Ce profil atypique à l'intérieur des transcrits photosystème I peut s'expliquer par sa co-transcription avec le transcrit *rps14* (Tseng et al., 2010) qui suit le profil des transcrits de la classe traduction.

Les transcrits du photosystème II sont les transcrits plastidiaux les plus représentés et les plus abondants (environ 5 % du signal détecté par gène en moyenne). La plupart des transcrits des composants du photosystème II suivent une cinétique identique : leur abondance relative au transcriptome plastidial est constante pendant les deux premiers stades de développement de la graine (DAF 2/4 et DAF 6/11) puis diminue pendant la dessiccation et dans la graine sèche. Leur regroupement au sein des mêmes unités transcriptionnelles, comme pour les transcrits *psbK* et *psbI* (Neuhaus et Link, 1990) ou bien les transcrits *psbE*, *psbF*, *psbJ* et *psbL* (Tseng et al., 2010) explique la cinétique identique d'accumulation des messagers. A l'intérieur de ce groupe, l'accumulation du transcrit *psbA* est remarquable puisqu'il est le messager le plus détecté sur les macroarrays aux stades d'embryogenèse (DAF 2/4) et de dessiccation (DAF 13/15). De plus, alors que les valeurs de la plupart des transcrits photosynthétiques diminuent pendant la dessiccation, celle du messager de *psbA* augmente encore. Des travaux récents dans l'équipe ont montré que les messagers *psbA* dimi-

	Nom du gène	DAF 2/4		DAF 6/11		DAF 13/15		Stade 0	
		% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type
ATP Synthase	atpA	0,42	+ 0,18	0,64	+ 0,17	0,74	+ 0,19	1,13	+ 0,31
	atpB	0,31	± 0,17	0,35	± 0,19	0,35	± 0,05	0,60	± 0,20
	atpE	0,17	± 0,15	0,27	± 0,13	0,16	± 0,02	0,25	± 0,19
	atpF	0,34	+ 0,30	0,61	+ 0,16	0,25	+ 0,03	0,19	+ 0,05
	atpH	11,79	± 1,00	7,95	± 2,75	4,14	± 0,46	6,90	± 1,45
	atpI	0,78	± 0,39	0,83	± 0,23	0,85	± 0,26	1,45	± 0,16
Cyt b <sub>6</sub> /f	petA	0,20	+ 0,19	0,42	+ 0,06	0,52	+ 0,01	1,27	+ 0,34
	petB	0,85	± 0,11	1,60	± 0,13	2,56	± 0,68	1,70	± 0,55
	petD	0,86	± 0,20	1,32	± 0,25	1,53	± 0,38	0,83	± 0,28
	petG	0,69	± 0,23	1,07	± 0,58	0,62	± 0,51	1,17	± 0,35
	petL	1,14	± 0,81	1,46	± 0,51	0,76	± 0,45	1,81	± 0,23
	petN	0,19	± 0,10	0,11	± 0,04	0,05	± 0,07	0,01	± 0,02
PSI	psaA	0,06	± 0,06	0,22	± 0,10	0,21	± 0,18	0,11	± 0,11
	psaB	0,15	± 0,08	0,30	± 0,12	0,69	± 0,18	0,35	± 0,26
	psaC	0,30	± 0,07	0,52	± 0,37	0,29	± 0,07	0,37	± 0,24
	psaI	4,29	± 0,64	4,32	± 1,21	1,32	± 1,32	0,27	± 0,24
	psaJ	8,27	± 2,09	10,04	± 3,11	3,91	± 2,22	7,00	± 0,83
PSII	psbA	21,10	± 15,16	8,86	± 3,75	39,66	± 4,97	16,93	± 5,42
	psbB	0,94	± 0,32	1,12	± 0,40	0,44	± 0,15	0,19	± 0,21
	psbC	2,74	± 0,52	2,48	± 0,64	3,02	± 1,77	1,69	± 0,26
	psbD	0,87	± 0,23	1,55	± 0,15	3,46	± 1,82	1,46	± 0,27
	psbE	5,39	± 3,24	5,35	± 2,54	1,12	± 0,67	0,72	± 0,21
	psbF	5,69	± 2,65	7,47	± 1,76	1,59	± 0,57	1,16	± 0,23
	psbH	0,26	± 0,19	0,44	± 0,26	0,10	± 0,10	0,28	± 0,34
	psbI	0,43	± 0,04	0,94	± 0,56	0,45	± 0,28	0,69	± 0,19
	psbJ	5,38	± 0,94	5,41	± 0,46	2,11	± 0,18	1,65	± 0,18
	psbK	1,12	± 0,85	2,48	± 0,34	0,99	± 0,25	1,66	± 0,30
	psbL	5,03	± 2,89	7,93	± 0,23	2,05	± 0,65	1,33	± 0,18
	psbM	3,83	± 1,15	5,42	± 2,38	3,24	± 0,61	2,48	± 0,07
	psbN	1,77	± 1,80	1,84	± 0,63	2,46	± 0,30	1,62	± 0,78
	psbT	2,65	± 0,76	3,59	± 0,96	1,38	± 0,53	1,27	± 0,67
psbZ	0,77	± 0,27	0,99	± 0,14	1,59	± 0,84	0,21	± 0,37	
	rbcL	3,85	± 0,15	2,55	± 0,71	0,29	± 0,22	0,31	± 0,28

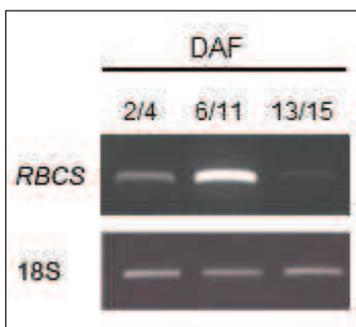
**Tableau 4. - Abondance des transcrits plastidiaux de la classe photosynthèse.**

Les signaux obtenus sur les macroarrays sont quantifiés par le logiciel ArrayGauge.

La proportion de chaque transcrit est calculée par rapport au signal total détecté sur le macroarray et est donc relative au transcriptome plastidial. Les transcrits sont ensuite regroupés par classe fonctionnelle (voir **Figure 15**). Les valeurs présentées ici sont les moyennes de trois expérimentations indépendantes. Stade 0 : Demarsy, 2006.

nent fortement pendant les phases précoces de la germination puis augmentent de nouveau une fois le processus terminé. Cette dégradation précoce pourrait ainsi servir de réserve de nucléotides utilisée pendant la germination (Demarsy et al., soumis).

Le transcrite *rbcL* code la grande sous-unité de la rubisco. Il possède un profil d'accumulation caractéristique des transcrits du photosystème II : abondant jusqu'à la fin de la période photosynthétique, il diminue ensuite fortement pour devenir très peu détectable pendant la dessiccation et dans la graine sèche. Ce profil confirme les résultats d'extension d'amorce précédents (voir I-2-3-2). L'accumulation de la sous-unité nucléaire de la rubisco, *RBCS*, a été mesurée par RT-PCR semi-quantitative (**Figure 18**) et montre une cinétique comparable, soulignant la co-régulation des gènes plastidiaux et nucléaires. Ce résultat illustre qu'en général, le profil d'accumulation des transcrits plastidiaux codant les protéines photosynthétiques est le même que celui décrit pour les sous-unités codées dans le génome nucléaire (Ruuska et al., 2002). Ces données confirment donc la coordination de l'expression des deux génomes pour la synthèse des messagers photosynthétiques dans les graines en formation.



**Figure 18. - Expression du transcrite *RBCS* au cours de la formation de la graine.**

**Accumulation des transcrits par RT-PCR semi-quantitative.** Les ARN ont été extraits à partir des graines récoltées aux stades d'embryogenèse (DAF 2/4), de maturation (DAF 6/11), de dessiccation (DAF 13/15). Le nombre d'amplification pour chaque couple d'amorce a été déterminé afin de se situer dans la phase exponentielle de l'amplification.

La quantité d'ADNc est contrôlée par l'amplification du gène 18S d'expression constitutive. La réaction PCR se déroule dans 25 µL de volume réactionnel. 10 µL de chaque réaction de PCR sont déposés sur gel d'agarose 2 % (p/v) puis visualisés par coloration au BET.

### III-5. Expression des transcrits plastidiaux de la classe « Transcription »

La classe « Transcription » est composée des gènes codant les quatre sous-unités de la PEP. Comme observé dans l'analyse globale (voir I-3-3), et contrairement aux transcrits photosynthétiques, la proportion des transcrits de cette classe augmente, relativement au transcriptome plastidial, pendant le développement de la graine (**Tableau 5**). Cette hausse débute après la période de maturation (DAF 6/11) et est

Nom du gène	DAF 2/4		DAF 6/11		DAF 13/15		Stade 0	
	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type
rpoA	0,29	+ 0,27	0,26	+ 0,09	0,67	+ 0,14	2,44	+ 0,86
rpoB	0,09	± 0,05	0,09	± 0,07	0,27	± 0,12	0,45	± 0,11
rpoC1	0,22	± 0,13	0,14	± 0,08	0,55	± 0,12	3,15	± 1,26
rpoC2	0,05	+ 0,04	0,04	+ 0,04	0,07	+ 0,06	0,12	+ 0,05

**Tableau 5. - Abondance des transcrits plastidiaux de la classe « Transcription ».** Les signaux obtenus sur les macroarrays sont quantifiés par le logiciel ArrayGauge. La proportion de chaque transcrite est calculée par rapport au signal total détecté sur le macroarray et est donc relative au transcriptome plastidial. Les transcrits sont ensuite regroupés par classe fonctionnelle (voir **Figure 15**). Les valeurs présentées ici sont les moyennes de trois expérimentations indépendantes. Stade 0 : Demarsy, 2006.

accentuée lors du passage à l'état de graine sèche (stade 0). Si l'on compare les valeurs d'expression attribuées à chacun de ces gènes (voir Annexe III), on ne retrouve pas exactement la cinétique observée par RT-PCR semi quantitative (voir I-2-1-2). Toutefois, les messagers de cette classe sont très faiblement détectés sur le macroarray et représentent chacun moins de 0,5 % du signal des transcrits plastidiaux. Pour les transcrits de cette classe, la méthode atteint donc ses limites.

### III-6. Expression des transcrits plastidiaux de la classe « Traduction »

La classe « Traduction » contient les gènes codant les sous-unités plastidiales des ribosomes. Les transcrits de l'opéron constitué des gènes *rpl23-rpl2-rpl22-rps3-rpl16-rpl14-rps8-rpl36-rps11* (Hubschmann et Börner, 1997 ; Sugita et Sugiura, 1996) suivent tous un profil d'accumulation identique : l'abondance de ces messagers augmente à partir du stade de dessiccation (DAF 13/15) jusqu'au stade graine sèche (stade 0) (**Tableau 6**). Ces transcrits, ainsi que la majorité des transcrits de la classe « Traduction » suit donc le profil des transcrits de la classe « Transcription ».

**Tableau 6. - Abondance des transcrits plastidiaux de la classe « Traduction ».**

Les signaux obtenus sur les macroarrays sont quantifiés par le logiciel ArrayGauge. La proportion de chaque transcrite est calculée par rapport au signal total détecté sur le macroarray et est donc relative au transcriptome plastidial. Les transcrits sont ensuite regroupés par classe fonctionnelle (voir **Figure 15**). Les valeurs présentées ici sont les moyennes de trois expérimentations indépendantes. Stade 0 : Demarsy, 2006.

Nom du gène	DAF 2/4		DAF 6/11		DAF 13/15		Stade 0	
	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type
rpl2	0,62	+ 0,50	0,61	+ 0,07	0,60	+ 0,07	3,30	+ 0,59
rpl14	0,17	± 0,11	0,21	± 0,13	0,45	± 0,16	0,92	± 0,24
rpl16	0,17	± 0,17	0,33	± 0,16	0,31	± 0,13	1,16	± 0,07
rpl20	0,21	+ 0,18	0,14	+ 0,02	0,94	+ 0,31	1,25	+ 0,27
rpl22	0,16	± 0,12	0,13	± 0,05	0,20	± 0,10	0,62	± 0,29
rpl23	0,38	± 0,33	0,42	± 0,07	0,32	± 0,08	0,63	± 0,58
rpl32	0,82	+ 0,48	2,31	+ 1,02	1,45	+ 0,70	5,67	+ 1,14
rpl33	0,08	± 0,06	0,15	± 0,10	0,69	± 0,81	0,43	± 0,10
rpl36	0,15	± 0,06	0,16	± 0,11	0,49	± 0,08	2,19	± 0,10
rps2	0,13	± 0,12	0,11	± 0,03	0,31	± 0,03	0,80	± 0,27
rps3	0,27	± 0,25	0,30	± 0,13	0,28	± 0,04	1,45	± 0,31
rps4	0,14	+ 0,13	0,29	+ 0,07	0,14	± 0,08	0,29	± 0,06
rps7	0,16	± 0,12	0,26	± 0,10	0,49	± 0,09	1,08	± 0,05
rps8	0,23	± 0,25	0,25	± 0,10	0,84	± 0,17	2,01	± 0,41
rps11	0,03	+ 0,02	0,03	± 0,04	0,23	+ 0,24	0,44	± 0,08
rps12	0,17	+ 0,25	0,09	+ 0,11	0,31	+ 0,13	0,02	+ 0,03
rps14	0,36	± 0,05	0,46	± 0,16	0,89	± 0,12	0,39	± 0,19
rps15	0,12	+ 0,06	0,13	+ 0,05	0,18	+ 0,05	0,46	± 0,14
rps16	0,04	± 0,01	0,03	± 0,02	0,10	± 0,16	0,09	± 0,09
rps18	0,34	± 0,29	0,34	± 0,11	0,40	± 0,50	0,57	± 0,13
rps19	0,10	+ 0,02	0,26	+ 0,28	0,18	+ 0,13	0,06	+ 0,05

### III-7. Expression des transcrits de la fonction de chlororespiration

Quelques transcrits du complexe NDH ne sont quasiment pas détectables (*ndhA*, *ndhF*, *ndhH*, *ndhJ*) (**Tableau 7**). Tout en restant très faible, la proportion des transcrits *ndhB*, *ndhG*, *ndhI* et *ndhK*, augmente néanmoins significativement lors de la transition entre le stade de dessiccation (DAF 13/15) et la graine sèche (Stade 0) et plus globalement au cours du développement de la graine.

Nom du gène	DAF 2/4		DAF 6/11		DAF 13/15		Stade 0	
	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type
<i>ndhA</i>	0,01	+ 0,01	0,00	+ 0,01	0,07	+ 0,05	0,05	+ 0,05
<i>ndhB</i>	0,17	± 0,11	0,35	± 0,18	0,81	± 0,17	2,66	± 0,31
<i>ndhC</i>	0,40	± 0,37	0,27	± 0,35	0,24	± 0,21	0,06	± 0,02
<i>ndhD</i>	0,08	+ 0,07	0,18	+ 0,07	0,39	+ 0,48	0,24	+ 0,19
<i>ndhE</i>	0,21	± 0,11	0,29	± 0,09	0,42	± 0,11	0,53	± 0,13
<i>ndhF</i>	0,04	± 0,04	0,03	± 0,02	0,10	± 0,17	0,03	± 0,03
<i>ndhG</i>	0,15	+ 0,05	0,20	+ 0,08	0,15	+ 0,13	0,74	+ 0,19
<i>ndhH</i>	0,02	± 0,02	0,01	± 0,01	0,04	± 0,06	0,00	± 0,00
<i>ndhI</i>	0,05	± 0,07	0,07	± 0,06	0,29	± 0,16	0,97	± 0,27
<i>ndhJ</i>	0,02	+ 0,02	0,04	+ 0,02	0,03	+ 0,02	0,17	+ 0,13
<i>ndhK</i>	0,16	± 0,09	0,26	± 0,10	0,33	± 0,26	0,71	± 0,14

**Tableau 7. - Abondance des transcrits plastidiaux de la classe « Chlororespiration ».**

Les signaux obtenus sur les macroarrays sont quantifiés par le logiciel ArrayGauge. La proportion de chaque transcrit est calculée par rapport au signal total détecté sur le macroarray et est donc relative au transcriptome plastidial.

Les transcrits sont ensuite regroupés par classe fonctionnelle (voir **Figure 15**). Les valeurs présentées ici sont les moyennes de trois expérimentations indépendantes. Stade 0 : Demarsy, 2006.

La plupart des transcrits du complexe sont localisés sur la même unité transcriptionnelle (Meurer et al., 1996). La régulation différentielle de l'abondance des messagers montre qu'il existe de grandes disparités dans leur accumulation et souligne ici l'importance du contrôle post-transcriptionnel. En outre, la conservation de la stœchiométrie du complexe dépend également d'un contrôle traductionnel et post-traductionnel (Hashimoto et al., 2003).

### III-8. Expression des autres transcrits plastidiaux

Dans cette classe sont répertoriés tous les transcrits ne pouvant être regroupés dans les autres classes fonctionnelles. On retrouve diverses protéines putatives ou à fonctions encore inconnues (transcrits *ycf*, *cemA* et *orf77*), la sous-unité  $\beta$  de l'acétyl-coA carboxylase (*accD*), un gène impliqué dans l'épissage des ARN plastidiaux (*matK*) ou bien encore une sous-unité du protéasome plastidial (*clpP*) (**Tableau 8**).

Soulignant les fonctions très diverses des gènes de ce groupe, l'expression de leurs ARNm au cours de la formation de la graine est très variable. Par exemple,

**Tableau 8. - Abondance des autres transcrits plastidiaux.**

Les signaux sur les macroarrays sont quantifiés par le logiciel ArrayGauge. La proportion de chaque transcrit est calculée par rapport au signal total détecté sur le macroarray. Les transcrits sont ensuite regroupés par classe fonctionnelle (voir **Figure 15**). Les valeurs présentées ici sont les moyennes de trois expérimentations indépendantes. Stade 0 : Demarsy, 2006.

Nom du gène	DAF 2/4		DAF 6/11		DAF 13/15		Stade 0	
	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type
accD	0,12	+ 0,11	0,20	+ 0,12	0,23	+ 0,09	0,11	+ 0,05
cemA	0,04	± 0,05	0,14	± 0,03	0,22	± 0,12	0,56	± 0,18
clpP	0,42	± 0,28	0,42	± 0,24	0,52	± 0,34	0,52	± 0,04
matK	0,52	+ 0,54	0,82	+ 0,46	0,96	+ 0,24	2,00	+ 0,34
Orf77	0,20	± 0,18	0,20	± 0,07	0,45	± 0,10	0,64	± 0,27
Ycf1	0,48	± 0,21	0,48	± 0,11	0,14	± 0,15	0,10	± 0,12
Ycf2	0,12	+ 0,02	0,03	+ 0,04	0,20	+ 0,03	0,53	+ 0,00
Ycf3	0,02	± 0,04	0,05	± 0,03	0,08	± 0,07	0,10	± 0,18
Ycf4	0,04	± 0,06	0,03	± 0,02	0,10	± 0,09	0,30	± 0,45
Ycf5	0,07	+ 0,06	0,11	+ 0,04	0,03	± 0,03	0,24	± 0,15

l'abondance du transcrit *ycf1*, relative au transcriptome plastidial, ne varie pas pendant les deux premiers stades de développement (DAF 2/4 et DAF 6/11) puis sa proportion diminue à partir de la dessiccation de la graine (DAF 13/15). Au contraire, l'abondance des transcrits *clpP*, *orf77* et *ycf4* augmente à partir du stade DAF 13/15.

Les profils d'expression des transcrits *cemA*, *matK* et *ycf3* montrent une augmentation permanente de leur abondance de l'embryogenèse jusqu'au stade graine sèche (stade 0) à l'image des transcrits de la classe « transcription ».

Enfin, le transcrit *accD* possède un profil particulier puisque son abondance reste constante au cours du développement de la graine.

### III-9. Expression des transcrits antisens plastidiaux

Les transcrits antisens sont peu présents pendant la formation des graines. Ils s'accumulent majoritairement pendant le stade de maturation (DAF 6/11) où ils représentent au maximum 4 % du signal détecté sur le macroarray (**Figure 16B**). On détecte également toujours les mêmes transcrits antisens au cours du développement de la graine. Ce sont principalement les transcrits antisens des gènes photosynthétiques *psbA*, *psaJ*, *psbE* et *rbcL* ainsi que quelques transcrits de la classe « traduction » comme *rpl33* ou *rps18*. Ces transcrits antisens correspondent globalement à des gènes dont le transcrit sens est assez fortement exprimé.

L'accumulation de ces antisens résulte parfois de la production d'un transcrit sens sur le brin opposé du génome plastidial. Par exemple, la synthèse du messager de *psbN* produit un antisens du gène *psbT*. Leur rôle reste pour le moment mal caractérisé. Ils pourraient dans certains cas protéger les transcrits sens d'une dégradation

nucléolytique lors d'un stress photo-oxydatif, par exemple par l'association des deux ARNm sens et antisens d'un gène (Zghidi-Abouzid et al., 2011).

Les résultats obtenus par les expériences de macroarray montrent que le profil d'accumulation des transcrits plastidiaux est différent pendant les trois stades de formation de la graine. Dès l'embryogenèse (DAF 2/4), les gènes codant les protéines photosynthétiques sont les plus exprimés suggérant que la régulation de l'expression du génome plastidial s'oriente déjà vers la phase photosynthétique qui va suivre.

Le niveau d'accumulation des messagers est ensuite maximal pendant la période de maturation (DAF 6/11) pendant laquelle la photosynthèse est active. On note ainsi une grande différence d'accumulation entre les gènes codant les sous-unités plastidiales des gènes photosynthétiques et celle des gènes appartenant aux classes « transcription » et « traduction ».

Au cours de la dessiccation (DAF 13/15), l'accumulation de tous les transcrits photosynthétiques diminue, à l'exception de *psbA*. Les changements du profil d'expression proviennent ainsi majoritairement de la baisse quantitative des ARNm liés à la fonction photosynthétique puisque l'abondance des autres types de transcrits reste stable ou augmente légèrement. De plus, la comparaison des profils des macroarrays des stades d'embryogenèse (DAF 2/4) et de dessiccation (DAF 13/15) suggère que l'expression du génome plastidial peut être différente entre deux stades non photosynthétiques.

#### IV. Discussion et conclusion

Cette première partie de mon travail a été initiée par des travaux dans l'équipe remettant en cause le modèle de mise en place des polymérases plastidiales lors des phases précoces de développement de la jeune plantule. En effet, les fonctions principales de ces deux polymérases avaient conduit Mullet à suggérer que, lors de la germination, seules les NEP étaient actives et transcrivaient les gènes de ménage nécessaires à la reprise des activités métaboliques (Mullet, 1993). Parmi ces gènes de ménage figuraient les gènes codant le second système transcriptionnel plastidial, la PEP. Cette enzyme, synthétisée lors de la différenciation des proplastides en chloroplastes au moment de l'apparition des cotylédons, transcrit préférentiellement les gènes photosynthétiques. Or, ce modèle a été remis en cause par des travaux dans l'équipe (Demarsy et al., 2006) montrant que, pendant les toutes premières étapes de la germination, dès l'imbibition, la PEP est non seulement présente mais est également active.

En effet, l'inhibition spécifique de cette polymérase par un antibiotique (la tagétine) provoque un retard de germination des graines traitées. Si les messagers et les protéines du système transcriptionnel sont présents dans la graine, leur expression et leur régulation au cours de la formation de la graine restent inconnues mais conditionnent leur présence dans la graine sèche et donc l'efficacité de la germination. La première partie de mon travail a consisté à analyser l'expression du plastome au cours de la formation de la graine d'*Arabidopsis thaliana*. Cette formation est caractérisée par trois stades développementaux que nous avons déterminés selon nos conditions de culture. Le premier stade se déroule du deuxième au quatrième jour après fécondation (DAF 2/4) et correspond à l'embryogenèse. Du sixième au onzième jour après fécondation (DAF 6/11) la graine entre dans la période de maturation où elle accumule des réserves en vue de son stockage et de sa germination. Chez *Arabidopsis*, comme chez la plupart des légumineuses et des graines à réserves oléagineuses, cette période est également caractérisée par une période photosynthétique transitoire. Enfin, le dernier stade (DAF 13/15) de dessiccation achève la formation de la graine avant d'atteindre le stade graine sèche.

### **Les transcrits photosynthétiques sont les transcrits plastidiaux majoritaires au cours du développement de la graine**

Nous avons donc analysé l'expression du plastome pendant la formation de la graine. L'étude globale de l'expression du génome plastidial, réalisée à l'aide d'un microarray permettant d'analyser simultanément l'accumulation de 79 transcrits plastidiaux, montre que le profil d'expression est modifié selon le stade de formation de la graine (**Figure 16**). Les gènes photosynthétiques sont déjà les plus présents au stade d'embryogenèse (DAF 2/4) suggérant qu'au niveau moléculaire, l'expression des gènes est déjà orientée vers le métabolisme photosynthétique. Le plus fort taux d'accumulation des transcrits est observé pendant la période de maturation (DAF 6/11). A ce stade, la quantité ou l'abondance des messagers codant les gènes des différents complexes photosynthétiques (photosystème I et II, ATP synthase et cytochrome  $b_6/f$ ) est deux fois supérieure à celles des transcrits des gènes de ménage des classes « transcription » et « traduction ». Finalement, pendant la dessiccation, tous les messagers diminuent, à l'exception du transcrit *psbA*, et la différence entre l'expression des gènes photosynthétiques et des gènes de ménage est réduite. Les changements des profils d'expression entre chaque microarray proviennent ainsi essentiellement de la variation d'accumulation des transcrits photosynthétiques.

Les mécanismes conduisant au maintien du transcrit *psbA* à un fort niveau d'accumulation au cours de la dessiccation ne sont pas clairs. Il n'est techniquement pas

possible de préparer des plastes à partir de graines d'*Arabidopsis* en cours de développement et réaliser des expériences de run-on. Ainsi, nous ne pouvons pas savoir si ce profil provient d'une synthèse *de novo* qui continue lors de la dessiccation ou si les transcrits *psbA* est spécifiquement protégé des mécanismes de dégradation. S'il y a protection, celle-ci ne semble en tout cas pas provenir de l'hybridation de ce transcrit avec son antisens comme cela a récemment été démontré pour le transcrit *psbT* (Zghidi-Abouzid et al., 2011). En effet, bien que l'antisens de *psbA* soit l'un des transcrits antisens les plus exprimés au cours de la formation de la graine, son accumulation reste relativement faible comparée au transcrit sens et ne permettrait d'en protéger qu'une faible proportion. De plus, *psbA* possède un profil atypique au cours de la germination. En effet, son accumulation diminue fortement pendant la reprise des activités métaboliques, contrairement aux autres transcrits plastidiaux, avant de s'accumuler seulement lorsque la germination est terminée (Demarsy et al, soumis). Les transcrits *psbA* sont donc dégradés au cours de la germination. Ils ne doivent donc pas être protégés contre les mécanismes de dégradation. Ce profil pourrait laisser supposer que le transcrit *psbA* est utilisé comme réserve de nucléotides pour la synthèse des autres transcrits au cours de la germination.

La dégradation, la protection ou la synthèse des transcrits, qu'ils soient nucléaires ou plastidiaux, semble néanmoins spécifique à chaque gène. En effet, au cours de la dessiccation, l'accumulation des transcrits photosynthétiques nucléaires est par exemple fortement diminuée tandis que l'accumulation des transcrits nucléaires codant la machinerie transcriptionnelle plastidiale augmente. Il en est de même pour les transcrits plastidiaux : tandis que les transcrits de l'opéron ribosomique *rrn* initiés au promoteur PC restent stables, les transcrits du même opéron ribosomique initiés au promoteur P2 diminuent. Le même type d'observation est effectué pour le transcrit *psbA*, qui est stable alors que les ARNm codant les sous-unités plastidiales des complexes photosynthétiques diminuent.

### **L'accumulation des ARNm de l'appareil transcriptionnel plastidial n'est pas coordonnée à celle des protéines correspondantes au cours de la formation de la graine**

Nous avons mis en évidence, dans la graine en cours de dessiccation, une synthèse *de novo* des transcrits de l'appareil transcriptionnel plastidial codés par le génome nucléaire. En effet, le niveau des transcrits des NEP RPOTmp et RPOTp, ainsi que celui de la plupart des facteurs sigma, augmente après le stade de maturation (**Figure 10**). L'analyse par immunodétection de certains composants de l'appareil

transcriptionnel plastidial montre que le niveau des protéines ne correspond pas au niveau d'accumulation des ARNm. En effet, les protéines analysées sont plus fortement accumulées pendant l'embryogenèse et la maturation, au moment où la transcription du plastome est maximale (**Figure 11**). Au cours de la dessiccation, ces protéines deviennent quasiment indétectables. Cette baisse est significative et n'est pas liée à la dilution du signal des protéines à cause de la forte accumulation des protéines de réserves au cours de la dessiccation (**Figure 12**). Ainsi, les ARNm des NEP synthétisés pendant la dessiccation ne sont pas traduits. Ce profil n'est pas généralisé à l'ensemble du génome plastidial puisque pour les gènes photosynthétiques par exemple, le niveau d'accumulation des transcrits correspond à celui des protéines (**Figure 13**).

En résumé, l'expression des composants de l'appareil transcriptionnel plastidial révèle une opposition entre l'augmentation de l'accumulation des transcrits au cours de la dessiccation et l'accumulation majoritaire des protéines correspondantes pendant l'embryogenèse et la maturation.

### **L'accumulation des protéines et des messagers de l'appareil transcriptionnel plastidial au cours de la formation de la graine conditionne l'efficacité de sa germination**

La comparaison des cinétiques d'accumulation des transcrits et des protéines au cours de la formation de la graine suggère que les protéines plastidiales présentes dans la graine sèche sont des reliquats des protéines synthétisées au cours de la période de maturation. En revanche, l'augmentation spécifique des messagers codant la machinerie transcriptionnelle plastidiale (PEP, NEP et SIGs) au cours de la dessiccation et leur stockage dans la graine sèche met en avant l'importance de ces ARNm pour la germination. Au regard de cette observation, ces messagers seraient même probablement plus importants que la faible quantité de polymérase (PEP et NEP) et de facteurs sigma (seul SIG3 est peut-être présent dans la graine sèche ; Privat et al., 2003) stockée dans la graine sèche.

Cependant, l'activité spécifique des polymérase plastidiales dans les premières étapes du processus de germination n'est pas connue. Par exemple, dans les feuilles de maïs, elle est très différente au cours de la différenciation des plastes (Cahoon et al., 2004). Même en faible nombre, les molécules d'ARN polymérase peuvent montrer une activité enzymatique très importante. L'activité spécifique des polymérase plastidiales stockées dans la graine pourrait donc néanmoins être importante. De récentes études de l'équipe ont montré que la synthèse des transcrits plastidiaux augmente dès la stratification et semblent précéder le début de la traduction dans les plastes (Courtois et al.,

2007 ; Demarsy et al., soumis). Ces résultats confirment l'importance du stockage des polymérases dans la graine sèche pour la germination.

Lorsque l'on s'intéresse au stockage des transcrits des appareils transcriptionnels plastidiaux, il est nécessaire de différencier les transcrits d'origine nucléaire des transcrits codés directement dans le plastome. En ce qui concerne les transcrits d'origine nucléaire, des études ont montré depuis longtemps l'existence à l'intérieur des graines sèches d'une grande quantité d'ARN stockés et traductibles (Dure et Waters, 1965). Des expériences menées grâce à des inhibiteurs de la transcription nucléaire ( $\alpha$ -amanitine) et de la traduction cytoplasmique (cycloheximide) ont montré que la germination peut toujours s'effectuer en présence d' $\alpha$ -amanitine mais est impossible en présence de cycloheximide. Ces résultats montrent l'importance du stockage des transcrits d'origine nucléaire dans la graine pour assurer la production immédiate de protéines au cours de la germination (Rajjou et al., 2004).

De la même manière, il semble que les transcrits d'origine nucléaire des NEP RPOTmp et RPOTp et des facteurs sigma stockés dans la graine soient importants pour la germination. Cependant, il reste difficile de prouver si les transcrits stockés dans la graine sont ceux utilisés pour la traduction lors de la germination. En effet, les messagers et les protéines de RPOTp augmentent tous les deux pendant la stratification. Les protéines RPOTmp et SIG3 augmentent quant à elles pendant la germination tandis que les messagers correspondants augmentent déjà pendant la stratification (Privat et al., 2003 ; Demarsy et al., 2006). Ainsi, nous ne pouvons pas distinguer si la synthèse des protéines provient de la traduction d'ARNm stockés ou d'ARNs nouvellement synthétisés. Il est probable que la synthèse *de novo* des ARNm augmente les possibilités de traduction des messagers et favorise donc une production suffisante et rapide des ARN polymérases correspondantes et des facteurs de transcription pendant la germination.

Au cours de la stratification, la PEP transcrit principalement l'opéron ribosomique *rrn* à partir du promoteur P2 tandis que les NEP transcrivent de nombreux gènes. RPOTp transcrit les gènes de l'opéron *rpoB* et de nombreux gènes codant des protéines ribosomiques tandis que RPOTmp transcrit l'opéron ribosomique *rrn* à partir du promoteur PC (Courtois et al., 2007 ; Demarsy et al., soumis) ainsi que des gènes mitochondriaux (Kühn et al., 2009). Ainsi, la polymérase PEP stockée dans la graine pourrait être suffisante pour transcrire cet unique opéron *rrn*. Au contraire, la quantité de polymérases NEPs stockée ne permettrait pas d'assurer une transcription suffisante des gènes de ménage pendant la germination. La néosynthèse des polymérases NEP semblerait donc indispensable pour l'efficacité de la germination.

En ce qui concerne les transcrits d'origine plastidiale, de nombreux messagers codés par le génome plastidial, exceptés les transcrits des sous-unités de la PEP, diminuent pendant la dessiccation mais une partie d'entre eux est stockée dans la graine sèche. Pendant la germination, les transcrits codant les protéines des gènes de ménage (sous-unités de la PEP et protéines ribosomiques par exemple) sont déjà produits pendant la stratification alors que l'augmentation des protéines correspondantes n'est pas encore observée. Les protéines des gènes de ménage et des gènes photosynthétiques augmentent seulement plus tard au cours du développement. Pour ces gènes plastidiaux, la transcription précède donc la traduction (Demarsy et al., soumis). Le rôle potentiel des transcrits stockés dans la graine en vue de la germination devient donc moins pertinent.



## **Chapitre II**

# **Mise au point d'une microméthode de détection des ADNc**

---

---

Les analyses du transcriptome du génome plastidial des graines d'*Arabidopsis thaliana* au cours de leur formation réalisées par macroarray et présentées au cours du chapitre précédent ont mis en évidence que les données obtenues pour les gènes faiblement exprimés sont souvent peu précises. Les dépôts générés par l'hybridation des ADNc marqués radioactivement sont en effet à la limite de la détection permise par la technique et le logiciel de quantification du signal. Cela conduit notamment, après répétitions de l'hybridation et quantification, à des écarts types très importants, souvent supérieurs à 50 % de la valeur moyenne. Par exemple, sur le macroarray du stade embryonnaire DAF 2/4 présenté au cours du premier chapitre, environ 60 % des transcrits (majoritairement des transcrits peu accumulés) sont concernés par ce problème. Cette proportion n'est plus que de 30 % pour le stade de maturation DAF 6/11 soulignant une amélioration de la reproductibilité de la quantification lorsque le signal d'hybridation est plus fort (voir Annexe III).

Une des possibilités pour augmenter l'intensité du signal des transcrits faiblement exprimés sur le macroarray consiste à exposer plus longuement les écrans photosensibles. Cette possibilité est cependant limitée par la période du  $^{32}\text{P}$  qui conduit à une diminution de l'intensité du signal radioactif de moitié tous les 15 jours. Une autre possibilité pour amplifier le signal est d'utiliser plus de radioactivité ou d'ARN. Dans ce cas se pose alors le problème inverse : le signal produit par les messagers fortement exprimés est saturé et la distinction de leur niveau d'accumulation devient impossible. De plus, les difficultés liées à la récolte des graines en cours de formation, notamment pendant le stade embryonnaire DAF 2/4, limitent fortement les possibilités d'augmenter la quantité d'ARN. Nous avons donc cherché au cours de ce travail à mettre au point une autre technique de marquage et d'hybridation des ADNc permettant d'abaisser le seuil de détection des messagers et de diminuer la quantité de matériel nécessaire à l'hybridation. Ce chapitre présente les résultats préliminaires obtenus par cette technique.

## I. Présentation du projet

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Laboratoire Interdisciplinaire de Physique (LIPhy) et le laboratoire Biopuces à Grenoble. L'objectif de ce projet est triple. Le premier objectif est d'abaisser le seuil de détection afin d'améliorer la visualisation et la reproductibilité de la quantification des transcrits les plus faiblement accumulés. Pour cela, l'hybridation ne se déroule plus sur une membrane de nitrocellulose mais sur une lame de quartz. De plus, le marquage des transcrits n'est plus effectué par radioactivité mais par fluorescence. En effet, des études relativement anciennes montrent que la sensibilité des techniques basées sur la fluorescence permet d'abaisser le

seuil de détection au niveau d'une molécule unique (Xie et Trautman, 1998). Ce n'est pourtant que plus récemment que ces méthodes ont été adoptées pour la détection et le comptage de molécules uniques sur des microarrays (Hesse et al., 2006 ; Mir, 2006) permettant la détection d'une très faible quantité d'oligonucléotides.

Le second objectif est de pouvoir faire la distinction entre les messagers de longueurs différentes à l'intérieur d'un même dépôt. Nous avons vu au cours du chapitre précédent que de nombreux gènes plastidiaux possèdent plusieurs promoteurs et que leurs ARN peuvent subir une coupure nucléolytique dans la région 5'UTR (transcrit « processé »). Ces mécanismes conduisent à la formation de transcrits de tailles différentes. Afin de distinguer tous les transcrits générés pour un même gène, la première possibilité est de réaliser des extensions d'amorce. Cette technique permet de cartographier avec précision les régions promotrices d'un gène mais requiert néanmoins une quantité d'ARN (10 µg en moyenne par gène) incompatible avec celle obtenue à partir des graines en cours de formation. La seconde possibilité est de réaliser des RT-PCR quantitatives en choisissant judicieusement les amorces. Cette technique est avantageuse d'un point de vue matériel (1µg d'ARN permet l'analyse de plusieurs gènes) mais reste cependant très longue à réaliser et donc difficilement applicable dans le cas d'une étude globale comportant de nombreux gènes. L'utilisation de la fluorescence combinée à la possibilité de détecter une molécule unique pourrait permettre de réaliser la distinction à l'intérieur d'un même dépôt de transcrits de tailles différentes. En effet, selon la longueur du transcrit, plus ou moins de fluorescence devrait être incorporée dans l'ADNc en cours de sa synthèse lors de l'étape de rétrotranscription. De ce fait, l'intensité du signal fluorescent devrait être proportionnelle à la quantité de fluorophores incorporée et donc à la taille du transcrit.

Le troisième objectif est de diminuer la quantité de matériel nécessaire pour réaliser l'hybridation. En effet, les expériences de macroarray réalisées au cours du premier chapitre nécessitent 2 µg d'ARN dépourvu d'ADN contaminant. Cette quantité est difficile à obtenir à partir des graines en cours de formation, notamment pour les graines du stade embryogénique (DAF 2/4).

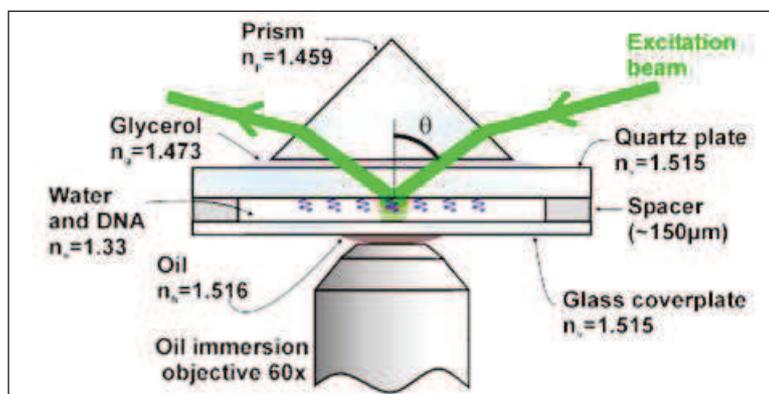
La faisabilité du projet repose sur des expériences préalables réalisées par le laboratoire LIPhy montrant la possibilité de mesurer en temps réel la concentration, sur une surface définie, de molécules d'ADN fluorescentes fixées sur un support solide (Delon et al., 2006). Ces expériences étaient basées sur la technique de FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy, Webb, 2001). De par son temps d'acquisition, cette méthode n'est pas adaptée à l'étude globale du génome plastidial d'*Arabidopsis thaliana*. En revanche, l'imagerie de molécules uniques semble plus prometteuse, comme nous allons le voir ci-dessous.

## II. Principe de la technique optique utilisée

La détection et la révélation de l'hybridation sur les lames sont effectuées par le laboratoire LIPhy par microscopie TIRF. Cette technique permet d'imager des molécules fluorescentes sur la surface d'une lame de verre. L'excitation de la fluorescence n'a en effet lieu que sur une très faible épaisseur (environ 100 nm) au niveau de l'interface entre la lame et l'eau (**Figure 19**). De cette manière, et comparativement aux techniques classiques d'observation de fluorescence par microscopie, le bruit de fond dû aux molécules plus éloignées de la surface est fortement diminué. L'utilisation de cette technique dans le cadre de notre projet permet l'acquisition du signal fluorescent d'un dépôt sans risquer d'altérer le signal des dépôts environnants sur la lame.

Figure 19. - Principe du TIRFM.

La lame sur laquelle l'ADN est déposé est observée à l'aide d'un microscope inversé après excitation par un laser (excitation beam). L'onde réfractée est détectée par un dispositif approprié.  $n$  : indice de réfraction.



## III. Mise au point de la méthode

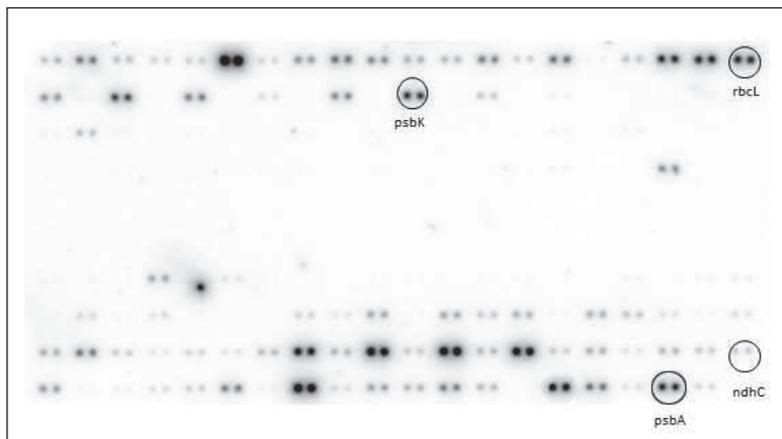
### III-1. Choix des gènes et design des amorces

Nous cherchons à vérifier que la technique mise au point permet de faire la distinction entre le niveau d'accumulation de plusieurs transcrits. Nous avons donc sélectionné quatre gènes dont le niveau d'expression sur le macroarray est sensiblement différent : le gène *psbA*, qui est généralement le plus exprimé (voir Chapitre I), le gène *rbcl* (fortement exprimé), le gène *psbK* (faiblement exprimé) et le gène *ndhC* (très faiblement exprimé). Le résultat de l'accumulation de ces transcrits après hybridation sur macroarray est présenté **Figure 20**. La présence de deux gènes faiblement ou très faiblement exprimés permettra de comparer les limites de détection des deux techniques.

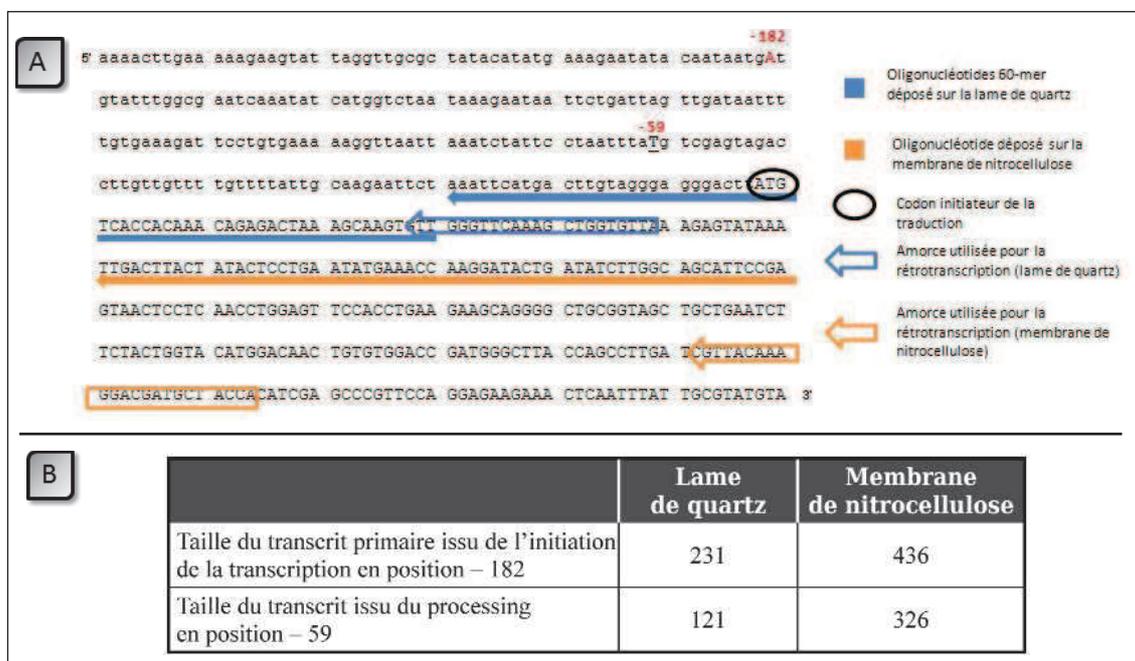
Les oligonucléotides déposés sur la lame de quartz sont des 60-mers dont l'extrémité 5' est aminée afin de permettre leur accrochage au support. Les séquences déposées pour les gènes *psbA*, *psbK* et *ndhC* sont identiques à celles déposées sur la membrane de nitrocellulose afin de comparer seulement les deux méthodes de détection (l'hybridation s'effectue *a priori* avec les mêmes paramètres physico-chimiques).

**Figure 20. - Localisation des transcrits *psbA*, *rbcL*, *psbK* et *ndhC* sur les macroarrays.**

Profil d'expression des ARNm plastidiaux. Les membranes de macroarray sont hybridées avec les ADNc marqués (300 000 cpm) synthétisés à partir de 2 µg d'ARN total extraits de feuilles de 6 jours. Après exposition contre des écrans photosensibles, l'image est numérisée. La localisation des transcrits sélectionnés pour l'hybridation sur lame est indiquée par des cercles.



Seule la séquence de l'oligonucléotide correspondant au gène *rbcL* est modifiée. En effet, afin de pouvoir distinguer deux molécules fluorescentes de longueur différente, il est nécessaire que la différence de taille soit au moins d'un facteur 2 afin que la variation d'intensité du signal puisse être mesurée (résultats préliminaires obtenus par le laboratoire LIPhy). La position de l'oligonucléotide 60-mers du gène *rbcL* déposé sur la lame de verre et l'amorce utilisée pour la rétrotranscription ont donc été modifiées par rapport aux expériences d'hybridation sur membrane de nitrocellulose. Ce repositionnement permet d'introduire un facteur 2 entre la taille du transcrit long et celle du transcrit « processé » (**Figure 21**).

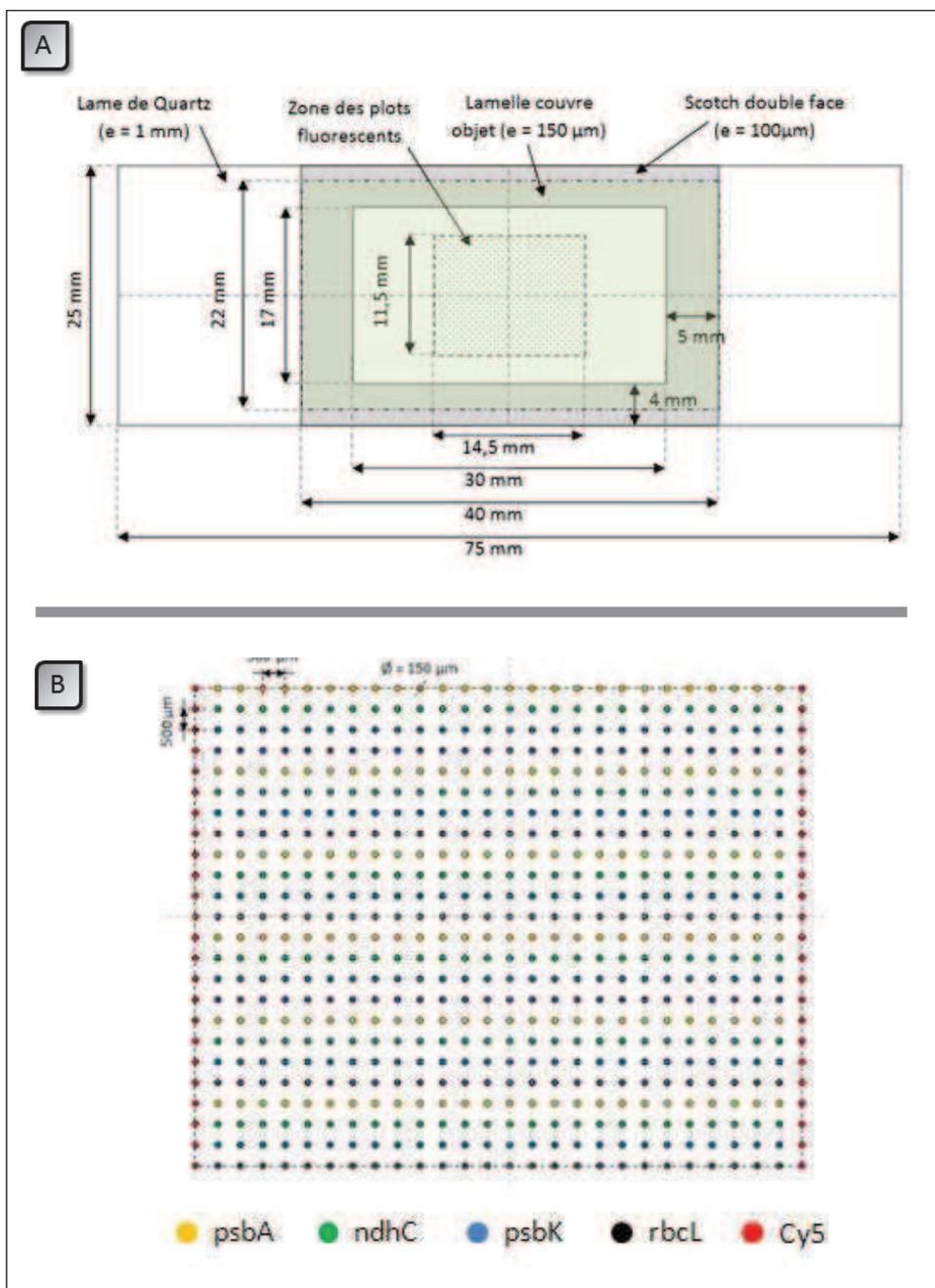


**Figure 21. - Taille attendue des transcrits *rbcL* s'hybridant sur lame et sur membrane de nitrocellulose.**

- A** Séquence de la région promotrice du gène *rbcL*. Le sens des amorces utilisées (5' vers 3') est indiqué par la direction de la flèche. Nucléotide en rouge (position - 182) : site d'initiation de la transcription. Nucléotide souligné (- 59) : site de coupure nucléotydique dans la région 5' UTR (processing).
- B** Tableau récapitulatif des tailles attendues. Les positions de l'amorce 3' et de l'oligonucléotide déposé varient, générant des fragments de taille différente pour l'hybridation sur lame de quartz et sur nitrocellulose.

### III-2. Plan de dépôt des oligonucléotides

Le dépôt des oligonucléotides sur les lames a été réalisé par le laboratoire Biopuces. Au total, 9 fmoles d'oligonucléotides sont déposées sur des lames de quartz en trois injections de 300 pL. Les lames de quartz produisent moins d'autofluorescence que les lames de verre et permettent ainsi de minimiser le bruit de fond. Avant la réalisation des dépôts, les lames sont traitées chimiquement afin de faciliter l'accrochage des oligonucléotides selon un protocole confidentiel mis en place par le Laboratoire Biopuces. Le plan de spotting est présenté **Figure 22**. La taille de chacun des dépôts,



**Figure 22. - Plan de dépôt des oligonucléotides sur la lame de quartz.**

- A** La zone de dépôt est au centre de la lame de quartz (« zone des plots fluorescents »). Avant révélation au TIRFM, cette zone est recouverte d'une lamelle maintenue en place par un scotch double face servant également de spacer.
- B** Schéma de l'organisation des dépôts.

espacés de 500  $\mu\text{m}$  sur la lame de quartz, est de 150  $\mu\text{m}$  de diamètre. Des plots témoins contenant le fluorophore Cy5 disposés sur les deux plus petits côtés de la lame permettront la calibration du balayage de l'échantillon. Ces plots permettent de réaliser la calibration sans risquer d'altérer le signal fluorescent d'un dépôt d'intérêt.

### ***III-3. Marquage et hybridation***

#### **III-3-1. Choix du fluorophore pour le marquage**

Le fluorophore servant à marquer les ADNc par rétrotranscription des ARN a été sélectionné pour sa compatibilité avec le laser HeNe (633 nm) utilisé pour la microscopie. Il s'agit de l'Alexa647 (Invitrogen) car il présente une meilleure stabilité au photoblanchiment que le fluorophore Cy5 par exemple. L'Alexa647 est donc plus adaptée au temps d'acquisition nécessaire pour la visualisation des dépôts. Les tests réalisés avec les deux fluorophores commerciaux disponibles (dUTP et dCTP) n'ont pas révélé de différence significative dans le marquage des transcrits, nous avons donc choisi le dCTP.

#### **III-3-2. Détermination de la quantité optimale de fluorophore pour la rétrotranscription**

Préalablement aux analyses, nous avons déterminé la quantité optimale de fluorophore à utiliser lors de la rétrotranscription des ARN. Ces expériences ont été réalisées dans l'équipe par Emeline Lambert. La rétrotranscription se déroule en présence d'un mélange de nucléotides marqués dilués par des nucléotides « froid ». La rétrotranscription a été effectuée avec des concentrations croissantes d'Alexa647 en présence d'une amorce spécifique du gène *rbcL* selon la méthode décrite dans la section Matériel et méthodes. L'accumulation du messager *rbcL* a ensuite été amplifiée par PCR. Les résultats ont montré que la concentration optimale de fluorophore est de trois nucléotides froids pour un nucléotide marqué. En effet, aucune amplification n'est observée pour des concentrations plus élevées en fluorophores suggérant que la rétrotranscription n'a pas eu lieu ou a été fortement diminuée. Cette inhibition peut être causée par l'encombrement stérique de la molécule fluorescente qui empêche son incorporation. Ce résultat pourrait donc poser problème pour la distinction de la taille des molécules, puisque basée sur la différence d'intensité de la fluorescence et donc sur le nombre de molécules fluorescentes incorporées pendant la rétrotranscription.

### III-3-3. Réaction de rétrotranscription, purification des ADNc néosynthétisés et hybridation sur les lames de quartz

La réaction de rétrotranscription des ARN en ADNc a été réalisée dans les conditions décrites dans la section Matériel et méthodes à partir de 2 µg d'ARN extraits de plantules de 6 jours préalablement traitées à la DNase. Afin de pouvoir comparer les résultats avec ceux obtenus sur membrane de nitrocellulose, nous avons utilisé les mêmes conditions de marquage et d'hybridation. Quelques adaptations et précautions supplémentaires sont néanmoins nécessaires.

Tout d'abord, toutes les réactions se déroulent dans l'obscurité afin de limiter au maximum la dégradation du fluorophore. De plus, toutes les solutions sont filtrées sur membrane 0,2 µm afin d'éliminer les impuretés pouvant se déposer sur les lames de quartz et altérer la qualité de révélation. Les ADNc marqués sont purifiés sur colonne Microspin G-25 selon les indications du fournisseur. Cette étape permet d'éliminer les nucléotides fluorescents non marqués. L'hybridation sur la lame de quartz se déroule pendant 24 heures dans un tube Falcon 50 mL en présence de 35 mL de tampon d'hybridation contenant 30 µL de sonde marquée par le fluorophore.

## **IV. Résultats préliminaires**

### ***IV-1. Rendement d'incorporation des dCTP fluorescents***

Le rendement d'incorporation des dCTP fluorescents a été mesuré suite à la production et au marquage de deux ADNc de longueurs différentes issu du gène *rbcL* (expérience réalisée par Emeline Lambert). Les ADNc correspondant ont été synthétisés par transcription *in vitro*. Le transcrit long est composé de 306 bases dont 74 résidus C tandis que le transcrit court a une taille de 147 bases dont 45 résidus C. Les mesures des propriétés photophysiques de ces deux ADNc, réalisées par le laboratoire LIPhy par FCS, ont permis de définir le rendement d'incorporation des dCTP fluorescents par comparaison aux propriétés de l'Alexa647 libre. Ces résultats indiquent qu'en moyenne, respectivement pour le transcrit court et pour le transcrit long, seulement 0,5 et 1,8 molécules fluorescentes sont incorporées au cours de la rétrotranscription (Delon et al., 2010). Ce faible rendement d'incorporation du fluorophore (moins de 2 % des sites potentiels ont incorporé le fluorophore) est probablement lié à l'encombrement stérique du dCTP marqué qui limite son utilisation par la reverse transcriptase.

Etant donné le faible nombre de molécules fluorescentes incorporées et leur distribution statistique, relier la taille d'une molécule d'ADNc au nombre de fluorophores intégrés et donc à l'intensité de la fluorescence émise s'avère difficile. En effet, malgré le repositionnement de l'amorce et de l'oligonucléotide du gène *rbcL* (voir III-1), la faible incorporation des nucléotides conduira à la création de deux ADNc possédant un nombre comparable de fluorophores incorporés lors de la rétrotranscription. Nous avons donc dû constater que la technique de détection d'ADNc fluorescents par TIRFM ne permet pas de distinguer avec certitude la différence de taille des molécules hybridées sur un même dépôt.

## ***IV-2. Evaluation de la qualité de l'hybridation***

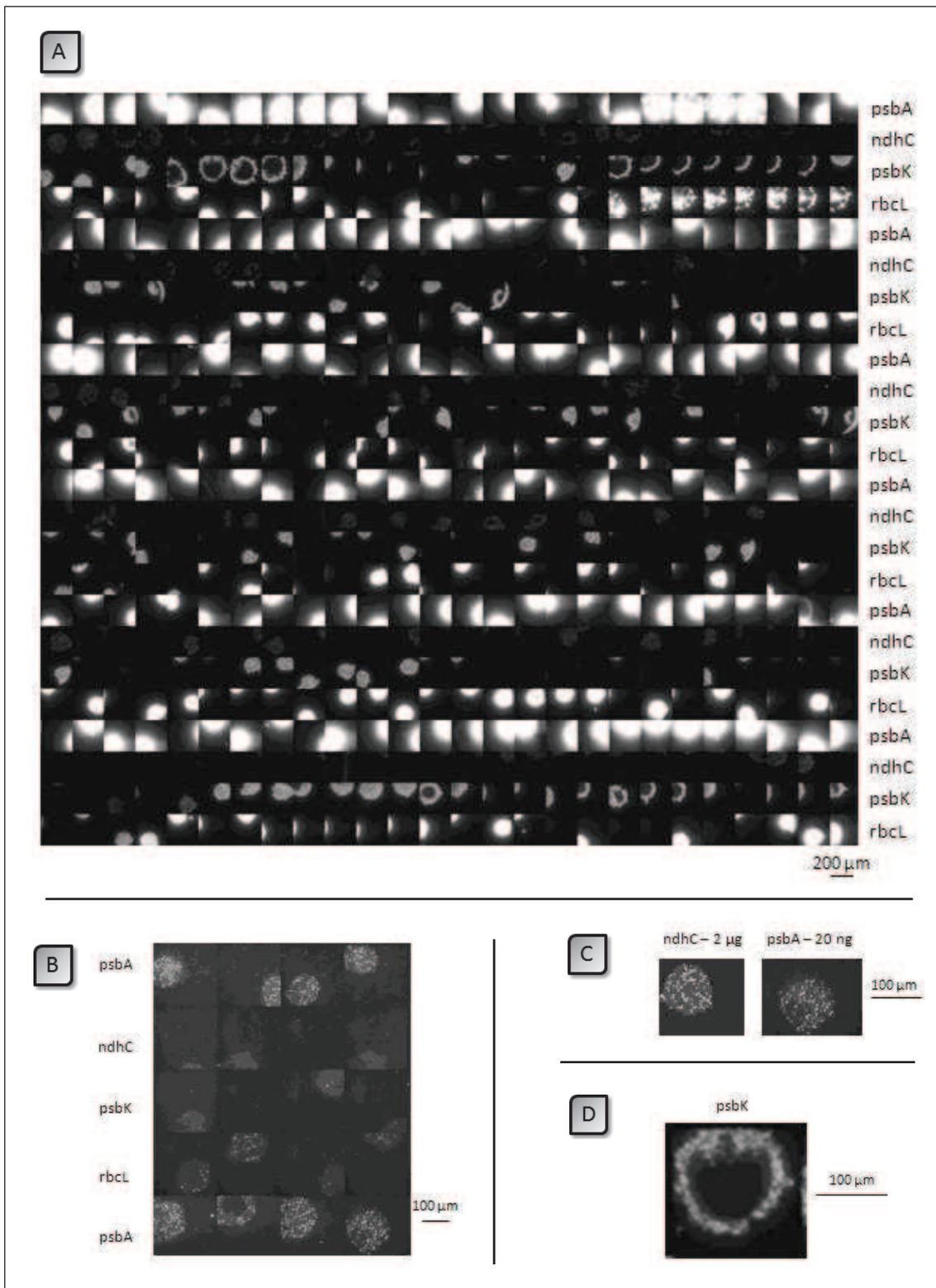
Les ADNc ont été synthétisés à partir de 2 µg d'ARN de feuilles de six jours et marqués par l'incorporation d'Alexa647-dCTP lors de l'étape de rétrotranscription. Ces ADNc sont ensuite hybridés sur la lame de quartz. L'image de la lame visualisée par TIRFM est présentée **Figure 23A**. Chaque case représente la capture d'image correspondant à un dépôt.

### **IV-2-1. Calibration spatiale de la caméra et précision du spotting**

Nous constatons sur la **Figure 23A** que la plupart des dépôts sont excentrés et ne sont donc pas visualisés dans leur intégralité. Ce problème peut provenir de la précision de la géométrie des dépôts et/ou de la calibration spatiale de la caméra. En effet, le dépôt est réalisé sous forme d'un disque de 150 µm de diamètre alors que la taille de l'image capturée est un carré de 200 µm de côté. Le déplacement de la caméra est automatisé mais un décalage minime dans la géométrie du dépôt peut le faire sortir du champ de capture de l'image. Cependant, la quantification du signal reste possible lorsque le signal est homogène puisque le nombre de molécules fluorescentes mesuré est rapporté par unité de surface.

### **IV-2-2. Forme des dépôts**

La forme des dépôts à l'intérieur de la lame n'est pas homogène. Pour les gènes fortement exprimés (*psbA* et *rbcL*), la forme ronde obtenue correspond à celle classiquement observée par hybridation sur membrane de nitrocellulose. Cependant, les formes des dépôts des transcrits *psbK* et *ndhC* sont beaucoup plus irrégulières et hété-



**Figure 23. - Images obtenues par TIRFM de la lame après hybridation.**

Quantité d'ARN utilisée pour la rétrotranscription et le marquage des ADNc : 2 µg (A), 20 ng (B).

C Fluorescence des transcrits *ndhC* et *psbA* selon la quantité d'ARN utilisée pour la rétrotranscription.

D **Agrandissement d'un dépôt du transcrit *psbK*.** Quantité d'ARN utilisée pour la rétrotranscription et le marquage des ADNc : 2 µg.

rogènes et, dans certains cas, l'hybridation semble s'être réalisée uniquement à la périphérie de la forme circulaire attendue (**Figure 23D**). Ce problème semble donc préférentiellement concerner les transcrits les moins exprimés et pourrait provenir d'un artefact, d'un problème lors du contact entre les oligonucléotides et la lame de quartz ou bien d'un problème dans l'évaporation du solvant après le dépôt. Afin d'augmenter l'homogénéité du dépôt, il est envisagé de modifier la composition du tampon de dépôt (communication personnelle du labo Biopuces, composition confidentielle).

### IV-2-3. Quantification du signal

L'intensité de chaque dépôt à l'intérieur d'une même ligne et entre chaque ligne pour un même gène semble relativement constante. Ce profil traduit une bonne reproductibilité de l'hybridation et de la révélation. L'intensité de la fluorescence correspondant au transcrit *psbA* est plus forte que celle correspondant aux transcrits *psbK* et *ndhC*. Il est cependant difficile de distinguer s'il existe une différence d'intensité entre les transcrits *psbA* et *rbcL*. De plus, la relation d'intensité entre les dépôts correspondant aux gènes *ndhC*, *psbK* et *rbcL/psbA* semble correspondre au profil d'hybridation sur membrane de nitrocellulose (**Figure 20**). Cependant, la visualisation et le comptage de molécules uniques n'est possible que pour le transcrit *ndhC*, le plus faiblement exprimé. L'intensité de la fluorescence est en effet suffisamment faible pour distinguer chaque « grain » de lumière correspondant à une molécule d'ADNc hybridée. Il est par contre nécessaire de photoblanchir, c'est-à-dire d'éteindre une certaine quantité de fluorescence des dépôts des trois autres gènes avant de pouvoir procéder à leur quantification.

Afin de déterminer le seuil de détection de la technique, d'autres expériences d'hybridation ont été réalisées en diminuant la quantité d'ARN utilisée d'un facteur 10 puis 100. La rétrotranscription est ainsi réalisée respectivement à partir de 200 et 20 ng d'ARN. Cependant, suite à des problèmes techniques lors de la révélation, la lame réalisée à partir de 200 ng n'a pu être révélée et seul un quart des dépôts de l'hybridation à partir de 20 ng sont exploitables. L'image obtenue dans cette dernière expérience est présentée **Figure 23B**. On constate dans ces conditions que le signal de fluorescence n'est saturé pour aucun des dépôts. Il devient donc possible de visualiser des molécules uniques pour les transcrits *psbA* et *rbcL*, les plus fortement exprimés, en évitant l'étape de blanchiment.

Sur la base de cette observation, nous constatons que les images obtenues respectivement pour le transcrit *psbA* (réalisée à partir de 20 ng d'ARN) et pour le transcrit

*ndhC* (réalisée à partir de 2 µg d'ARN, soit 100 fois plus) sont très comparables (**Figure 23C**). Dans ces conditions, nous pouvons suggérer que la différence d'accumulation entre les transcrits *ndhC* et *psbA* est approximativement d'un facteur 100.

Lorsque seulement 20 ng d'ARN totaux sont rétrotranscrits, nous constatons que le nombre de molécules fluorescentes détectées des transcrits *ndhC* et *psbK* est très faible. Le comptage statistique n'est alors pas fiable. La quantité d'ARN utilisée ici n'est pas suffisante. On en déduit alors que dans les conditions expérimentales utilisées, une même lame ne peut permettre la détection de molécules uniques de tous les transcrits sans avoir recours au photoblanchiment car leur niveau d'expression est trop disparate.

### **IV-3. Comparaison de la quantification des transcrits par hybridation sur macroarray, sur lame et par qRT-PCR**

Afin de valoriser le profil d'hybridation obtenu, nous avons quantifié les rapports entre les transcrits *psbA*, *rbcL*, *psbK* et *ndhC* sur la lame réalisée à partir de 2 µg d'ARN (**Figure 23**) puis nous les avons comparés avec ceux obtenus par macroarray ou qRT-PCR (**Tableau 9**). Les valeurs de qRT-PCR ont été obtenues dans l'équipe par Frank Bühr.

Les ratios entre les quatre gènes obtenus après hybridation sur la lame de quartz ont été calculés par le laboratoire LIPhy. Ces mesures nécessitent de photoblanchir les dépôts des transcrits les plus exprimés (*psbA*, *rbcL* et *psbK*). En effet, l'intensité de la fluorescence de ces dépôts ne permet pas de distinguer des molécules uniques. Le photoblanchiment permet l'extinction d'une certaine quantité de fluorescence jusqu'à pouvoir compter des molécules uniques. La valeur initiale de fluorescence du dépôt peut ensuite être recalculée en tenant compte des paramètres de photoblanchiment. Les dépôts du transcrit le plus faiblement accumulé, *ndhC*, ne nécessitent quant à eux pas de blanchiment car on distingue directement les molécules uniques sur l'image obtenue par TIRFM. Il est intéressant de noter que cette quantification confirme le rapport d'un facteur 100 entre les transcrits *psbA* et *ndhC* estimé précédemment (voir IV-2-2).

Les valeurs obtenues par les différentes techniques montrent une bonne corrélation entre les rapports des transcrits *ndhC* et *psbK* puisque leur ratio reste quasiment identique quelle que soit la technique utilisée (facteur maximum de 1,5). Pour le gène *rbcL*, l'écart est plus important. Le signal quantifié par qRT-PCR est trois fois supérieur à celui obtenu par hybridation sur membrane de nitrocellulose et environ deux fois supérieur à celui obtenu par hybridation sur lame. Cette différence est accentuée

Gènes	Lame	Macroarray	qRT-PCR
<i>ndhC</i>	1	1	1
<i>psbK</i>	5,8	5,2	3,7
<i>rbcL</i>	19	11,5	36
<i>psbA</i>	106	44	301

**Tableau 9. - Proportion relative des transcrits *ndhC*, *psbK*, *rbcL* et *psbA* détectés par hybridation sur membrane de nitrocellulose, par hybridation sur lame de quartz et par RT-PCR quantitative.**

Les valeurs ont été normalisées pour chaque expérience par rapport au gène le plus faiblement exprimé (*ndhC*).

pour le transcrit *psbA* puisqu'on observe un rapport de 7 entre les valeurs obtenues par l'hybridation sur membrane et par qRT-PCR. Ce rapport n'est que de 2,8 entre l'hybridation sur lame et la qRTP-PCR. Il est difficile d'expliquer les causes d'une si grande différence pour les transcrits fortement exprimés. Il est probable que les signaux des expériences d'hybridation s'approchent de la saturation. Les valeurs obtenues pour les transcrits fortement exprimés semblent donc sous-estimées pour ces deux techniques. Cette différence est néanmoins accentuée sur membrane de nitrocellulose.

Afin de préciser cette première analyse, et même si le profil général d'accumulation des quatre transcrits semble respecté, il apparaît indispensable de confirmer ces premiers résultats en répétant les différentes manipulations et d'étendre ces observations à la détection de transcrits d'autres gènes.

## V. Discussion et conclusion

Dans ce chapitre, nous avons exposé les travaux préliminaires en vue de la mise au point d'une nouvelle technique de détection des messagers. Par rapport à la technique d'hybridation sur macroarray utilisée dans le chapitre I de ce travail, nos objectifs initiaux étaient tout d'abord d'améliorer la détection des transcrits faiblement exprimés et ensuite de diminuer la quantité de matériel biologique. Enfin, nous souhaitons pouvoir distinguer, à l'intérieur d'un même dépôt, des transcrits de tailles différentes. Cette technique, développée en collaboration avec les laboratoires LIPhy (CNRS-UJF) et Biopuces (CEA-G), est basée sur le marquage des ADNc par la fluorescence (Alexa647-dCTP) et l'observation des molécules marquées à l'aide de techniques microscopiques extrêmement sensibles, comme la TIRF.

Les résultats préliminaires obtenus montrent qu'après marquage des ADNc par le fluorophore et hybridation sur lame de quartz, la révélation par TIRFM permet de visualiser l'hybridation de molécules uniques (**Figure 23**). Cette technique améliore donc sensiblement le seuil de détection obtenue par hybridation sur membrane de

nitrocellulose. Cet abaissement du seuil de détection permet d'envisager également de diminuer la quantité d'ARN utilisée pour la rétrotranscription. D'après la comparaison des profils d'hybridation réalisée à partir de différentes quantités d'ARN, nous estimons que la quantité idéale pour une hybridation réalisée dans 35 mL de tampon est de 200 ng. Cette quantité permettrait en effet de conserver un signal suffisant pour les transcrits faiblement exprimés. La quantité d'ARN utilisée par rapport à l'hybridation sur membrane de nitrocellulose serait alors diminuée d'un facteur 10. Elle pourrait probablement encore être diminuée d'un facteur 10 ou 100 en diminuant le volume de tampon d'hybridation jusqu'à 100  $\mu$ L, valeur classiquement utilisée pour les hybridations sur lame. La diminution du volume permettrait de faciliter l'interaction des molécules fluorescentes avec les amorces déposées sur la lame de quartz. Cette technique est donc prometteuse pour l'étude transcriptomique des graines en cours de formation et de façon plus générale, pour l'étude d'échantillons peu abondants.

Nos observations montrent qu'au maximum seulement un à deux nucléotides marqués sont incorporés par molécule d'ADNc rétrotranscrite. L'encombrement stérique dû à la présence du fluorophore limite probablement son incorporation dans la molécule d'ADNc et/ou sa manipulation par la reverse transcriptase. Ce faible taux d'incorporation des nucléotides marqués au cours de la rétrotranscription ne permet pas de pouvoir distinguer deux transcrits de tailles différentes à l'intérieur d'un même dépôt comme espéré. De plus, les sites d'initiation de la transcription peuvent être très proches *in vivo*. Cette proximité contraint à sélectionner une amorce proche d'un des sites afin de pouvoir conserver au minimum un facteur 2 entre la taille des ADNc synthétisés par rétrotranscription. Les ADNc plus courts ainsi générés incorporent statistiquement moins de nucléotides marqués et sont potentiellement invisibles ou peu visibles. Dans ces cas, deux transcrits d'un même gène ne seront donc pas observables. Il faudra donc toujours s'orienter vers des techniques complémentaires (extension d'amorce, RT-PCR quantitative, inhibiteurs spécifiques de la transcription, mutants affectés dans l'expression des composants de l'appareil transcriptionnel plastidial) lorsque l'on souhaite différencier des messagers initiés à partir de promoteurs différents et/ou déterminer la nature de la polymérase à l'origine de la transcription du gène étudié.

Notre étude préliminaire a également permis d'identifier des problèmes mécaniques et techniques liés à la fabrication de la lame et à la détection des molécules fluorescentes hybridées. Ainsi, certaines zones de dépôt d'amorces montrent une hétérogénéité de leur surface (**Figure 23D**). Il est possible que ces artefacts soient dus à la technique de dépôt elle-même (par diffusion du liquide à la surface du support vers les

bords du ménisque), à la tension superficielle du mélange tampon-ADNc ou bien à la vitesse d'évaporation de ce tampon. Il apparaît indispensable de répéter ces expériences en modifiant les caractéristiques du tampon de dépôt. Il faudra également résoudre les problèmes liés au déplacement automatisé de la lame sous l'objectif du microscope. Le cadrage des dépôts sur la lame devra ainsi être amélioré de façon à visualiser la totalité de la zone d'hybridation et en conséquence augmenter l'efficacité de la détection. La perte du plan focal lors de la révélation de la lame a par exemple empêché l'observation de la lame réalisée à partir de 200 ng d'ARN. Ce problème, retrouvé fréquemment lors des révélations d'hybridation sur lame par TIRFM, peut être résolu en adaptant le système de visualisation (Hesch et al., 2009).

Malgré les promesses offertes par cette technique d'hybridation et de détection par microscopie TIRF, une autre technique d'analyse de l'expression du transcriptome a été développée récemment et offre de nouvelles possibilités. Cette technique, appelée « deep sequencing » ou « séquençage de masse », consiste à séquencer directement la population de transcrits dans un échantillon (Wang et al., 2009). Après une étape de rétrotranscription, les ADNc néosynthétisés sont généralement fragmentés puis liés à un adaptateur avant d'être séquencés. La longueur des séquences obtenues varient entre 30 et 400 bp et sont alignées par rapport à la séquence connue du génome. Cette méthode permet également d'évaluer le nombre de copies de chaque séquence et est donc quantitative. Le séquençage de masse possède de nombreux avantages. On peut par exemple déterminer les extrémités 5' des messagers et ainsi discerner les différentes tailles d'un même transcrit, ce qui, comme nous l'avons vu, n'est pas possible avec la technique d'hybridation sur lame que nous avons mise au point. Le séquençage massif offre aussi des gammes de quantification du signal beaucoup plus importantes que celles offertes par les techniques d'hybridation (facteur de 1 à 8 000 contre un facteur de 1 à quelques centaines). Ces avantages ont conduit de nombreuses études à utiliser cette méthode afin d'analyser le transcriptome d'espèce eucaryotes comme *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Schizosaccharomyces pombe* ou bien encore des cellules de souris ou des cellules humaines (Nagalakshmi et al., 2008 ; Sultan et al., 2008 ; Mortazavi et al., 2008 ; Lister et al., 2008 ; Cloonan et al., 2008). Néanmoins, la technique de séquençage de masse nécessite une expertise importante dans la gestion et l'analyse bioinformatique des données.

L'émergence de la technique de séquençage de masse peut naturellement conduire à réexaminer l'intérêt des techniques d'analyse transcriptomique par hybridation. Cette question a fait l'objet d'une publication récente (Malone et Oliver, 2011) où les auteurs pointent les problèmes liés à la technique de séquençage de masse. Outre le

fait que la technique est encore relativement récente, comparativement aux techniques d'hybridation, et nécessite donc des mises au point permanentes afin d'en déterminer les limites (par exemple, le problème de l'hétérogénéité de l'efficacité du séquençage est au centre de plusieurs publications), son coût relativement élevé mais surtout les moyens nécessaires pour le traitement des données de séquençage la rendent beaucoup moins accessible que les techniques d'hybridation classiques.

Enfin, le séquençage massif ne permet pas non plus d'améliorer la détection des transcrits très faiblement exprimés. Comme nous l'avons vu lors du chapitre I, les transcrits faiblement accumulés génèrent des signaux qu'il est difficile de quantifier avec précision après hybridation sur membrane de nitrocellulose. Le même problème se pose avec la technique de séquençage. Il faut en effet déterminer le nombre nécessaire de séquençages de l'échantillon pour s'assurer que tous les transcrits ont été détectés. Par exemple, un facteur de transcription impliqué dans le dimorphisme sexuel de la drosophile et connu pour n'être exprimé que dans quelques cellules n'a pas été détecté lors de l'étude du transcriptome de l'animal par séquençage massif (Graveley et al., 2011). La méthode de détection des transcrits par microscopie TIRF, en abaissant le seuil de détection à une molécule fluorescente, est à cet égard plus prometteuse.

## **Chapitre III**

# **Caractérisation de la photosynthèse embryonnaire des graines d'*Arabidopsis thaliana***

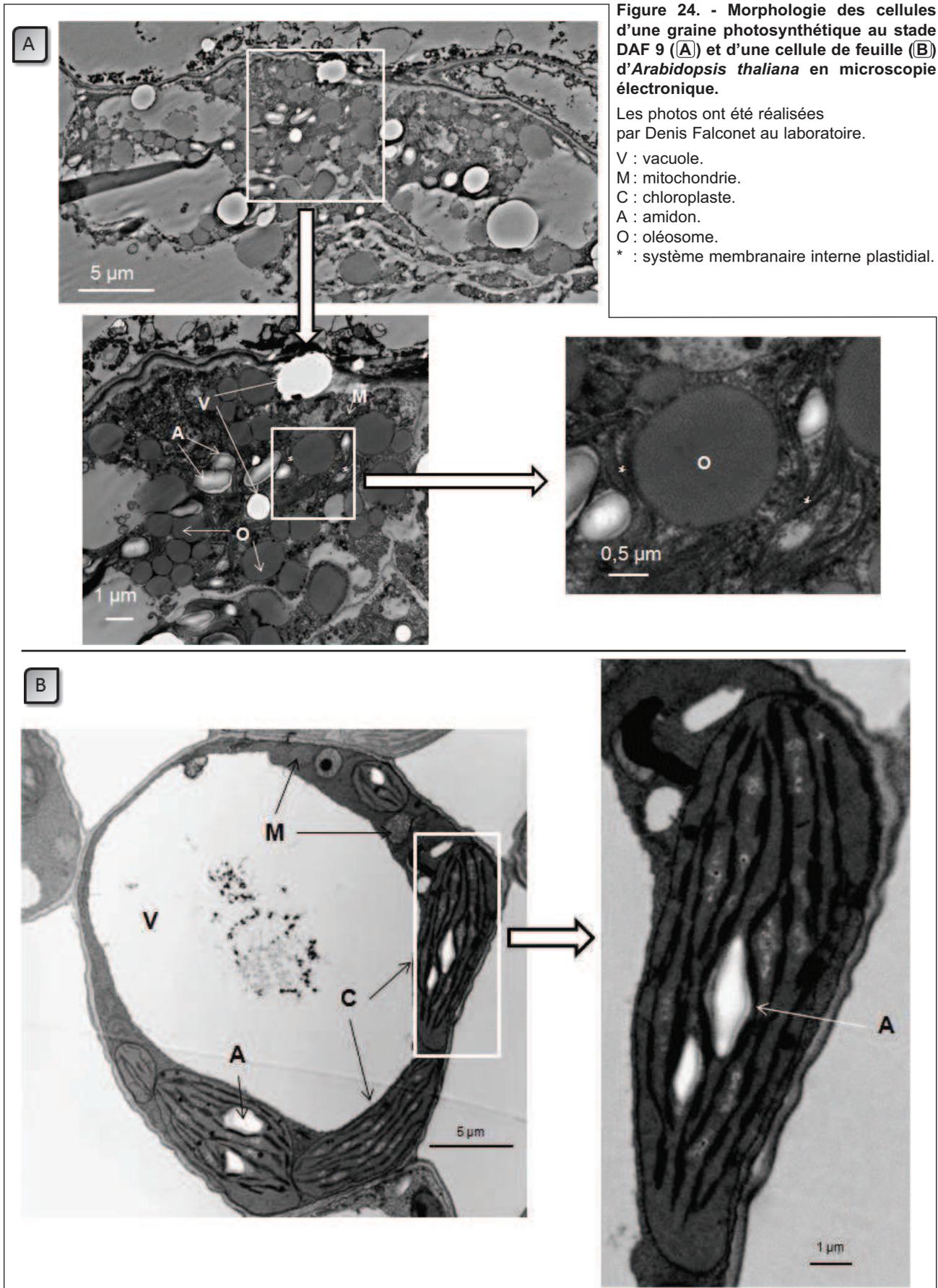
---

---

Nous avons précédemment rappelé qu'au cours de la formation de la graine d'*Arabidopsis thaliana*, l'embryon est transitoirement photosynthétique. Cette différenciation débute lors de la fin de l'embryogenèse et s'étend dans nos conditions de culture du sixième au onzième jour après fécondation (voir Chapitre I).

Dans ce même chapitre, nous avons vu que pendant la formation de la graine, les gènes photosynthétiques sont fortement exprimés et ceci dès l'embryogenèse. Ces gènes sont ensuite fortement réprimés lors de la dessiccation. La question de l'importance du métabolisme photosynthétique pour la formation de la graine et de son rôle dans le développement futur de la plantule est encore peu étudiée. *A priori*, la photosynthèse embryonnaire permettrait la fourniture de squelettes carbonés pour la synthèse des lipides et de l'énergie nécessaire au stockage des réserves (par l'apport d'ATP ou d'équivalents réduits). Elle permettrait également de limiter les conditions d'hypoxie dans la graine en produisant de l'O<sub>2</sub> tout en consommant le CO<sub>2</sub> produit par la respiration mitochondriale (pour revue voir Rolletschek et Borisjuk, 2005). Les graines utilisées pour ces études sont généralement des graines de pois ou d'autres espèces fourragères. De ce fait, au cours des siècles, ces espèces ont toutes subi, depuis la découverte de leur potentiel nutritionnel, une sélection visant à améliorer la qualité ou la quantité des réserves. On peut donc penser que les mécanismes de régulation du métabolisme et de la formation de ces graines se sont éloignés des processus basiques et généraux. Ainsi, peu d'études réalisées jusqu'à présent ont utilisé *Arabidopsis thaliana* comme modèle de travail. La taille de la graine limite généralement les possibilités d'investigation. Nous avons néanmoins choisi cette espèce pour notre étude en raison de son caractère ancestral permettant de s'affranchir du problème de sélection ainsi que des outils disponibles concernant l'analyse de son expression génique.

Dans ce troisième chapitre, nous allons comparer les mécanismes de la photosynthèse dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* à celle des feuilles. Pour cela, nous avons utilisé les graines en maturation (stade DAF 6/11) et des feuilles de la plante adulte. Nous avons tout d'abord caractérisé les conditions de déroulement de cette photosynthèse. En effet, la graine se développe à l'intérieur d'une silique, modifiant les conditions lumineuses et/ou atmosphériques qui influent potentiellement sur l'activité photosynthétique. Nous avons ensuite comparé l'expression des gènes plastidiaux et nucléaires participant à la réaction photosynthétique aux niveaux transcriptionnels et traductionnels. Nous avons alors recherché une modification de l'organisation de l'appareil photosynthétique ou de son fonctionnement. Finalement, nous avons examiné le rôle physiologique de la photosynthèse des graines d'*Arabidopsis thaliana* au regard de la germination. Toutes les expériences réalisées au cours de ce chapitre ont été réalisées en collaboration avec Giovanni Finazzi (CNRS, Laboratoire PCV).



## I. Spécificité anatomique des plastes dans les graines et conditions physicochimiques à l'intérieur de la silique

### *I-1. Morphologie des cellules photosynthétiques et des plastes de graines et de feuilles*

Nous avons comparé en microscopie électronique des cellules de graine photosynthétique (au stade DAF 9) et de feuilles de plantules de 6 jours (collaboration avec Denis Falconnet, CNRS, LPCV) (**Figure 24**). Les cellules des graines (**Figure 24A**) ont une forme irrégulière et comportent plusieurs vacuoles de très petite taille comparée à l'unique vacuole des feuilles qui occupe les trois quarts de l'espace intracellulaire (**Figure 24B**). Le cytoplasme de la cellule de graine contient plus de mitochondries que dans les feuilles. De nombreux corps lipidiques (oléosomes) sont également visibles dans le cytoplasme des graines. Ils sont spécifiques de ces cellules et leur taille varie entre 0,5 et 3  $\mu\text{m}$  de diamètre. Le nombre de grains d'amidon par cellule est quant à lui plus faible dans les graines. Cette observation est cohérente avec la dégradation de l'amidon pendant la fin du stade embryogénique au profit de la synthèse de composés de réserve lipidiques (voir Introduction).

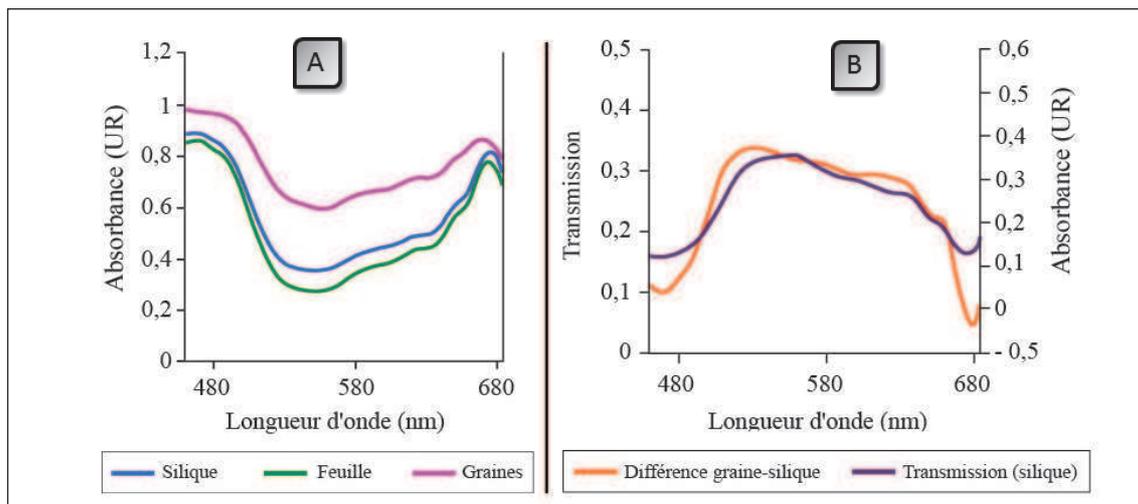
Nous observons sur la **Figure 24A** que les chloroplastes des cellules de la graine sont peu individualisés. Il est difficile de délimiter l'enveloppe, mais on distingue néanmoins des membranes empilées ressemblant aux thylacoïdes autour des grains d'amidon. Ces observations sont conformes à celles de Mansfield et al. (1991) mais ne nous permettent pas de comparer la taille des chloroplastes entre les deux cellules.

En résumé, dans les graines photosynthétiques d'*Arabidopsis thaliana*, les caractéristiques des cellules reflètent leur fonction principale à ce stade de développement. En effet, la grande majorité du métabolisme est orientée vers la production et le stockage de réserves qui sont ensuite mobilisées pendant la germination. Au niveau anatomique, cela se traduit par une augmentation du nombre de mitochondries, la réduction de la taille de la vacuole et par la présence de nombreux corpslipidiques. Dans les cellules de graine, il est très difficile de délimiter les chloroplastes car l'enveloppe n'est pas ou peu visible. Cependant, des empilements de membranes caractéristiques des thylacoïdes sont visibles, suggérant que les structures membranaires nécessaires à la fonction photosynthétique sont bien présentes.

## I-2. Conditions lumineuses à l'intérieur de la silique

La graine d'*Arabidopsis thaliana* se développe à l'intérieur d'une silique. Les conditions lumineuses et atmosphériques dans lesquelles se déroule la photosynthèse embryonnaire sont donc particulières. La lumière doit tout d'abord traverser la silique avant de pouvoir atteindre l'embryon. Différentes mesures effectuées chez les lupins (Atkins et Flinn, 1978), le colza (Eastmond et al., 1996) ou le soja (Rolletschek et al., 2005) montrent que seuls 8 à 30 % de la lumière incidente atteignent l'embryon et que cette quantité diminue graduellement du tégument vers le centre de l'embryon. La qualité spectrale de la lumière est également potentiellement modifiée par la silique. Nous avons donc dans un premier temps mesuré le spectre de la lumière reçue par les graines photosynthétiques d'*Arabidopsis thaliana*.

Pour cela, nous avons tout d'abord comparé la lumière absorbée par les siliques, les feuilles et les graines (**Figure 25A**). Les siliques, les graines et les feuilles absorbent principalement la lumière rouge (longueurs d'onde voisines de 680 nm) et bleue



**Figure 25. - Conditions lumineuses dans les siliques d'*Arabidopsis thaliana*.**

- A** Spectres d'absorption mesurés dans une silique, une feuille de rosette et des graines photosynthétiques d'*Arabidopsis thaliana* (DAF 6/11). Pour limiter la diffusion de la lumière incidente, les tissus ont été collés sur le porte échantillon de façon contigüe. Les valeurs ont été normalisées pour être comparées.
- B** Spectre de transmission de la silique. Spectre de différence graine-silique obtenu à partir des spectres d'absorption en **A**. Les valeurs ont été normalisées pour être comparées.

(longueurs d'onde voisines de 480 nm). Cependant, les graines absorbent significativement plus de lumière verte (longueurs d'onde voisines de 550 nm) que les siliques et les feuilles. Le spectre de la lumière transmise par la silique se superpose parfaitement au spectre de différence graine-silique (**Figure 25B**). En d'autres termes, les graines ont une capacité d'absorption de la lumière verte plus développée que les tissus chlorophyl-

liens de la feuille qui correspond aux longueurs d'onde transmises par la silique. Ceci pourrait témoigner d'une compensation de l'exposition à une faible quantité de lumière par une utilisation plus efficace du spectre disponible. D'après le spectre de transmission de la silique, la graine reçoit environ 30 % de la lumière incidente perçue par la face externe de la silique (**Figure 25B**). Ce résultat est similaire à celui décrit chez le colza (Eastmond et al., 1996). Si l'on considère que l'éclairement solaire produit au plus fort de la journée une intensité lumineuse de 1000  $\mu\text{E}$ , la surface des graines d'*Arabidopsis* pourrait recevoir, en conditions naturelles, une intensité lumineuse maximale de 300  $\mu\text{E}$ .

### ***l-3. Disponibilité des gaz à l'intérieur de la silique***

#### **l-3-1. Oxygène**

Le développement à l'intérieur de la silique de la graine entraîne également des modifications des conditions gazeuses au voisinage des cellules de la graine. La silique représente une première barrière de diffusion aux gaz. En effet, alors que la pression atmosphérique en  $\text{O}_2$  est d'environ 21 kPa, des mesures réalisées par des microélectrodes sensibles à l'oxygène montrent qu'à l'intérieur des siliques d'*Arabidopsis*, la pression est deux fois plus faible (Porterfield et al., 1999). De plus, chez les dicotylédones, le tégument de la graine n'est pas pourvu de stomates, l' $\text{O}_2$  doit donc diffuser en milieu aqueux. Or, sa capacité de diffusion est environ 10 000 fois plus faible dans l'eau que dans l'air et est encore diminuée par la présence de nombreuses couches cellulaires lipidiques (Rolletschek et al., 2007). Le tégument représente donc la seconde barrière à la diffusion gazeuse, et en particulier à celle de l'oxygène dans les graines. L'existence de ces deux barrières entraîne une hypoxie à l'intérieur de la graine. La taille de la graine d'*Arabidopsis thaliana* empêchant l'utilisation d'électrodes afin de mesurer directement sa teneur en oxygène, l'hypoxie a seulement été mise en évidence indirectement par des analyses métaboliques (Gibon et al., 2002). Ainsi, l'hypoxie conduit à une restriction de la glycolyse, de la respiration et des activités biochimiques utilisant de l'ATP et à une réorientation du métabolisme vers des voies moins consommatrices d'oxygène.

Des mesures effectuées grâce à des microélectrodes dans les graines vertes isolées de fève, de soja ou de colza placées à l'obscurité montrent une baisse d'un facteur dix de la teneur en oxygène entre les couches externes et internes de l'embryon par rapport au milieu extérieur (Borisjuk et Rolletschek, 2009). Ces résultats suggèrent que les mécanismes de diffusion sont très peu efficaces à l'intérieur de la graine. Cependant,

après éclaircissement, la teneur en O<sub>2</sub> des graines au voisinage de l'embryon augmente grâce à la production d'oxygène endogène d'origine photosynthétique (Borisjuk et Rolletschek, 2009). Le niveau d'oxygène mesuré à l'intérieur est alors multiplié par sept par rapport à la teneur à l'obscurité. L'hypoxie à l'intérieur des graines peut donc être contrebalancée en partie par l'activité photosynthétique, qui nécessite par contre du CO<sub>2</sub>.

### I-3-2. Dioxyde de carbone

Le CO<sub>2</sub> est plus soluble dans l'eau que l'oxygène et diffuse donc plus facilement jusqu'à l'embryon photosynthétique à l'intérieur de la graine. Néanmoins la fixation du CO<sub>2</sub> atmosphérique par la photosynthèse des graines reste limitée puisqu'elle est 50 fois moins efficace que celle d'une feuille (expérience menée chez le colza, Brar et Thies, 1977).

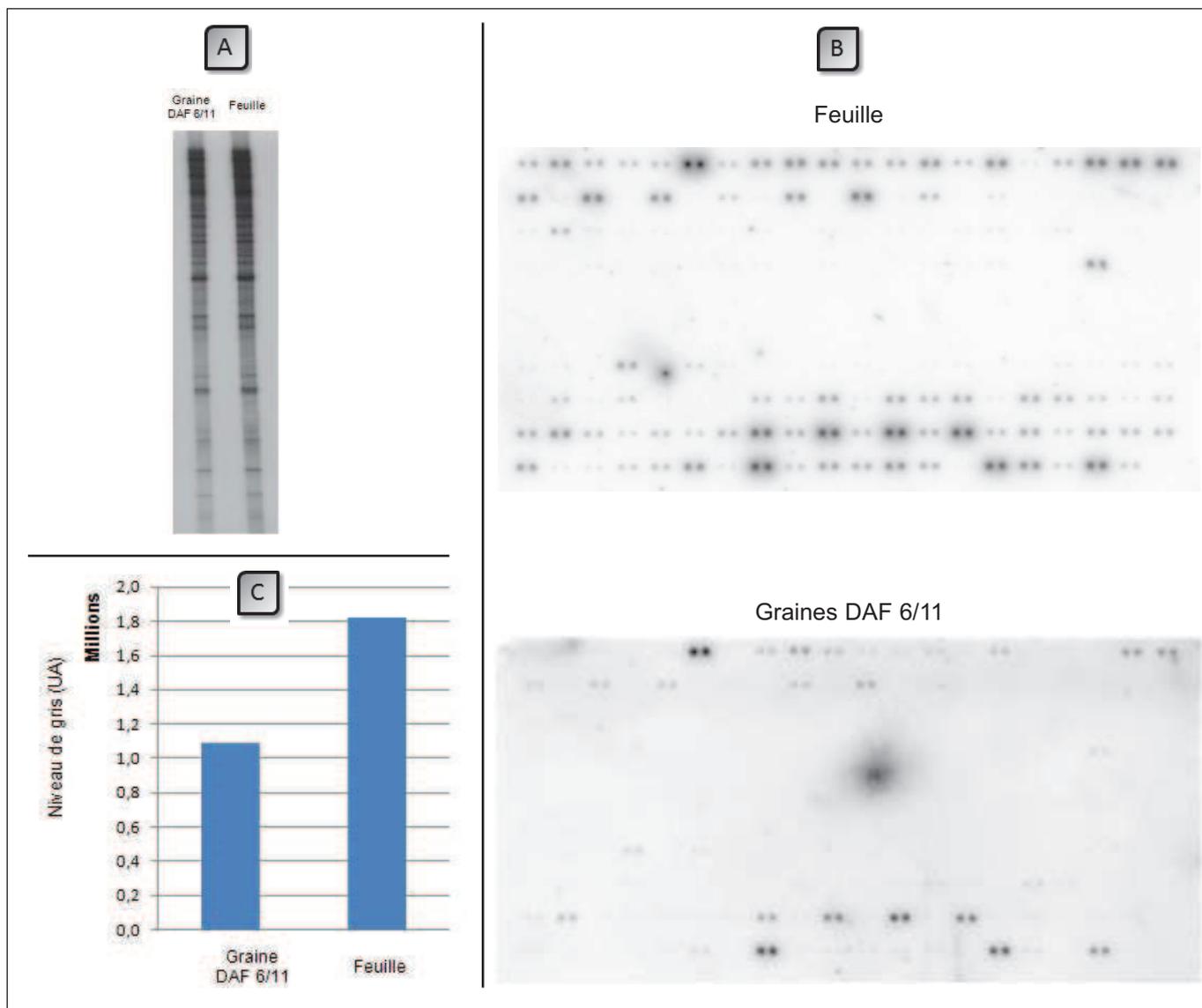
En contrepartie, le rendement d'utilisation du carbone fixé est amélioré par la Rubisco qui fonctionne indépendamment du cycle de Calvin dans les graines (Schwender et al., 2004). Des mesures à partir de carbone marqué (<sup>13</sup>C) ont en effet montré que la RubisCO fonctionne avec les enzymes non oxydatives de la voie des pentoses phosphates, produisant à partir des mêmes carbohydrates plus d'acétylCoA, donc plus d'huile (20 % supplémentaire), tout en perdant moins de carbone.

Les conditions physico-chimiques au voisinage des cellules de l'embryon sont donc caractérisées par une faible intensité lumineuse (300 μE au maximum), un enrichissement en lumière verte et une hypoxie globale de la graine contrebalancée par la production d'oxygène dans les graines photosynthétiques. A ces conditions particulières s'ajoute également une morphologie atypique des chloroplastes dans les graines. Nous avons cherché à savoir si ces conditions physicochimiques et anatomiques spéciales de la graine en développement avaient une incidence sur l'expression du génome plastidial qui code une grande partie des composants de l'appareil photosynthétique.

## **II. Comparaison des transcriptomes plastidiaux des graines et des feuilles**

### ***II-1. Analyse globale du transcriptome***

Grâce à l'outil de microarray mis au point dans l'équipe, nous avons comparé l'expression du plastome dans les graines photosynthétiques et les feuilles. Le profil d'accumulation des transcrits plastidiaux a été réalisé comme décrit dans la section Matériel et Méthodes et analysé comme au chapitre I. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 26**. Le profil des ADNc marqués séparés selon leur taille (**Figure 26A**)



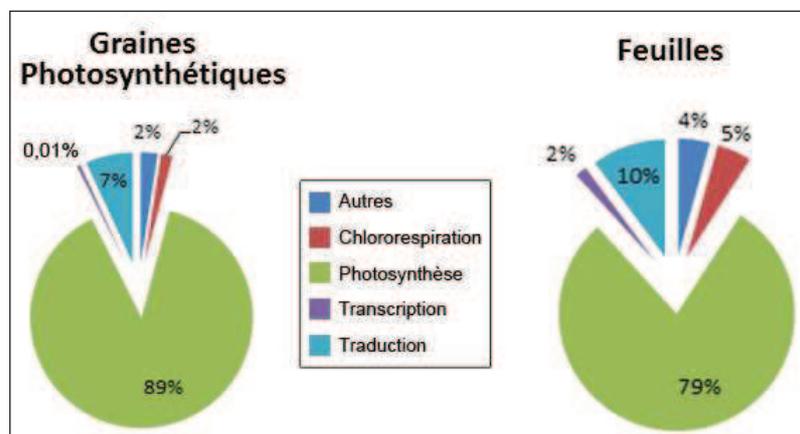
**Figure 26. - Expression globale du génome plastidial des graines photosynthétiques et des feuilles par macroarray.**

- (A) Profil des sondes marquées radioactivement après séparation électrophorétique des ADNc marqués sur acrylamide en conditions dénaturantes** (voir Matériel et Méthodes). 6  $\mu$ L par puits correspondant à 3000 cpm sont déposés pour chaque échantillon. La visualisation est effectuée par autoradiographie.
- (B) Profil d'expression des ARNm plastidiaux pendant la formation de la graine.** Les membranes de macroarray sont hybridées avec les ADNc marqués (300 000 cpm) synthétisés à partir de 4  $\mu$ g d'ARN total extraits des graines photosynthétiques (DAF 6/11) et de feuilles de 6 jours. Après exposition contre des écrans photosensibles, l'image est numérisée.
- (C) Quantification globale du niveau des transcrits.** Les valeurs représentées ici sont la somme des intensités de tous les spots correspondant à des transcrits « sens ».

ne montre pas de différence significative. Le niveau global de marquage des ADNc est donc similaire dans les deux organes comparés ici. L'observation des macroarrays suggère que le niveau d'accumulation des messagers plastidiaux est supérieur dans les feuilles (**Figure 26B**), ce que confirme la quantification des niveaux de gris effectuée comme au chapitre I (**Figure 26C**). Le taux d'accumulation des transcrits plastidiaux,

par rapport aux ARN totaux, est donc presque deux fois plus grand dans les tissus foliaires que dans les graines.

Nous avons ensuite réalisé une analyse par classe fonctionnelle des gènes plastidiaux (voir **Figure 15** du chapitre I) et comparé, pour chaque classe, l'expression globale dans les graines photosynthétiques et dans les feuilles. Nous observons tout d'abord que la répartition des transcrits plastidiaux des différentes classes fonctionnelles est très similaire dans les graines et les feuilles (**Figure 27**). Dans les deux organes, les transcrits photosynthétiques sont largement majoritaires. Cependant, leur proportion est légèrement plus importante dans les graines (89 % du signal détecté) que dans les feuilles (79 %).



**Figure 27. - Proportion des transcrits, regroupés par classe fonctionnelle, détectés sur macroarray à partir d'ARN extraits de graines photosynthétiques et de feuilles.**

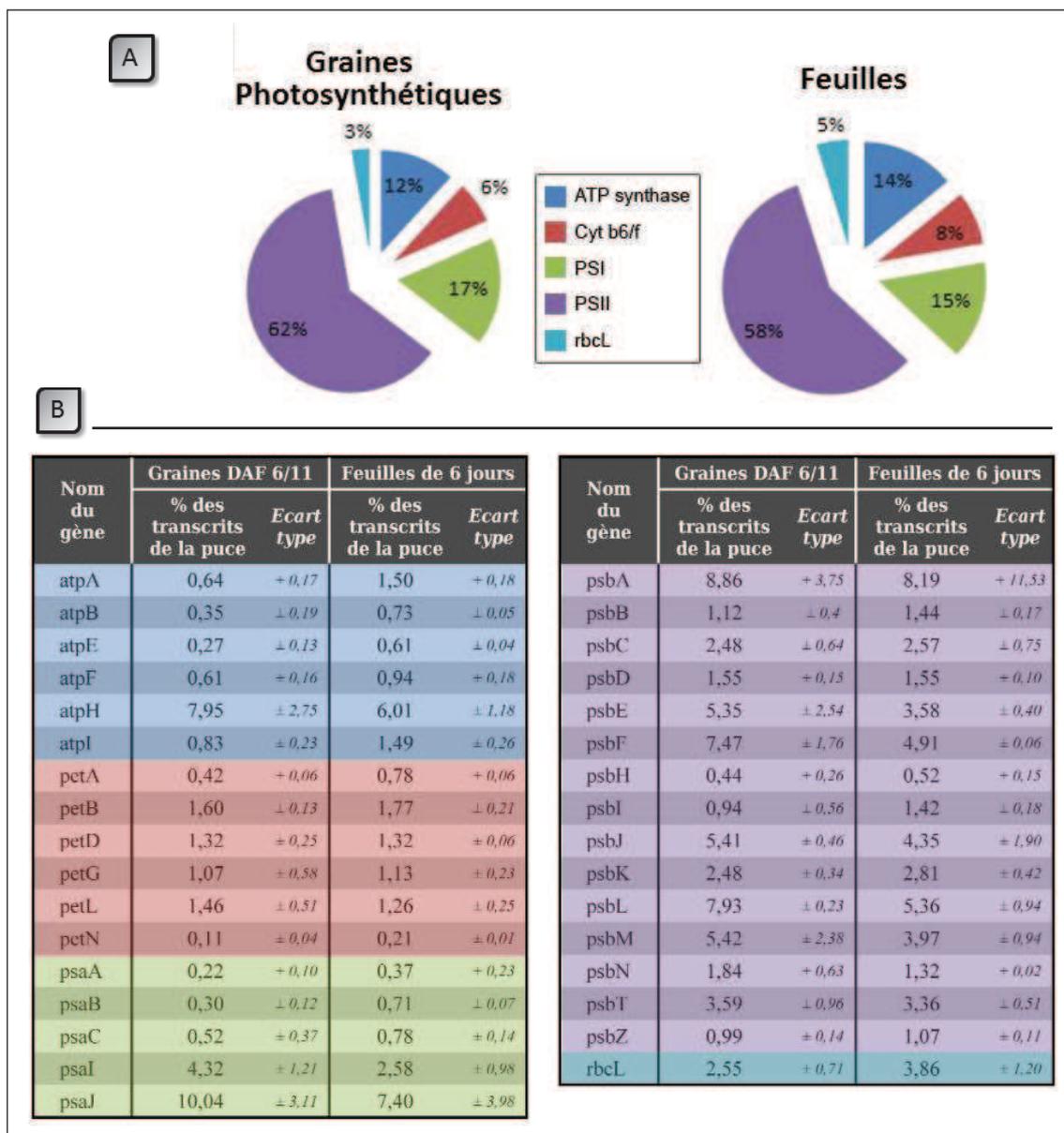
Après hybridation et exposition contre des écrans photosensibles, la quantification du signal est déterminée par le logiciel ArrayGauge. La proportion des transcrits de chaque classe fonctionnelle est calculée en divisant les valeurs de chaque transcrit par la somme des valeurs détectées sur le macroarray. Cette proportion est donc relative au génome plastidial. Les pourcentages des transcrits d'une classe fonctionnelle sont ensuite additionnés. Les valeurs présentées ici sont les moyennes de trois expérimentations indépendantes.

La comparaison globale de l'expression du génome plastidial dans les graines photosynthétiques et dans les feuilles montre donc que le génome plastidial est deux fois plus exprimé dans les feuilles et que les transcrits photosynthétiques représentent la majorité des messagers plastidiaux. C'est donc l'expression de ces transcrits que nous allons comparer plus en détail.

## ***II-2. Expression des transcrits photosynthétiques plastidiaux***

Les transcrits photosynthétiques ont été regroupés en fonction du complexe auquel ils appartiennent (photosystèmes I et II, cytochrome  $b_6/f$ , ATP synthase et le

transcrit *rbcl*) (**Figure 28A**). Les transcrits du photosystème II sont largement majoritaires et représentent environ 60 % des transcrits photosynthétiques dans le plastome des graines comme des feuilles. La proportion des autres complexes est également similaire. Ce regroupement ne montre donc aucune différence significative dans la répartition des différents transcrits photosynthétiques dans les graines photosynthétiques et dans les feuilles.



**Figure 28. - Expression des transcrits des complexes plastidiaux photosynthétiques par macroarray.**

Le signal sur les macroarrays est quantifié par le logiciel ArrayGauge.

- A**) La proportion de chaque complexe est calculée par rapport au signal total détecté pour les transcrits de la classe photosynthèse.
- B**) La proportion de chaque transcrit est calculé par rapport au signal total détecté sur les macroarrays. Cette proportion est donc relative au génome plastidial. Les valeurs présentées ici sont les moyennes de trois expérimentations indépendantes.

Nous avons ensuite réalisé une analyse plus spécifique de l'expression des gènes de chaque complexe. Les résultats présentés **Figure 28B** comparent la proportion de chaque transcrite au sein du macroarray. Les proportions des transcrits plastidiaux des sous-unités du photosystème I et du cytochrome  $b_6/f$  sont semblables dans les graines et dans les feuilles. Quelques transcrits (ceux de *petA*, *petN* et *psaB*) sont cependant significativement plus abondants dans les feuilles. Les transcrits de l'ATP synthase sont plus abondants dans les feuilles, à l'exception d'*atpH* (qui reste le transcrite de ce complexe le plus accumulé, voir chapitre I). L'abondance des transcrits du photosystème II est équivalente pour la plupart des messagers dans les graines et les feuilles. Contrairement à tous les transcrits étudiés, la proportion des transcrits *psbF* et *psbL* est plus importante dans les graines. Ces deux gènes sont co-transcrits à l'intérieur du même opéron (Tseng et al., 2010). La variabilité des données des autres transcrits de l'opéron (*psbE* et *psbJ*) ne permet pas de contrôler si cette particularité est étendue à toute l'unité transcriptionnelle. Ces sous-unités sont importantes pour la fonctionnalité du photosystème II. En effet, la mutation d'un des gènes de cet opéron entraîne une diminution de l'activité du complexe (expérience menée chez le tabac, Swiatek et al., 2003).

La proportion des transcrits du gène *rbcL* parmi les transcrits photosynthétiques est légèrement augmentée dans les feuilles. Cette observation pourrait suggérer des modifications du métabolisme, en particulier du cycle de Calvin dans les graines (Schwender et al., 2004). Cependant, les données sont à la limite de détection de la technique et une confirmation par extension d'amorce serait nécessaire.

### ***II-3. Expression des autres transcrits plastidiaux***

Les transcrits plastidiaux des sous-unités de la PEP et des protéines ribosomiques sont plus abondants dans les feuilles que dans les graines (**Tableau 10**). Cette différence pourrait traduire une activité transcriptionnelle plus intense dans les feuilles.

Les gènes liés à la fonction de chlororespiration sont eux aussi relativement plus accumulés dans les feuilles. Ce résultat est en contradiction avec le fait que la chlororespiration est plus active dans les plastes indifférenciés (Peltier et Cournac, 2002) et le faible niveau de différenciation des plastes des graines observée en microscopie par Mansfield (Mansfield et al., 1991). Une régulation post-transcriptionnelle différentielle de l'expression de ces messagers pourrait néanmoins modifier la proportion des protéines dans les deux organes.

TRANSCRIPTION					CHLORORESPIRATION				
Nom du gène	Graines DAF 6/11		Feuilles de 6 jours		Nom du gène	Graines DAF 6/11		Feuilles de 6 jours	
	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type		% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type
rpoA	0,26	+ 0,09	0,68	+ 0,07	ndhA	0,00	± 0,01	0,23	± 0,03
rpoB	0,09	± 0,07	0,36	± 0,04	ndhB	0,35	+ 0,18	0,66	+ 0,12
rpoC1	0,14	± 0,08	0,48	± 0,05	ndhC	0,27	± 0,35	0,37	± 0,05
rpoC2	0,04	± 0,04	0,08	± 0	ndhD	0,18	± 0,07	0,19	± 0,04
					ndhE	0,29	± 0,09	0,64	± 0,07
					ndhF	0,03	± 0,02	0,16	± 0,02
					ndhG	0,20	+ 0,08	0,73	+ 0,07
					ndhH	0,01	± 0,01	0,01	± 0,01
					ndhI	0,07	± 0,06	0,84	± 0,23
					ndhJ	0,04	± 0,02	0,08	± 0,01
					ndhK	0,26	+ 0,10	0,90	+ 0,2

TRADUCTION					AUTRES TRANSCRITS				
Nom du gène	Graines DAF 6/11		Feuilles de 6 jours		Nom du gène	Graines DAF 6/11		Feuilles de 6 jours	
	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type		% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type
rpl2	0,61	± 0,07	0,99	± 0,11	accD	0,20	± 0,12	0,13	± 0,01
rpl14	0,21	± 0,13	0,53	± 0,02	cemA	0,14	± 0,03	0,48	± 0,05
rpl16	0,33	± 0,16	0,68	± 0,12	clpP	0,42	+ 0,24	0,15	+ 0,07
rpl20	0,14	± 0,02	0,27	± 0,01	matK	0,82	± 0,46	1,64	± 0,24
rpl22	0,13	± 0,05	0,33	± 0,04	orf77	0,20	± 0,07	0,41	± 0,05
rpl23	0,42	± 0,07	0,65	± 0,10	ycf1	0,48	± 0,11	0,95	± 0,06
rpl32	2,31	± 1,02	1,90	± 0,60	ycf2	0,03	+ 0,04	0,11	+ 0,01
rpl33	0,15	± 0,10	0,32	± 0,05	ycf3	0,05	± 0,03	0,08	± 0,03
rpl36	0,16	± 0,11	0,53	± 0,03	ycf4	0,03	± 0,02	0,08	± 0,07
rps2	0,11	± 0,03	0,34	± 0,03	ycf5	0,11	± 0,04	0,31	± 0,09
rps3	0,30	± 0,13	0,62	± 0,13					
rps4	0,29	± 0,07	0,32	± 0,05					
rps7	0,26	± 0,10	0,40	± 0,08					
rps8	0,25	± 0,10	0,67	± 0,13					
rps11	0,03	± 0,04	0,16	± 0,01					
rps12	0,09	± 0,11	0,01	± 0					
rps14	0,46	± 0,16	0,62	± 0,02					
rps15	0,13	± 0,05	0,25	± 0,07					
rps16	0,03	± 0,02	0,06	± 0,01					
rps18	0,34	± 0,11	0,51	± 0					
rps19	0,26	± 0,28	0,06	± 0,02					

**Tableau 10. - Abondance des transcrits plastidiaux détectés par macroarray.**

Les signaux obtenus sur les macroarrays sont quantifiés par le logiciel ArrayGauge. La proportion de chaque transcrit est calculée par rapport au signal total détecté sur le macroarray et est donc relative au transcriptome plastidial. Les transcrits sont ensuite regroupés par classe fonctionnelle (voir **Figure 15**). Les valeurs présentées ici sont les moyennes de trois expérimentations indépendantes.

Les transcrits de la classe « traduction » sont globalement très peu accumulés mais leur proportion est plus importante dans les feuilles. Seuls trois transcrits, *rps19*, *rps12* et *rpl32* ont un profil d'accumulation différent, plus faible dans les feuilles par rapport aux graines. Ces profils particuliers peuvent s'expliquer par leur localisation particulière sur le plastome. Par exemple, le transcrit *rps19* se trouve à la frontière de la séquence inversée-répétée. Le transcrit *rps12* est quant à lui le seul transcrit du plastome à subir un trans-épissage lors de sa maturation. Il est possible que la détection de ces messagers soit donc perturbée par des formes intermédiaires d'hybridation. La bi-

fonctionnalité de RPL32, qui est à la fois une protéine ribosomique mais qui régule également son propre épissage (Eng et Warner, 1991) peut aussi expliquer son profil particulier au sein de la classe fonctionnelle « traduction ».

Un profil similaire est observé pour le transcrit *accD*. Ce transcrit code une sous-unité de l'acetyl-CoA carboxylase, enzyme-clé de la biosynthèse des lipides et est plus abondant dans les graines. Cette observation suggère, sous réserve de régulations post-transcriptionnelles, que l'enzyme est plus exprimée dans les graines, ce qui est cohérent avec la présence de nombreux corps lipidiques dans le cytoplasme des cellules (**Figure 24**).

L'analyse transcriptomique globale montre que l'accumulation des transcrits photosynthétiques plastidiaux est plus importante (en quantité) dans les feuilles que dans les graines. Les quelques spécificités, comme la plus forte abondance des transcrits *psbF* et *psbL* dans les graines par exemple, ne permettent pas de suggérer un fonctionnement différent de l'activité photosynthétique plastidiale des graines d'*Arabidopsis*. Cette analyse transcriptomique ne renseigne cependant pas sur l'organisation ou l'activité de la chaîne de transfert d'électrons qui est un des éléments principaux de régulation de l'activité photosynthétique. De plus, alors que notre étude ne porte que sur les transcrits plastidiaux, l'assemblage des complexes photosynthétiques au cœur de cette chaîne nécessite la coordination du génome plastidial et nucléaire. Nous avons donc voulu caractériser plus précisément l'organisation de chacun des complexes.

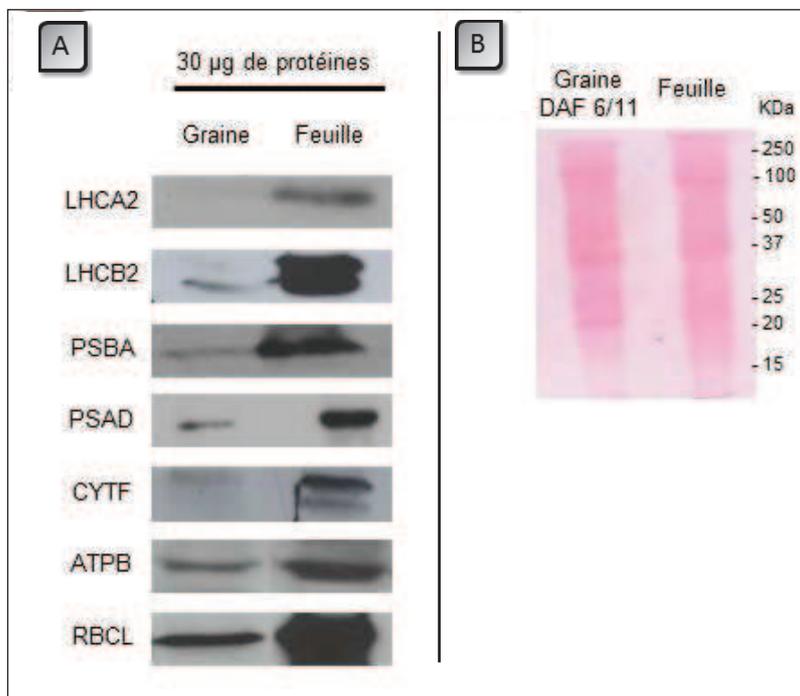
### **III. Organisation des complexes photosynthétiques dans les graines et les feuilles**

L'objectif de ces expériences est de vérifier que les complexes photosynthétiques sont présents dans les plastides des graines, et de vérifier leur fonctionnalité. Nous avons pour cela utilisé des protéines marqueurs de la présence des différents complexes photosynthétiques qui sont aussi des sous-unités fondamentales pour la fonctionnalité des complexes.

#### ***III-1. Accumulation des protéines des complexes photosynthétiques***

Nous avons sélectionné une protéine du photosystème I (PSAD), du photosystème II (PSBA), du cytochrome  $b_6/f$  (PETA), des antennes collectrices (LHCA2 et

LHCB2), de l'ATP synthase (ATPB) ainsi que la protéine RBCL pour la sous-unité plastidiale de la RubisCO. L'accumulation des protéines de chaque complexe a été analysée par immunodétection à l'aide d'anticorps spécifiques (**Figure 29**).



Les résultats montrent que toutes les protéines sont détectées dans les graines photosynthétiques et dans les feuilles. Cependant, rapporté à la quantité de protéines totales, le niveau d'accumulation est systématiquement plus faible dans les graines que dans les feuilles.

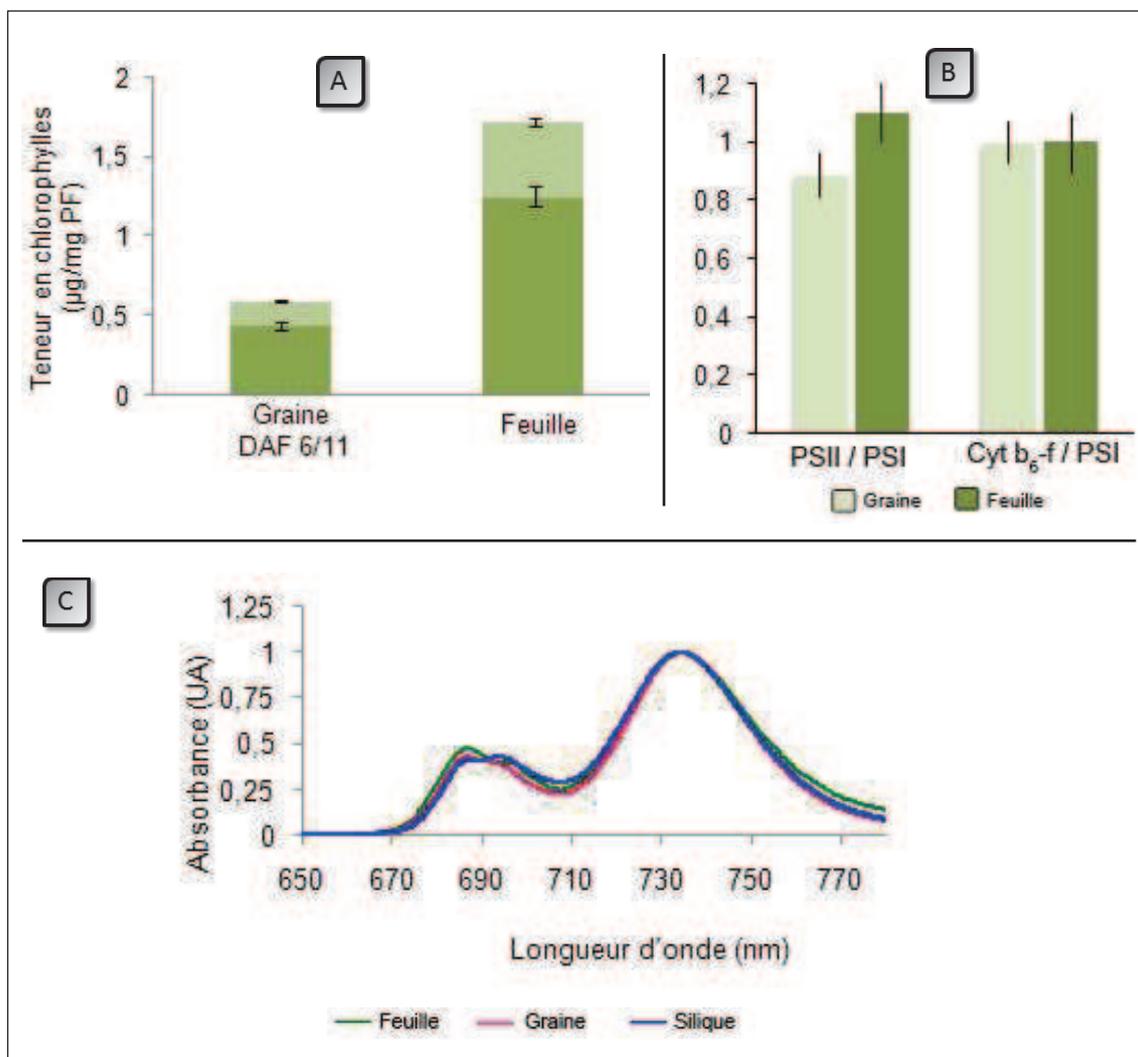
Ces protéines sont généralement utilisées dans la littérature pour caractériser la présence de chacun des complexes photosynthétiques. Il semble donc, malgré la différence de l'accumulation observée, que tous les complexes photosynthétiques soient présents dans la graine d'*Arabidopsis thaliana* au stade de maturation (DAF 6/11). Nous avons cherché à vérifier si ces complexes sont fonctionnels et correctement couplés les uns aux autres dans les graines photosynthétiques.

## III-2. Fonctionnalité des complexes photosynthétiques

### III-2-1. Teneur en chlorophylles

Nous avons tout d'abord dosé par spectrophotométrie la teneur des feuilles et des graines photosynthétiques en chlorophylles rapportée à la masse fraîche (voir section

Matériel et Méthodes). Les feuilles contiennent 1,8  $\mu\text{g}$  de chlorophylle par mg de poids frais alors que les graines n'en contiennent que 0,6  $\mu\text{g}$  (**Figure 30A**). Le rapport chlorophylle a (chl<sub>a</sub>) sur chlorophylle b (chl<sub>b</sub>) est d'environ un tiers. Dans les graines photosynthétiques, la quantité de chlorophylle est donc diminuée d'un facteur 3 mais le rapport chl<sub>a</sub>/chl<sub>b</sub> reste inchangé. La valeur de ce rapport est un bon indicateur de la proportion relative des deux photosystèmes. Nos résultats indiquent donc que la stœchiométrie des deux photosystèmes n'est pas modifiée dans les graines par rapport aux feuilles.



**Figure 30. - Organisation des photosystèmes dans les graines photosynthétiques et les feuilles.**

**A** Dosage des chlorophylles a et b dans les graines photosynthétiques et dans les feuilles. Les valeurs correspondent aux moyennes de trois expériences indépendantes.

**B** Stœchiométrie des cellules photosynthétiques mesurée par électrochromisme. PSI : photosystème I. PSII : photosystème II. Cyt b<sub>6</sub>/f : cytochrome b<sub>6</sub>/f.

**C** Spectre d'absorption à 77 K de feuilles, de siliques et de graines photosynthétiques.

Ce rapport permet également de mesurer l'adaptation de l'appareil photosynthétique en fonction des conditions lumineuses. En effet, en condition de faible éclairage, dans les feuilles, la capacité d'absorption de la lumière est accrue par l'augmentation de la taille des antennes collectrices. Ces antennes collectrices contiennent essentiellement des molécules de chlorophylle b. Ainsi sous de faibles intensités lumineuses, la quantité de chlorophylle b augmente, faisant diminuer le rapport chl<sub>a</sub>/chl<sub>b</sub>. A l'intérieur des siliques, la graine en développement ne reçoit qu'une faible quantité de lumière puisque la silique en filtre environ les deux tiers. On pourrait donc s'attendre à ce que la taille de ses antennes collectrices augmente afin d'accroître la quantité de lumière absorbée. Ce n'est cependant pas le cas, puisque le rapport chl<sub>a</sub>/chl<sub>b</sub> des graines est identique au rapport obtenu pour des feuilles sous éclairage normal (**Figure 30A**). Ce résultat suggère donc que dans les graines l'absorption de la lumière serait optimisée en modifiant la qualité de la lumière absorbée (absorption de plus de lumière verte - **Figure 25A**) plutôt que la quantité (la taille des antennes collectrices ne semblant pas être augmentée).

Nous avons complété et contrôlé ces analyses pigmentaires en précisant l'organisation et la stœchiométrie des deux photosystèmes l'un par rapport à l'autre.

### III-2-2. Stœchiométrie des photosystèmes

Les rapports entre les trois complexes majeurs (photosystème I, photosystème II et cytochrome b<sub>6</sub>/f) de la chaîne de transfert d'électrons ont été mesurés par électrochromisme (**Figure 30B**). Le signal électrochromique génère un signal triphasique (voir Matériel et Méthode). La première phase est proportionnelle à l'activité des deux photosystèmes, la seconde au cytochrome b<sub>6</sub>/f tandis que la dernière phase correspond à la relaxation du système par l'ATP synthase. En bloquant au moyen d'inhibiteurs (DCMU et DBMIB) le transfert des électrons à des endroits spécifiques de la chaîne, nous pouvons mesurer la différence d'amplitude de chacune des phases et ainsi mesurer l'importance de chaque complexe.

Le rapport entre le photosystème II et photosystème I est proche de 1 dans les feuilles (**Figure 30B**). Ce rapport est de 0,9 dans les graines photosynthétiques. Cette différence de stœchiométrie n'est cependant pas assez importante pour traduire une modification significative du transfert des électrons et donc de l'activité photosynthétique. Le rapport stœchiométrique entre le cytochrome b<sub>6</sub>/f et le photosystème I est quant à lui équivalent entre les graines et les feuilles. Les trois complexes, PSI, PSII et b<sub>6</sub>/f sont donc présents et à des stœchiométries relativement équivalentes.

L'efficacité de la photosynthèse dépend non seulement de la présence et de la stœchiométrie des complexes photosynthétiques mais aussi de la qualité du couplage électronique entre la collection des photons et les photosystèmes.

### III-2-3. Couplage des photosystèmes et des antennes collectrices

Pour évaluer la qualité de ce couplage, nous avons réalisé un spectre d'absorbance à ultra basse température (77 K). A cette température, l'agitation des molécules est limitée et favorise l'obtention d'un signal plus net (**Figure 30C**). Un spectre a été enregistré à partir de feuilles et de siliques montrant deux pics majeurs à 690 nm et 740 nm correspondant respectivement au photosystème II et I. Le spectre enregistré à partir des graines photosynthétiques montre les mêmes pics. Aucun signal supplémentaire n'est visible. L'absence de pic additionnel indique le couplage parfait des photosystèmes II et I avec leurs antennes dans les graines photosynthétiques comme dans les feuilles.

Ces expériences physico-chimiques montrent donc que l'organisation des photosystèmes au sein de la chaîne de transfert d'électrons est parfaitement fonctionnelle. Puisque tous les éléments nécessaires à la réaction photosynthétique sont présents et organisés de façon fonctionnelle, nous avons ensuite voulu mesurer l'activité photosynthétique des graines au stade DAF 6/11.

## **III-4. Mesure de l'activité photosynthétique**

### III-4-1. Activité photosynthétique

La mesure de l'activité photosynthétique a été réalisée sur des graines en suspension aqueuse en suivant, à l'aide d'une électrode de Clark, les variations de la teneur en O<sub>2</sub> du milieu (voir section Matériel et méthodes). Les résultats présentés **Figure 31A** montrent un dégagement net d'oxygène dès les faibles éclaircements ce qui traduit une activité photosynthétique des graines au stade DAF 6/11. Remarquons que la mesure d'un dégagement d'oxygène en milieu aqueux signifie que le tégument de la graine photosynthétique n'est pas complètement étanche aux gaz. *In situ*, dans la silique et à ce stade, les échanges gazeux avec le milieu extérieur sont donc toujours possibles. Il reste cependant impossible de distinguer la proportion d'oxygène qui s'échappe de la graine de celle qui pourrait être stockée (Cloetens et al., 2006) et/ou être utilisée par les mitochondries dans la graine.

Le point de saturation de la réaction photosynthétique est obtenu, dans nos condi-

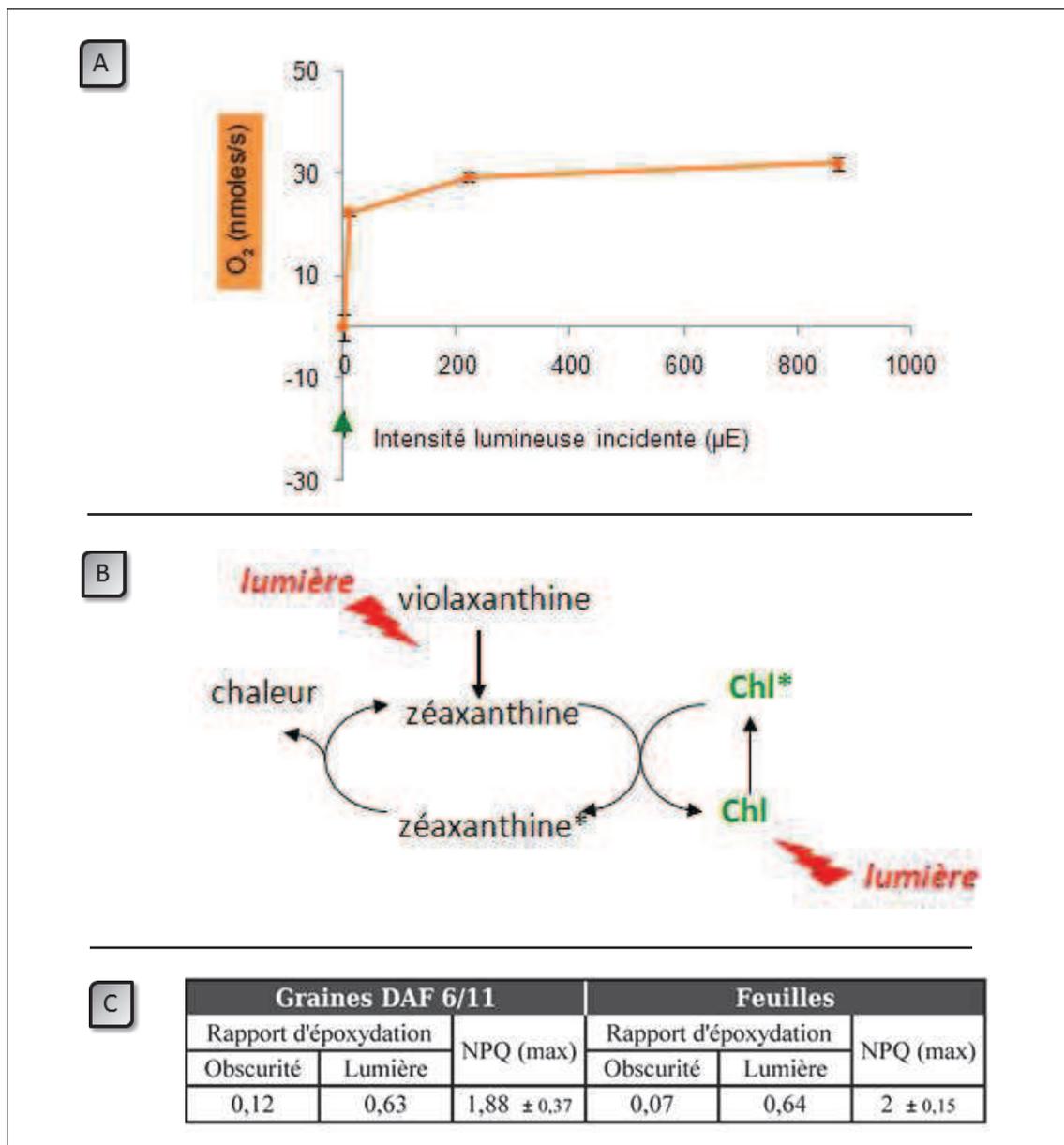


Figure 31. - Mesure de l'activité photosynthétique et mise en évidence d'un mécanisme de photoprotection dans les graines photosynthétiques.

- A** Photosynthèse nette dans les graines photosynthétiques. Mesure à l'électrode de Clark. Triangle vert : respiration à l'obscurité..
- B** Dissipation de l'énergie lumineuse par le cycle des xanthophylles.
- C** Tableau des rapports d'époxydation et de NPQ dans les graines photosynthétiques et les feuilles. Le rapport d'époxydation [(zéaxanthine) / (violaxanthine + zéaxanthine)]a été mesuré après dosage des pigments. Les rapports d'époxydation des feuilles sont tirés de Niyagi et al., 1998.

tions expérimentales, pour une intensité lumineuse d'environ 200  $\mu\text{E}$ . Ce point est déterminé lorsque l'augmentation des paramètres lumineux ne conduit plus à une augmentation du dégagement d' $\text{O}_2$  produit par la réaction photosynthétique. Bien que très faible, l'intensité lumineuse incidente reçue par la graine peut atteindre, d'après nos estimations, 300  $\mu\text{E}$  (voir I-2). Or, nous constatons que la lumière devient facteur limi-

tant de la photosynthèse à partir de 200  $\mu\text{E}$  dans nos conditions expérimentales. Au-delà de cette intensité, l'énergie lumineuse supplémentaire apportée dans nos conditions expérimentales doit donc être dissipée par l'intermédiaire de mécanismes de photoprotection pour éviter d'endommager la chaîne de transfert d'électrons. Nous avons voulu déterminer si ces mécanismes sont fonctionnels dans les graines.

### III-4-2. Mécanisme de photoprotection

En cas de fort éclaircissement, l'énergie d'une partie des photons absorbés par les centres actifs des photosystèmes n'est pas convertie en énergie chimique. Le transfert classique des électrons aux photosystèmes n'est plus assuré. Dans des conditions lumineuses extrêmes et prolongées, ce mécanisme peut aboutir à une inactivation ou à la destruction des photosystèmes. Chez les plantes, des mécanismes de photoprotection permettent alors d'évacuer l'énergie supplémentaire dans une voie non photochimique. Cette voie génère un quenching non photochimique (NPQ) qui correspond à la dissipation par chaleur de l'excès de photons absorbés par les chlorophylles. Le NPQ peut être mesuré de deux façons. D'une part, il existe une relation linéaire entre le NPQ et l'intensité de la fluorescence maximale des chlorophylles. La valeur maximale du NPQ mesurée dans les graines par cette technique en lumière saturante (1800  $\mu\text{E}$ ) est similaire à la valeur décrite dans la littérature pour les feuilles d'*Arabidopsis*, soit 2 (**Figure 31C**). D'autre part, l'énergie des photons excédentaires absorbés par les chlorophylles est captée par la zéaxanthine, pigment de la famille des caroténoïdes. Cette énergie est ensuite dissipée sous forme de chaleur lorsque la zéaxanthine est réduite (**Figure 31B**). Le rapport d'époxydation, calculé en rapportant la teneur en zéaxanthine à celle de son précurseur la violaxanthine, est directement proportionnel à l'intensité du NPQ et indique donc la mise en route des mécanismes de photoprotection. Nous observons clairement une hausse de ce rapport dans les graines après éclaircissement, comparable à celle mesurée chez les feuilles (Niyogi et al., 1998), témoignant donc de la dissipation thermique de l'énergie excédentaire (**Figure 31C**).

Bien que l'éclaircissement potentiel des graines photosynthétiques soit faible, ce résultat démontre que des moyens de photoprotection similaires à ceux des feuilles sont actifs dans les graines. Ce résultat peut apparaître surprenant dans la mesure où, comme nous l'avons vu précédemment, le passage de la lumière à travers la silique limite en grande partie le risque d'exposition de la graine à de fortes intensités lumineuses. Nos résultats suggèrent néanmoins que l'appareil photosynthétique des graines est pleinement évolué et comporte toutes les caractéristiques et potentialités d'un appareil photosynthétique classique.

Nos observations montrent donc que l'architecture des appareils photosynthétiques des graines en formation et des feuilles sont totalement comparables. De même, l'activité de la chaîne de transfert d'électrons est potentiellement identique, y compris dans les mécanismes de photoprotection. Cependant, seules les graines oléagineuses et celles des légumineuses sont transitoirement photosynthétiques. Dans ces graines, le coût métabolique et énergétique d'une telle différenciation transitoire nous amène à nous interroger sur la nécessité d'une telle différenciation au cours de la formation de la graine. Nous avons donc examiné l'importance de la photosynthèse embryonnaire sur le développement de la graine.

#### **IV. Importance de la photosynthèse embryonnaire sur le développement de la graine et la vigueur germinative**

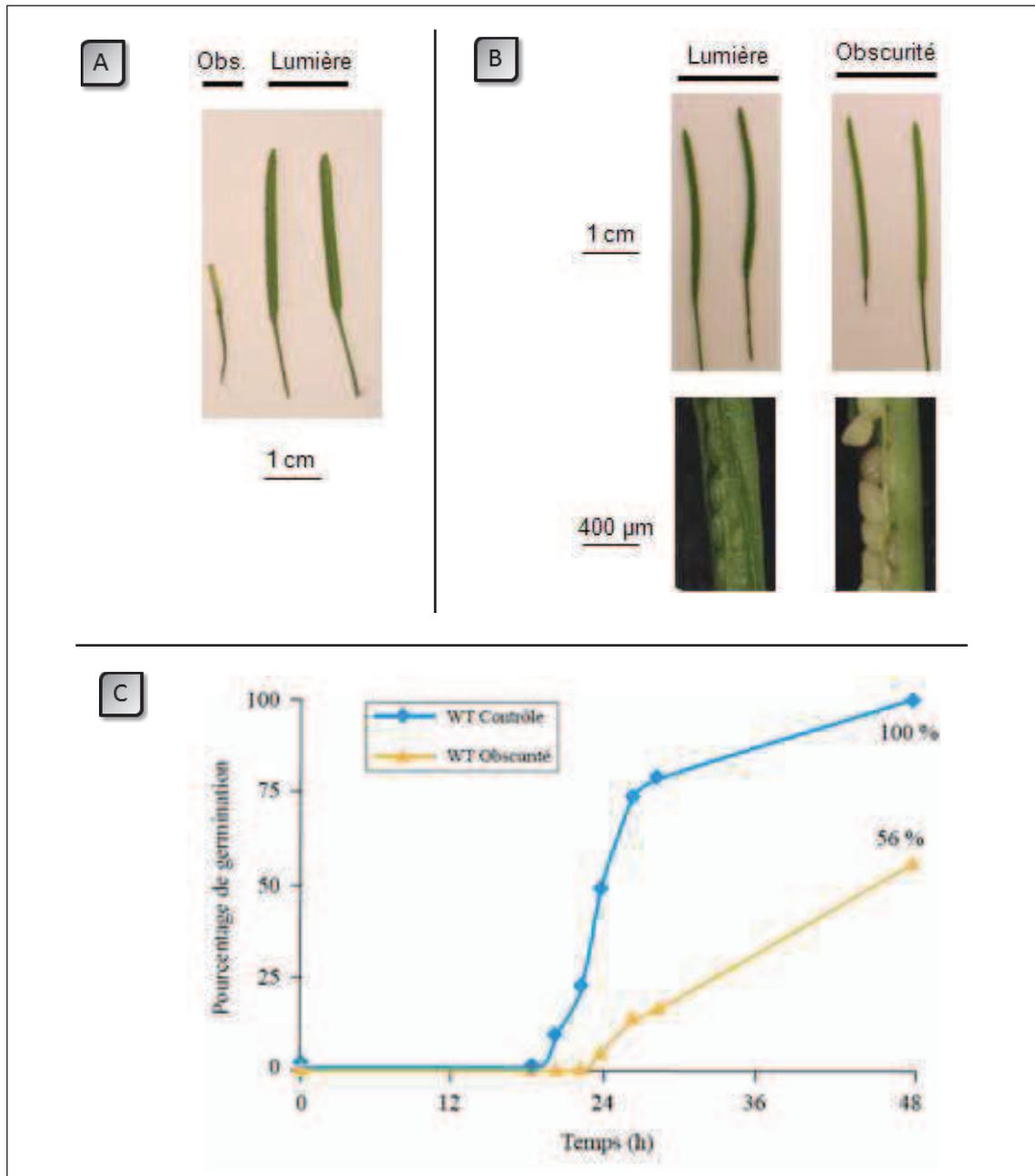
Le rôle de la photosynthèse au cours de la formation des graines a déjà été largement étudié. Comme rappelé en introduction de ce chapitre, son implication dans la synthèse des lipides (Ruuska et al., 2002 ; Baud et Lepiniec, 2010) ainsi que dans la régulation de la teneur en oxygène des graines (Rolletschek et Borisjuk, 2005) ont été caractérisées. Nous avons choisi d'aborder le rôle physiologique de la photosynthèse de la graine d'*Arabidopsis thaliana* en étudiant les conséquences de son inhibition sur la morphologie et la future germination de la graine.

##### ***IV-1. Influence de l'inhibition de la photosynthèse embryonnaire sur la formation des graines et leur vigueur germinative***

Afin d'examiner l'importance de la photosynthèse dans la formation de la graine, nous avons cherché à modifier les conditions de la photosynthèse à l'intérieur de la silique. La première idée consiste à faire varier les conditions d'éclairement dans lesquelles la photosynthèse se déroule. Cependant, les graines se développent à l'intérieur de la silique qui filtre la lumière et qu'il est difficile d'éliminer par dissection. Nous avons donc cherché à inhiber totalement la photosynthèse des graines. Dans un premier temps, nous avons badigeonné les siliques en croissance avec une solution contenant du DCMU qui inhibe le transfert des électrons au niveau du photosystème II. Cependant les résultats n'ont pas été concluants car l'inhibiteur n'arrive probablement pas à traverser la silique puis à pénétrer la graine.

Nous avons alors recouvert une partie de la hampe florale de la plante avec une feuille de papier aluminium afin de la maintenir à l'obscurité tout au long de la forma-

tion de la graine. Après une semaine de culture, les siliques couvertes ne se sont pas développées contrairement aux siliques non couvertes portées par la même hampe florale (**Figure 32A**). L'absence de lumière semble donc, par un mécanisme non défini, bloquer l'initiation de la formation de la silique et donc des graines. Cette expérience



**Figure 32. - Effet de la lumière sur la morphologie et la vigueur germinative des graines.**

**(A)** et **(B)**: Morphologie des siliques et des graines au stade DAF 10 développées à l'obscurité dès la fécondation (**A**) et après DAF 5 (**B**). Les morphologies ont été comparées après visualisation sous loupe binoculaire.

**(C)** Test de germination. Le test a été réalisé à partir de graines développées en condition standard (WT contrôle) et des graines obtenues en (**B**) (WT obscurité). Le test se déroule en lumière continue (80  $\mu$ E) à 23 °C. La graine est considérée comme ayant germé quand la radicule a percé le tégument de la graine. Ces mesures sont représentatives de trois tests indépendants.

souligne que la lumière est indispensable à l'initiation de la formation de la silique. Cependant cette expérience ne permet pas de conclure quant au rôle direct de la photosynthèse sur le développement des graines. Il est en effet possible que l'obscurité modifie la balance hormonale et affecte ainsi le développement de la graine dans des phases extrêmement précoces, bien avant la différenciation photosynthétique de l'embryon.

Nous avons alors maintenu à l'obscurité les siliques à partir de la fin de la période d'embryogenèse au stade DAF 5. En effet, à ce stade, l'embryon est complètement formé et entre juste dans la période photosynthétique (voir Chapitre I). Nous avons ensuite laissé les graines se développer pendant 5 jours puis comparé leur morphologie à celles des graines développées en conditions normales (**Figure 32B**). Dans les deux conditions expérimentales, la taille des siliques est la même mais les siliques maintenues à l'obscurité sont sans surprise moins chlorophylliennes. A l'intérieur des siliques maintenues à l'obscurité, les graines ont une taille comparable aux graines témoins mais ne sont pas chlorophylliennes (**Figure 32B**). Bien que toutes les graines soient présentes dans les siliques (pas de mortalité embryonnaire), 4 à 5 graines par silique arborent une coloration plus brune (visible sur la **Figure 32B**). Il est très difficile de vérifier si cette coloration est le signe d'un arrêt ou d'une altération du développement car la différence phénotypique n'est quasiment plus détectable au moment de la récolte des graines. Il devient donc impossible de les isoler pour les étudier plus précisément.

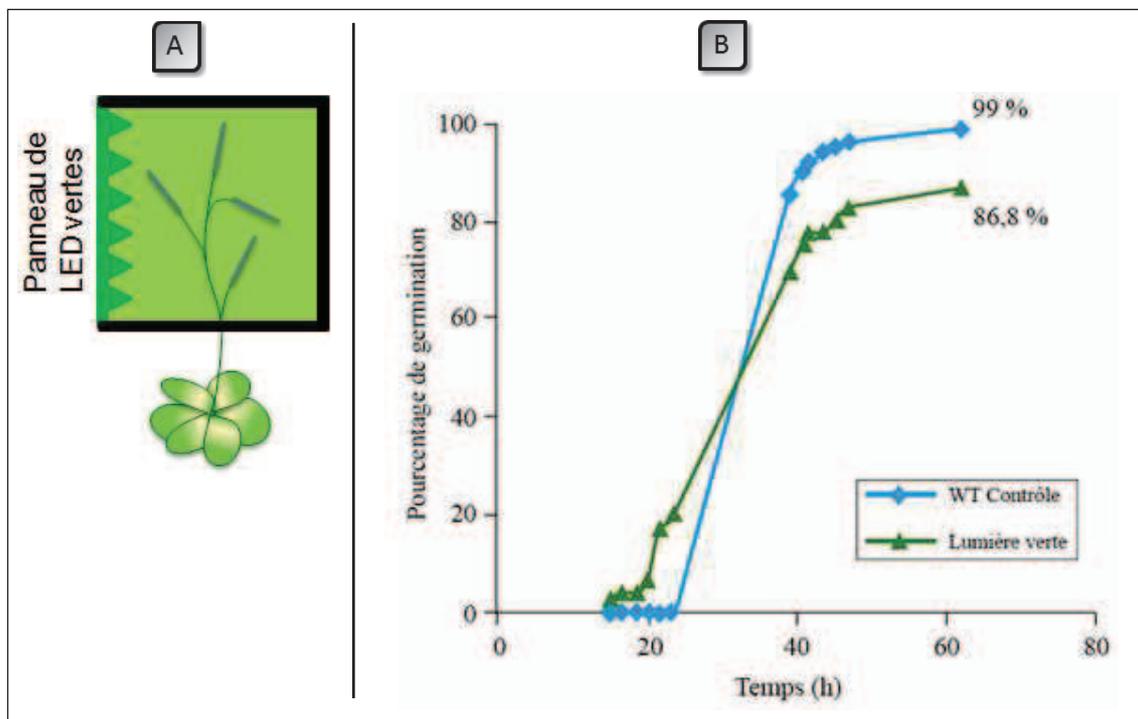
Les graines qui se sont développées à l'intérieur des siliques maintenues à l'obscurité à partir de DAF 5 ont été récoltées à DAF 18 puis mises à sécher à 16 °C pendant une quinzaine de jours. Nous avons testé la vigueur germinative des graines formées dans ces conditions au moyen de tests de germination (**Figure 32C**). Ces tests montrent clairement que les graines maintenues à l'obscurité à partir de la fin de l'embryogenèse accusent un retard de germination d'environ cinq heures. Leur pouvoir germinatif est également fortement réduit : seulement 56 % des graines ont germé après 48 heures alors que la totalité des graines contrôles a germé. Cette expérience permet de conclure que l'activité photosynthétique dans les graines conditionne leur capacité à germer. Les photoassimilats importés de la plante mère ne sont donc pas suffisants pour assurer la formation correcte des graines.

Le développement des graines à l'obscurité a aussi pour conséquence potentielle l'altération des photorécepteurs. Or, plusieurs études ont montré que ceux-ci sont nécessaires à la formation de graines capables de germer (pour revue voir Franklin,

2009). Nous avons donc dans un deuxième temps tenté de dissocier les effets de la photosynthèse et ceux de l'activation des photorécepteurs sur la formation de la graine.

#### ***IV-2. Influence de l'inhibition des photorécepteurs sur la vigueur germinative de la graine***

La lumière blanche qui éclaire la plante au cours de la formation de la graine comprend les longueurs d'onde bleues et rouges qui activent les photorécepteurs, en particulier les phytochromes. Par ailleurs, nous avons montré que la graine en développement absorbe une partie des longueurs d'onde vertes. Afin de séparer l'influence des photorécepteurs de celle de la photosynthèse embryonnaire sur le développement de la graine, nous avons cultivé des plantes en éclairant la hampe florale en lumière verte et la rosette en lumière blanche (**Figure 33A**). Le dispositif mis en place au moyen d'une batterie de LED vertes cherche à éviter l'activation des phytochromes (absence de lumière rouge et bleue) tout en permettant aux graines d'effectuer la photosynthèse. Les conditions lumineuses sur les feuilles de rosette de la plante mère ne sont pas



**Figure 33. - Viguer germinative des graines cultivées sous lumière verte.**

- A** Schéma du dispositif expérimental. Le panneau de LED vertes est installé dans une boîte afin de s'assurer que seule la hampe florale est éclairée en lumière verte.
- B** Test de germination. Le test a été réalisé à partir de graines développées en condition standard (WT Contrôle) et sous lumière verte. Le test se déroule en lumière continue (80  $\mu$ E) à 23 °C. La graine est considérée comme ayant germé quand la radicule a percé le tégument de la graine. Ces mesures sont représentatives de trois tests indépendants.

modifiées. Les transferts entre la plante mère et la graine en formation ne sont donc *a priori* pas affectés par ces conditions expérimentales.

Après croissance et développement, les graines ont été récoltées à maturité et leur vigueur germinative a été évaluée par un test de germination. Nos résultats (**Figure 33B**) montrent que le taux de germination, proche de 90 %, est donc pratiquement totalement restauré par rapport aux graines maintenues à l'obscurité. Ces résultats suggèrent que la diminution de la vigueur germinative observée à la **Figure 32C** est liée à l'absence de photosynthèse dans les graines et non à un défaut d'activation des phytochromes.

Pour résumer, la photosynthèse dans les graines en formation semble donc nécessaire mais pas suffisante au développement de la graine. Les graines peuvent en effet terminer leur développement sans effectuer la photosynthèse mais elles présentent alors à la fois un retard de germination et une baisse de leur vigueur germinative.

## V. Discussion et conclusion

Dans cette troisième partie de mon travail, nous avons cherché à caractériser la photosynthèse embryonnaire dans les graines d'*Arabidopsis thaliana*. Peu d'études ont jusqu'à présent utilisé cette graine comme modèle de travail, sa petite taille limite en effet fortement les possibilités d'investigations. Nous avons néanmoins entrepris de caractériser l'expression génique plastidiale dans cette espèce pour analyser au niveau moléculaire (transcriptionnel et traductionnel) l'expression des complexes protéiques impliqués dans cette voie métabolique. Nous avons ensuite recherché les particularités physiologiques du fonctionnement de la photosynthèse dans les graines et tenté d'éclairer sur le rôle de cette voie dans la vigueur germinative.

### **Les conditions physico-chimiques dans lesquelles se déroule la photosynthèse sont modifiées au voisinage de l'embryon photosynthétique.**

La silique à l'intérieur de laquelle la graine se développe filtre la lumière dans ses deux aspects qualitatif et quantitatif. Ainsi, la graine reçoit seulement 30 % de la lumière incidente et cette lumière est enrichie en longueurs d'onde vertes. Pour pallier le défaut de lumière, la taille des antennes collectrices est augmentée dans les plantes d'ombre selon un déterminisme génétique. Nous avons observé que la taille des antennes collectrices n'est pas modifiée dans les graines par rapport aux feuilles

(**Figure 30A**). Dans les graines, la réponse aux faibles intensités lumineuses est donc différente et passe probablement par l'augmentation de l'absorption des longueurs d'onde vertes. La séparation par HPLC des pigments extraits des graines n'a pas permis l'identification d'une espèce inconnue dérivée des caroténoïdes ou des chlorophylles (non montré). Il est donc probable que cette modification du spectre d'absorption des graines soit due à la géométrie des molécules pigmentaires entre elles, ou bien encore à l'architecture des membranes photosynthétiques. Nos expériences sont trop préliminaires pour avancer une explication définitive. Néanmoins, la longueur d'onde des photons absorbés n'a pas d'influence sur l'efficacité du transfert d'électrons et donc sur la photosynthèse elle-même. Par contre, il a été montré que la lumière verte pénètre plus profondément dans une feuille que la lumière rouge et bleue. A flux de photons égal, la lumière verte a donc une plus grande probabilité d'atteindre les thylacoïdes éloignés de la surface de la graine. Pour ces tissus profonds, la photosynthèse est ainsi plus efficace sous lumière verte (Terashima et al., 2009). Un phénomène similaire pourrait donc permettre à la graine d'augmenter sa capacité photosynthétique.

La silique limite également les disponibilités en gaz de la graine et de l'embryon en développement. Ceci génère à l'intérieur de la graine des conditions d'hypoxie qui sont partiellement contrebalancées par la production d'O<sub>2</sub> d'origine photosynthétique par l'embryon. Il a été suggéré qu'une partie de cet oxygène soit stocké à l'intérieur de canaux existant dans la graine (Cloetens et al., 2006) pour être utilisé lors de la germination. Cependant nos observations montrent qu'au stade photosynthétique, le tégument de la graine est suffisamment perméable pour permettre une étude à l'électrode à oxygène en solution. Il est également extrêmement difficile d'évaluer la proportion de l'oxygène produit qui reste à l'intérieur de la graine de celle qui est utilisée pour la respiration mitochondriale.

### **L'appareil photosynthétique de la graine d'*Arabidopsis* est pleinement fonctionnel**

L'expression des composants principaux de l'appareil photosynthétique a été analysée au niveau transcriptionnel et traductionnel. Aucune différence d'expression significative n'a été mise en évidence dans l'organisation des complexes impliqués dans la photosynthèse (**Figures 26 à 29**). De même, aucune modification n'a été mise en évidence dans l'architecture de la chaîne de transfert d'électrons des thylacoïdes, ni dans le fonctionnement global de la photosynthèse (**Figures 30 et 31**). Un mécanisme de photoprotection similaire à celui des feuilles est potentiellement actif dans les graines

photosynthétiques, pourtant faiblement éclairées (**Figure 31**). Bien que transitoire et se déroulant dans des conditions de faible éclairage et de réduction de la disponibilité des gaz, la différenciation de l'appareil photosynthétique dans les graines est donc complète dans tous ses aspects et conduit à une voie métabolique entièrement fonctionnelle.

### **La photosynthèse embryonnaire est nécessaire au développement de la graine**

Il a été suggéré dans de nombreuses études que la photosynthèse embryonnaire fournisse un complément métabolique et énergétique aux voies de biosynthèse des réserves de la graine. Néanmoins, l'accumulation des réserves dans la graine dépend essentiellement de l'activité photosynthétique de la plante mère. Dans ces conditions, le coût énergétique de la différenciation complète d'un appareil photosynthétique dans un organite adapté, puis de sa dédifférenciation en quelques jours semble exorbitant. Nous avons donc examiné l'influence de la photosynthèse embryonnaire sur la vigueur germinative. Nos résultats montrent que la lumière est indispensable au développement de la silique et qu'en absence de lumière au cours de la période de maturation (DAF 6/11), la vigueur germinative est fortement diminuée (pourcentage de germination et retard de germination). Nous avons tenté de séparer les effets de la lumière sur l'activité photosynthétique de ceux sur l'activation des photorécepteurs en utilisant un éclairage vert. Dans ces conditions, la vigueur germinative est restaurée. Ces résultats devront être confirmés en déterminant par exemple la vigueur germinative de graines albinos. En effet, toute mutation générant des graines non photosynthétiques devrait entraîner un retard de germination.

Au total, il semble que la photosynthèse embryonnaire soit importante, mais non indispensable, non seulement dans l'accumulation des réserves, mais aussi dans la vigueur germinative des graines. La mise en route de la différenciation complète de chloroplastes fonctionnellement actifs dans les graines pourrait également être vue comme un test de la future capacité de la plantule à accomplir la photosynthèse. Les graines n'ayant pas réussi ce « test fonctionnel » germeraient moins bien (moins de réserves, vigueur diminuée). Ainsi, la population de plantes issues des graines pourrait conserver ses caractéristiques.

# ***Conclusion***

---

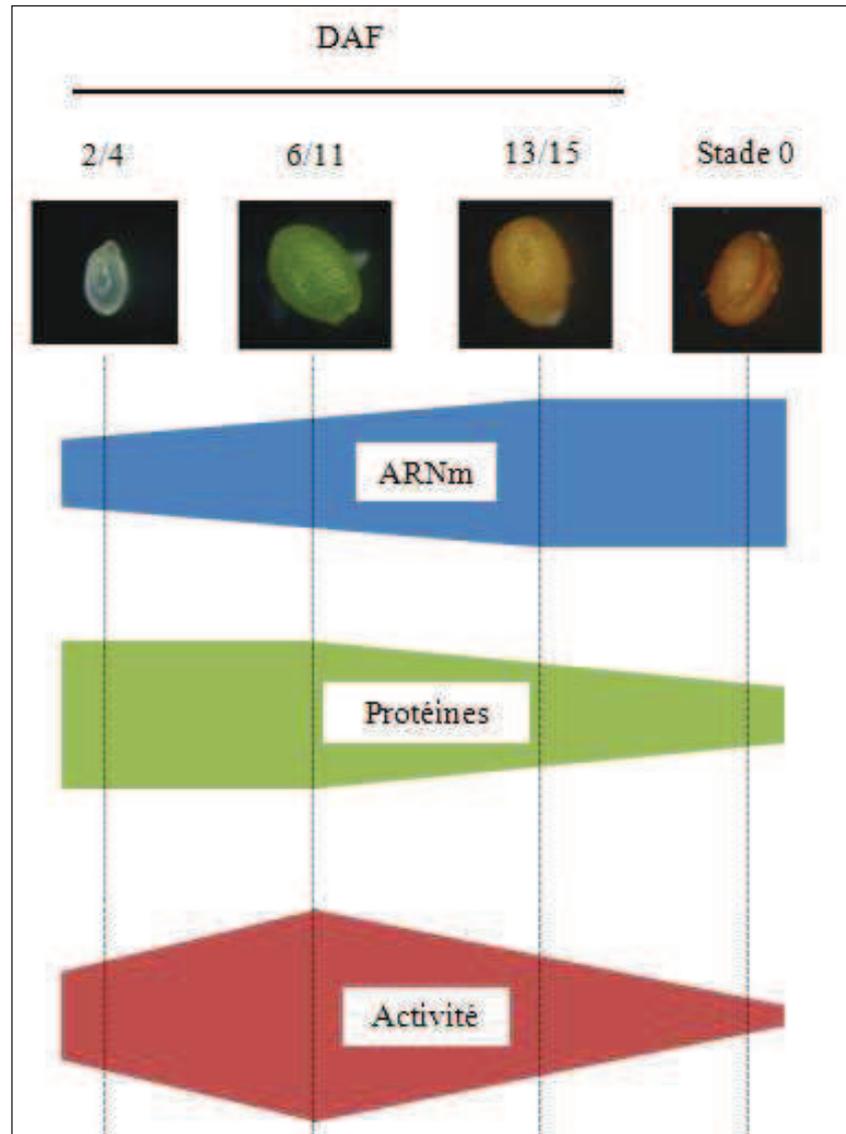
---

La formation des graines chez les plantes supérieures est caractérisée par trois étapes de développement : l'embryogenèse, la maturation et la dessiccation. L'importance des plastes dans ces différentes étapes de la formation de la graine et pour la germination a été soulignée d'une part par la caractérisation de nombreux mutants affectant des gènes qui codent pour des protéines plastidiales et d'autre part par l'analyse de l'expression du génome plastidial au cours de la germination.

Afin de mieux comprendre le rôle et le fonctionnement de plastes pendant cette phase importante du cycle de la plante, mon travail de thèse a consisté à caractériser l'expression du génome plastidial au cours de la formation de graines et à analyser les conditions de la photosynthèse embryonnaire.

Nous avons tout d'abord analysé l'expression des messagers et des protéines de l'appareil transcriptionnel plastidial. Les messagers des NEP et des facteurs sigma s'accumulent préférentiellement à partir du stade de dessiccation de la graine et dans la graine sèche. Cependant, l'accumulation des protéines et l'activité des polymérase PEP et NEP est maximale au cours de la maturation et diminue ensuite pendant la dessiccation. Les données obtenues permettent d'établir l'existence d'un découplage entre l'accumulation des ARNm et celle des protéines correspondantes (**Figure 34**). Les ARN produits pendant la dessiccation ne sont probablement pas traduits. Nous proposons que l'augmentation remarquable des messagers des NEPs RPOTmp et RPOTp au cours de la dessiccation et dans la graine sèche serve à fournir des messagers traductibles pour la production des polymérase dès la stratification et permette ainsi d'augmenter la quantité et l'activité NEP dès les premiers stades de la germination. Il en est de même pour les facteurs sigma qui régulent l'activité de la PEP. En effet, la traduction des facteurs sigma à partir des messagers stockés dans la graine dès la stratification permettrait l'activation de l'enzyme core PEP ayant conservée sa fonctionnalité durant la phase de dessiccation et présente dans la graine sèche. Ainsi, la production de messagers néosynthétisés au cours de la dessiccation suivie de leur traduction pendant la stratification contribue à augmenter l'efficacité de la germination.

La réactivation de l'expression génique plastidiale lors de la germination dépend donc de reliquats des ARN polymérase présentes dans la graine sèche et de l'accumulation des ARNm codant l'appareil transcriptionnel au cours de la dessiccation. La raison pour laquelle les ARN s'accumulent alors que les protéines diminuent reste encore sans réponse précise. Bien qu'également susceptibles de subir une oxydation (Bazin et al., 2011), les ARN constituent une forme de stockage plus stable et éventuellement plus facile à réparer que les protéines. En effet, l'oxydation des protéines au cours du



**Figure 34.**  
**Accumulation des**  
**ARNm et des protéines**  
**des appareils NEP et**  
**PEP au cours de la for-**  
**mation de la graine**  
**d'*Arabidopsis thaliana*.**  
 Modèle établi d'après les  
 données obtenues en  
 RT-PCR et en immuno-  
 détection. La surface est  
 représentative de  
 l'expression mais n'est  
 pas quantitative.

vieillesse des graines conduit souvent à une perte de fonction, à une sensibilité accrue aux protéases, et *in fine*, à une diminution de la vigueur germinative des graines (Rajjou et al., 2008). Par ailleurs, le nombre et la taille des plastes diminuent pendant la dessiccation. Le volume de stockage disponible pour des protéines plastidiales est donc très réduit et il est probablement plus facile de stocker des produits dans le compartiment cytoplasmique sous forme d'ARNs. Bien que l'activation de la transcription et de la traduction nucléo-cytoplasmique soit simultanée lorsque débute la germination, seule la traduction est absolument nécessaire à la germination (Rajjou et al., 2004). On comprend donc que le stockage des messagers produits au cours de la formation de la graine soit important pour la germination. Ces messagers sont immédiatement traduits dès l'imbibition de la graine sèche. A l'opposé, dans les plastes, la trans-

cription précède clairement la traduction au début de la germination (Demarsy et al., soumis). Elle dépend donc, d'une part, du stockage de la PEP et des NEPs sous forme de protéines, et d'autre part de la néo-synthèse immédiate des ARN polymérase et des facteurs sigma dans le cytoplasme à partir des ARNm stockés dans la graine sèche. Nos travaux et des travaux antérieurs (Demarsy et al., soumis) montrent que les protéines composant les appareils transcriptionnels plastidiaux stockées dans la graine sèche ont été synthétisées au cours de la formation de la graine et que leur fonctionnalité est conservée durant la période de dessiccation et au-delà par un mécanisme encore non élucidé.

L'étude du transcriptome plastidial montre que le profil d'accumulation des ARNm codant les protéines impliquées dans la photosynthèse subit les variations les plus importantes au cours de la formation des graines. La cinétique d'accumulation de ces messagers correspond à celle des protéines, ce qui suggère l'existence d'une régulation principalement transcriptionnelle. Cependant les profils d'accumulation des ARNm des chloroplastes dans des graines et de ceux des chloroplastes des feuilles sont similaires. Notre étude a permis de confirmer que la photosynthèse embryonnaire se déroule dans des conditions particulières d'éclairage, sous une lumière fortement enrichie en longueurs d'onde vertes. Nous avons montré que ces conditions n'affectent ni la structure, ni le fonctionnement de l'appareil photosynthétique qui est semblable à celui d'une feuille. En présence des seuls pigments chlorophylles et caroténoïdes, absorbant peu dans cette partie du spectre, la question de l'efficacité de cette photosynthèse est soulevée. Nous avons montré que cette photosynthèse embryonnaire est nécessaire à la formation de graines pour une vigueur germinative normale. Elle est donc efficace. Pour expliquer ce résultat, nous suggérons que cette période de la photosynthèse n'est pas seulement importante pour augmenter l'accumulation de réserves. En prenant en compte nos résultats sur l'expression du génome plastidial, nous suggérons qu'en absence de photosynthèse, les plastes accumulent moins d'ARN messagers codant les ARN polymérase et les protéines correspondantes dans la graine. Ceci contribuerait à diminuer encore la vigueur germinative de la graine. Pour confirmer cette hypothèse, il pourra être envisagé d'analyser l'expression du plastome de graines maintenues à l'obscurité au cours de leur développement, ou bien de graines d'espèces non photosynthétiques. L'évaluation de la qualité et de la quantité de leurs réserves pourrait permettre de mieux caractériser le rôle de la photosynthèse embryonnaire dans la vigueur germinative.

Envisager de conduire de telles analyses transcriptomiques globales à partir de matériel biologique en faible quantité justifie le développement de techniques très sen-

sibles d'hybridation et de détection des ADNc. A cet égard, les résultats que nous avons obtenus en détectant par microscopie TIRF les ADNc marqués par un fluorophore sont prometteurs. Le seuil de détection obtenu est ainsi abaissé jusqu'à la visualisation d'une molécule unique tandis que la quantité de matériel nécessaire pour réaliser l'hybridation est diminuée. Avec une telle méthode, il devient envisageable d'analyser l'expression du génome plastidial au niveau cellulaire dans un futur proche.

Les résultats obtenus lors de ce travail apportent de nouvelles informations sur le fonctionnement de la transcription plastidiale au cours de la formation de la graine. L'importance de l'accumulation d'ARNm, de certaines protéines ainsi que celle de la photosynthèse embryonnaire dans la vigueur germinative ont été soulignées. Ces données permettent de comprendre comment l'efficacité de la germination dépend de la phase de formation de la graine.



# ***Matériel et méthodes***

---

---

## I. Obtention du matériel végétal

### I-1. Stérilisation en surface des graines d'*Arabidopsis thaliana*

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* sont stérilisées en surface par lavage dans une **solution de stérilisation** (1 mL de solution pour un volume équivalent de 50  $\mu$ L de graines). Après agitation pendant cinq minutes, les graines sont lavées par trois rinçages successifs à l'éthanol 100 % puis mises à sécher pendant une nuit sous hotte à flux laminaire.

**Solution de stérilisation : 0,75 % Hypochlorite de sodium – 80 % Ethanol**

### I-2. Culture sur terre d'*Arabidopsis thaliana*

Les graines sont placées à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant deux heures afin d'éliminer les œufs de thrips, puis semées sur un mélange de terre et de vermiculite (4 : 1) imbibé d'eau et traité par une solution de Bt Vectobac 0,5 % afin d'éliminer les larves de Sciarides. Les pots sont ensuite recouverts d'un film plastique afin de maintenir une atmosphère saturée en eau pendant la première semaine de développement. Après stratification à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  à l'obscurité pendant une nuit, les pots sont placés en salle de culture. Les plantes sont arrosées deux fois par semaine avec de l'eau et tous les dix jours avec de l'engrais (PlantProd N22 : P10 : K22 – 2 g/L) et cultivées dans des conditions de jours longs (16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité) sous une intensité lumineuse de  $80\text{ }\mu\text{E}$  et une température constante de  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### I-3. Test de germination

La germination des graines d'*Arabidopsis* est réalisée à  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  en lumière continue ( $80\text{ }\mu\text{E}$ ) après stratification pendant 24 heures à l'obscurité et à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Les graines sont



**Figure 35. - Graine d'*Arabidopsis thaliana* germée.**

disposées dans des boîtes de pétri (diamètre 5 cm) contenant trois feuilles de papier-filtre (Whatman, diamètre 4,7 cm) recouvertes d'une membrane de nitrocellulose quadrillée facilitant le comptage des graines (Whatman ME 24/21 ST ;  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  ; diamètre 4,7 cm) et imbibées avec 1,3 mL d'eau stérile.

Chaque test de germination est réalisé en triplicat à raison de 70 à 80 graines par répétition. Une graine est considérée comme ayant germé lorsque la radicule a percé le tégument de la graine et est visible sous loupe binoculaire (**Figure 35**).

#### I-4. Récolte des graines

Chez *Arabidopsis thaliana*, le jour de fécondation DAF 0 (DAF : Day After Fecondation), correspond à l'ouverture du bourgeon floral. Il est repéré grâce à l'ajout d'un fil coloré autour du pétiole de la fleur. Un code couleur est ensuite mis en place permettant de repérer les différents stades de développement de la graine et de récolter les graines correspondantes (**Figure 36**).



**Figure 36. - Repérage du jour de fécondation.**

Le jour de fécondation est repéré grâce à un fil coloré autour du bourgeon floral.

Les siliques, contenant les graines au stade désiré, sont scotchées par leur pédicelle sur un morceau de parafilm et ouvertes sous loupe binoculaire. Les graines sont plongées immédiatement dans l'azote liquide et conservées à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation.

La récolte des graines sèches est effectuée après une dizaine de jours de séchage des siliques.

#### I-5. Stockage des graines

Après récolte, les graines sèches sont stockées à  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation. Les graines non mures sont stockées à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### I-6. Préparation des échantillons pour observation en microscopie électronique

Les graines sont fixées dans le glutaraldéhyde à 2,5 % dans du **tampon phosphate** à température ambiante pendant deux heures. Les échantillons sont rincés par trois bains successifs dans le tampon phosphate, fixés dans du tétraxide d'osmium 2 % pendant une heure à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  puis déshydratés dans des bains successifs d'éthanol à concentration croissante (70 %, 95 % puis trois bains à 100 % ; 20 minutes chacun). Les graines sont ensuite imprégnées de résine dans deux bains d'une heure en présence d'un tiers d'épon et de deux tiers d'éthanol 100 % puis de deux tiers d'épon et d'un tiers d'alcool 100 %. Les échantillons sont placés dans des moules d'inclusion à plat contenant l'épon pure. La polymérisation dure 72 heures à  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Les coupes semi-fines et ultra-fines ainsi que l'observation au microscope électronique ont été réalisées par Denis Falconet au laboratoire.

**Tampon phosphate : 100 mM NaHPO<sub>4</sub> ; pH 7,2**

## II. Extraction et dosage des pigments

### II-1. Dosage rapide des chlorophylles

Le matériel végétal, protégé de la lumière, est broyé dans 100  $\mu$ L d'acétone 80 % à l'aide d'un piston dans un tube eppendorf. 100  $\mu$ L d'acétone sont ajoutés et le mélange est de nouveau broyé puis vortexé pendant 30 secondes. Les débris sont éliminés par centrifugation (10 min - 13 200 rpm - 4 °C) et le dosage des pigments dans l'extrait acétonique est réalisé au spectrophotomètre aux longueurs d'onde spécifiques d'absorbance des chlorophylles a et b (respectivement 663 et 647 nm) (Lichtenthaler, 1987). Les résultats sont rapportés à la masse de matière fraîche.

### II-2. Extraction des pigments

Le matériel végétal, conservé à l'abri de la lumière pendant toute la manipulation, est broyé dans un tube eppendorf régulièrement refroidi par immersion dans l'azote liquide afin d'éviter la dégradation des pigments par oxydation. 200  $\mu$ L de méthanol 80 % sont ajoutés et le mélange est vortexé plusieurs fois pendant dix secondes puis replacé dans la glace. Après centrifugation (5 min - 13 200 rpm - 4 °C), les pigments sont récoltés dans la phase méthanolique correspondant au surnageant. Deux nouvelles extractions sont effectuées, selon le même protocole, en présence de 200  $\mu$ L de méthanol 100 % puis d'acétate d'éthyl afin d'extraire la totalité des pigments. Les surnageants sont réunis et le solvant est éliminé par évaporation sous atmosphère d'argon pour éviter l'oxydation des caroténoïdes. Les pigments sont repris dans 20  $\mu$ L de diméthylformamide et analysés par HPLC (collaboration avec Marcel Kuntz).

## III. Méthode d'analyse des acides nucléiques

### III-1. Séparation des acides nucléiques sur gel d'agarose

Les acides nucléiques, mélangés à du **tampon de dépôt**, sont visualisés après électrophorèse en **gel d'agarose** (migration pendant 15 à 20 minutes à 150 V dans du **TBE 0,5x**) sous éclairage à 320 nm par ajout de Bromure d'éthidium, agent intercalant des acides nucléiques (Sambrook et al., 1989).

**Tampon de dépôt** : 3 % Glycérol ; 0,025 % Bleu de bromophénol

**Gel d'agarose** : TBE 0,5x contenant : 0,5 à 2 % (p/v) Agarose selon la taille attendue des fragments – 0,000002 % (p/v) Bromure d'éthidium

**TBE 0,5x** : 50 mM Tris ; 50 mM Borate ; 1,25 mM EDTA

### **III-2. Extraction rapide d'ADN génomique d'*Arabidopsis thaliana***

Cette méthode est particulièrement adaptée au criblage de mutant par PCR. Le matériel végétal (1 à 2 feuilles) est broyé avec un pilon dans un tube eppendorf de 1,5 mL avec deux fois 100 µL de **tampon d'extraction**. Le mélange est vortexé énergiquement pendant 10 secondes puis centrifugé (5 min - 13 200 rpm - 23 °C). L'ADN contenu dans le surnageant est précipité par 200 µL d'isopropanol et récolté par centrifugation (10 min - 13 200 rpm - 4 °C). Le culot d'ADN est lavé par ajout de 150 µL d'éthanol 70 % (préalablement refroidi à - 20 °C) et centrifugation (3 min - 13 200 rpm - 4 °C). Il est ensuite séché puis repris dans un petit volume (20 à 50 µL) d'eau stérile. L'ADN est conservé à - 20 °C pendant un an.

**Tampon d'extraction** : 200 mM Tris-HCl pH 8 ; 250 mM NaCl ;  
25 mM EDTA pH 8 ; 0,5 % SDS

### **III-3. Extraction d'ARN**

La méthode que nous avons mise au point a fait l'objet d'une publication (Allorent et al., 2010). Elle permet d'obtenir des ARN particulièrement purs ( $A_{260}/A_{280} = 1,90$  et  $A_{230}/A_{280} = 2,3$ ) à partir de graines ou de feuilles pour l'analyse de l'expression du génome plastidial par RT-PCR, extension d'amorce ou microarray. Les différentes purifications permettent de diminuer la quantité de polysaccharides et de polyphénols, et ainsi d'éviter la contamination des extraits par des molécules inhibitrices des réactions enzymatiques.

#### **III-3-1. Broyage du matériel végétal**

Le matériel végétal (25 à 50 mg), récolté dans l'azote liquide et conservé à - 80 °C, est broyé dans un mortier régulièrement refroidi par de l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. 1 mL de **tampon d'extraction** est ajouté à la poudre dans le mortier puis le glaçon formé est broyé jusqu'à retour à l'état liquide du tampon. Le tampon est ensuite transféré dans des tubes eppendorf de 2 mL. Afin de récupérer le maximum de broyat, le mortier est rincé par 1 mL de tampon d'extraction.

#### **III-3-2. Extraction des ARN**

Le mélange est vortexé pendant trois minutes et les débris sont éliminés par centrifugation (15 min - 13 200 rpm - 22 °C). Le surnageant, contenant les acides

nucléiques, est transféré dans des tubes 2 mL (0,8 mL maximum par tube). Les composés phénoliques sont éliminés par addition d'un volume de chloroforme au surnageant, puis par agitation du mélange au vortex pendant trois minutes et centrifugation (25 min - 13 200 rpm - 22 °C). La phase aqueuse, débarrassée des composés phénoliques, est récupérée puis un volume de **phénol mixture** et 0,5 volume de chloroforme sont ajoutés afin d'éliminer les protéines entraînées dans la phase phénolique après centrifugation (10 min - 13 200 rpm - 22 °C). Les acides nucléiques contenus dans la phase aqueuse sont récupérés et la phase aqueuse est lavée par addition d'un volume de chloroforme et centrifugation (5 min - 13 200 rpm - 22 °C).

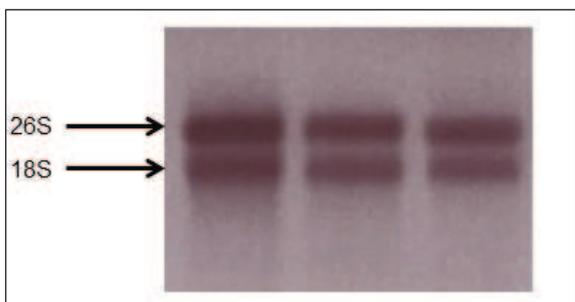
### III-3-3. Précipitation, lavage et dosage des ARN

La phase aqueuse est transférée dans un tube eppendorf de 1,5 mL et les acides nucléiques sont précipités dans l'isopropanol (0,6 volume - 20 min - 22 °C) et récoltés sous forme de culot par centrifugation (30 min - 13 200 rpm - 4 °C). Le culot est séché pendant 15 à 20 minutes à température ambiante puis est repris dans 100 µL d'eau stérile et les ARN sont précipités dans du Chlorure de lithium (2 M final) pendant une nuit à 4 °C afin de séparer les ADN (solubles) des ARN. Après centrifugation (30 min - 13 200 rpm - 4 °C), le culot d'ARN totaux est lavé par 150 µL d'éthanol 70 % (préalement refroidi à - 20 °C) et centrifugation (3 min - 13 200 rpm - 4 °C) et est ensuite séché à température ambiante puis repris dans 25 à 50 µL d'eau stérile.

Les ARN sont quantifiés au spectrophotomètre (absorbance à 230, 260 et 280 nm). Leur qualité est contrôlée par dépôt de 100 ng d'ARN sur gel d'agarose 1 % (**Figure 37**).

**Tampon d'extraction** : 100 mM Tris-Hcl pH 9,5 ; 600 mM NaCl ; 10 mM EDTA ; 2 % Lithium Dodecyl Sulfate ; 400 mM Trisodium citrate ; 5 % β-Mercaptoéthanol

**Phénol mixture** Phénol saturé en eau contenant 35 % (p/v) Guanidine thiocyanate et 0,1 volume Acétate de sodium 2M pH 4



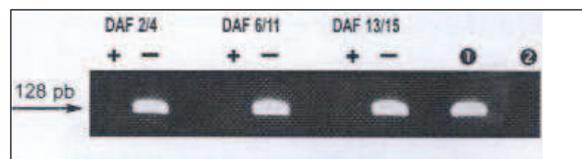
**Figure 37. - Dosage et contrôle de la qualité des ARN.**

100 ng d'ARN sont déposés sur gel d'agarose 1 % (p/v) puis visualisés par coloration au BET après séparation électrophorétique. La visualisation des ARNr 26S et 18S permet de contrôler l'absence de dégradation.

### III-4. Traitement des ARN à la DNase

L'ADN est éliminé par un traitement de 30 minutes à 37 °C dans un volume réactionnel de 100 µL contenant 10 µL de tampon Turbo DNase, 1,5 µL de Turbo DNase et de 10 à 15 µg d'ARN totaux. 1,5 µL d'enzyme est ensuite ajouté et le mélange est de nouveau mis à incuber pendant 30 minutes à 37 °C. L'enzyme est éliminée par deux extractions successives au phénol/chloroforme : au volume réactionnel est ajouté 20 µL de TNE 10x, 80 µL d'eau stérile et 200 µL de phénol/chloroforme/IAA (25 : 24 : 1). Après centrifugation (10 min - 13 200 rpm - 22 °C), la phase aqueuse est récupérée et lavée par ajout d'un volume de chloroforme et centrifugation (5 min - 13200 rpm - 22 °C). Les ARN contenus dans la phase aqueuse sont précipités en présence de trois volumes d'éthanol 100 % pendant une nuit à - 20 °C et récupérés par centrifugation (30 min - 13 200 rpm - 4 °C). Le culot est rincé avec 150 µL d'éthanol 70 % (préalablement refroidi à - 20°C) par centrifugation (3 min - 13 200 rpm - 4 °C) puis est séché et repris dans 20 µL d'eau stérile.

L'efficacité du traitement DNase est contrôlée par amplification par PCR d'un gène plastidial (**Figure 38**) permettant de s'assurer de l'absence totale d'ADN. En effet, le génome plastidial est beaucoup plus représenté que le génome nucléaire dans une cellule végétale (une copie du génome nucléaire pour plusieurs centaines de copies du génome dans un chloroplaste).



**Figure 38. - Vérification de l'efficacité du traitement des ARN à la DNase par amplification du gène plastidial *psbN* par PCR.**

Les produits d'amplification sont séparés sur gel d'agarose 1,5 %. + : ARN traités. - : ARN non traités. 1 : témoin positif (matrice = ADN génomique). 2 : témoin négatif (pas de matrice).

TNE 10x : 100 mM TrisHCl ; 2 M NaCl ; 10 mM EDTA ; pH 7,4

### III-5. Analyse des ARN par rétrotranscription et PCR semi-quantitative

#### III-5-1. Synthèse du premier brin d'ADNc

La synthèse du premier brin d'ADNc est réalisée dans un volume réactionnel total de 55 µL. Les ARN (1 µg) sont dénaturés pendant cinq minutes à 65 °C en présence de 1 µg d'amorces aléatoires sous forme d'hexamères (Random Primers - Invitrogen) et 0,5 mM de dNTP. Le **tampon de réaction** est ensuite ajouté et le mélange est incubé

pendant deux minutes à température ambiante avant ajout de 3,7 U de RNase Inhibitor (Euromedex) et de 200 U de Reverse transcriptase [Superscript II (Invitrogen)].

On réalise alors l'hybridation des amorces avec les ARN pendant 10 minutes à température ambiante puis la polymérisation des ADNc pendant 50 minutes à 42 °C. L'enzyme est inactivée par chauffage à 70 °C pendant 10 minutes.

La réaction peut être stockée à – 20 °C pendant plusieurs mois.

### III-5-2. Amplification des ADNc par PCR semi-quantitative

La réaction d'amplification est réalisée à partir d'1 µL de la solution contenant les ADNc. Les conditions PCR ont été déterminées pour chaque couple d'amorce afin que la réaction ait lieu dans la phase exponentielle de l'amplification. La quantité d'ADNc est ajustée par rapport à l'amplification du gène ribosomique 18S d'expression constitutive (Quantum 18S RNA Universal Kit - Ambion). La réaction d'amplification se déroule selon les cycles suivants pour tous les gènes étudiés : dénaturation de 5 minutes à 95 °C puis n cycles [selon les amorces utilisées (voir Annexe I)] de 30 secondes à 95 °C / 30 secondes à 55 °C / 45 secondes à 72 °C) et la réaction se termine par une élongation finale de 5 minutes à 72 °C.

Les produits PCR sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %.

**Tampon de réaction :** 250 mM Tris-Hcl pH 8,3 ;  
375 mM KCl ; 15 mM MgCl<sub>2</sub>

### *III-6. Analyse des ARN par extension d'amorce*

#### III-6-1. Marquage de l'oligonucléotide amorce et du produit PCR

100 ng d'oligonucléotide ou 100 fmol de produit PCR sont marqués par transfert du groupement marqué  $\gamma$  d'une molécule de [<sup>32</sup>P]-dATP à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide par la T4 polynucléotide kinase (Invitrogen) selon les indications du fournisseur. Le milieu réactionnel contient : 5 µL de tampon 5x Forward buffer, 5 µL de  $\gamma$ -P[<sup>32</sup>P]-dATP (10 µCi/µL, 3 000 Ci/mmol), dans un volume total de 25 µL. Après dénaturation à 95 °C pendant 5 minutes, l'enzyme est ajoutée [5 U de T4 polynucléotide kinase (Invitrogen)] et la réaction se déroule pendant 10 minutes à 37 °C. La réac-

tion est stoppée par dénaturation thermique de l'enzyme à 65 °C pendant 10 minutes. L'oligonucléotide et le produit PCR marqués sont purifiés par chromatographie d'exclusion sur colonne G50 (GE Healthcare). La colonne est préparée dans une seringue de 1 mL bouchée à son extrémité par de la laine de verre, en sédimentant 1 mL de **résine Séphadex G50**. Le volume réactionnel est complété à 200 µL avec le tampon **TE**. L'échantillon est déposé au sommet de la colonne, qui est rincée avec 200 µL de tampon TE. Les ADNc marqués sont élués par 300 µL de TE et conservés à – 20 °C. Dans ces conditions, les nucléotides non incorporés sont retardés sur la résine et éliminés.

### III-6-2. Marquage du marqueur de taille

100 ng de marqueur de taille Kb (Invitrogen) est marqué par échange du  $\gamma$ -P du [<sup>32</sup>P]-dATP avec les oligonucléotides du marqueur. Le protocole du marquage et la purification sont identiques au marquage de l'amorce et du produit PCR, seul le tampon du milieu réactionnel est différent [5x Exchange buffer (Invitrogen)].

### III-6-3. Réaction d'extension d'amorce

Les ARN totaux sont dénaturés pendant 10 minutes à 65 °C en présence de 3 µL d'oligonucléotide marqué dans un volume total de 15 µL. Après 5 minutes sur la glace, le mélange est incubé à la température d'hybridation ( $T_m$ ) de l'oligonucléotide pendant 20 minutes puis de nouveau placé sur la glace. La rétrotranscription se déroule pendant 50 minutes à 42 °C dans un mélange contenant 0,4 mM de chaque dNTP, 5 µL de **tampon de réaction**, 10 mM de DTT, 3,7 U de RNase Inhibitor (Euromedex) et 100 U de Reverse transcriptase [Superscript II (Invitrogen)].

La réaction est stoppée par chauffage à 70 °C pendant 15 minutes. La RNase A (1 µL ; 1 mg/mL - Fermentas) est ensuite ajoutée afin d'éliminer les ARN. Les ADNc néosynthétisés sont dilués dans 155 µL de TE et 20 µL de **TNE10x** puis purifiés par extraction phénol/chloroforme/IAA. Un volume de phénol/chloroforme est ajouté et le mélange est vortexé et centrifugé (10 min - 13 200 rpm - 22 °C). La phase aqueuse contenant les ADNc est récupérée et précipitée avec trois volumes d'éthanol à – 20 °C pendant une nuit.

Après centrifugation (30 min - 13 200 rpm - 4 °C), le culot est lavé par ajout de 150 µL d'éthanol 70 % (préalablement refroidi à – 20 °C) et centrifugation (5 min - 13 200 rpm - 4 °C). Le culot est séché puis repris dans 5 µL de **tampon de dépôt déna-**

**turant.** Les ADNc marqués sont séparés sur **gel de polyacrylamide** après dénaturation à 95 °C pendant 5 minutes et migration dans du tampon **TBE-S** pendant environ 2 h à 30 W. Le gel est séché puis révélé par autoradiographie.

**Résine Séphadex G50** : 3 g de Séphadex G50 dans 100 mL de TE

**TE** : 10 mM Tris-HCl pH 8 ; 1 mM EDTA

**Tampon de réaction** : 250 mM Tris-HCl pH8,3 ; 375 mM KCl ; 15 mM MgCl<sub>2</sub>

**TNE10x** : 100 mM Tris-HCl ; 2 M NaCl ; 10 mM EDTA ; pH 7,4

**Tampon de dépôt dénaturant** : 97,5 % formamide ; 10 mM EDTA ; 0,3 % bleu de bromophénol ; 0,3 % xylène cyanol

**Gel de polyacrylamide** : TBE-S 1x contenant : 6 % polyacrylamide ; 8 M Urée

**TBE-S 1x** : 45 mM Tris-borate pH 8,3 ; 0,5 mM EDTA

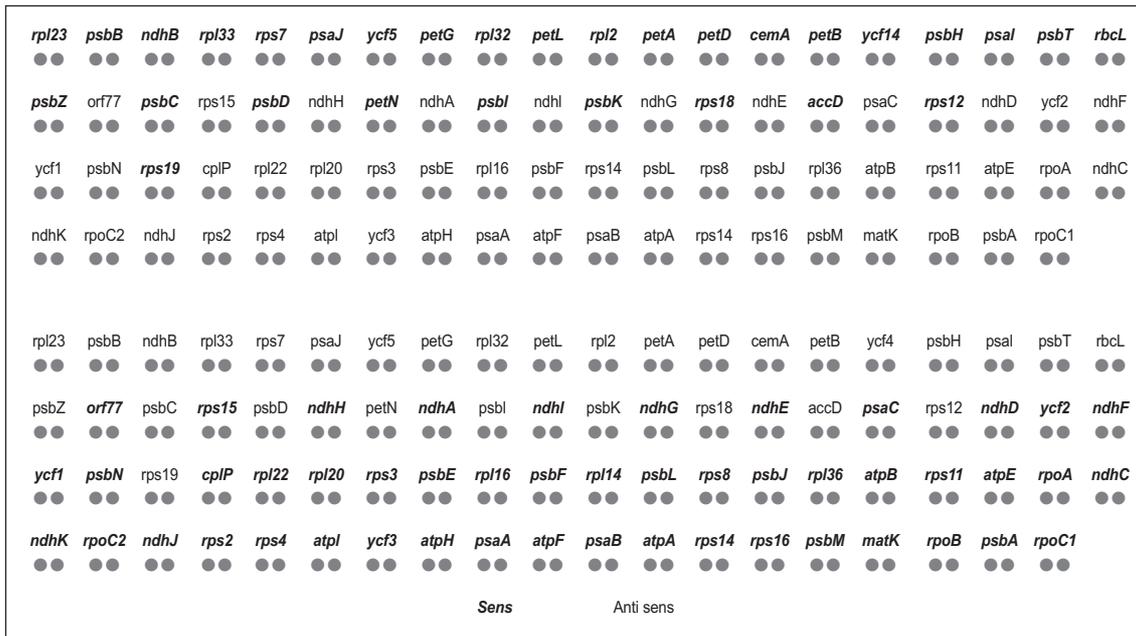
### ***III-7. Analyse des ARN par hybridation sur macroarray***

Le macroarray utilisé a été élaboré au laboratoire et permet de détecter l'expression des ARN messagers de 79 gènes plastidiaux ainsi que celle des transcrits anti-sens correspondants. Chaque expérience nécessite plusieurs étapes :

- Le marquage radioactif des ADNc plastidiaux rétrotranscrits à partir des ARNm extraits de chaque stade,
- L'hybridation de ces ADNc sur la membrane de macroarray,
- L'exposition contre des écrans photosensibles,
- La numérisation des écrans photosensibles,
- Le traitement informatique (détermination de l'intensité de chaque spot),
- L'analyse statistique des données.

La rétrotranscription des ARNm en ADNc marqués radioactivement est réalisée en utilisant comme amorces un mélange d'oligonucléotides (oligomères de 70 nucléotides) spécifiques de chaque gène plastidial. La radioactivité incorporée lors de l'étape de rétrotranscription est quantifiée après purification des ADNc sur de la résine Séphadex G50. La même quantité de radioactivité (mesurée en cpm au compteur à scintillation) est utilisée pour l'hybridation.

L'hybridation se déroule sur la membrane de macroarray selon les conditions d'hybridation mises au point au laboratoire (Zghidi et al., 2007). Sur cette membrane sont déposés en double, des oligonucléotides d'une longueur de 70 nucléotides complémentaires des ADNc néosynthétisés et correspondant à chaque gène plastidial (sens et anti-sens) (**Figure 39**).



**Figure 39. - Plan du macroarray utilisé pour l'analyse du transcriptome plastidial d'*Arabidopsis thaliana*.** Des ADNc simple brin de 79 transcrits plastidiaux (sens et anti-sens) ont été déposés en duplicat sur la membrane de nitrocellulose.

### III-7-1. Synthèse des ADNc par rétrotranscription et marquage au $^{32}\text{P}$

Les ARN totaux, préalablement traités à la DNase (voir III-4), sont dénaturés à 65 °C pendant 5 minutes en présence de 0,2 pmol du mélange d'oligonucléotides spécifiques, de 0,5 mM de dTTP, dGTP et dCTP, et de 0,75  $\mu\text{M}$  de [ $^{32}\text{P}$ ]- $\alpha$  dATP dans un volume total de 27  $\mu\text{L}$ . 100 U de RNase inhibitor et le **tampon de réaction** sont ensuite ajoutés puis le mélange est placé à 42 °C pendant 3 minutes afin de réaliser l'hybridation des amorces. La rétrotranscription est initiée par l'ajout de 600 U de reverse transcriptase [Superscript II (Invitrogen)]. La réaction s'effectue à 42 °C pendant 50 minutes. L'enzyme est ensuite inactivée par chauffage à 70 °C pendant 15 minutes. Un traitement supplémentaire par 10 U de RNase H (Fermentas) pendant 20 minutes à 37 °C est réalisé afin d'éliminer l'ARN hybridé à l'ADNc nouvellement synthétisé.

**Tampon de réaction :** 250 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 375 mM KCl – 15 mM  $\text{MgCl}_2$

### III-7-2. Purification des ADNc

Les ADNc sont purifiés par chromatographie d'exclusion sur de la résine **Séphadex G50** (GE Healthcare) comme indiqué précédemment (voir III-6-1). La

radioactivité incorporée est quantifiée par comptage scintigraphique (1  $\mu\text{L}$  d'ADNc marqué dans 10 mL de liquide de scintillation (Kodak), donnant une activité moyenne de 80 000 à 500 000 cpm). La quantité de sonde est ajustée par rapport aux résultats du comptage. La qualité des ADNc (efficacité du marquage, absence de dégradation) est contrôlée sur **gel de polyacrylamide** par dépôt de 1  $\mu\text{L}$  d'ADNc dénaturés pendant 5 minutes à 95 °C (puis conservés dans la glace) dans 4  $\mu\text{L}$  de **tampon de dépôt dénaturant**. La migration s'effectue dans du tampon **TBE-S 1x** pendant environ 2 h à 30 W. Le gel est ensuite séché et révélé par autoradiographie.

**Solution de Séphadex G50** : 3 g de Séphadex G50 dans 100 mL de TE

**Gel de polyacrylamide** : TBE-S 1x contenant : 6 % polyacrylamide ; 8 M Urée

**Tampon de dépôt dénaturant** : 97,5 % formamide ; 10 mM EDTA ; 0,3 % bleu de bromophénol ; 0,3 % xylène cyanol

**TBE-S 1x** : 45 mM Tris-borate pH 8,3 ; 0,5 mM EDTA

### III-7-3. Hybridation des ADNc sur les membranes

La membrane en nitrocellulose est humidifiée dans du tampon **SSC 2x** puis est préhybridée dans 25 mL de **tampon d'hybridation** pendant 1 heure à 65 °C. La sonde est dénaturée pendant 5 minutes à 95 °C et conservée dans la glace avant utilisation. L'hybridation est réalisée dans 25 mL de tampon d'hybridation frais contenant la sonde sous agitation durant 3 jours à 65 °C. La membrane est ensuite lavée dans 25 mL de **tampon de lavage** successivement pendant 10 minutes à température ambiante puis 5 minutes à 65 °C. Elle est ensuite rincée dans du SSC 2x, puis placée contre un écran photosensible (Fujifilm Imaging Plate) pendant 7 à 12 jours. L'écran est analysé par numérisation (PhosphoImager Fujifilm FLA-8000).

**SSC 2x** : 0,3 M NaCl ; 0,03 M Trisodium citrate ; pH 7

**Tampon d'hybridation** : 0,5 M  $\text{NaHPO}_4$  pH 7,2 ; 1 mM EDTA ; 7 % SDS ; 1 % BSA

**Tampon de lavage** : 40 mM  $\text{NaHPO}_4$  pH 7,2 ; 1 mM EDTA ; 1 % SDS

### III-7-4. Analyse informatique des résultats de macroarray

Les images numérisées sont traitées par le logiciel ArrayGauge (Fujifilm). Une matrice permet de mesurer l'intensité de chaque dépôt d'ADNc et du bruit de fond associé. Les résultats sont ensuite récupérés sous forme de matrice numérique exploi-

table à l'aide du tableur Excel. La moyenne des valeurs attribuées à deux dépôts d'un même ADNc est alors effectuée.

## IV. Méthode d'analyse des protéines

### IV-1. Extraction de protéines

L'échantillon, conservé à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , est broyé au piston dans un tube eppendorf de 1,5 mL contenant 100  $\mu\text{L}$  de **tampon SDG** en pratiquant trois cycles de congélation dans l'azote liquide puis décongélation. Le piston est ensuite rincé avec 50  $\mu\text{L}$  de tampon SDG. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (15 min - 13 200 rpm -  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Le surnageant est récupéré tandis que le culot est de nouveau broyé avec 50  $\mu\text{L}$  de tampon SDG. Après rinçage du piston avec 50  $\mu\text{L}$  de tampon SDG et centrifugation (15 min - 13 200 rpm -  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), les surnageants sont regroupés et centrifugés (10 min - 13 200 rpm -  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) afin d'éliminer des débris résiduels. Les protéines sont précipitées par ajout de cinq volumes d'acétone 100 % et centrifugation (25 min - 13 200 rpm -  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Le surnageant est éliminé et le culot de protéines est séché puis repris dans 100 à 200  $\mu\text{L}$  de **tampon de charge 2x** en vue d'une analyse SDS-PAGE.

**Tampon SDG** : 2,5 % SDS ; 2 % DTT ; 10 % Glycérol ;  
62,5 mM Tris-HCl pH 6,8

**Tampon de charge 2x** : 0,1 M Tris-Hcl pH 6,8 ; 0,7 M  $\beta$ -Mercaptoéthanol ;  
20 % Glycérol ; 2 % SDS ; 0,01 % Bleu de bromophénol

### IV-2. Dosage de protéines

Le dosage des protéines est réalisé d'après Esen (1978). L'extrait à doser (5  $\mu\text{L}$ ) est mélangé à 5  $\mu\text{L}$  de **tampon SDS-PAGE 2x**, dénaturé pendant 5 minutes à  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  et conservé dans la glace. 2  $\mu\text{L}$  du mélange, ainsi que 2  $\mu\text{L}$  de BSA (2 mg/mL) et 2  $\mu\text{L}$  de tampon SDS PAGE 2x sont déposés en duplicat sur des morceaux de papier Whatman (1 cm x 1 cm) qui sont laissés à sécher à l'air libre durant 10 minutes. Les protéines sont fixées pendant 5 minutes par incubation des morceaux de papier Whatman dans 25 mL de **tampon de fixation** puis colorées par incubation dans 25 mL de **tampon de coloration** pendant 15 minutes. L'excès de tampon de coloration est éliminé par rinçage à l'eau distillée froide puis les échantillons sont placés dans deux bains successifs d'eau bouillante pendant 1 minute et de nouveau rincés à l'eau distillée froide. Les carrés de papier Whatman sont séchés et placés dans des tubes eppendorfs 1,5 mL avec 1 mL de **tampon d'éluion** pendant 2 h à  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou pendant une nuit à température ambiante. Les

protéines colorées diffusent dans le tampon, elles sont quantifiées par mesure au spectrophotomètre à 578 nm par comparaison à une gamme étalon.

**Tampon SDS-PAGE 2x** : 0,1 M Tris-HCl pH 6,8 ; 0,7 M  $\beta$ -Mercaptoéthanol ; 20 % Glycérol ; 2 % SDS

**Tampon de fixation** : 25 % Isopropanol ; 10 % Acide acétique

**Tampon de coloration** : 25 % Isopropanol ; 10 % Acide acétique ; 0,1 % (p/v) Coomassie brillant blue G

**Tampon d'éluion** : 0,5 % (p/v) SDS

### ***IV-3. Séparation monodimensionnelle des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)***

Le gel d'acrylamide se compose d'un **gel de séparation** et d'un **gel de concentration**. La migration s'effectue dans du **tampon de migration** (tampon Tris-glycine, Laemmli, 1970) à 10 mA pendant 15 minutes puis à 20 mA pendant environ 1 heure (pour un gel). Après migration, les protéines sont colorées au bleu de Coomassie ou transférées sur membrane de nitrocellulose pour immunodétection.

**Gel de séparation** : 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 ; 0,4 % SDS ; 10 à 12 % acrylamide (p/v)

**Gel de concentration** : 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 ; 0,4 % SDS ; 5 % acrylamide (p/v)

**Tampon de migration** : 25 mM Tris ; 190 mM Glycine ; 0,1 % SDS

### ***IV-4. Coloration des protéines au bleu de Coomassie***

La coloration des protéines se fait par incubation pendant environ 30 minutes du gel de polyacrylamide dans une **solution de bleu de Coomassie**. La décoloration s'effectue par bains successifs dans la **solution de décoloration** jusqu'à décoloration optimale.

**Solution de bleu de Coomassie** : 0,5 % (p/v) Coomassie R250 ; 20 % Ethanol – 10 % Acide acétique

**Solution de décoloration** : 7 % Acide acétique ; 40 % Ethanol

### ***IV-5. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose***

Le transfert des protéines est réalisé à partir d'un système de « sandwich » composé de deux éponges et de six feuilles de papier Whatman (de même taille que le gel) imbibées de **tampon de transfert**. Le gel de polyacrylamide est placé en contact avec une membrane de nitrocellulose (porosité : 0,2 ou 0,45  $\mu$ m) au centre du sandwich, et

le transfert s'effectue à 100 V pendant 80 minutes sous agitation permanente dans un système de migration (Biorad) refroidi par un bloc de glace. L'efficacité et la qualité du transfert sont contrôlées par coloration de la membrane de nitrocellulose dans une **solution de rougeponceau S** pendant 10 minutes et décoloration à l'eau distillée. La décoloration complète de la membrane est réalisée par un bain de 10 minutes dans une solution de **T-TBS**.

**Tampon de transfert** : 25 mM Tris ; 190 mM Glycine ; 0,04 % SDS ; 20 % Ethanol.

**Solution de rouge Ponceau S** : 1 % Acide acétique ; 0,5 % p/v Rouge ponceau.

**T-TBS** : 20 mM Tris ; 150 mM NaCl ; 0,1 % Tween 20 ; pH 8,3.

#### IV-6. Immunodétection

La membrane de nitrocellulose est incubée dans une **solution T-TBS-L** pendant une nuit à 4 °C afin de bloquer tous les sites de la membrane dépourvus de protéines. La membrane est ensuite placée dans une solution T-TBS-L contenant l'anticorps primaire dilué (1/500 à 1/20 000 selon l'anticorps) pendant au minimum une heure à température ambiante ou pendant une nuit à 4 °C. La membrane est lavée par six rinçages successifs de cinq minutes dans du T-TBS-L afin d'éliminer les interactions non spécifiques puis est incubée pendant une heure dans l'anticorps secondaire. Le second anticorps (Biorad) est couplé à la peroxydase de raifort et dirigé contre les IgG de l'antisérum primaire (dilution au 1/2 000 dans du T-TBS-L). La membrane est à nouveau lavée par six rinçages successifs de cinq minutes dans du T-TBS-L puis par un rinçage de 10 minutes dans du **T-TBS**. La membrane est ensuite mise en présence du réactif (ECL+ ; GE Healthcare) et révélée en chambre noire par film autoradiographique (GE Healthcare).

**Solution de T-TBS-L** : 5 % (p/v) lait écrémé ; 20 mM Tris ; 150 mM NaCl ; 0,1 % Tween 20 ; pH 8,3

**T-TBS** : 20 mM Tris ; 150 mM NaCl ; 0,1 % Tween 20 ; pH 8,3

## V. Techniques de clonage et de surexpression de protéines - Gateway

L'objectif est de cloner, surproduire et purifier les sous-unités RPOA et RPOB de la PEP d'*Arabidopsis thaliana* en quantité suffisante pour la production d'anticorps spécifiques.

## **V-1. Principe du clonage**

Le clonage a été réalisé via la technologie Gateway, développée par la société Invitrogen, qui repose sur les propriétés de recombinaison du bactériophage lambda. Le clonage se déroule en deux étapes :

- 1) La création d'un clone d'entrée par recombinaison entre les séquences attP du vecteur pDONR (Invitrogen) et les séquences attB d'un produit d'amplification purifié.
- 2) La création d'un clone d'expression par recombinaison entre le clone d'entrée et le vecteur d'expression choisi.

Le clone d'expression est ensuite transformé dans le système choisi (bactérie, levure) afin de surproduire la protéine désirée.

## **V-2. Vecteurs et souches utilisés**

### **V-2-1. Vecteur pDONR221**

Le vecteur pDONR221 possède deux sites attP permettant sa recombinaison avec un produit d'amplification possédant deux sites de recombinaison attB. La recombinaison génère un clone d'entrée possédant deux sites de recombinaison nommés attL. Ce vecteur porte un gène conférant à la bactérie hôte la résistance à la kanamycine.

### **V-2-2. Vecteur pDEST17**

Le vecteur pDEST17 est un vecteur d'expression qui possède deux sites attR permettant la recombinaison avec les séquences attL du clone d'entrée. Il possède un gène qui confère à la bactérie hôte la résistance à l'ampicilline. L'expression du gène d'intérêt est sous le contrôle d'un promoteur T7 situé en amont (5') d'un codon ATG initiateur de la traduction et d'une séquence codant six résidus Histidine (His) placés en phase avec la séquence de la protéine d'intérêt. Une telle construction permet l'expression d'une protéine étiquetée possédant 6 His en N-terminal qui facilite la purification par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel.

### **V-2-3. Souche *E.coli* DH5 $\alpha$**

Cette souche est utilisée lors du clonage du vecteur d'entrée.

### **V-2-4. Souche *E.coli* BL21-AI**

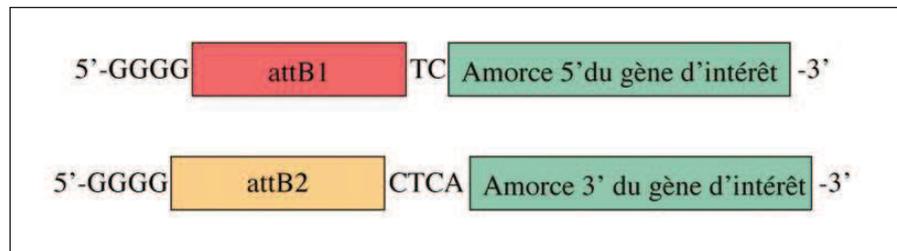
Cette souche est utilisée pour l'expression des protéines recombinantes car la dégradation des protéines exogènes est limitée. L'induction de l'expression de la protéine se fait par addition d'arabinose (0,2 % p/v) au milieu de culture.

### V-3. Préparation des fragments d'ADN

#### V-3-1. Amplification par PCR du fragment à cloner

La séquence correspondant au fragment à cloner est amplifiée par PCR à partir d'ADN génomique d'*Arabidopsis thaliana* (voir III-2). Le nombre d'erreurs dans la synthèse des brins d'ADN complémentaires est limité par l'utilisation d'une ADN polymérase Taq haute fidélité (Iproof - Biorad) possédant une activité correctrice exonucléase 3'-5' selon les consignes du fournisseur (volume réactionnel : 50 µL). Les amorces utilisées sont construites de façon à introduire les séquences attB1 et attB2 en amont et en aval de la séquence d'intérêt pour permettre la recombinaison entre le produit amplifiés par PCR et le vecteur d'entrée (**Figure 40** et Annexe II).

Figure 40. - Design des amorces PCR utilisés pour le clonage par la méthode Gateway.



#### V-3-2. Purification des produits amplifiés par PCR

Les produits amplifiés par PCR sont purifiés avec le kit « High Pure PCR Product Purification Kit » (Roche) selon les instructions du fournisseur.

#### V-3-3. Séquençage

La fidélité de la séquence clonée est vérifiée par séquençage des amplicons par la société Macrogen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com) - Corée du Sud).

### V-4. Construction du vecteur d'expression

#### V-4-1. Première recombinaison : produit PCR – vecteur d'entrée (pDONR221)

La recombinaison entre les séquences attB du fragment d'ADN amplifié par PCR et les séquences attP du vecteur cible s'effectue dans un volume total de 10 µL. À 150 ng de vecteur sont mélangés 100 fmoles de produit amplifié par PCR et purifié,

2  $\mu\text{L}$  de 5x BP Clonase Buffer (Invitrogen) et 2  $\mu\text{L}$  d'enzyme BP Clonase (Invitrogen). Le mélange est vortexé brièvement, incubé 2 minutes sur la glace puis pendant une nuit à 25 °C. La réaction est stoppée par ajout de 1  $\mu\text{L}$  de protéinase K (Invitrogen) pendant 10 minutes à 37 °C. Le clone d'entrée est obtenu par mini prep (Sambrook et al., 1989) après transformation du vecteur d'entrée dans des souches *E.coli* DH5 $\alpha$ .

#### V-4-2. Seconde recombinaison : clone d'entrée – vecteur d'expression (pDEST17)

La recombinaison entre les sites attL et attR des vecteurs d'entrée et d'expression s'effectue avec 80 ng de clone d'entrée et 300 ng de vecteur d'expression pDEST17 dans les mêmes conditions que la première recombinaison (voir ci-dessus) en utilisant le tampon 5x LR Clonase Buffer (Invitrogen) et l'enzyme LR Clonase (Invitrogen). Le vecteur d'expression est ensuite transformé dans des souches *E.coli* BL21-AI permettant la surexpression de la protéine.

### **V-5. Transformation**

Les vecteurs issus des recombinaisons sont transformés par choc thermique dans des souches *E.coli* compétentes (voir V-2 ; Vecteurs et souches utilisés). À 100  $\mu\text{L}$  de bactéries compétentes sont ajoutés 1  $\mu\text{L}$  de la réaction de recombinaison. Le mélange est incubé dans la glace pendant 30 minutes, le vecteur est ensuite inséré dans la bactérie par choc thermique à 42 °C pendant 30 secondes puis le mélange est replacé dans la glace. 900  $\mu\text{L}$  de milieu LB sont ajoutés et le mélange est incubé à 37 °C pendant une heure afin de favoriser la réplication du vecteur intégré.

Les bactéries sont étalées sur boîte de Pétri contenant du **milieu LB** gélosé supplémenté avec l'antibiotique de sélection dont le plasmide porte un gène de résistance. Les boîtes sont ensuite incubées pendant une nuit à 37 °C afin d'assurer la croissance des colonies transformées.

**Milieu LB** : 1 % Bactotryptone ; 0,5 % Bactoyeastextract ; 85 mM NaCl

### **V-6. Préparation de plasmide**

Une culture de 1,5 mL de **milieu LB** contenant l'antibiotique de sélection à la concentration appropriée (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) estensemencée avec une colonie isolée puis incubée pendant une nuit à 37 °C sous agitation. L'extraction des plasmides se fait

grâce au kit Plasmid DNA Kit (Biobasic Inc.) selon les indications du fournisseur. Les plasmides sont ensuite dosés au spectrophotomètre et leur qualité est contrôlée sur gel d'agarose.

**Milieu LB** : 1 % Bactotryptone ; 0,5 % Bactoyeastextract ; 85 mM NaCl

## V-7. Production de protéines recombinantes

### V-7-1. Préparation des extraits bruts

Une préculture de 3 mL de **milieu LB** contenant l'antibiotique de sélection est ensemencée à partir d'une colonie prélevée sur boîte et incubée pendant une nuit à 37 °C sous agitation (200 rpm) puis inoculée au 1/100 dans 25 mL de milieu sélectif. Lorsque la DO atteint 0,6, la culture est divisée en deux et l'induction de la protéine recombinante est initiée par ajout d'arabinose (0,2 % p/v final) dans l'une des deux cultures, la seconde servant de contrôle. L'induction se poursuit pendant 4 heures à 37 °C et des prélèvements de 500 µL de culture sont effectués régulièrement : ils permettront de contrôler la cinétique d'induction et d'en déterminer les conditions optimales. Les bactéries prélevées sont sédimentées par centrifugation (1 min - 13 200rpm - 4 °C) et sont reprises dans 80 µL de **tampon de charge 2x**. Après dénaturation à 95 °C pendant 10 minutes, les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE (voir IV-3). Les protéines recombinantes sont visualisées par coloration au Bleu de Coomassie ou par immunodétection en utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette 6xHis cotraduite avec la protéine d'intérêt. On note le temps d'induction permettant l'obtention de la quantité maximale de protéine recombinante.

**Milieu LB** : 1 % Bactotryptone ; 0,5 % Bactoyeastextract ; 85 mM NaCl

**Tampon de charge 2x** : Tris-HCl 0,1 M pH 6,8 ; β-Mercaptoéthanol 0,7 M ; 20 % Glycérol ; 2 % SDS ; 0,01 % Bleu de bromophénol.

### V-7-2. Préparation de la protéine recombinante

#### V-7-2-1. Obtention de l'extrait brut

L'immunisation de deux lapins en vue de la production d'anticorps nécessite 5 mg de protéine recombinante. Une culture de 30 mL (**milieu LB** contenant l'antibiotique de sélection) est préparée à partir d'une colonie sur boîte. Après croissance pendant une nuit à 37 °C, cette préculture est utilisée pour inoculer au 1/100 1,6 L de

milieu sélectif et incubée à 37 °C sous agitation (200 rpm) jusqu'à l'obtention d'une DO de 0,6. L'induction de l'expression du plasmide est initiée par ajout d'arabinose (0,2 % final) et se poursuit selon les conditions optimales définies précédemment. Les bactéries sont sédimentées par centrifugation (15 min - 4 000 rpm - 4 °C) et les culots sont repris dans un volume approprié de **tampon de lyse** puis mis sous agitation pendant une heure à température ambiante. La paroi et la membrane plasmique des bactéries sont lysées par deux passages dans une presse de French en présence d'inhibiteur de protéases (PMSF, 50 mM final). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (40 min - 20 000 g - 15 °C).

#### V-7-2-2. Purification de la protéine recombinante

Le surnageant est récupéré et déposé au sommet d'une colonne d'affinité Ni-NTA. La colonne est lavée par 4 mL de **tampon de lavage** et la protéine recombinante est obtenue par passage de 4 mL de **tampon d'élution**, récupérés sous forme d'aliquotes de 500 µL. 30 µL de chaque fraction d'élution sont analysés par SDS-PAGE puis par immunodétection. Les fractions contenant la protéine recombinante sont conservées.

**Milieu LB** : 1 % Bactotryptone ; 0,5 % Bactoyeastextract ; 85 mM NaCl

**Tampon de lyse** : 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 10 mM Tris pH 8 ; 8 M Urée ; 10 mM Imidazole

**Tampon de lavage** : 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 10 mM Tris pH 8 ; 8 M Urée ; 20 mM Imidazole

**Tampon d'élution** : 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 10 mM Tris pH 8 ; 8 M Urée ; 250 mM Imidazole

### V-8. Obtention des anticorps

Afin de séparer la protéine recombinante de ses contaminants mineurs, les polypeptides contenus dans les fractions éluées sont séparés par SDS-PAGE. Le gel est coloré négativement dans un bain d'Acétate de sodium 4M (seul le fond du gel est coloré, les polypeptides apparaissent en négatif). Les bandes d'acrylamide contenant la protéine recombinante d'intérêt sont excisées puis congelées à - 20 °C. Les anticorps sont obtenus par injection de 5 mg de polypeptides par lapin selon le programme d'immunisation prévu par le laboratoire Eurogentec (Belgique). Deux prélèvements de sérum sont effectués pour des tests de réactivités avant la saignée finale.

### V-9. Caractérisation des anticorps

Le titre de l'antisérum obtenu et sa spécificité sont déterminés sur la protéine recombinante puis sur des extraits protéiques totaux d'*Arabidopsis thaliana*. Des tests de

réaction croisée sur des polypeptides extraits d'autres espèces végétales sont également menés. L'ensemble de ces résultats a été déposé sur le site de la startup Uniplastomic ([www.uniplastomic.com](http://www.uniplastomic.com)) en vue de la commercialisation des anticorps ainsi préparés.

## VI. Méthodes d'analyse de la photosynthèse

### VI-1. Mesure de l'activité de la chaîne de transfert d'électrons

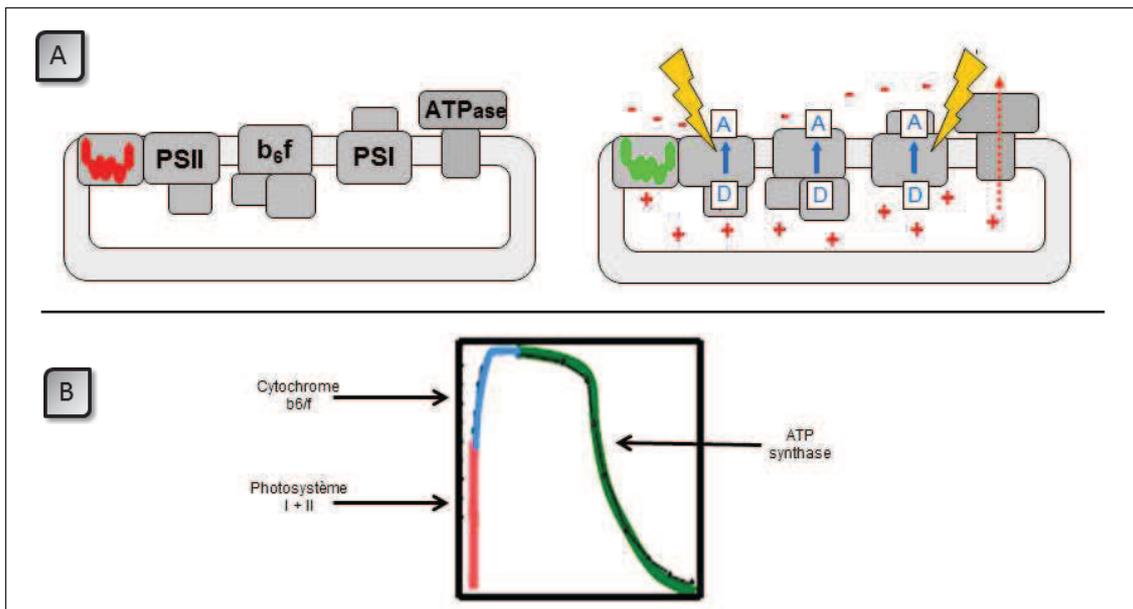
L'activité de la chaîne de transfert d'électrons des thylacoïdes est quantifiée à l'aide d'une électrode à oxygène de type Clark (Hansatech) par la mesure en continu de la concentration du milieu en oxygène à 25 °C. Le matériel végétal (graines en formation) est déposé dans 1 mL de **tampon phosphate**. Des produits en solution stock suffisamment concentrée pour ne pas modifier le volume réactionnel sont éventuellement ajoutés en cours d'enregistrement. Les paramètres de l'éclairage (qualité et quantité de lumière) sont contrôlés au moyen de l'électrode elle-même. Les vitesses de dégagement d'oxygène sont calculées à l'aide du logiciel pilotant l'électrode.

**Tampon phosphate** :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM ; KCl 10 mM ; pH 7,8

### VI-2. Principe de l'Electro Chromic Shift (ECS) et utilisation

L'ECS est une méthode non invasive qui permet d'analyser le fonctionnement des complexes majeurs de l'appareil photosynthétique au sein d'un tissu (Bailleul et al., 2010). Cette méthode repose sur le fait que chez les organismes photosynthétiques, l'accepteur et le donneur d'électrons d'un complexe photosynthétique sont situés de part et d'autre de la membrane (**Figure 41A**). L'exposition à la lumière entraîne alors une séparation de charge de part et d'autre de la membrane des thylacoïdes qui modifie le spectre des pigments et constitue le signal ECS.

Lorsque les thylacoïdes sont éclairés en lumière saturante pendant une durée inférieure à 10  $\mu\text{s}$ , le signal ECS peut être décomposé en plusieurs phases. Tout d'abord, on note une augmentation rapide du signal qui est proportionnelle au nombre de photosystèmes actifs (**Figure 41B** - Courbe rouge), puis un signal caractéristique du cytochrome  $b_6/f$  (**Figure 41B** - Courbe bleue) et enfin une phase plus lente de relaxation du système qui correspond au passage des protons à travers le canal de l'ATP synthase (**Figure 41B** - Courbe verte). De cette manière la participation et le fonctionnement de chacun des complexes photosynthétiques peuvent être évalués. Par exemple, l'utilisation d'un inhibiteur du photosystème II comme le DCMU réduit l'amplitude du signal lié aux photosystèmes et permet ainsi d'évaluer leur rapport stœchiométrique.



**Figure 41. - Principe de l'électrochromisme.**

- A** Schéma de la chaîne de transfert d'électron.  
**B** Profil du signal électrochromique.

### VI-3. Enregistrement des spectres d'émission, d'absorption et des spectres à basse température

Le matériel végétal (graines en formation, siliques ou feuilles) est récolté puis disposé de manière à former une couche homogène sans surépaisseur. Il est ensuite placé devant le faisceau de lumière.

Le spectre à 77K révèle trois pics d'émission : deux à 685 et 695 nm provenant du photosystème II et un à 730 nm issu du photosystème I. Ces émissions sont liées aux centres réactionnels (et/ou aux antennes internes des photosystèmes). L'absence d'émission à 680 nm (antenne photosystème II) ou à 700 nm (antenne photosystème I) indique que le couplage énergétique, c'est-à-dire que le transfert d'énergie d'excitation entre les antennes et les centres réactionnels est parfait.

# ***Références***

---

---

# A

**Allison, L. A., L. D. Simon, et al. (1996).** "Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants." *Embo Journal* 15(11): 2802-2809.

**Angelovici, R., G. Galili, et al. (2010).** "Seed desiccation: a bridge between maturation and germination." *Trends in Plant Science* 15(4): 211-218.

**Antoine, A. F., J. E. Faure, et al. (2000).** "A calcium influx is triggered and propagates in the zygote as a wavefront during in vitro fertilization of flowering plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(19): 10643-10648.

**Asano, T., Y. Yoshioka, et al. (2004).** "A mutation of the CRUMPLED LEAF gene that encodes a protein localized in the outer envelope membrane of plastids affects the pattern of cell division, cell differentiation, and plastid division in *Arabidopsis*". *Plant Journal* 38(3): 448-459.

**Atkins, C. A. and A. M. Flinn (1978).** "CARBON-DIOXIDE FIXATION IN CARBON ECONOMY OF DEVELOPING SEEDS OF LUPINUS-ALBUS (L)." *Plant Physiology* 62(4): 486-490.

**Azevedo, J., F. Courtois, et al. (2008).** "Intrplastidial trafficking of a phage-type RNA polymerase is mediated by a thylakoid RING-H2 protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(26): 9123-9128.

# B

**Baba, K., J. Schmidt, et al. (2004).** "Organelle gene transcription and early seedling development are affected in the *rpoT*;2 mutant of *Arabidopsis*." *Plant Journal* 38(1): 38-48.

**Babiychuk, E., K. Vandepoole, et al. (2011).** "Plastid gene expression and plant development require a plastidic protein of the mitochondrial transcription termination factor family". PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 108(16):6674-6679.

**Baeza, L., A. Bertrand, et al. (1991).** "CHARACTERIZATION OF A PROTEIN-BINDING SEQUENCE IN THE PROMOTER REGION OF THE 16S RIBOSOMAL-RNA GENE OF THE SPINACH CHLOROPLAST GENOME." *Nucleic Acids Research* 19(13): 3577-3581.

**Bailleul, B., P. Cardol, et al. (2010).** "Electrochromism: a useful probe to study algal photosynthesis." *Photosynthesis Research* 106(1-2): 179-189.

**Bailly, C., C. Audigier, et al. (2001).** "Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality." *Journal of Experimental Botany* 52(357): 701-708.

**Bailly, C., J. Leymarie, et al. (2004).** "Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying." *Journal of Experimental Botany* 55(396): 475-483.

**Baldwin, A., A. Wardle, et al. (2005).** "A molecular-genetic study of the *Arabidopsis* Toc75 family". *Plant Physiology* 138(2):715-733.

**Bang, W., A. Hata, et al. (2009).** "AtObgC, a plant ortholog of bacterial Obg, is a chloroplast-targeting GTPase essential for early embryogenesis". *Plant Molecular Biology* 71(4-5): 379-390.

**Bates, P. D., T. P. Durrett, et al. (2009).** "Analysis of Acyl Fluxes through Multiple Pathways of Triacylglycerol Synthesis in Developing Soybean Embryos." *Plant Physiology* 150(1): 55-72.

**Baud, S. and L. Lepiniec (2010).** "Physiological and developmental regulation of seed oil production." *Progress in Lipid Research* 49(3): 235-249.

- Baumgartner**, B. J., J. C. Rapp, et al. (1989). "PLASTID TRANSCRIPTION ACTIVITY AND DNA COPY NUMBER INCREASE EARLY IN BARLEY CHLOROPLAST DEVELOPMENT." *Plant Physiology* 89(3): 1011-1018.
- Bazin**, J., N. Langlade, et al. (2011). "Targeted mRNA Oxidation Regulates Sunflower Seed Dormancy Alleviation during Dry After-Ripening." *Plant Cell* 23(6): 2196-2208.
- Beaudoin**, N., C. Serizet, et al. (2000). "Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades." *Plant Cell* 12(7): 1103-1115.
- Beick**, S., C. Schmitz-Linneweber, et al. (2008). "The pentatricopeptide repeat protein PPR5 stabilizes a specific tRNA precursor in maize chloroplasts." *Molecular and Cellular Biology* 28(17): 5337-5347.
- Belmonte**, M., M. Elhiti, et al. (2010). "Depletion of cellular brassinolide decreases embryo production and disrupts the architecture of the apical meristems in *Brassica napus* microspore-derived embryos". *Journal of Experimental Botany* 61(10): 2779-2794.
- Benamar**, A., H. Rolletschek, et al. (2008). "Nitrite-nitric oxide control of mitochondrial respiration at the frontier of anoxia." *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1777(10): 1268-1275.
- Bendich**, A. J. (1987). "WHY DO CHLOROPLASTS AND MITOCHONDRIA CONTAIN SO MANY COPIES OF THEIR GENOME." *Bioessays* 6(6): 279-282.
- Bendich**, A. J. (2004). "Circular chloroplast chromosomes: The grand illusion." *Plant Cell* 16(7): 1661-1666.
- Berg**, M., R. Rogers, et al. (2005). "Requirement of aminoacyl-tRNA synthetases for gametogenesis and embryo development in *Arabidopsis*". *Plant Journal* 44(5): 866-878.
- Berger**, F., P. E. Grini, et al. (2006). "Endosperm: an integrator of seed growth and development." *Current Opinion in Plant Biology* 9(6): 664-670.
- Bewley**, J. D. (1997). "Seed germination and dormancy." *Plant Cell* 9(7): 1055-1066.
- Bewley**, J.D., and Black, M. (1994). *Seeds: Physiology of Development and Germination*. (New York: Plenum Press).
- Bock**, R. (2007). *Structure, function, and inheritance of plastid genomes Cell and Molecular Biology of Plastids*. R. Bock, Springer Berlin / Heidelberg. 19: 29-63.
- Bohne** AV, Weihe A, Börner T (2009) Transfer RNAs inhibit *Arabidopsis* phage-type RNA polymerases. *Endocytobiosis Cell Res* 19:63-69
- Boisnard-Lorig**, C., A. Colon-Carmona, et al. (2001). "Dynamic analyses of the expression of the HISTONE :: YFP fusion protein in *Arabidopsis* show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains." *Plant Cell* 13(3): 495-509.
- Borisjuk**, L., D. Macherel, et al. (2007). "Low oxygen sensing and balancing in plant seeds: a role for nitric oxide." *New Phytologist* 176(4): 813-823.
- Borisjuk**, L., T. H. Nguyen, et al. (2005). "Gradients of lipid storage, photosynthesis and plastid differentiation in developing soybean seeds." *New Phytologist* 167(3): 761-776.
- Borisjuk**, L. and H. Rolletschek (2009). "The oxygen status of the developing seed." *New Phytologist* 182(1): 17-30.
- Borisjuk**, L., H. Rolletschek, et al. (2003). "Energy status and its control on embryogenesis of legumes: ATP distribution within *Vicia faba* embryos is developmentally regulated and correlated with photosynthetic capacity." *Plant Journal* 36(3): 318-329.
- Borisjuk**, L., H. Weber, et al. (1995). "Embryogenesis of *Vicia faba* L: Histodifferentiation in relation to starch and storage protein synthesis." *Journal of Plant Physiology* 147(2): 203-218.
- Bourgis**, F., A. Kilaru, et al. (2011). "Comparative transcriptome and metabolite analysis of oil palm and date palm mesocarp that differ dramatically in carbon partitioning." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(30): 12527-12532.
- Bowman**, J. L., D. R. Smyth, et al. (1989). "GENES DIRECTING FLOWER DEVELOPMENT IN *ARABIDOPSIS*." *Plant Cell* 1(1): 37-52.

- Bozhkov**, P. V., L. H. Filonova, et al. (2005). Programmed cell death in plant embryogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, Vol 67. G. P. Schatten. San Diego, Elsevier Academic Press Inc. 67: 135-179.
- Brar**, G. and W. Thies (1977). "CONTRIBUTION OF LEAVES, STEM, SILIQUES AND SEEDS TO DRY-MATTER ACCUMULATION IN RIPENING SEEDS OF RAPESEED, BRASSICA-NAPUS-L." *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie* 82(1): 1-13.
- Braybrook**, S. A. and J. J. Harada (2008). "LECs go crazy in embryo development." *Trends in Plant Science* 13(12): 624-630.
- Brown**, R. C., B. E. Lemmon, et al. (2003). "Events during the first four rounds of mitosis establish three developmental domains in the syncytial endosperm of *Arabidopsis thaliana*." *Protoplasma* 222(3-4): 167-174.
- Bruce**, B. D. (2000). "Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution." *Trends in Cell Biology* 10(10): 440-447.
- Bryant**, N., J. Lloyd, et al. (2011). "Identification of Nuclear Genes Encoding Chloroplast-Localized Proteins Required for Embryo Development in *Arabidopsis* ". *Plant Physiology* 155(4): 1678-1689.
- Budziszewski**, G. J., S. P. Lewis, et al. (2001). "Arabidopsis genes essential for seedling viability: Isolation of Insertional mutants and molecular cloning." *Genetics* 159(4): 1765-1778.
- Bunger**, W. and J. Feierabend (1980). "CAPACITY FOR RNA-SYNTHESIS IN 70S RIBOSOME-DEFICIENT PLASTIDS OF HEAT-BLEACHED RYE LEAVES." *Planta* 149(2): 163-169.

## C

- Cadman**, C. S. C., P. E. Toorop, et al. (2006). "Gene expression profiles of *Arabidopsis Cvi* seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism." *Plant Journal* 46(5): 805-822.
- Cahoon**, A. B., F. M. Harris, et al. (2004). "Analysis of developing maize plastids reveals two mRNA stability classes correlating with RNA polymerase type." *Embo Reports* 5(8): 801-806.
- Cahoon**, E. B., J. M. Shockey, et al. (2007). "Engineering oilseeds for sustainable production of industrial and nutritional feedstocks: solving bottlenecks in fatty acid flux." *Current Opinion in Plant Biology* 10(3): 236-244.
- Canino**, G., E. Bocian, et al. (2009). "*Arabidopsis* encodes four tRNase Z enzymes". *Plant Physiology* 150(3):1494-1502.
- Cannon**, G. C., L. N. Ward, et al. (1999). "The 68 kDa DNA compacting nucleoid protein from soybean chloroplasts inhibits DNA synthesis in vitro." *Plant Molecular Biology* 39(4): 835-845.
- Carles**, C., N. Bies-Etheve, et al. (2002). "Regulation of *Arabidopsis thaliana* Em genes: role of ABI5." *Plant Journal* 30(3): 373-383.
- Carter**, M. L., A. C. Smith, et al. (2004). "Structure, circadian regulation and bioinformatic analysis of the unique sigma factor gene in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Photosynthesis Research* 82(3): 339-349.
- Chang**, C. C., J. Sheen, et al. (1999). "Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases." *Plant Cell* 11(5): 911-926.
- Chateigner-Boutin**, A. L., M. Ramos-Vega, et al. (2008). "CLB19, a pentatricopeptide repeat protein required for editing of rpoA and clpP chloroplast transcripts." *Plant Journal* 56(4): 590-602.
- Chen**, J. G., S. Shimomura, et al. (2001). "The role of auxin-binding protein 1 in the expansion of tobacco leaf cells." *Plant Journal* 28(6): 607-617.
- Cheng**, W. H., A. Endo, et al. (2002). "A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions." *Plant Cell* 14(11): 2723-2743.
- Cheung**, A. Y. and H. M. Wu (2008). "Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes." *Annual Review of Plant Biology* 59: 547-572.

- Chumley**, T. W., J. D. Palmer, et al. (2006). "The complete chloroplast genome sequence of *Pelargonium x hortorum*: Organization and evolution of the largest and most highly rearranged chloroplast genome of land plants." *Molecular Biology and Evolution* 23(11): 2175-2190.
- Cloetens**, P., R. Mache, et al. (2006). "Quantitative phase tomography of *Arabidopsis* seeds reveals intercellular void network." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(39): 14626-14630.
- Cloonan**, N., A. R. R. Forrest, et al. (2008). "Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing." *Nature Methods* 5(7): 613-619.
- Cochrane**, M. P. and C. M. Duffus (1979). "MORPHOLOGY AND ULTRASTRUCTURE OF IMMATURE CEREAL-GRAINS IN RELATION TO TRANSPORT." *Annals of Botany* 44(1): 67-&.
- Coll**, N. S., A. Danon, et al. (2009). "Characterization of *soldat8*, a Suppressor of Singlet Oxygen-Induced Cell Death in *Arabidopsis* Seedlings." *Plant and Cell Physiology* 50(4): 707-718.
- Côme**, D., F. Corbineau (2006). "Dictionnaire de la biologie des semences et des plantules". Editions Tec et Doc.
- Courtois**, F., L. Merendino, et al. (2007). "Phage-type RNA polymerase RPOTmp transcribes the *rrn* operon from the PC promoter at early developmental stages in *arabidopsis*." *Plant Physiology* 145(3): 712-721.
- Curaba**, J., T. Moritz, et al. (2004). "AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in *Arabidopsis*." *Plant Physiology* 136(3): 3660-3669.

## D

- Damude**, H. G. and A. J. Kinney (2008). "Enhancing plant seed oils for human nutrition." *Plant Physiology* 147(3): 962-968.
- Day**, R. C., R. P. Herridge, et al. (2008). "Transcriptome Analysis of Proliferating *Arabidopsis* Endosperm Reveals Biological Implications for the Control of Syncytial Division, Cytokinin Signaling, and Gene Expression Regulation." *Plant Physiology* 148(4): 1964-1984.
- Debeaujon**, I., L. Lepiniec, et al. (2007). "Seed coat development, dormancy and germination". Bradford K and nonogaki H (eds) Blackwell publishing, vol27, 24-43.
- Delon**, A., J. Derouard, et al. (2006). "Measurement of surface concentration of fluorophores by fluorescence fluctuation spectroscopy." *Optics Letters* 31(8): 1142-1144.
- Delon**, A., I. Wang, et al. (2010). "Measuring, in Solution, Multiple-Fluorophore Labeling by Combining Fluorescence Correlation Spectroscopy and Photobleaching." *Journal of Physical Chemistry B* 114(8): 2988-2996.
- Demarsy**, E. (2006). Thèse de Doctorat de l'Université Joseph Fourier.
- Demarsy**, E., F. Buhr et al. (2011). "Characterisation of the plastid specific germination transcriptional program". Soumis.
- Demarsy**, E., F. Courtois, et al. (2006). "Building up of the plastid transcriptional machinery during germination and early plant development." *Plant Physiology* 142(3): 993-1003.
- Dumas**, C. and P. Rogowsky (2008). "Fertilization and early seed formation." *Comptes Rendus Biologies* 331(10): 715-725.
- Dure**, L. and L. Waters (1965). "LONG-LIVED MESSENGER RNA - EVIDENCE FROM COTTON SEED GERMINATION." *Science* 147(3656): 410-&.
- Dyall**, S. D., M. T. Brown, et al. (2004). "Ancient invasions: From endosymbionts to organelles." *Science* 304(5668): 253-257.

# E

- Eastmond, P., L. Kolacna, et al.** (1996). "Photosynthesis by developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L)." *Journal of Experimental Botany* 47(304): 1763-1769.
- Emanuel, C., U. von Groll, et al.** (2006). "Development- and tissue-specific expression of the RpoT gene family of *Arabidopsis* encoding mitochondrial and plastid RNA polymerases." *Planta* 223(5): 998-1009.
- Eng, F. J. and J. R. Warner** (1991). "STRUCTURAL BASIS FOR THE REGULATION OF SPLICING OF A YEAST MESSENGER-RNA." *Cell* 65(5): 797-804.
- Esen, A.** "A simple method for quantitative, semi-quantitative, and qualitative assay of protein". *Analytical Biochemistry* 89(1) : 264-27.
- Estevez, J. M., A. Cantero, et al.** (2000). "Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*." *Plant Physiology* 124(1): 95-103.

# F

- Favory, J. J., M. Kobayshi, et al.** (2005). "Specific function of a plastid sigma factor for *ndhF* gene transcription." *Nucleic Acids Research* 33(18): 5991-5999.
- Finch-Savage, W. E., C. S. C. Cadman, et al.** (2007). "Seed dormancy release in *Arabidopsis Cvi* by dry after-ripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing." *Plant Journal* 51(1): 60-78.
- Finch-Savage, W. E. and G. Leubner-Metzger** (2006). "Seed dormancy and the control of germination." *New Phytologist* 171(3): 501-523.
- Finkelstein, R., W. Reeves, et al.** (2008). "Molecular aspects of seed dormancy." *Annual Review of Plant Biology* 59: 387-415.
- Finkelstein, R. R., S. S. L. Gampala, et al.** (2002). "Abscisic acid signaling in seeds and seedlings." *Plant Cell* 14: S15-S45.
- Fisk, D. G., M. B. Walker, et al.** (1999). "Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression." *Embo Journal* 18(9): 2621-2630.
- Frey, A., B. Godin, et al.** (2004). "Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana glauca*." *Planta* 218(6): 958-964.
- Friml, J. and K. Palme** (2002). "Polar auxin transport - old questions and new concepts?" *Plant Molecular Biology* 49(3-4): 273-284.

# G

- Gallardo, K., C. Job, et al.** (2001). "Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming." *Plant Physiology* 126(2): 835-848.
- Gallardo, K., R. Thompson, et al.** (2008). "Reserve accumulation in legume seeds." *Comptes Rendus Biologies* 331(10): 755-762.

- Garcia, D., V. Saingery, et al. (2003).** "Arabidopsis haiku mutants reveal new controls of seed size by endosperm." *Plant Physiology* 131(4): 1661-1670.
- Gazzarrini, S., Y. Tsuchiya, et al. (2004).** "The transcription factor FUSCA3 controls developmental timing in Arabidopsis through the hormones gibberellin and abscisic acid." *Developmental Cell* 7(3): 373-385.
- Geisler, M. and F. D. Sack (2002).** "Variable timing of developmental progression in the stomatal pathway in Arabidopsis cotyledons." *New Phytologist* 153(3): 469-476.
- Gibon, Y., H. Vigeolas, et al. (2002).** "Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates, and glycolytic intermediates based on a novel enzymic cycling system." *Plant Journal* 30(2): 221-235.
- Girke, T., J. Todd, et al. (2000).** "Microarray analysis of developing Arabidopsis seeds." *Plant Physiology* 124(4): 1570-1581.
- Goldberg, R. B., G. Depaiva, et al. (1994).** "PLANT EMBRYOGENESIS - ZYGOTE TO SEED." *Science* 266(5185): 605-614.
- Graham, I. A., T. Larson, et al. (2007).** "Rational metabolic engineering of transgenic plants for biosynthesis of omega-3 polyunsaturates." *Current Opinion in Biotechnology* 18(2): 142-147.
- Graveley, B. R., A. N. Brooks, et al. (2011).** "The developmental transcriptome of Drosophila melanogaster." *Nature* 471(7339): 473-479.
- Grimanelli, D., E. Perotti, et al. (2005).** "Timing of the maternal-to-zygotic transition during early seed development in maize." *Plant Cell* 17(4): 1061-1072.
- Guignard M.L (1899),** Sur les anthérozoïdes et la double copulation sexuelle chez les végétaux angiospermes, *C.R. Acad. Sci.* 128 864-871.
- Guitton, A. E., D. R. Page, et al. (2004).** "Identification of new members of Fertilisation Independent Seed Polycomb Group pathway involved in the control of seed development in Arabidopsis thaliana." *Development* 131(12): 2971-2981.

## H

- Hagemann, R. (2010).** "The foundation of extranuclear inheritance: plastid and mitochondrial genetics." *Molecular Genetics and Genomics* 283(3): 199-209.
- Hajdukiewicz, P. T. J., L. A. Allison, et al. (1997).** "The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids." *Embo Journal* 16(13): 4041-4048.
- Hakimi, M. A., I. Privat, et al. (2000).** "Evolutionary conservation of C-terminal domains of primary Sigma(70)-type transcription factors between plants and bacteria." *Journal of Biological Chemistry* 275(13): 9215-9221.
- Hanaoka, M., K. Kanamaru, et al. (2005).** "Glutamyl-tRNA mediates a switch in RNA polymerase use during chloroplast biogenesis." *Embo Reports* 6(6): 545-550.
- Hanaoka, M., K. Kanamaru, et al. (2003).** "Molecular genetic analysis of chloroplast gene promoters dependent on SIG2, a nucleus-encoded sigma factor for the plastid-encoded RNA polymerase, in Arabidopsis thaliana." *Nucleic Acids Research* 31(24): 7090-7098.
- Hansson, A., K. Amann, et al. (2007).** "Knock-out of the chloroplast-encoded PSI-J subunit of photosystem I in Nicotiana tabacum - PSI-J is required for efficient electron transfer and stable accumulation of photosystem I." *Febs Journal* 274(7): 1734-1746.
- Harada, J. J. (2001).** "Role of Arabidopsis LEAFY COTYLEDON genes in seed development." *Journal of Plant Physiology* 158(4): 405-409.
- Hashimoto, M., T. Endo, et al. (2003).** "A nucleus-encoded factor, CRR2, is essential for the expression of chloroplast ndhB in Arabidopsis." *Plant Journal* 36(4): 541-549.

- Hattori, M., H. Miyake, et al. (2007).** "A pentatricopeptide repeat protein is required for RNA processing of clpP pre-mRNA in moss chloroplasts." *Journal of Biological Chemistry* 282(14): 10773-10782.
- Hedtke, B., T. Borner, et al. (1997).** "Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in Arabidopsis." *Science* 277(5327): 809-811.
- Hedtke, B., M. Meixner, et al. (1999).** "Green fluorescent protein as a marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases of higher plants in vivo." *Plant Journal* 17(5): 557-561.
- Hennig, L., W. Gruissem, et al. (2004).** "Transcriptional programs of early reproductive stages in Arabidopsis." *Plant Physiology* 135(3): 1765-1775.
- Herzog, M., A. M. Dorne, et al. (1995).** "GASA, A GIBBERELLIN-REGULATED GENE FAMILY FROM ARABIDOPSIS-THALIANA RELATED TO THE TOMATO GAST1 GENE." *Plant Molecular Biology* 27(4): 743-752.
- Hesch, C., J. Hesse, et al. (2009).** "Two-stage focus-hold system for rapid ultra-sensitive read-out of large-area biochips." *Journal of Microscopy-Oxford* 234(3): 251-254.
- Hess, W. R. and T. Borner (1999).** "Organellar RNA polymerases of higher plants." *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, Vol 190 190: 1-59.
- Hesse, J., J. Jacak, et al. (2006).** "RNA expression profiling at the single molecule level." *Genome Research* 16(8): 1041-1045.
- Hills, M. J. (2004).** "Control of storage-product synthesis in seeds." *Current Opinion in Plant Biology* 7(3): 302-308.
- Homann, A. and G. Link (2003).** "DNA-binding and transcription characteristics of three cloned sigma factors from mustard (*Sinapis alba* L.) suggest overlapping and distinct roles in plastid gene expression." *European Journal of Biochemistry* 270(6): 1288-1300.
- Hricova, A., V. Quesada, et al. (2006).** "The SCABRA3 nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in Arabidopsis." *Plant Physiology* 141(3): 942-956.
- Hubschmann, T. and T. Borner (1998).** "Characterisation of transcript initiation sites in ribosome-deficient barley plastids." *Plant Molecular Biology* 36(3): 493-496.
- Hudson, G. S., T. A. Holton, et al. (1988).** "SPINACH CHLOROPLAST RPOBC GENES ENCODE 3 SUBUNITS OF THE CHLOROPLAST RNA-POLYMERASE." *Journal of Molecular Biology* 200(4): 639-654.
- Hsu, SC. M. Belmonte, et al (2010).** "Indispensable Role of Plastids in *Arabidopsis thaliana* Embryogenesis". *Current Genomics* 11(5) : 338-349.
- Ikehara, T., H. Uchida, et al. (1996).** "Chloroplast nucleoids in large number and large DNA amount with regard to maternal inheritance in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Protoplasma* 194(1-2): 11-17.
- Iratni, R., L. Baeza, et al. (1994).** "REGULATION OF RDNA TRANSCRIPTION IN CHLOROPLASTS - PROMOTER EXCLUSION BY CONSTITUTIVE REPRESSION." *Genes & Development* 8(23): 2928-2938.
- Iratni, R., L. Diederich, et al. (1997).** "Organ-specific transcription of the *rrn* operon in spinach plastids." *Journal of Biological Chemistry* 272(21): 13676-13682.
- Ishizaki, Y., Y. Tsunoyama, et al. (2005).** "A nuclear-encoded sigma factor, Arabidopsis SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulates early chloroplast development in cotyledons." *Plant Journal* 42(2): 133-144.
- Isono, K., Y. Niwa, et al. (1997).** "Evidence for transcriptional regulation of plastid photosynthesis genes in Arabidopsis *thaliana* roots." *Plant Physiology* 114(2): 623-630.

## J

- Jacobsen**, J. V., D. W. Pearce, et al. (2002). "Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley." *Physiologia Plantarum* 115(3): 428-441.
- Jarvis**, P. and J. Soll (2002). "Toc, Tic, and chloroplast protein import (vol 1541, pg 64, 2001)." *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1590(1-3): 177-189.
- Jenkins**, B. D., D. J. Kulhanek, et al. (1997). "Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplasts reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors." *Plant Cell* 9(3): 283-296.
- Jeong**, S. Y., A. Rose, et al. (2003). "MFP1 is a thylakoid-associated, nucleoid-binding protein with a coiled-coil structure." *Nucleic Acids Research* 31(17): 5175-5185.
- Job**, C., L. Rajjou, et al. (2005). "Patterns of protein oxidation in Arabidopsis seeds and during germination." *Plant Physiology* 138(2): 790-802.
- Jofuku**, K. D., P. K. Omidyar, et al. (2005). "Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene APETALA2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(8): 3117-3122.

## K

- Kagaya**, Y., R. Okuda, et al. (2005). "Indirect ABA-dependent regulation of seed storage protein genes by FUSCA3 transcription factor in Arabidopsis." *Plant and Cell Physiology* 46(2): 300-311.
- Kagaya**, Y., R. Toyoshima, et al. (2005). "LEAFY COTYLEDON1 controls seed storage protein genes through its regulation of FUSCA3 and ABSCISIC ACID INSENSITIVE3." *Plant and Cell Physiology* 46(3): 399-406.
- Kanamaru**, K., M. Fujiwara, et al. (1999). "Plastidic RNA polymerase sigma factors in Arabidopsis." *Plant and Cell Physiology* 40(8): 832-842.
- Kanamaru**, K., A. Nagashima, et al. (2001). "An Arabidopsis sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts." *Plant and Cell Physiology* 42(10): 1034-1043.
- Kang**, I. H., J. G. Steffen, et al. (2008). "The AGL62 MADS domain protein regulates cellularization during endosperm development in Arabidopsis." *Plant Cell* 20(3): 635-647.
- Kapoor**, S. and M. Sugiura (1999). "Identification of two essential sequence elements in the nonconsensus type II PatpB-290 plastid promoter by using plastid transcription extracts from cultured tobacco BY-2 cells." *Plant Cell* 11(9): 1799-1810.
- Kapoor**, S., J. Y. Suzuki, et al. (1997). "Identification and functional significance of a new class of non-consensus-type plastid promoters." *Plant Journal* 11(2): 327-337.
- Kapoor**, S., T. Wakasugi, et al. (1994). "AN ATPE-SPECIFIC PROMOTER WITHIN THE CODING REGION OF THE ATPB GENE IN TOBACCO CHLOROPLAST DNA." *Current Genetics* 26(3): 263-268.
- Kawashima**, T. and R. B. Goldberg (2010). "The suspensor: not just suspending the embryo." *Trends in Plant Science* 15(1): 23-30.
- Kazama**, T., T. Nakamura, et al. (2008). "Suppression mechanism of mitochondrial ORF79 accumulation by Rf1 protein in BT-type cytoplasmic male sterile rice." *Plant Journal* 55(4): 619-628.
- Keegstra**, K. and K. Cline (1999). "Protein import and routing systems of chloroplasts." *Plant Cell* 11(4): 557-570.
- Kim**, J., A. Rudella, et al. (2009). "Subunits of the Plastid ClpPR Protease Complex Have Differential Contributions to Embryogenesis, Plastid Biogenesis, and Plant Development in Arabidopsis." *Plant Cell* 21(6): 1669-1692.

- Kinney, A. J.** (2006). "Metabolic engineering in plants for human health and nutrition." *Current Opinion in Biotechnology* 17(2): 130-138.
- Kinney, A. J.** (2009). "Enhancing Soybean Seed Lipid Biosynthesis for Nutritional, Energy and Industrial Applications." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 45: S22-S22.
- Kobayashi, Y., Y. Dokiya, et al.** (2001). "Dual targeting of phage-type RNA polymerase to both mitochondria and plastids is due to alternative translation initiation in single transcripts." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289(5): 1106-1113.
- Kotera, E., M. Tasaka, et al.** (2005). "A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts." *Nature* 433(7023): 326-330.
- Krause, K., R. M. Maier, et al.** (2000). "Disruption of plastid-encoded RNA polymerase genes in tobacco: expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome." *Molecular and General Genetics* 263(6): 1022-1030.
- Kroj, T., G. Savino, et al.** (2003). "Regulation of storage protein gene expression in Arabidopsis." *Development* 130(24): 6065-6073.
- Kubota, Y., A. Miyao, et al.** (2007). "Two novel nuclear genes, OsSIG5 and OsSIG6, encoding potential plastid sigma factors of RNA polymerase in rice: Tissue-specific and light-responsive gene expression." *Plant and Cell Physiology* 48(1): 186-192.
- Kuhn, K., U. Richter, et al.** (2009). "Phage-Type RNA Polymerase RPOTmp Performs Gene-Specific Transcription in Mitochondria of Arabidopsis thaliana." *Plant Cell* 21(9): 2762-2779.
- Kuroiwa, T.** (1989). "THE NUCLEI OF CELLULAR ORGANELLES AND THE FORMATION OF DAUGHTER ORGANELLES BY THE PLASTID-DIVIDING RING." *Botanical Magazine-Tokyo* 102(1066): 291-329.
- Kuroiwa, T.** (1991). "THE REPLICATION, DIFFERENTIATION, AND INHERITANCE OF PLASTIDS WITH EMPHASIS ON THE CONCEPT OF ORGANELLE NUCLEI." *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology* 128: 1-&.
- Kwong, R. W., A. Q. Bui, et al.** (2003). "LEAFY COTYLEDON1-LIKE defines a class of regulators essential for embryo development." *Plant Cell* 15(1): 5-18.

## L

- Laemmli, U. K.** (1970). "CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING ASSEMBLY OF HEAD OF BACTERIOPHAGE-T4." *Nature* 227(5259): 680-&.
- Larkin, R. M., J. M. Alonso, et al.** (2003). "GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling." *Science* 299(5608): 902-906.
- Le, B. H., C. Cheng, et al.** (2010). "Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(18): 8063-8070.
- Legen, J., S. Kemp, et al.** (2002). "Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries." *Plant Journal* 31(2): 171-188.
- Leister, D.** (2003). "Chloroplast research in the genomic age." *Trends in Genetics* 19(1): 47-56.
- Leibsmache, S.** (1993). "THE 110-KDA POLYPEPTIDE OF SPINACH PLASTID DNA-DEPENDENT RNA-POLYMERASE - SINGLE-SUBUNIT ENZYME OR CATALYTIC CORE OF MULTIMERIC ENZYME COMPLEXES." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(12): 5509-5513.

- Lerbs-Mache**, S. (2011). "Function of plastid sigma factors in higher plants: regulation of gene expression or just preservation of constitutive transcription?" *Plant Molecular Biology* 76(3-5): 235-249.
- Leubner-Metzger**, G. (2001). "Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways." *Planta* 213(5): 758-763.
- Leubner-Metzger**, G. (2005). "beta-1,3-glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening." *Plant Journal* 41(1): 133-145.
- Li**, W. M., S. Ruf, et al. (2006). "Constancy of organellar genome copy numbers during leaf development and senescence in higher plants." *Molecular Genetics and Genomics* 275(2): 185-192.
- Lichtenthaler**, HK. (1987). "Chlorophylls and carotenoids. Pigments of photosynthetic biomembranes". *Methods in Enzymology* 148 : 350-382.
- Liere**, K. and P. Maliga (1999). "In vitro characterization of the tobacco rpoB promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters." *Embo Journal* 18(1): 249-257.
- Lilly**, J. W., M. J. Havey, et al. (2001). "Cytogenomic analyses reveal the structural plasticity of the chloroplast genome in higher plants." *Plant Cell* 13(2): 245-254.
- Lister**, R., R. C. O'Malley, et al. (2008). "Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis." *Cell* 133(3): 523-536.
- Liu**, J. W. and R. J. Rose (1992). "THE SPINACH CHLOROPLAST CHROMOSOME IS BOUND TO THE THYLAKOID MEMBRANE IN THE REGION OF THE INVERTED REPEAT." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 184(2): 993-1000.
- Loschelder**, H., J. Schweer, et al. (2006). "Dual temporal role of plastid sigma factor 6 in Arabidopsis development." *Plant Physiology* 142(2): 642-650.
- Lotan**, T., M. Ohto, et al. (1998). "Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells." *Cell* 93(7): 1195-1205.
- Luerssen**, K., V. Kirik, et al. (1998). "FUSCA3 encodes a protein with a conserved VP1/ABI3-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in Arabidopsis thaliana." *Plant Journal* 15(6): 755-764.
- Luo**, M., E. S. Dennis, et al. (2005). "MINISEED3 (MINI3), a WRKY family gene, and HAIKU2 (IKU2),, a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene, are regulators of seed size in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(48): 17531-17536.
- Lurin**, C., C. Andres, et al. (2004). "Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis." *Plant Cell* 16(8): 2089-2103.
- Lysenko**, E. A. (2007). "Plant sigma factors and their role in plastid transcription." *Plant Cell Reports* 26(7): 845-859.

## M

- Malone**, J. H. and B. Oliver (2011). "Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome." *Bmc Biology* 9.
- Mandel**, M. A., K. A. Feldmann, et al. (1996). "CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution." *Plant Journal* 9(5): 649-658.
- Mansfield**, S. G. and L. G. Briarty (1991). "EARLY EMBRYOGENESIS IN ARABIDOPSIS-THALIANA .2. THE DEVELOPING EMBRYO." *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 69(3): 461-476.
- Mansfield**, S. G., L. G. Briarty, et al. (1991). "EARLY EMBRYOGENESIS IN ARABIDOPSIS-THALIANA .1. THE MATURE EMBRYO SAC." *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 69(3): 447-460.

- Manz**, B., K. Muller, et al. (2005). "Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated in vivo by nuclear magnetic resonance imaging." *Plant Physiology* 138(3): 1538-1551.
- Mathews**, D. E. and R. D. Durbin (1990). "TAGETITOXIN INHIBITS RNA-SYNTHESIS DIRECTED BY RNA-POLYMERASES FROM CHLOROPLASTS AND ESCHERICHIA-COLI." *Journal of Biological Chemistry* 265(1): 493-498.
- Meierhoff**, K., S. Felder, et al. (2003). "HCF152, an Arabidopsis RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast psbB-psbT-psbH-petB-petD RNAs." *Plant Cell* 15(6): 1480-1495.
- Meurer**, J., A. Berger, et al. (1996). "A nuclear mutant of Arabidopsis with impaired stability on distinct transcripts of the plastid psbB, psbD/C, ndhH, and ndhC operons." *Plant Cell* 8(7): 1193-1207.
- Misumi**, O., L. Suzuki, et al. (1999). "Isolation and phenotypic characterization of Chlamydomonas reinhardtii mutants defective in chloroplast DNA segregation." *Protoplasma* 209(3-4): 273-282.
- Mochizuki**, N., J. A. Brusslan, et al. (2001). "Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(4): 2053-2058.
- Mochizuki**, N., R. Tanaka, et al. (2008). "The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(39): 15184-15189.
- Monke**, G., L. Altschmied, et al. (2004). "Seed-specific transcription factors ABI3 and FUS3: molecular interaction with DNA." *Planta* 219(1): 158-166.
- Mortazavi**, A., B. A. Williams, et al. (2008). "Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq." *Nature Methods* 5(7): 621-628.
- Mullet**, J. E. (1993). "DYNAMIC REGULATION OF CHLOROPLAST TRANSCRIPTION." *Plant Physiology* 103(2): 309-313.
- Murphy**, D. J. (1990). "STORAGE LIPID BODIES IN PLANTS AND OTHER ORGANISMS." *Progress in Lipid Research* 29(4): 299-324.
- Myouga**, F., K. Akiyama, et al. (2010). "The Chloroplast Function Database: a large-scale collection of Arabidopsis Ds/Spm- or T-DNA-tagged homozygous lines for nuclear-encoded chloroplast proteins, and their systematic phenotype analysis". *Plant Journal* 61(3): 529-542.

## N

- Nagalakshmi**, U., Z. Wang, et al. (2008). "The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing." *Science* 320(5881): 1344-1349.
- Nagashima**, A., M. Hanaoka, et al. (2004). "DNA microarray analysis of plastid gene expression in an Arabidopsis mutant deficient in a plastid transcription factor sigma, SIG2." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 68(3): 694-704.
- Nagashima**, A., M. Hanaoka, et al. (2004). "The multiple-stress responsive plastid sigma factor, SIG5, directs activation of the psbD blue light-responsive promoter (BLRP) in Arabidopsis thaliana." *Plant and Cell Physiology* 45(4): 357-368.
- Nakano**, T., S. Murakami, et al. (1997). "A novel protein with DNA binding activity from tobacco chloroplast nucleoids." *Plant Cell* 9(9): 1673-1682.
- Nambara**, E. and A. Marion-Poll (2003). "ABA action and interactions in seeds." *Trends in Plant Science* 8(5): 213-217.
- Napier**, J. A. (2007). "Transgenic plants as a source of fish oils: healthy, sustainable and GM." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87(1): 8-12.

**Narusaka, M., K. Kawai, et al. (2008).** "Gene coding for SigA-binding protein from *Arabidopsis* appears to be transcriptionally up-regulated by salicylic acid and NPR1-dependent mechanisms." *Journal of General Plant Pathology* 74(5): 345-354.

**Nawashin S.G., (1898)** "Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgaenge bei *Lilum Martagon* und *Fritillaria tenella*", *Bul. Acad. Imp. Sci. St. Petersburg* 9) 377-382.

**Neuhaus, H. and G. Link (1990).** "THE CHLOROPLAST PSBK OPERON FROM MUSTARD (*SINAPIS-ALBA* L) - MULTIPLE TRANSCRIPTS DURING SEEDLING DEVELOPMENT AND EVIDENCE FOR DIVERGENT OVERLAPPING TRANSCRIPTION." *Current Genetics* 18(4): 377-383.

**Niyogi, KK., AR. Grossman, et al. (1998).** "Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion." *Plant Cell* 10(7): 1121-1134.

## O

**Ogas, J., J. C. Cheng, et al. (1997).** "Cellular differentiation regulated by gibberellin in the *Arabidopsis thaliana* pickle mutant." *Science* 277(5322): 91-94.

**O'Hara, P., A. R. Slabas, et al. (2002).** "Fatty acid and lipid biosynthetic genes are expressed at constant molar ratios but different absolute levels during embryogenesis." *Plant Physiology* 129(1): 310-320.

**Ohito, M., R. L. Fischer, et al. (2005).** "Control of seed mass by APETALA2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(8): 3123-3128.

**Ohito, M. A., S. K. Floyd, et al. (2009).** "Effects of APETALA2 on embryo, endosperm, and seed coat development determine seed size in *Arabidopsis*." *Sexual Plant Reproduction* 22(4): 277-289.

**Ohyama, K., H. Fukuzawa, et al. (1986).** "CHLOROPLAST GENE ORGANIZATION DEDUCED FROM COMPLETE SEQUENCE OF LIVERWORT *MARCHANTIA-POLYMORPHA* CHLOROPLAST DNA." *Nature* 322(6079): 572-574.

**Olsen, O. A. (2004).** "Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell* 16: S214-S227.

**Onda, Y., Y. Yagi, et al. (2008).** "Light induction of *Arabidopsis* SIG1 and SIG5 transcripts in mature leaves: differential roles of cryptochrome 1 and cryptochrome 2 and dual function of SIG5 in the recognition of plastid promoters." *Plant Journal* 55(6): 968-978.

## P

**Palmer, J. D. and W. F. Thompson (1982).** "CHLOROPLAST DNA REARRANGEMENTS ARE MORE FREQUENT WHEN A LARGE INVERTED REPEAT SEQUENCE IS LOST." *Cell* 29(2): 537-550.

Patel, R., S. Hsu, et al. (2008). "The Omp85-related chloroplast outer envelope protein OEP80 is essential for viability in *Arabidopsis*". *Plant Physiology* 148(1): 235-245

**Peltier, G. and L. Cournac (2002).** "Chlororespiration." *Annual Review of Plant Biology* 53: 523-550.

**Penfield, S., Y. Li, et al. (2006).** "Arabidopsis ABA INSENSITIVE4 regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm." *Plant Cell* 18(8): 1887-1899.

**Pfalz, J., O. A. Bayraktar, et al. (2009).** "Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts." *Embo Journal* 28(14): 2042-2052.

- Pfannschmidt**, T. (2010). "Plastidial retrograde signalling - a true "plastid factor" or just metabolite signatures?" *Trends in Plant Science* 15(8): 427-435.
- Portereiko**, M. F., A. Lloyd, et al. (2006). "AGL80 is required for central cell and endosperm development in Arabidopsis." *Plant Cell* 18(8): 1862-1872.
- Porterfield**, D. M., A. X. Kuang, et al. (1999). "Oxygen-depleted zones inside reproductive structures of Brassicaceae: implications for oxygen control of seed development." *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 77(10): 1439-1446.
- Prikryl**, J., M. Rojas, et al. (2011). "Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(1): 415-420.
- Privat**, I., M. A. Hakimi, et al. (2003). "Characterization of Arabidopsis plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3." *Plant Molecular Biology* 51(3): 385-399.
- Purton**, S. and J. C. Gray (1989). "THE PLASTID RPOA GENE ENCODING A PROTEIN HOMOLOGOUS TO THE BACTERIAL RNA-POLYMERASE ALPHA-SUBUNIT IS EXPRESSED IN PEA-CHLOROPLASTS." *Molecular & General Genetics* 217(1): 77-84.

## R

- Rajjou**, L., K. Gallardo, et al. (2004). "The effect of alpha-amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination." *Plant Physiology* 134(4): 1598-1613.
- Rajjou**, L., Y. Lovigny, et al. (2008). "Proteome-wide characterization of seed aging in Arabidopsis : a comparison between artificial and natural aging protocols". *Plant Physiology* 331(10) : 796-805.
- Rawsthorne**, S. (2002). "Carbon flux and fatty acid synthesis in plants." *Progress in Lipid Research* 41(2): 182-196.
- Reidt**, W., T. Wohlfarth, et al. (2000). "Gene regulation during late embryogenesis: the RY motif of maturation-specific gene promoters is a direct target of the FUS3 gene product." *Plant Journal* 21(5): 401-408.
- Reith**, M. (1995). "MOLECULAR-BIOLOGY OF RHODOPHYTE AND CHROMOPHYTE PLASTIDS." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 549-575.
- Rider**, S. D., J. T. Henderson, et al. (2003). "Coordinate repression of regulators of embryonic identity by PICKLE during germination in Arabidopsis." *Plant Journal* 35(1): 33-43.
- Riefler**, M., O. Novak, et al. (2006). "Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism." *Plant Cell* 18(1): 40-54.
- Rochat**, C., S. Wuilleme, et al. (1995). "A MUTATION AT THE RB GENE, LOWERING ADPGPPASE ACTIVITY, AFFECTS STORAGE PRODUCT METABOLISM OF PEA SEED COATS." *Journal of Experimental Botany* 46(285): 415-421.
- Rolletschek**, H., L. Borisjuk, et al. (2002). "Legume embryos develop in a hypoxic environment." *Journal of Experimental Botany* 53(371): 1099-1107.
- Rolletschek**, H., L. Borisjuk, et al. (2007). "Temperature-dependent endogenous oxygen concentration regulates microsomal oleate desaturase in developing sunflower seeds." *Journal of Experimental Botany* 58(12): 3171-3181.
- Rolletschek**, H., K. Koch, et al. (2005). "Positional cues for the starch/lipid balance in maize kernels and resource partitioning to the embryo." *Plant Journal* 42(1): 69-83.
- Rolletschek**, H., H. Weber, et al. (2003). "Energy status and its control on embryogenesis of legumes. Embryo photosynthesis contributes to oxygen supply and is coupled to biosynthetic fluxes." *Plant Physiology* 132(3): 1196-1206.

- Roxrud, I., S. E. Lid, et al. (2007).** "GASA4, one of the 14-member Arahidopsis GASA family of small polypeptides, regulates flowering and seed development." *Plant and Cell Physiology* 48(3): 471-483.
- Ruuska, S. A., T. Girke, et al. (2002).** "Contrapuntal networks of gene expression during Arabidopsis seed filling." *Plant Cell* 14(6): 1191-1206.

## S

- Sabelli, P. A. and B. A. Larkins (2009).** "The contribution of cell cycle regulation to endosperm development." *Sexual Plant Reproduction* 22(4): 207-219.
- Salvador, M. L., U. Klein, et al. (1998).** "Endogenous fluctuations of DNA topology in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*." *Molecular and Cellular Biology* 18(12): 7235-7242.
- Sambrook, NY., EF. Fritsch, et al. (1989).** "Molecular cloning : a laboratory manual". Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press. Ref Type : Generic.
- Sato, N., C. Albrieux, et al. (1993).** "DETECTION AND CHARACTERIZATION OF A PLASTID ENVELOPE DNA-BINDING PROTEIN WHICH MAY ANCHOR PLASTID NUCLEOIDS." *Embo Journal* 12(2): 555-561.
- Scharff, L. B. and H. U. Koop (2006).** "Linear molecules of tobacco ptDNA end at known replication origins and additional loci." *Plant Molecular Biology* 62(4-5): 611-621.
- Schmitz-Linneweber, C. and I. Small (2008).** "Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression." *Trends in Plant Science* 13(12): 663-670.
- Schmitz-Linneweber, C., R. Williams-Carrier, et al. (2005).** "RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5 ' region of mRNAs whose translation it activates." *Plant Cell* 17(10): 2791-2804.
- Schweer, J., H. Loschelder, et al. (2006).** "A promoter switch that can rescue a plant sigma factor mutant." *Febs Letters* 580(28-29): 6617-6622.
- Schweer, J., H. Turkeri, et al. (2010).** "Role and regulation of plastid sigma factors and their functional interactors during chloroplast transcription - Recent lessons from *Arabidopsis thaliana*." *European Journal of Cell Biology* 89(12): 940-946.
- Schwender, J., F. Goffman, et al. (2004).** "Rubisco without the Calvin cycle improves the carbon efficiency of developing green seeds." *Nature* 432(7018): 779-782.
- Sekine, K., T. Hase, et al. (2002).** "Reversible DNA compaction by sulfite reductase regulates transcriptional activity of chloroplast nucleoids." *Journal of Biological Chemistry* 277(27): 24399-24404.
- Serino, G. and P. Maliga (1998).** "RNA polymerase subunits encoded by the plastid rpo genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme." *Plant Physiology* 117(4): 1165-1170.
- Severinov, K., A. Mustaev, et al. (1996).** "Structural modules of the large subunits of RNA polymerase - Introducing archaeobacterial and chloroplast split sites in the beta and beta' subunits *Escherichia coli* RNA polymerase." *Journal of Biological Chemistry* 271(44): 27969-27974.
- Shih, M. D., F. A. Hoekstra, et al. (2008).** Late Embryogenesis Abundant Proteins. *Advances in Botanical Research*, Vol 48. J. C. Kader and M. Delseny. London, *Academic Press Ltd.* 48: 211-255.
- Shiina, T., Y. Tsunoyama, et al. (2005).** Plastid RNA polymerases, promoters, and transcription regulators in higher plants. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, Vol 244. K. W. Jeon. San Diego, *Elsevier Academic Press Inc.* 244: 1-68.
- Shimizu, M., H. Kato, et al. (2010).** "Sigma factor phosphorylation in the photosynthetic control of photosystem stoichiometry." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(23): 10760-10764.

- Shinozaki, K., M. Ohme, et al. (1986).** "THE COMPLETE NUCLEOTIDE-SEQUENCE OF THE TOBACCO CHLOROPLAST GENOME - ITS GENE ORGANIZATION AND EXPRESSION." *Embo Journal* 5(9): 2043-2049.
- Shotwell, M.A., C. Afonso, et al. (1988)** Molecular characterization of oat seed globulins. *Plant Physiology* **87**, 698-704
- Siemenroth, A., R. Wollgiehn, et al. (1981).** "SYNTHESIS OF RIBOSOMAL-RNA IN RIBOSOME-DEFICIENT PLASTIDS OF THE MUTANT ALBOSTRIANS OF HORDEUM-VULGARE-L." *Planta* 153(6): 547-555.
- Skalitzky, A., J. Martin, et al. (2011).** "Plastids contain a second sec translocase system with essential functions". *Plant Physiology* 155(1):354-369.
- Small, I. D. and N. Peeters (2000).** "The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins." *Trends in Biochemical Sciences* 25(2): 46-47.
- Spencer, M. W. B., S. A. Casson, et al. (2007).** "Transcriptional profiling of the Arabidopsis embryo." *Plant Physiology* 143(2): 924-940.
- Sreenivasulu, N., L. Altschmied, et al. (2004).** "Transcript profiles and deduced changes of metabolic pathways in maternal and filial tissues of developing barley grains." *Plant Journal* 37(4): 539-553.
- Stahl, D. J., S. R. Rodermel, et al. (1993).** "CO-TRANSCRIPTION PATTERN OF AN INTROGRESSED OPERON IN THE MAIZE CHLOROPLAST GENOME COMPRISING 4 ATP SYNTHASE SUBUNIT GENES AND THE RIBOSOMAL RPS2." *Plant Molecular Biology* 21(6): 1069-1076.
- Steffen, J. G., I. H. Kang, et al. (2008).** "AGL61 interacts with AGL80 and is required for central cell development in Arabidopsis." *Plant Physiology* 148(1): 259-268.
- Stern, D. B., M. Goldschmidt-Clermont, et al. (2010).** Chloroplast RNA Metabolism. Annual Review of Plant Biology, Vol 61. S. Merchant, W. R. Briggs and D. Ort. Palo Alto, *Annual Reviews*. 61: 125-155.
- Stone, S. L., L. W. Kwong, et al. (2001).** "LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(20): 11806-11811.
- Strand, A., T. Asami, et al. (2003).** "Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX." *Nature* 421(6918): 79-83.
- Strand, A. and T. Kleine (2007).** "Plastid-to-nucleus signaling". Robert R. Wise and J. Kenneth Hooper (eds.), *The Structure and Function of Plastids*, 183-197.
- Stumpf, P. K. (1981).** "PLANTS, FATTY-ACIDS, COMPARTMENTS." *Trends in Biochemical Sciences* 6(7): 173-176.
- Sugita, M. and M. Sugiura (1996).** "Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants." *Plant Molecular Biology* 32(1-2): 315-326.
- Sugiura, C., Y. Kobayashi, et al. (2003).** "Complete chloroplast DNA sequence of the moss *Physcomitrella patens*: evidence for the loss and relocation of rpoA from the chloroplast to the nucleus." *Nucleic Acids Research* 31(18): 5324-5331.
- Sugiura, M., T. Hirose, et al. (1998).** "Evolution and mechanism of translation in chloroplasts." *Annual Review of Genetics* 32: 437-459.
- Sultan, M., M. H. Schulz, et al. (2008).** "A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome." *Science* 321(5891): 956-960.
- Sun, X. D., D. Shantharaj, et al. (2010).** "Transcriptional and hormonal signaling control of Arabidopsis seed development." *Current Opinion in Plant Biology* 13(5): 611-620.
- Sussex, I., M. Clutter, et al. (1973).** "BIOSYNTHETIC ACTIVITY OF SUSPENSOR OF PHASEOLUS-COCCINEUS." *Caryologia* 25: 261-272.
- Swiatecka-Hagenbruch, M., K. Liere, et al. (2007).** "High diversity of plastidial promoters in Arabidopsis thaliana." *Molecular Genetics and Genomics* 277(6): 725-734.

**Swiatek, M., R. E. Regel, et al. (2003).** "Effects of selective inactivation of individual genes for low-molecular-mass subunits on the assembly of photosystem II, as revealed by chloroplast transformation: the psbEFLJ operon in *Nicotiana tabacum*." *Molecular Genetics and Genomics* 268(6): 699-710.

## T

**Tanabe, S., M. Ashikari, et al. (2005).** "A novel cytochrome P450 is implicated in brassinosteroid biosynthesis via the characterization of a rice dwarf mutant, dwarf11, with reduced seed length." *Plant Cell* 17(3): 776-790.

**Tanaka, H., P. Dhonukshe, et al. (2006).** "Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development." *Cellular and Molecular Life Sciences* 63(23): 2738-2754.

**Tanaka, M., A. Kikuchi, et al. (2008).** "Sugar signaling is involved in histone deacetylase-mediated repression of embryonic characteristics after germination." *Plant Biotechnology* 25(4): 335-340.

**Terashima, I., T. Fujita, et al. (2009).** "Green light drives leaf photosynthesis more efficiently than red light in strong white light : revisiting the enigmatic question of why leaves are green." *Plant and Cell Physiology* 50(4): 684-697.

**Testolin, R. and G. Cipriani (1997).** "Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in the genus *Actinidia*." *Theoretical and Applied Genetics* 94(6-7): 897-903.

**To, A., C. Valon, et al. (2006).** "A network of local and redundant gene regulation governs Arabidopsis seed maturation." *Plant Cell* 18(7): 1642-1651.

**Tolleter, D., M. Jaquinod, et al. (2007).** "Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation." *Plant Cell* 19(5): 1580-1589.

**Tozawa, Y., M. Teraishi, et al. (2007).** "The plastid sigma factor SIG1 maintains photosystem I activity via regulated expression of the psaA operon in rice chloroplasts." *Plant Journal* 52(1): 124-132.

**Tschiersch, H., L. Borisjuk, et al. (2011).** "Gradients of seed photosynthesis and its role for oxygen balancing." *Biosystems* 103(2): 302-308.

**Tseng, C. C., T. Y. Sung, et al. (2010).** "Editing of accD and ndhF chloroplast transcripts is partially affected in the Arabidopsis vanilla cream1 mutant." *Plant Molecular Biology* 73(3): 309-323.

**Tsudzuki, T., T. Wakasugi, et al. (2001).** "Comparative analysis of RNA editing sites in higher plant chloroplasts." *Journal of Molecular Evolution* 53(4-5): 327-332.

**Tsunoyama, Y., Y. Ishizaki, et al. (2004).** "Blue light-induced transcription of plastid-encoded psbD gene is mediated by a nuclear-encoded transcription initiation factor, AtSig5." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(9): 3304-3309.

**Turk, E. M., S. Fujioka, et al. (2003).** "CYP72B1 inactivates brassinosteroid hormones: An intersection between photomorphogenesis and plant steroid signal transduction." *Plant Physiology* 133(4): 1643-1653.

**Tzafir, I., R. Pena-Muralla, et al. (2004).** "Identification of genes required for embryo development in *Arabidopsis*." *Plant Physiology* 135(3): 1206-1220.

## V

**van Dongen, J. T., G. W. Roeb, et al. (2004).** "Phloem import and storage metabolism are highly coordinated by the low oxygen concentrations within developing wheat seeds." *Plant Physiology* 135(3): 1809-1821.

**Vigeolas, H., J. T. van Dongen, et al. (2003).** "Lipid storage metabolism is limited by the prevailing low oxygen concentrations oilseed rape." *Plant Physiology* 133(4): 2048-2060.

**Voelker, T. and A. T. Kinney (2001).** "Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 335-361.

## W

**Walbot, V., M. Clutter, et al. (1972).** "REPRODUCTIVE DEVELOPMENT AND EMBRYOGENY IN PHASEOLUS." *Phytomorphology* 22(1): 59-68.

**Wall, M. K., L. A. Mitchenall, et al. (2004).** "Arabidopsis thaliana DNA gyrase is targeted to chloroplasts and mitochondria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(20): 7821-7826.

**Wang, D. F., M. D. Tyson, et al. (2006).** "Partially redundant functions of two SET-domain polycomb-group proteins in controlling initiation of seed development in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(35): 13244-13249.

**Wang, Z., M. Gerstein, et al. (2009).** "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics." *Nature Reviews Genetics* 10(1): 57-63.

**Webb, W. W. (2001).** "Fluorescence correlation spectroscopy: inception, biophysical experimentations, and prospectus." *Applied Optics* 40(24): 3969-3983.

**Weber, H., L. Borisjuk, et al. (1997).** "Sugar import and metabolism during seed development." *Trends in Plant Science* 2(5): 169-174.

**Weber, H., L. Borisjuk, et al. (2005).** Molecular physiology of legume seed development. *Annual Review of Plant Biology*. Palo Alto, Annual Reviews. 56: 253-279.

**Wetzel, C. M., C. Z. Jiang, et al. (1994).** "NUCLEAR ORGANELLE INTERACTIONS - THE IMMUTANS VARIATION MUTANT OF ARABIDOPSIS IS PLASTID AUTONOMOUS AND IMPAIRED IN CAROTENOID BIOSYNTHESIS." *Plant Journal* 6(2): 161-175.

## X

**Xiang, D. Q., P. Venglat, et al. (2011).** "Genome-Wide Analysis Reveals Gene Expression and Metabolic Network Dynamics during Embryo Development in Arabidopsis." *Plant Physiology* 156(1): 346-356.

**Xie, G. L. and L. A. Allison (2002).** "Sequences upstream of the YRTA core region are essential for transcription of the tobacco atpB NEP promoter in chloroplasts in vivo." *Current Genetics* 41(3): 176-182.

**Xie, X. S., E. Sanchez, et al. (1998).** "Near-field and two-photon fluorescence imaging of single molecules and biomolecules." *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 216: U84-U84.

**Xie, Y. D., W. Li, et al. (2010).** "The Arabidopsis gene SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1 plays a role in the salicylate- and jasmonate-mediated defence responses." *Plant Cell and Environment* 33(5): 828-839.

**Xu, X. and S. Moller (2004).** "AtNAP7 is a plastidic SufC-like ATP-binding cassette/ATPase essential for Arabidopsis embryogenesis". *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 101(24):9143-9148.

**Xu, X.** and S. Moller (2006). "AtSufE is an essential activator of plastidic and mitochondrial desulfurases in *Arabidopsis*". *EMBO Journal* 25(4): 900-909

## Y

**Yamauchi, Y.,** M. Ogawa, et al. (2004). "Activation of Gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds." *Plant Cell* 16(2): 367-378.

**Yao, J. L.,** S. Roy-Chowdhury, et al. (2003). "AtSig5 is an essential nucleus-encoded *Arabidopsis* sigma-like factor." *Plant Physiology* 132(2): 739-747.

## Z

**Zago, E.,** S. Morsa, et al. (2006). "Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco." *Plant Physiology* 141(2): 404-411.

**Zghidi, W.,** L. Merendino, et al. (2007). "Nucleus-encoded plastid sigma factor SIG3 transcribes specifically the psbN gene in plastids." *Nucleic Acids Research* 35(2): 455-464.

**Zghidi-Abouzeid, O.,** L. Merendino, et al. (2011). "Characterization of plastid psbT sense and antisense RNAs." *Nucleic Acids Research* 39(13): 5379-5387.

**Zhang, H.,** S. D. Rider, et al. (2008). "The CHD3 remodeler PICKLE promotes trimethylation of histone H3 lysine 27." *Journal of Biological Chemistry* 283(33): 22637-22648.

**Zoschke, R.,** K. Liere, et al. (2007). "From seedling to mature plant: *Arabidopsis* plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription are differentially regulated during leaf development." *Plant Journal* 50(4): 710-722.



# ***Annexes***

---

---

## ANNEXE I

## Amorces utilisées pour les expériences de RT-PCR semi-quantitative

Gène	Amorces (5' vers 3')	Température	Nombre de cycles	Taille approx. de l'amplicon
Hema1	GGGTCTTAATGGGGTTCGT	55°C	28	500
	GTCAAGACCAGCTGAGACTTC			
Sigma1	CCGGGCAAGGGGACTATA	55°C	36	700
	CCGAGTCTTTCATGTAGGTG			
Sigma2	GTTGCGCAGGAAGTTGATC	55°C	30	600
	TCGACTCCAGCAGCAGAAG			
Sigma3	GGAGGTCGAGTGTGACAGCT	55°C	38	500
	ATGCCGTGACACCATCGTA			
Sigma4	CGTGGAGCTGAGAGATTTGA	55°C	34	400
	CATCTCCTCTGGCCTTGTTT			
Sigma5	GAGAGGCTTGTGCGGGA	55°C	34	400
	GCCCTCTCATACCCGCTTGA			
Sigma6	CCTGCGTCGGTTCTCTC	55°C	34	500
	ACCCTCATCGTCCACATCG			
rpoA	CCCCTGTGAAAATCATTG	55°C	28	200
	CCGGGAGGCTTGATGAAGT			
rpoB	ACTCCTCAGAATTTGGTAAC	55°C	31	400
	CTGCCGCTATCATATAAT			
rpoC1	ATCCTGGAAATACAGCATCC	55°C	28	200
	ATCTTCCCATTCATTCCCC			
rpoC2	ATAGATCACTTCGGGATGGC	55°C	28	200
	ATATGGACTGGATTGAAGGG			
RpoTmp	TGGTTATTGTTCTGGTTTAT	55°C	28	900
	AACAATTCATCTACCTCAGG			
RpoTp	TTCATTGGAAGACCAATACC	55°C	28	200
	TTTCAAAGTCTGATCAACC			
atpB	CGACTGGAACACTTAGAGGA	55°C	26	200
	GGTACTGGATGTAGCCTTCC			
atpH	CTGCCTCAGGTTGTCTCGC	55°C	25	100
	CTGCTGCTTCGGTTATTGC			
rbcL	GGCTGCGGTAGCTGCTGA	55°C	26	200
	CATGTACCCGCAGTAGCATT			
rbcS	GAGCACGGATTTGTGTACCG	55°C	26	200
	GTTGCGAATCCGATGATCC			
accD	CCGGTAGCCCTGGGGTTAT	55°C	26	200
	GCTCCTCCGGAAGAACACAC			
psbB	GGTATCCGACCCTTATGGA	55°C	26	200
	GGCCCGCTAATATACCCAAC			
rps7	AAGACGTGTAGGCGGGTCAA	55°C	28	200
	TTGCGTATGGCATCGCCACT			
clpP	GGTGGATGGGTAATATCTGG	55°C	27	200
	CGTGAGGGAATGCTATACGT			
rm 16S-PC	GGGTAGCTATATTTCTGGG	55°C	23	150
	GCTTCCTTCTTCGTAGACA			

## ANNEXE II

## Amorces utilisées pour le clonage par la technique Gateway

Gène	Amorces (5' vers 3')	Température	Nombre de cycles	Taille approx. de l'amplicon
rpoA (Gateway)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTCATGGTTCGCGAGAAAGTCAAAGTA GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCTGATCATTCTTTTCTAGAATGTCTAAT	60°C	35	1000
rpoB (Gateway)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTCATGAAATTTGGCATGGGTACACTT GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCTGATCAATCACCTACTTTTATTTCACGTTTCTG	60°C	35	1500

## ANNEXE III

## Valeurs obtenues pour les transcrits des macroarrays présentés au chapitre I

## AUTRES TRANSCRITS

Nom du gène	DAF 2/4				DAF 6/11				DAF 13/15				Stade 0	
	Moyenne intensité	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	Moyenne intensité	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	Moyenne intensité	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type
accD	21 077	± 18 435	0,12	± 0,11	102 974	± 61 970	0,20	± 0,12	40 739	± 15 819	0,23	± 0,09	0,11	± 0,05
cemA	7 958	± 7 775	0,04	± 0,05	71 435	± 13 014	0,14	± 0,03	38 962	± 21 450	0,22	± 0,12	0,56	± 0,18
clpP	79 019	± 47 101	0,42	± 0,28	218 552	± 124 163	0,42	± 0,24	91 565	± 60 431	0,52	± 0,34	0,52	± 0,04
matK	83 783	± 91 450	0,52	± 0,54	425 689	± 235 653	0,82	± 0,46	170 915	± 42 359	0,96	± 0,24	2,00	± 0,34
orf77	39 754	± 30 304	0,20	± 0,18	101 574	± 34 659	0,20	± 0,07	80 430	± 17 222	0,45	± 0,10	0,64	± 0,27
ycf1	75 745	± 35 445	0,48	± 0,21	246 938	± 55 640	0,48	± 0,11	24 489	± 26 684	0,14	± 0,15	0,10	± 0,12
ycf2	14 510	± 3 984	0,12	± 0,02	14 928	± 19 497	0,03	± 0,04	35 435	± 5 965	0,20	± 0,03	0,53	± 0,00
ycf3	3 924	± 6 794	0,02	± 0,04	27 303	± 14 625	0,05	± 0,03	13 726	± 12 108	0,08	± 0,07	0,10	± 0,18
ycf4	6 101	± 10 564	0,04	± 0,06	17 648	± 11 451	0,03	± 0,02	17 655	± 15 402	0,10	± 0,09	0,30	± 0,45
ycf5	14 649	± 10 638	0,07	± 0,06	56 587	± 20 478	0,11	± 0,04	5 222	± 4 526	0,03	± 0,03	0,24	± 0,15

## CHLORORESPIRATION

Nom du gène	DAF 2/4				DAF 6/11				DAF 13/15				Stade 0	
	Moyenne intensité	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	Moyenne intensité	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	Moyenne intensité	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type
ndhA	1 423	± 1 777	0,01	± 0,01	1 443	± 2 854	0,00	± 0,01	13 160	± 8 848	0,07	± 0,05	0,05	± 0,05
ndhB	25 762	± 17 949	0,17	± 0,11	183 072	± 90 666	0,35	± 0,18	143 852	± 30 826	0,81	± 0,17	2,66	± 0,31
ndhC	73 566	± 63 458	0,40	± 0,37	139 777	± 180 086	0,27	± 0,35	42 610	± 37 084	0,24	± 0,21	0,06	± 0,02
ndhD	16 932	± 12 241	0,08	± 0,07	93 118	± 34 877	0,18	± 0,07	69 479	± 86 177	0,39	± 0,48	0,24	± 0,19
ndhE	36 306	± 18 114	0,21	± 0,11	147 496	± 48 579	0,29	± 0,09	75 022	± 20 116	0,42	± 0,11	0,53	± 0,13
ndhF	3 050	± 6 663	0,04	± 0,04	15 524	± 12 484	0,03	± 0,02	17 701	± 30 598	0,10	± 0,17	0,03	± 0,03
ndhG	24 264	± 9 029	0,15	± 0,05	101 300	± 40 918	0,20	± 0,08	26 672	± 23 438	0,15	± 0,13	0,74	± 0,19
ndhH	3 551	± 2 669	0,02	± 0,02	4 266	± 4 971	0,01	± 0,01	6 887	± 11 519	0,04	± 0,06	0,00	± 0,00
ndhI	10 424	± 11 245	0,05	± 0,07	37 575	± 29 906	0,07	± 0,06	52 334	± 28 093	0,29	± 0,16	0,97	± 0,27
ndhJ	3 620	± 4 163	0,02	± 0,02	20 086	± 8 888	0,04	± 0,02	4 568	± 3 953	0,03	± 0,02	0,17	± 0,13
ndhK	19 255	± 15 827	0,16	± 0,09	134 673	± 50 406	0,26	± 0,10	59 085	± 46 875	0,33	± 0,26	0,71	± 0,14

## PHOTOSYNTHESE

Nom du gène	DAF 2/4				DAF 6/11				DAF 13/15				Stade 0	
	Moyenne intensité	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	Moyenne intensité	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	Moyenne intensité	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type
atpA	71 005 ± 31 298		0,42 ± 0,18		332 300 ± 86 156		0,64 ± 0,17		131 708 ± 34 557		0,74 ± 0,19		1,13 ± 0,31	
atpB	56 557 ± 29 662		0,31 ± 0,17		181 795 ± 95 495		0,35 ± 0,19		62 760 ± 8 838		0,35 ± 0,05		0,60 ± 0,20	
atpE	35 137 ± 25 948		0,17 ± 0,15		139 589 ± 68 786		0,27 ± 0,13		28 385 ± 2 898		0,16 ± 0,02		0,25 ± 0,19	
atpF	69 882 ± 50 381		0,34 ± 0,30		313 628 ± 83 520		0,61 ± 0,16		43 675 ± 5 839		0,25 ± 0,03		0,19 ± 0,05	
atpH	1 524 007 ± 170 920		11,79 ± 1,00		4 102 416 ± 1 418 542		7,95 ± 2,75		736 572 ± 80 675		4,14 ± 0,46		6,90 ± 1,45	
atpI	136 391 ± 65 811		0,78 ± 0,39		429 262 ± 119 801		0,83 ± 0,23		150 979 ± 47 027		0,85 ± 0,26		1,45 ± 0,16	
petA	37 495 ± 31 866		0,20 ± 0,19		217 326 ± 31 660		0,42 ± 0,06		92 041 ± 2 373		0,52 ± 0,01		1,27 ± 0,34	
petB	120 003 ± 18 946		0,85 ± 0,11		827 217 ± 64 644		1,60 ± 0,13		455 745 ± 119 793		2,56 ± 0,68		1,70 ± 0,55	
petD	106 677 ± 34 308		0,86 ± 0,20		681 746 ± 130 882		1,32 ± 0,25		272 358 ± 66 857		1,53 ± 0,38		0,83 ± 0,28	
petG	112 105 ± 38 555		0,69 ± 0,23		549 936 ± 300 976		1,07 ± 0,58		110 165 ± 89 638		0,62 ± 0,51		1,17 ± 0,35	
petL	217 455 ± 138 327		1,14 ± 0,81		751 563 ± 263 659		1,46 ± 0,51		135 742 ± 79 133		0,76 ± 0,45		1,81 ± 0,23	
petN	18 788 ± 17 274		0,19 ± 0,10		58 829 ± 19 751		0,11 ± 0,04		9 678 ± 12 944		0,05 ± 0,07		0,01 ± 0,02	
psaA	12 723 ± 9 719		0,06 ± 0,06		114 975 ± 50 712		0,22 ± 0,10		38 016 ± 31 348		0,21 ± 0,18		0,11 ± 0,11	
psaB	14 890 ± 13 617		0,15 ± 0,08		153 454 ± 60 205		0,30 ± 0,12		122 572 ± 31 870		0,69 ± 0,18		0,35 ± 0,26	
psaC	37 731 ± 12 293		0,30 ± 0,07		267 043 ± 189 103		0,52 ± 0,37		51 420 ± 11 674		0,29 ± 0,07		0,37 ± 0,24	
psaI	590 197 ± 108 411		4,29 ± 0,64		1 485 526 ± 1 359 723		4,32 ± 1,21		235 157 ± 233 931		1,32 ± 1,32		0,27 ± 0,24	
psaJ	1 219 103 ± 354 770		8,27 ± 2,09		5 180 116 ± 1 603 909		10,04 ± 3,11		694 679 ± 393 074		3,91 ± 2,22		7,00 ± 0,83	
psbA	1 752 952 ± 2 579 742		21,10 ± 15,16		4 574 877 ± 1 938 229		8,86 ± 3,75		7 049 117 ± 886 562		39,66 ± 4,97		16,93 ± 5,42	
psbB	150 838 ± 54 969		0,94 ± 0,32		578 008 ± 208 958		1,12 ± 0,40		77 876 ± 25 991		0,44 ± 0,15		0,19 ± 0,21	
psbC	329 778 ± 88 415		2,74 ± 0,52		1 278 556 ± 329 964		2,48 ± 0,64		537 483 ± 314 050		3,02 ± 1,77		1,69 ± 0,26	
psbD	106 553 ± 39 807		0,87 ± 0,23		797 900 ± 76 512		1,55 ± 0,15		615 099 ± 323 574		3,46 ± 1,82		1,46 ± 0,27	
psbE	983 374 ± 551 533		5,39 ± 3,24		2 760 105 ± 1 309 892		5,35 ± 2,54		198 491 ± 119 837		1,12 ± 0,67		0,72 ± 0,21	
psbF	871 280 ± 450 894		5,69 ± 2,65		3 855 343 ± 907 199		7,47 ± 1,76		283 342 ± 101 355		1,59 ± 0,57		1,16 ± 0,23	
psbH	50 918 ± 32 582		0,26 ± 0,19		228 157 ± 133 568		0,44 ± 0,26		17 159 ± 17 034		0,10 ± 0,10		0,28 ± 0,34	
psbI	57 225 ± 6 935		0,43 ± 0,04		486 412 ± 291 231		0,94 ± 0,56		79 174 ± 48 837		0,45 ± 0,28		0,69 ± 0,19	
psbJ	784 519 ± 160 443		5,38 ± 0,94		2 790 261 ± 237 434		5,41 ± 0,46		374 743 ± 32 570		2,11 ± 0,18		1,65 ± 0,18	
psbK	124 709 ± 144 314		1,12 ± 0,85		1 280 918 ± 175 909		2,48 ± 0,34		175 575 ± 45 185		0,99 ± 0,25		1,66 ± 0,30	
psbL	714 001 ± 492 009		5,03 ± 2,89		4 093 732 ± 117 271		7,93 ± 0,23		364 234 ± 115 035		2,05 ± 0,65		1,33 ± 0,18	
psbM	574 826 ± 196 335		3,83 ± 1,15		2 795 433 ± 1 228 516		5,42 ± 2,38		575 529 ± 108 523		3,24 ± 0,61		2,48 ± 0,07	
psbN	99 951 ± 306 802		1,77 ± 1,80		949 128 ± 322 506		1,84 ± 0,63		436 915 ± 52 160		2,46 ± 0,30		1,62 ± 0,78	
psbT	418 683 ± 129 027		2,65 ± 0,76		1 851 034 ± 496 216		3,59 ± 0,96		245 374 ± 93 450		1,38 ± 0,53		1,27 ± 0,67	
psbZ	82 163 ± 46 696		0,77 ± 0,27		512 343 ± 72 138		0,99 ± 0,14		282 366 ± 149 513		1,59 ± 0,84		0,21 ± 0,37	
rbcl	527 761 ± 25 691		3,85 ± 0,15		1 315 361 ± 364 841		2,55 ± 0,71		51 350 ± 39 249		0,29 ± 0,22		0,31 ± 0,28	

## TRADUCTION

Nom du gène	DAF 2/4				DAF 6/11				DAF 13/15				Stade 0	
	Moyenne intensité	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	Moyenne intensité	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	Moyenne intensité	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type
rpl2	107 660	± 85 326	0,62	± 0,50	312 802	± 35 990	0,61	± 0,07	106 864	± 12 094	0,60	± 0,07	3,30	± 0,59
rpl14	25 187	± 19 539	0,17	± 0,11	110 804	± 64 550	0,21	± 0,13	80 023	± 29 359	0,45	± 0,16	0,92	± 0,24
rpl16	31 750	± 28 355	0,17	± 0,17	169 205	± 83 819	0,33	± 0,16	54 408	± 22 523	0,31	± 0,13	1,16	± 0,07
rpl20	42 569	± 30 916	0,21	± 0,18	71 676	± 11 012	0,14	± 0,02	166 913	± 54 591	0,94	± 0,31	1,25	± 0,27
rpl22	31 185	± 20 796	0,16	± 0,12	67 383	± 26 787	0,13	± 0,05	35 232	± 16 920	0,20	± 0,10	0,62	± 0,29
rpl23	77 061	± 55 753	0,38	± 0,33	218 079	± 34 325	0,42	± 0,07	57 388	± 14 779	0,32	± 0,08	0,63	± 0,58
rpl32	148 867	± 82 403	0,82	± 0,48	1 190 935	± 526 037	2,31	± 1,02	257 328	± 124 534	1,45	± 0,70	5,67	± 1,14
rpl33	15 739	± 10 702	0,08	± 0,06	78 441	± 54 128	0,15	± 0,10	122 588	± 144 606	0,69	± 0,81	0,43	± 0,10
rpl36	23 340	± 9 962	0,15	± 0,06	80 228	± 59 337	0,16	± 0,11	87 528	± 14 416	0,49	± 0,08	2,19	± 0,10
rps2	24 242	± 20 415	0,13	± 0,12	55 428	± 17 142	0,11	± 0,03	54 423	± 42 083	0,31	± 0,03	0,80	± 0,27
rps3	52 512	± 42 002	0,27	± 0,25	152 293	± 67 784	0,30	± 0,13	49 916	± 22 782	0,28	± 0,04	1,45	± 0,31
rps4	27 011	± 21 808	0,14	± 0,13	150 891	± 34 697	0,29	± 0,07	24 680	± 21 983	0,14	± 0,08	0,29	± 0,06
rps7	31 762	± 20 309	0,16	± 0,12	135 598	± 52 230	0,26	± 0,10	86 307	± 8 131	0,49	± 0,09	1,08	± 0,05
rps8	39 699	± 43 011	0,23	± 0,25	127 678	± 52 941	0,25	± 0,10	149 115	± 29 976	0,84	± 0,17	2,01	± 0,41
rps11	4 404	± 2 848	0,03	± 0,02	17 430	± 20 177	0,03	± 0,04	40 437	± 28 208	0,23	± 0,24	0,44	± 0,08
rps12	36 874	± 43 155	0,17	± 0,25	48 498	± 58 047	0,09	± 0,11	55 020	± 88 846	0,31	± 0,13	0,02	± 0,03
rps14	46 329	± 8 086	0,36	± 0,05	236 938	± 84 512	0,46	± 0,16	158 254	± 23 346	0,89	± 0,12	0,39	± 0,19
rps15	18 999	± 10 726	0,12	± 0,06	69 129	± 23 369	0,13	± 0,05	32 133	± 5 854	0,18	± 0,05	0,46	± 0,14
rps16	5 424	± 1 174	0,04	± 0,01	15 084	± 10 884	0,03	± 0,02	17 952	± 7 033	0,10	± 0,16	0,09	± 0,09
rps18	56 481	± 49 510	0,34	± 0,29	176 875	± 55 422	0,34	± 0,11	71 607	± 13 827	0,40	± 0,50	0,57	± 0,13
rps19	11 234	± 3 876	0,10	± 0,02	132 414	± 144 593	0,26	± 0,28	32 562	± 16 424	0,18	± 0,13	0,06	± 0,05

## TRANSCRIPTION

Nom du gène	DAF 2/4				DAF 6/11				DAF 13/15				Stade 0	
	Moyenne intensité	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	Moyenne intensité	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	Moyenne intensité	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type	% des transcrits de la puce	Ecart type
rpoA	39 534	± 45 493	0,29	± 0,27	133 661	± 44 862	0,26	± 0,09	118 558	± 24 005	0,67	± 0,14	2,44	± 0,86
rpoB	13 048	± 8 755	0,09	± 0,05	47 962	± 37 365	0,09	± 0,07	47 646	± 21 251	0,27	± 0,12	0,45	± 0,11
rpoC1	39 032	± 22 560	0,22	± 0,13	71 240	± 40 392	0,14	± 0,08	96 886	± 22 086	0,55	± 0,12	3,15	± 1,26
rpoC2	9 104	± 6 777	0,05	± 0,04	19 298	± 18 650	0,04	± 0,04	12 817	± 10 080	0,07	± 0,06	0,12	± 0,05



# ***Publications***

---

---

**Technical note:****RNA isolation from developing *Arabidopsis thaliana* seeds suitable for gene expression analyses****Guillaume Allorent<sup>1</sup>, Emeline Lambert<sup>1,2</sup>,  
Silva Lerbs-Mache<sup>1</sup> and Florence Courtois<sup>1,3</sup>**<sup>1</sup>Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, CNRS (UMR5168) / Université Joseph Fourier / INRA (UMR1200) / CEA Grenoble, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant (iRTSV), 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France; <sup>2</sup>Present address: Equipe 13, Institut Albert Bonniot, CRI INSERM/Université Joseph Fourier U823, Rond-point de la Chantourne, 38706 La Tronche Cedex 9, France; <sup>3</sup>correspondence to: florence.courtois@cea.fr

**A protocol is described for harvesting developing *Arabidopsis thaliana* seeds from the same stage and for RNA isolation in quality and quantity suitable for plasmid gene expression analyses. The method is designed in order to decrease seed polysaccharides and polyphenolics content of the RNA samples. DNA is removed from RNA samples by DNase treatment. In our hands, about 50-80 µg of pure RNA (A260/A280: 1.90; A230/A280: 2.3) is obtained from 25-50 mg of fresh tissues. RNA prepared according to this protocol can be used for RT-PCR, primer extension or macro array experiments.**

Journal of Endocytobiosis and Cell Research (2010) 26-33

Category: technical notes

Keywords: seed, RNA isolation, gene expression

Received: 4 October 2010; Accepted: 24 October 2010

**Introduction**

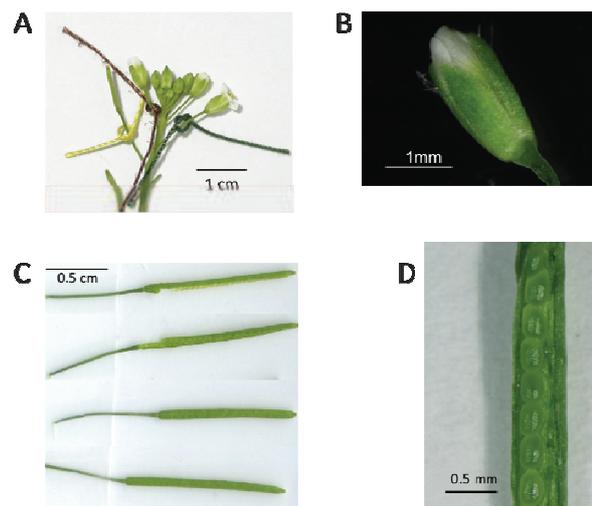
Seed production takes a central place in agricultural industry including human and animal food supply. The biology of seeds represents an important topic in plant research, reflecting the socio-economic value of seed storage compounds. Moreover, seed formation is a crucial step in Angiosperm life cycle that determines the efficiency of the germination process. Maternal (seed coat, endosperm) as well as filial (embryo) tissues interact by metabolite transfer or gene expression modulation during early seed development (reviewed in Weber et al. 2005).

Gene expression during seed formation has been most investigated in crop species as pea (Thompson et al. 2009), barley (Barrero et al. 2009), wheat (Wan et al. 2008) and rice (Yamakawa and Hakata 2010) where seeds reach a reasonable size for material collection. However, most of these species have been selected for centuries to improve their sink power that leads to increase the quality and amount of storage compounds. Therefore, the biochemical patterns and the gene expression profiles during seed formation in these over selected species may not be generalized.

Due to the remarkable advantages, provided by the knowledge coming from genomic sequencing and by the availability of collections of mutants, *Arabidopsis thaliana* became the dominant model for gene expression studies in dicots during the last years. This is even true for seeds (Ruuska et al. 2002; Le et al. 2010) although seed harvesting by silique dissection is very difficult, especially during the earlier stages of seed formation. The small size of *Arabidopsis* seeds strongly limits the amount of biological material available for RNA isolation.

Seeds contain high amounts of polysaccharides and polyphenolic compounds (Suzuki et al. 2004). Their complexation with RNA during extraction leads to the inhibition of enzymatic reactions, such as cDNA synthesis by Reverse Transcriptase (Ruuska and Ohlrogge 2001). Therefore, RNA isolation from seeds during their formation requires a protocol that removes polysaccharides and polyphenolics and allows obtaining acceptable RNA yields and a high quality of RNAs.

Many protocols are available for RNA isolation from *Arabidopsis* tissues (Kiefer et al. 2000; Bilgin et al. 2009), including seeds (Ruuska and Ohlrogge 2001; Suzuki et al. 2004). Commercial kits are also available. Unfortunately, in our experience, these protocols are unsatisfactory in preparing sufficient amount of RNAs from seeds from required quality and quantity. In the following, we will describe the procedure that we developed to analyse the plastid transcriptome of developing *Arabidopsis* seeds.

**Figure 1:** Labeling of flowers and silique dissection.

A) Knotted inflorescence. B) DAF0, Flower at the proper stage for knotting. C) Intact (bottom) and peeled (top) siliques fixed on support with sticky tape (on left-hand side). D) Seeds in a peeled silique just prior harvesting.

RNA isolation from developing *Arabidopsis* seed, Allorent et al.

This technical note describes (1) the protocol to harvest developing *Arabidopsis* seeds of the same physiological stage and (2) the protocol for RNA isolation from these seeds that provided RNA in enough quantity and of good quality to analyse the plastid RNAs by RT-PCR, primer extension and by macroarray experiments.

## The Method

The protocol described here produces high-purity DNA-free RNA from developing seeds. It is cheap and relatively quick to perform.

*Arabidopsis* naturally self-pollinates and fertilization occurs when the flower opens. Time course of seed formation is defined according to the first Day After Flowering (DAF) (Figure 1A).

The RNA isolation method described here is adapted from Suzuki et al. (2004). Several key points should be highlighted. To avoid RNA degradation, biological tissues are frozen as soon as possible during the harvesting by the use of frozen forceps. Thawing is only allowed after addition of the extraction buffer (see section 2). To prevent polyphenolics contamination, chloroform extraction is carried out prior phenol:chloroforme:IAA purification (section 3). The use of high salt extraction buffer, followed by two sequential RNA precipitations with isopropanol and LiCl (section 4) contributes to the reduction of the polysaccharide content. Several DNase treatments are performed to remove contaminant DNA (section 8). Between 25-50 mg of fresh tissue is sufficient to isolate 50-80  $\mu\text{g}$  of crude RNA, thus providing a reasonable yield of RNA adapted to the



**Figure 2: Arabidopsis seeds RNA quality.**

A) RNA (400 ng) is separated by Agarose (1%, w/v) Gel Electrophoresis and stained with Ethidium bromide. 1: crude RNA (step 27); 2: RNA after one DNase treatment (step 31 to 36); 3: RNA after two DNase treatments (step 31 to 41). Arrows indicate 26S and 18S ribosomal RNA bands. Scale is indicated on the left in bp. B) DNA contamination of RNA checked by PCR amplification of *psbN* (AtCp051). Primers: *psbN*1: 5'- ATGGAACAG-CAACCCTAGTCG-3' and *psbN*2: 5'- GTCCCGTGTTCCCTCGAATGG-3'. PCR conditions: 5 min 95°C, (30s 95°C, 30 s 55°C, 30s 72°C), 32 cycles, 1 min 72°C. Matrix: 1: crude RNA (200 ng; step 27); 2: RNA after one DNase treatment (200 ng; step 36); 3: RNA after two DNase treatments (200 ng; step 41); 4: AtDNA (500 ng); 5: water. Final volume: 25  $\mu\text{L}$ .

**Table 1:** Arabidopsis seeds RNA quality measurements following DNase treatments.

Sample ID	$\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	$\mu\text{g}$	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
1: RNA, Non Treated	1.85	10	1.92	1.69
2: RNA, Simple DNase treatment	0.45	9	1.90	2.33
3: RNA, Double DNase treatment	0.35	7.1	1.88	2.23

1: crude RNA (step 27); 2: RNA after one DNase treatment (step 31 to 36); 3: RNA after two DNase treatments (step 31 to 41). These results are representative of 5 independent experiments.

availability of seed material. Presence of guanidine thiocyanate in the phenol mixture keeps RNases denaturated and enhances the final yield. The ratio  $A_{260}/A_{280}$  is around 1.9 and shows very low protein content in the RNA samples (Table 1, line 1). The two sequential RNA precipitations with first isopropanol and then LiCl strongly reduce polysaccharides and polyphenolics content (Table 1,  $A_{260}/A_{230}$  ratio). The agarose gel shows clear bands of ribosomal RNA, indicating that no degradation occurred (Figure 2A).

According to the number of plastids per cell and to the number of DNA molecules per plastid, plastidial DNA represents the major part of the whole DNA content in a cell. Therefore, at least two DNase treatments are necessary to completely get rid of plastid DNA in the RNA preparations. The absence of plastid DNA in the preparations is checked after each round of DNase treatment by PCR (Figure 2A, compare lane 1 with lanes 2 and 3; for PCR conditions, see figure 2B). To increase the sensitivity of the detection of DNA, a short sequence is amplified using an elevated cycle number (in our case, 129 bp, *psbN* plastid gene, 32 cycles). Generally, the DNase treatments also enhance RNA purity, probably because of to the additional phenol:chloroforme:IAA purifications (Table 1, lines 2 and 3). However, efficiency of the DNase treatment and RNA quality strongly depend on the amount of RNA treated, which should not exceed 10  $\mu\text{g}$  (not shown).

RNA prepared according this protocol can be used for all analyses that need DNA-free RNA samples, such as RT-PCR, primer extension or macroarray experiments.

## Acknowledgements

We wish to thank our colleague Livia Merendino-Iseni for critical reading of the manuscript and for helpful and frequent discussions. This work was supported by Genoplante (ANR Seedplastomics n°ANR-07-GPLA-013-001) and by CNRS, INRA, CEA and Université Joseph Fourier funding. G.A receives a grant from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

## References

Barrero JM, Talbot MJ, White RG, Jacobsen JV, Gubler F. (2009) Anatomical and transcriptomic studies of the coleorhiza reveal

- the importance of this tissue in regulating dormancy in barley. *Plant Physiology*, 150:1006-1021.
- Bilgin DD, Delucia EH, Clough SJ. (2009) A robust plant RNA isolation method suitable for Affymetrix GeneChip analysis and quantitative real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 4:333-340.
- Kiefer E, Heller W, Ernst D. (2000) A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. *Plant Mol Biol Rep*. 18:33-39.
- Le BH, Cheng C, Bui AQ, Wagmaister JA, Henry KF, Pelletier J, Kwong L, Belmonte M, Kirkbride R, Horvath S. et al. (2010) Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107:8063-8070.
- Ruuska SA, Girke T, Benning C, Ohlrogge JB. (2002) Contrapuntal networks of gene expression during *Arabidopsis* seed filling. *Plant Cell*, 14:1191-1206.
- Ruuska SA, Ohlrogge JB. (2001) Protocol for small-scale RNA isolation and transcriptional profiling of developing *Arabidopsis* seeds. *Biotechniques*, 31:752.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press ed, Cold Spring Harbor, NY.
- Suzuki Y, Kawazu T, Koyama H. (2004) RNA isolation from siliques, dry seeds, and other tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Biotechniques*, 37:542.
- Thompson R, Burstin J, Gallardo K. (2009) Post-genomics studies of developmental processes in legume seeds. *Plant Physiology*, 151:1023-1029.
- Wan YF, Poole RL, Huttly AK, Toscano-Underwood C, Feeney K, Welham S, Gooding MJ, Mills C, Edwards KJ, Shewry PR. et al. (2008) Transcriptome analysis of grain development in hexaploid wheat. *Bmc Genomics*, 9.
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U. (2005) Molecular physiology of legume seed development. *Annu Rev Plant Biol*. 56:253-279.
- Yamakawa H, Hakata M. (2010) Atlas of rice grain filling-related metabolism under high temperature: joint analysis of metabolome and transcriptome demonstrated inhibition of starch accumulation and induction of amino acid accumulation. *Plant Cell Physiol*. 51:795-809.

## BOX – Equipment and Reagents

### Equipment

Jeweller's forceps (Dumont type 5)  
 Magnifying glass  
 Colourful cotton thread (diameter 0.5 mm)  
 Mortar and pestle  
 RNA-free 2-mL conic tubes (Dutscher, France)  
 RNA-free 1.5-mL tubes (Dutscher, France)  
 RNA-free tips (Dutscher, France)  
 Centrifuge 5415R, fixed angle rotor F-45-24-11, Eppendorf, France  
 Biophotometer, Eppendorf, France  
 Thermal Cycler C1000, Biorad, France

### Reagents

RNase-free water. Prepare small volumes (10-20 mL) of water. Autoclave at 120°C for 20 min. Store at room temperature.

Chloroform, Isopropyl alcohol (isopropanol) and Ethyl alcohol absolute (ethanol) are of RPE grade (Carlo Erba, France).

70 % (v/v) ethyl alcohol absolute in water.

4M LiCl. Autoclave at 120°C for 20 min. Store at room temperature.

Phenol:Chloroform:isoamylalcohol (25:24:1 v/v), Biosolve, France

Phenol mixture: 35% (w/v) guanidine thiocyanate in water-saturated phenol (Biophenol, Biosolve, France); add 0.1 volume 2M sodium acetate pH 4. Store at 4°C.

TBE 10X and TNE 10X prepared as in Sambrook et al. (1979).

Agarose, Molecular Biology grade, Eurogentec, France

Ribonuclease inhibitor (RNase inh), 40 U/μL, Euromedex, France

Turbo™ DNase, 2U/μL (Ambion, Applied Biosystems, France). Turbo™ DNase buffer 10X is provided with the enzyme.

Extraction buffer: 100mM Tris-HCL pH 9,5; 600 mM NaCl; 10 mM EDTA; 2% (w/v) Lithium dodecyl sulfate; 400 mM trisodium citrate; Autoclave at 120°C for 20 min. Store at room temperature. Warm to 30°C to avoid precipitate. Add 5% β-mercaptoethanol just prior to use.

### BOX – Protocol

#### 1 - Labelling of flowers and collecting seeds

(Timing: 1 hour per day for labelling flowers of 6 plants)

- Step 1** Grow *Arabidopsis thaliana* plants until inflorescences are developed. Only 2-3 inflorescences are conserved per plant and are fixed on a vertical support.
- Step 2** Knot a 1.5-cm long thread around the pedicel of all just-opening DAF 0 (DAF= days after fertilisation) flowers. Use a different colour code for each different day to establish the correspondence between DAF0 and the day of harvesting seeds (Figure 1, A and B)
- Step 3** Repeat step 2 every day, as long as needed to get enough material.
- Step 4** Collect the siliques from the stages of interest. Stick the pedicels on a parafilm sheet with sticky tape and peel one of the two leaflets of the silique (Figure 1, C and D). Use a magnifying glass. *Work as quickly as possible to avoid desiccation of the material under the light*
- Step 5** Pre-cool a 1.5-mL tube under liquid nitrogen and let it float on the surface of the liquid nitrogen.
- Step 6** Freeze jeweller's forceps in liquid nitrogen and immediately collect seeds by scraping along the silique. *Seeds are immediately frozen by contact with cold forceps.*
- Step 7** Place the frozen seeds into the pre-cooled 1.5-mL tube.

(Pause point: Seeds can be stored at -80°C up to 4-6 months.)

#### 2 - Tissue homogenization

(Timing: 1 hour for 2 samples)

- Step 8** Pre-cool mortar and pestle by pouring liquid nitrogen into them. *To prevent thawing and water vapour condensation, keep all the material in an insulating basket filled with liquid nitrogen.*
- Step 9** Transfer the frozen tissue from the -80°C freezer to liquid nitrogen prior to the next step.
- Step 10** Transfer the seeds (25-50 mg) to the mortar and grind with the pestle until a fine powder is obtained. *Avoid scattering of biological tissue on the walls of the mortar.*
- Step 11** Add 1 mL of extraction buffer to the powder. Take the mortar out of the insulating basket to let it thaw. Grind with the pestle until thawing at room temperature. *Take care to prevent splashing. Avoid scattering of biological tissue on the walls of the mortar. The tissue/buffer ratio can be approximate. Work in a fume hood.*
- Step 12** Transfer the liquid into a 2-mL tube by using a pipette. Rinse mortar and pestle with 1 mL extraction buffer and add the volume to the 2-mL tube. *Work carefully to collect all the biological material dispersed on the wall of the mortar. Always use RNase-free tubes and pipetman tips.*

**BOX – Protocol (continued)****3 - RNA extraction**

(Timing: 2 hour for 2 samples)

- Step 13** Vortex the 2-mL tube thoroughly for 3 min and centrifuge 15 min at 16000g at 20°C.
- Step 14** Transfer the liquid phase into another 2-mL tubes and add 1 volume of chloroform.
- Step 15** Vortex for 3 min and centrifuge at 16000g at 20°C for 25 min.
- Step 16** Transfer the upper phase into another 2-mL tube and add 1 volume of phenol mixture and ½ volume of chloroform. Centrifuge at 16000g at 20°C for 10 min.
- Step 17** Transfer the upper phase into a new 2-mL tube and add 1 volume of chloroform. Vortex 1 min and centrifuge at 16000g at 20°C for 5 min.

**4 - RNA precipitation**

(Timing: 1.5 hour for 2 samples, then one night)

- Step 18** Transfer the upper aqueous phase into a new 1.5-mL tube and add 0.6 volume of isopropanol. Mix by inverting the tube, let precipitate at room temperature for 20 min.
- Step 19** Centrifuge at 16000g at 4°C for 30 min. Discard the supernatant. Let it air dry at room temperature for 15-20 min.
- Step 20** Re-suspend pellet in 200 µL RNase-free sterile water, transfer into a 1.5-mL tube and add 200µL of LiCl (4M).
- Step 21** Incubate on ice at 4°C overnight. Tube is placed on ice inside an isolating basket and let in a fridge or cold room.

**5 - Washing and dissolving RNA**

(Timing: 1 hour for 2 samples)

- Step 22** Pre-cool rotor and centrifuge at 4°C. Centrifuge the tube at 16000g at 4°C for 30 min.
- Step 23** Discard the supernatant. *Be careful not to loose the RNA pellet.*
- Step 24** Add 150 µL 70% Ethanol cooled to -20°C. *Carefully rinse the wall of the tube to be sure to recover all RNA.*
- Step 25** Centrifuge at 16000g at 4°C for 3 min.

**BOX - Protocol (continued)**

**Step 26** Carefully discard the supernatant and let the pellet air dry at room temperature for 10-15 min.

**Step 27** Dissolve the pellet in 25-50  $\mu\text{L}$  of RNase-free sterile water.

(Pause point: RNA can be stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for up to 4-6 months. *Better stability is obtained for high concentrated solutions (over  $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).*)

**6 - Measuring RNA concentration**

(Timing: 15 minutes for 2 samples)

**Step 28** Determine the RNA concentration by measuring the absorbance at 230, 260 and 280 nm. The RNA is pure if the ratio  $A_{280}/A_{260}$  is between 1.8 and 2.2. The content of organic impurities (such as polysaccharides and polyphenolics) is evaluated by calculating the ratio  $A_{260}/A_{230}$ .

**7 - Checking RNA quality by electrophoresis on agarose RNA gel**

(Timing: 1.5 hour)

**Step 29** Prepare a 1% agarose gel in 0.5X TBE. *Always use RNase-free glassware: carefully clean with soap, rinse with distilled water and ethanol. Let air dry on paper.* After complete dissolution of agarose by boiling, add ethidium bromide (final concentration  $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and pour the gel in an RNase-free support.

**Step 30** Prepare samples by mixing 100-200 ng RNA in 6X sample buffer (Sambrook et al., 1989). Run the gel as described (Sambrook et al., 1989). *The 6X sample buffer must be RNase-free to avoid degradation of the RNA within the gel during migration.* Figure 2A show the electrophoresis pattern of good quality RNA with and without DNase treatment.

**8 - DNase treatment**

(Timing: 2 hours)

**Step 31** Mix in a 1.5-mL tube: Turbo DNase buffer 10X: 10  $\mu\text{L}$ , RNase inhibitor: 1  $\mu\text{L}$ , RNA: 10  $\mu\text{g}$ , fill up with water to 100  $\mu\text{L}$ . Add 1.5  $\mu\text{L}$  Turbo DNase (6 U). Incubate at  $37^{\circ}\text{C}$  for 30 min. Afterwards, add 3  $\mu\text{L}$  Turbo DNase and incubate at  $37^{\circ}\text{C}$  for an additional 30 min. *Treatment efficiency is greater when a maximum of 10  $\mu\text{g}$  RNA is incubated at one time in a minimum volume of 100  $\mu\text{L}$ .*

**Step 32** Add 20  $\mu\text{L}$  TNE 10X, 80  $\mu\text{L}$  water and 200  $\mu\text{L}$  phenol:chloroforme:IAA (25:24:1). Vortex for 3 min and centrifuge at 16000g at room temperature for 10 min.

**BOX – Protocol (continued)**

**Step 33** Transfer the aqueous upper phase in to a 1.5-mL tube and add 200 $\mu$ L phenol:chloroforme:IAA (25:24:1). Centrifuge at 16000g at room temperature for 10 min.

**Step 34** Transfer the aqueous upper phase into a new 1.5-mL tube and add 200 $\mu$ L chloroforme. Centrifuge at 16000g at room temperature for 5 min.

**9 – RNA precipitation**

(Timing: 2 hours)

**Step 35** Transfer the aqueous upper phase in to a 1.5-mL tube and add 3 volumes of ethanol. Mix by inverting the tube. Incubate in liquid nitrogen for 3 min. Centrifuge at 16000g at 4°C for 30 min.

**Step 36** Discard the supernatant. Re-suspend the pellet in 50 $\mu$ L of water.

**Step 37** Repeat step 31 to step 35.

**Step 38** Carefully discard the supernatant. Add 150  $\mu$ L 70% ethanol stored at -20°C. *Carefully rinse the wall of the tube to be sure to recover all RNA.*

**Step 39** Centrifuge at 16000g at 4°C for 3 min.

**Step 40** Carefully discard the supernatant and let the pellet air dry at room temperature for 15-20 min.

**Step 41** Dissolve the pellet in 20  $\mu$ L of RNase-free water. Measure RNA concentration as in section 6.

(Pause point: RNA can be stored at -20°C for up to 6-10 months.)

**Plastid gene expression during seed formation: Opposing expression of genes encoding the plastid transcriptional machinery and genes transcribed by this machinery**

Guillaume Alloreant, Florence Courtois and Silva Lerbs-Mache<sup>1</sup>

Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, UMR 5168, CNRS/UJF/INRA/CEA, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex, France

Running title: Plastid gene expression in seeds

<sup>1</sup>Corresponding author

e-mail: [silva.lerbs-mache@ujf-grenoble.fr](mailto:silva.lerbs-mache@ujf-grenoble.fr)

estimated length of the manuscript: 10 pages

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instruction for Authors ([www.plantcell.org](http://www.plantcell.org).) is: Silva Lerbs-Mache ([silva.lerbs-mache@ujf-grenoble.fr](mailto:silva.lerbs-mache@ujf-grenoble.fr))

**ABSTRACT**

Arabidopsis seed formation is coupled with two plastid differentiation processes: chloroplast formation followed by de-differentiation and degeneration. How these processes influence plastid gene expression is unknown. We report changes in the mRNA and protein levels of components of the plastid transcriptional machinery as well as changes in plastid transcriptome profiles and protein levels of some plastid-encoded proteins. Changes have been monitored over the three periods of seed formation, i. e. embryogenesis, maturation and desiccation. Most of the plastid-encoded mRNAs decrease during desiccation, except mRNAs encoding subunits of the plastid-encoded RNA polymerase PEP that are present in rather equal amounts during seed formation. Nucleus-encoded mRNAs of components of the plastid transcriptional machinery, i. e. sigma factors and the phage-type plastid RNA polymerases RPO<sub>Tp</sub>, RPO<sub>Tmp</sub>, increase significantly during desiccation. In contrast to the mRNA levels, the corresponding proteins diminish considerable in abundance during desiccation indicating strong regulation on the post-transcriptional level. We suggest that the accumulation and storage of RPO<sub>Tp</sub>, RPO<sub>Tmp</sub> and sigma factor encoding mRNAs in dry seeds serve immediate translation on cytoplasmic ribosomes during seed stratification/imbibition to enhance NEP protein levels and to provide regulatory proteins for stored PEP to guaranty efficient transcription during germination.

## INTRODUCTION

Seed formation of higher plants begins with a double fertilization process and ends with the establishment of a mature dry seed by passing through three well-defined developmental stages, i. e. embryogenesis, maturation and desiccation (for schematic presentations see Debeaujon et al., 2007 and Le et al., 2010). In *Arabidopsis*, this process occurs over a period of 18 to 21 days, depending on growth conditions. The different developmental periods during seed formation are assigned as days after fertilization (DAF).

Embryos develop in a hypoxic environment because seed internal oxygen concentration is low due to limited diffusional gas exchange through the seed coat. Seeds of many plants, especially oilseed crops, become green at the beginning of maturation and embryonic photosynthesis controls biosynthetic fluxes by providing oxygen and ATP that are used for respiration and biosynthesis (rev. in Weber et al., 2005). Maximum levels of embryonic photosynthesis coincide with lipid/oil biosynthesis (Ruuska et al., 2002). It is known that growth at sub-optimal oxygen concentration leads to inhibition of seed formation and results in loss of seed production at concentrations around 5% of atmospheric oxygen (Geigenberger, 2003). Thus, via oxygen production, photoheterotrophic plastids contribute to seed filling and seed quality. However, not only photosynthetically active chloroplasts play an important role during seed formation. Plastids differentiate into functionally distinct forms depending on the cellular and developmental context of the plant and numerous mutations affecting plastid-related genes are embryo-lethal attributing even more importance for proper seed development to non-photosynthetic plastids. These mutations concern mainly metabolic activities and gene expression (Hsu et al., 2010 and Bryant et al., 2010).

During embryogenesis, plastids remain undifferentiated up to the late globular stage. In the torpedo stage, many plastids contain already a well-developed granal system and greening starts (Mansfield and Briarty, 1991a). At the end of the maturation phase, chloroplasts degenerate into reduced non-photosynthetic plastids, called eoplasts. The late maturation/early desiccation phase of seed development is further characterized by a reduction of plastid number that should be due to their destruction (Mansfield and Briarty, 1991b). These results suggest that plastids should not be important in dry seeds and during germination. However, such a conclusion contradicts several results showing that plastid gene expression is important for efficient germination. For instance, a large-scale screening for seedling-lethal nuclear insertion mutants revealed that most of them are affected in chloroplast function (Budziszewski et al., 2001). Treatment of germinating seeds with

Tagetin, an inhibitor of one of the plastid transcription complexes, retards radicle protrusion indicating the importance of plastid gene expression for seed germination (Demarsy et al., 2006). Considering these results together with the finding that plastids are destroyed at the end of seed formation the question of whether plastids and plastid transcription are really important in seeds becomes pertinent.

Large-scale transcription profiling during *Arabidopsis* and barley seed development show that the expression of photosynthesis-related genes is temporally regulated during embryogenesis and seed development (Ruuska et al., 2002; Hennig et al., 2004; Sreenivasulu et al., 2004; Spencer et al., 2007). However, these analyses are focussed on nucleus-encoded genes that encode plastid-localized proteins. No systematic gene expression analysis has so far been done concerning the plastid genome. Transcription of the higher plant plastid genome is performed by two principally different transcription systems that originate from a cyanobacteria- and proteobacteria-like endosymbiote. The cyanobacteria-like ancestor of chloroplasts has contributed with a eubacteria-type RNA polymerase (PEP) and the proteobacteria-like ancestor of mitochondria with a phage-type RNA polymerase (NEP) to the plastid transcriptional apparatus of higher plants (Shiina et al., 2005; Filée and Forterre, 2006). NEP enzymes (RPOTp and RPOTmp) are mainly active in the expression of housekeeping genes, i. e. they play an important role in the building-up of the plastid transcriptional and translational apparatus during stratification, germination and early seedling outgrowth (Courtois et al., 2007; Demarsy et al., submitted). *RPOTmp/RPOTp* double mutants are growth arrested early after germination thus confirming the importance of basic plastid function during seed formation or early plant development (Hricova et al., 2006).

PEP plays a predominant role in the expression of photosynthesis related genes in leaves. However, PEP is already present and active in seeds (Demarsy et al., 2006). The PEP core enzyme is composed of four different subunits,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  and  $\beta''$ , which are encoded on the plastid genome. The activity/specificity of the PEP core enzyme is regulated by sigma-like transcription factors (SLFs) that are nucleus-encoded. Six different sigma factors, SIG1 to SIG6, have been described for *Arabidopsis thaliana* and some of them (SIG2, SIG3 and SIG5) might play a role in embryonic photosynthesis and very early plant development. SIG2-PEP holoenzyme transcribes specifically the tRNA-Glu gene (Kanamaru et al., 2001) and the *psaJ* gene (Nagashima et al., 2004), e. g. it might be implicated in plastid-nucleus feedback regulation via intermediates of chlorophyll biosynthesis and in the construction of photosystem I. SIG3 is already present in dry seeds (Privat et al., 2003; Demarsy et al., 2006) suggesting a specific function during seed maturation or during germination. SIG5 might have

specific functions during embryogenesis since a knock-out mutant has been described as embryo-lethal (Yao et al., 2003) and SIG6 seems to play a more general role in early plant development (Ishizaki et al., 2005; Loschelder et al., 2006).

To better understand the role of plastids and in particular plastid gene expression, during seed formation and for efficient germination, in the present article we have analysed changes in plastid mRNA and protein steady state levels and specifically changes in the mRNA and protein levels of nucleus encoded components of the plastid transcriptional machinery over all three periods of seed formation.

## RESULTS

### **Plastid mRNA profiles change from embryogenesis to maturation and from maturation to post-maturation/desiccation**

Growing seeds from 1 day up to 16 days after fertilization are represented in Figure 1. Compared to the schematic representation of changes in internal seed structure during seed formation (Le et al., 2010), the development is somewhat accelerated under our growth conditions. Chlorophyll degradation, i. e. post-maturation, starts already at DAF13. As it is technically not feasible to analyse the RNA profiles for each DAF separately, we decided to combine DAF2 to 4 (embryogenesis), DAF6 to 11 (photosynthesis /maturation) and DAF13 to 15 (post-maturation/desiccation) for our investigations.

Total RNA prepared from these three stages has been analysed by macroarray hybridisation using a plastid specific macroarray that allows analysing all plastid mRNAs. The spotting pattern is demonstrated in supplemental Figure 1. The images of one experiment are shown in Figure 2 and the schematic presentation of expression profiles corresponding to different functional gene groups (right hand side, lower part) is made by using the mean values of mRNA levels obtained from two other independent experiments. Mean values and standard deviations for each individual mRNA are reported in supplemental Table I.

Figure 2 shows that, except for transcription (TK), the proportion of plastid mRNAs in the total RNA preparation is highest during the maturation phase. For the ATPsynthase (ATP), others, Photosystem I (PSI), Photosystem II (PSII) functional groups, mRNA levels are lower at DAF13/15 than at DAF2/4. For the functional groups of electron transport (B6f), respiration (NdH), transcription (TK) and translation (TL) groups, mRNA levels are slightly

higher at DAF13/15 than at DAF 2/4 or rather equal in both stages. We note also that not all mRNAs, even within the same functional group, accumulate to equal levels. The most abundant mRNAs at DAF6/11 are coding for PSAJ, PSBE, PSBF, PSBL, PSBJ and PSBA proteins (boxed in Figure 2). These mRNAs represent already abundant mRNAs in the DAF2/4 profile. Especially to notice is the extremely high amount of *psbA* mRNA (labelled by an arrow in the DAF13/15 array) in the post-maturation period. While all other photosynthesis-related mRNAs are strongly reduced when compared to the DAF6/11 profile, the *psbA* mRNA level remains constant. For this reason, the *psbA* values have been omitted when mean values for functional groups were determined.

The comparison of the embryogenesis and post-maturation period shows changes in RNA levels for most of the genes, thus revealing that considerable differences exist in plastid gene expression patterns of the not yet and no more non-photosynthetic plastids corresponding to the two different developmental stages. The global analysis of mRNA levels of the various functional groups shows that the strongest quantitative changes in mRNA levels concern photosynthesis-related genes. Quantitative changes of mRNAs coding for housekeeping functions like transcription and translation are less pronounced.

#### **Most of the plastid mRNAs decrease, but the *rbcL* mRNA diminishes most strongly between DAF6/11 and DAF13/15**

The *rbcL* mRNA is no more detectable at DAF13/15 when analysed by macroarray hybridization. In contrast, the *clpP* mRNA, which is present at a lower level than *rbcL* at DAF6/11, is still visible at DAF13/15 (see Fig. 2, bordered by black circles). In order to verify this result we re-analysed the RNAs by primer extension (Fig. 3A). We have also analysed the *psbE* mRNA for comparison and the ribosomal precursor RNAs that are not present on the array. After quantification of the signal intensities of the precursor transcripts using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), the DAF2/4 and DAF13/15 values have been expressed as percentage of the DAF6/11 values that have been set to 100% (Fig. 3B).

At stage DAF13/15 RNA levels of *clpP*, *psbE* and rRNA correspond to 9, 3 and 2% of the DAF6/11 levels, respectively (Fig. 3B, lanes 7', 10' and 13'). For *clpP* and *psbE* mRNAs, we revealed only one type of transcripts, initiated at positions -53 and -127 from the ATG codon, respectively (Hajdukiewicz et al., 1997; Demarsy et al., submitted). For *rbcL* mRNA the -182 primary transcript and the -59 processing product (Mullet et al., 1985; Fig. 3A, lanes 2 and 3), are present. When both these RNAs were taken together, we found only 0,1% of

*rbcL* mRNA at DAF13/15 (Fig. 3B, lane 4'). This explains why *rbcL* mRNA is rather not detectable by array analysis and confirms that the *rbcL* mRNA level is indeed one of the most down-regulated RNA during the post-maturation period.

Concerning the ribosomal precursor RNAs, RPOTmp specific PC initiated transcripts (Courtois et al., 2007) are of very low abundance that does not change remarkably during seed formation. On the contrary, PEP initiated P2 transcripts diminish to 2% of DAF6/11 transcript during post-maturation/desiccation (Fig. 3A and B, lanes 12 and 13).

### **Most of the mRNAs encoding the plastid transcriptional machinery augment during the post-maturation period**

After having shown that most of the plastid-encoded mRNAs diminish strongly during post-maturation, we wanted to know what happens to the mRNAs encoding components of the plastid transcriptional apparatus, i. e. mRNAs encoding the proteins that are engaged in the production of the plastid RNAs. This analysis was done by semi-quantitative RT-PCR (Fig. 4A and B). Results show that mRNAs encoding PEP subunits do not change or augment slightly from DAF6/11 to DAF13/15 while NEP (RPOTmp and RPOTp) encoding mRNAs increase strongly during post-maturation. Between DAF13/15 and dry seeds (0), mRNA levels are equal (Fig. 4A).

The analysis of mRNAs encoding sigma-like transcription factors, necessary for PEP activity and specificity, shows more variations (Fig. 4B). SIG1, SIG2 and SIG3 encoding mRNAs augment gradually up to DAF13/15 and do not change any more afterwards. The SIG4 mRNA increases during post-maturation and desiccation up to dry seeds. The SIG5 and SIG6 mRNA levels augment up to DAF13/15 and continue to increase (SIG6) or diminish again during the last phase of desiccation (SIG5).

If we compare these results with the expression patterns of the majority of the plastid transcripts (Figs. 2 and 3) and with the expression of some selected plastid transcripts (Fig. 4D) it becomes evident that mRNAs encoding the plastid transcriptional machinery (PEP and NEP) are equal or augment between DAF6/11 and DAF13/15 when mRNAs made by this transcriptional machinery diminish. For additional comparison, we have also analysed some other nucleus-encoded mRNAs that code for plastid localized proteins, like *RbcS*, *HemA* and *LhcA1* (Fig. 4C). These RNAs behave like most of the plastid encoded mRNAs i. e. they diminish strongly between the maturation and the post-maturation phases. Altogether, we can conclude from these experiments that mRNAs encoding the plastid transcriptional machinery

augment specifically during post-maturation/desiccation and are stored afterwards in dry seeds.

### **Protein components of the plastid transcriptional machinery do not augment after maturation**

Having shown that mRNAs coding components of the plastid transcriptional apparatus augment during desiccation to be stored in dry seeds, we next analysed the corresponding proteins by immunodetection (Fig. 5B and C). The protein expression patterns are completely different from the mRNA expression patterns. RNA polymerase polypeptides as well as transcription factors are present at highest amounts at DAF2/4. Their quantity decreases already at DAF6/11 and during post-maturation /desiccation and in dry seeds the proteins are no more detectable with our antibodies. This result strongly suggests that the mRNAs that accumulate at DAF13/15 and in dry seeds are not translated. In comparison to the components of the transcriptional machinery, the amount of other plastid proteins decreases less and more slowly (Fig. 5D). RBCL, PSBB, ATPH and RPL2 are still detectable in dry seeds. The expression patterns of these proteins correspond well to the expression patterns of the corresponding mRNAs (compare with Fig. 4D).

One problem that might interfere with our interpretations of the Western results is related to the general polypeptide pattern of the analysed total protein fractions (Fig. 5A). The observed diminution of all analysed plastid proteins at DAF13/15 and in dry seeds might be due to the accumulation of high amounts of storage proteins, visible in the low molecular weight region in the electrophoresis pattern. Therefore, the amount of other plastid proteins might be artificially diminished if the same quantity of total proteins of the different extracts is analysed. To overcome this problem, we have re-analysed two of the proteins by loading total proteins corresponding to seeds present in three siliques (Fig. 6). In this way, we are loading 13 to 25 fold higher protein amounts of DAF13/15 and dry seeds proteins compared to DAF2/4 proteins (Fig. 6A) on the acrylamide gel and the general protein pattern shows that high molecular weight proteins are not diluted in the DAF13/15 and dry seed protein extracts when compared to the DAF2/4 extract (Fig. 6C). Under this condition, protein levels peak at DAF6/11 instead of DAF2/4 (compare Fig. 5C and D with Fig. 6B), but the strong decrease of proteins observed during the post-maturation phase persists.

In summary, these results indicate that during seed formation the expression of most of the plastid-encoded genes is regulated via the mRNA level while the expression of components of the plastid transcriptional apparatus is regulated at the translational level.

## DISCUSSION

In the present article, we have analysed the expression of the plastid genome and the expression of components of the plastid transcriptional machinery during seed formation. This work was initiated to investigate on two different problems. 1. Seed development proceeds via three well-defined phases, i. e. embryogenesis, maturation and desiccation. Arabidopsis seeds develop photosynthetically active chloroplasts and become green during the maturation phase. At the end of the maturation phase, these chloroplasts dedifferentiate into reduced non-photosynthetic plastids. These processes occur over a period of about 18 days. Thus, seed formation represents an interesting experimental system to investigate on changes in plastid gene expression connected to chloroplasts differentiation and dedifferentiation. 2. RNAs coding for plastid transcriptional components as well as proteins of the three plastid core RNA polymerases are already present in dry seeds (Demarsy et al., 2006) raising the question of whether these components represent just remnants of gene expression that occurred during embryonic photosynthesis or whether they might have (a) function(s) during germination. To investigate on these problems we have analysed the expression of the plastid transcriptional machinery during seed formation on the RNA and on the protein level.

Results reveal differences in plastid transcriptome patterns if all three analysed stages of seed formation are compared (Fig. 2). Photosynthesis related genes represent already the most expressed genes during embryogenesis (Fig. 2, DAF2/4) suggesting that the developmental programme leading to embryonic photosynthesis is already turned on during embryogenesis. Highest mRNA levels are found during maturation when chloroplasts are photosynthetically active (Fig. 2, DAF6/11). The quantitative differences between mRNAs of photosynthesis related genes belonging to the PSI, PSII, ATPsynthase (ATP) and cytochromeB6f (B6f) groups and housekeeping genes belonging to the translation (TL) and transcription (TK) groups is more than doubled. During desiccation, all mRNAs decrease strongly, except *psbA*, and the quantitative difference between mRNAs of photosynthesis related genes and housekeeping genes is lowest (Fig. 2, DAF13/15). Altogether, from these

results we can conclude that the observed changes in transcriptome patterns rely mainly on quantitative changes in photosynthesis related mRNAs.

The mechanism leading to the high *psbA* mRNA level during the desiccation period (Fig. 2) is not clear. It is technically not feasible to prepare plastids from developing Arabidopsis seeds and to perform run-on transcription experiment. Therefore, we cannot distinguish whether *de novo* synthesis still occurs during the desiccation period or whether *psbA* mRNA is just preserved from a general degradation mechanisms. Concerning the mechanism of RNA degradation, the protection of the *psbA* mRNA cannot be related to RNA double-strand formation that has recently been demonstrated for *psbT* sense/anti-sense RNA hybrids (Zghidi-Abouzid et al., 2011). Firstly, the *psbA* anti-sense RNA level is very low, i. e. only a very low amount of *psbA* mRNA could be protected. Secondly, the stored *psbA* mRNA is degraded during germination, i. e. it needs to be free for degradation. This can be concluded from our recent analyses of changes in plastid transcriptome patterns during germination. We have found that *psbA* behaves differently from other plastid mRNAs. While most of the plastid mRNAs augment during germination, the *psbA* mRNA level diminishes strongly and augments again only after germination is accomplished (Demarsy et al., submitted). Therefore, we suggest that this mRNA constitutes a reserve of nucleotides used during germination.

*De novo* synthesis during desiccation seems still to occur for nucleus-encoded mRNAs. This can be concluded from the increasing levels of *RPOTmp* and *RPOTp* mRNAs, as well as from the mRNAs encoding different sigma factors (Fig. 4A and B). However, for both types of mRNAs, nucleus-encoded and plastid-encoded, degradation/preservation/or synthesis is mRNA-specific. For example, photosynthesis related nucleus-encoded mRNAs are strongly down regulated during desiccation (Fig. 4C) while mRNAs coding for plastid transcriptional components are up regulated (Fig. 4A and B). The same holds true for plastid-encoded mRNAs. While PEP subunits encoding mRNAs, PC-initiated ribosomal precursor RNAs and *psbA* mRNA remain stable, mRNAs encoding photosynthesis related proteins and P2-initiated ribosomal precursor RNA are down regulated (Figs. 4A, D and Figs. 2 and 3).

The analysis of the protein levels of some components of the plastid transcriptional apparatus and of some plastid-encoded proteins shows that protein levels are not always related to mRNA levels (Figs. 5 and 6). The amount of all analysed proteins is highest during embryogenesis and maturation and declines strongly during desiccation. This decline is not an artefact due to dilution because of high storage protein accumulation (Fig. 6). In the case of photosynthesis related genes, this kinetic of protein accumulation coincides with that of the

corresponding mRNA. In contrast, for components of the transcriptional apparatus mRNA expression and protein levels behave oppositely. Protein levels are also highest during embryogenesis and maturation of seeds (Figs. 5 and 6), but mRNA levels of nucleus-encoded components are highest during desiccation and in dry seeds (Fig. 4) when protein levels have decreased to rather undetectable amounts (Fig. 5).

The different kinetics of mRNA and protein accumulation during seed formation suggests considering plastid proteins that are present in dry seeds as remnants of the intermediary metabolically active photosynthetic period. On the contrary, mRNAs coding for the plastid transcriptional apparatus specifically increase during desiccation and are stored in equally high amounts in dry seeds. From these results one would expect that stored mRNAs are specifically important for seed germination, perhaps more important than the small amounts of desiccation surviving proteins. On the other hand, considerable differences in the activity of plastid RNA polymerases have been observed to occur during chloroplast differentiation in maize leaves (Cahoon et al., 2004). Thus, a small amount of RNA polymerase might have a high enzymatic activity and the question arises of whether remnants of plastid RNA polymerase in seeds are transcriptionally active. Recent analyses of our group have shown that plastid RNA synthesis starts already during stratification and seems to precede the onset of translation (Courtois et al., 2007 and Demarsy et al., submitted). These results point to an importance of stored RNA polymerase for the onset of transcription during germination.

Concerning stored mRNAs, we need to consider nucleus-encoded and plastid-encoded mRNAs separately. It is known that dry seeds contain a large amount of stored, translatable mRNA (Dure and Waters, 1965). Experiments using inhibitors of nuclear transcription ( $\alpha$ -amanitin) and cytoplasmic translation (cycloheximide) have shown that germination still occurs in the presence of  $\alpha$ -amanitin, but it is abolished in the presence of cycloheximide suggesting importance of long-lived mRNA to assure immediate translation and production of proteins during germination (Rajjou et al., 2004). Regarding the plastidial transcription system, it is likely to assume that the corresponding stored nucleus-encoded mRNAs are important for efficient germination. However, it is difficult to prove that stored nucleus-encoded mRNAs serve immediate translation. In the case of RPOTp both, mRNA and protein levels, increase during stratification. RPOTmp and SIG3 proteins increase during germination (stage 1), while the corresponding mRNA levels increase already during stratification (Privat et al., 2003; Demarsy et al., 2006). In all these cases, we cannot distinguish whether the proteins result from translation of preformed mRNAs, from newly synthesized mRNAs or

from both. Most likely, mRNA *de novo* synthesis augments the level of translatable mRNA to assure efficient and rapid production of RNA polymerases during the germination and post-germination period.

If we consider now the plastid-encoded RNAs, we observe that the amount of many mRNAs, except those coding PEP subunits, decrease during desiccation. A part is nevertheless stored in dry seeds. During germination, rRNA and mRNAs coding for proteins of housekeeping functions, e. g. PEP subunits and ribosomal proteins, are already produced during stratification when a clear raise of the corresponding proteins is not yet observed. Proteins of housekeeping as well as photosynthesis related functions increase only from stages 1 and 2 (Demarsy et al., submitted), i. e. transcription starts before translation and the question of the role of stored mRNAs is less pertinent. During the stratification period, PEP is rather exclusively occupied by the synthesis of the rRNA operon at the P2 promoter while NEPs transcribe many genes. RPOTp transcribes genes encoding PEP subunits and many ribosomal proteins while RPOTmp transcribes the *rrn* operon at the PC promoter (Courtois et al., 2007 and Demarsy et al., submitted) as well as some mitochondrial genes (Kühn et al., 2009). Thus, stored PEP might be sufficient to transcribe mainly one operon, but stored NEPs might not be sufficient to assure efficient transcription during germination.

Altogether, transcription and translation in the nuclear/cytoplasmic compartment and in the plastid compartment are of different importance at the beginning of a new plant life cycle. While cytoplasmic translation is vital for germination, in plastids neither transcription nor translation is vital for germination to occur. Faithfull transcription and translation enhance the germination process and play an important role in the post-germination seedling development. The regain of metabolic activity in plastids starts with transcription and translation follows later. In this scenario, we propose that the remarkable enhancement of RpoTp and RpoTmp mRNA levels during desiccation and in dry seeds serves to provide ready to use translationally competent mRNA for cytoplasmic ribosomes in order to produce NEP and to augment NEP protein levels already during stratification. The same should hold true for sigma factors. PEP activity is regulated by sigma factor supply and rapid *de novo* synthesis of sigma factor(s) from stored mRNAs might be necessary to activate stored PEP core RNA polymerase for rRNA transcription during stratification and germination.

## METHODS

### Plant material

Arabidopsis plants have been grown on soil/vermiculite (4/1) in 16h light/8h dark cycle at 80  $\mu$ E and 23°C. Individual flowers have been labelled at opening (DAF0) by knotting with differently coloured threads where each colour corresponds to a given day of opening. Siliques of the desired stages were harvested and developing seeds were obtained from peeled siliques as described (Allorent et al., 2010). After harvesting the developing seeds were frozen in liquid N<sub>2</sub> and stored at -80°C. Mature, dry seeds were stored at 16°C.

### RNA isolation and semi-quantitative RT-PCR

The protocol of RNA isolation was adapted from Suzuki et al. (2004) by introducing several modifications. Absence of plastidial DNA contamination was regularly checked by PCR. The procedure is described in all details by Allorent et al. (2010).

Synthesis of cDNAs was performed in 55  $\mu$ l reaction volumes using 1  $\mu$ g of total RNA, 0,5 mM dATP, dGTP, dCTP and dTTP, 1  $\mu$ g of random primers (Invitrogen), 3,7 U of RNase inhibitor (Euromedex) and 200 U of reverse transcriptase (Superscript II, Invitrogen) at 42°C for 50 min. The reactions were stopped by heating at 70°C for 10 min. and the solutions were kept frozen at -20°C until further usage. PCR reactions are made by using aliquots of these cDNA solutions corresponding to the same amount of 18S rRNA (see above).

RNA quantities of different samples were adjusted to equal amounts by using the Quantum<sup>TM</sup>RNA Universal 18S kit (Ambion). PCR reactions were performed as follows: denaturation for 5 min. at 95°C, amplification (30 sec. at 95°, 30 sec. 55°C, 45 sec. 72°C) and termination at 72°C for 5 min. The number of amplification cycles was determined for each of the RNA samples in pre-assays in order to assure that the reaction is still in the exponential phase. PCR products are finally analysed by electrophoresis in 2% Agarose gels and stained with ethidium bromide.

### RNA analysis by primer extension

Primer extension experiments have been performed using 2  $\mu$ g (16S rRNA) or 10  $\mu$ g (all other mRNAs) of total RNA. Primers have been 5'-labelled using  $\gamma$ [<sup>32</sup>P]dATP (10  $\mu$ C/ $\mu$ l; 3000 Ci/mmol, Perkin Elmer, France) and T4 polynucleotide kinase (Invitrogen) according to the supplies' protocol. The reaction is stopped by denaturation of the enzyme at 65°C for 10

min. and the labelled oligonucleotide is separated from unincorporated dATP by gel filtration through Sephadex G50 (GE Healthcare). The labelled primer is annealed with the corresponding RNA after previous denaturation at 65°C for 10 min. by incubating at 1°C below the  $T_M$  of the primer for 20 min. Retro-transcription was performed using 100 U of Superscript II (Invitrogen) at 42°C for 50 min. The reaction was stopped by heating at 70°C for 15 min. and remaining RNA was digested by treatment with RNaseA (Fermentas). Before cDNAs were purified by phenol/chloroform treatment and ethanol precipitation, a  $^{32}\text{P}$ -labelled PCR product was added to the reaction as loading control. The cDNAs were separated on a 6 % polyacrylamide denaturing gel together with a molecular size standard (1 kb ladder, Invitrogen).

The following primers have been used for primer extension: 5'-CCCAACACTTGCTTTAG -3' (*rbcL*), 5'-GATGTATCTCCTTCTCC-3' (*clpP*), 5'-GACCCAGTATCGAATAC-3' (*psbE*), 5'- TTCATAGTTGCATTACT-3' (16S rRNA).

### Array hybridization

*CDNA synthesis.* cDNAs have been synthesized as previously described (Zghidi et al., 2007). 4µg of each RNA preparation have been labelled for macroarray hybridisation. RNA was reverse transcribed using a primer mix that contains specific primers corresponding to the 80 protein coding genes and their anti-sense RNAs that can be analysed on the macroarray (Uniplastomic). The reaction was performed in the presence of 100 µCi of  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$  dATP (Perkin Elmer, France) using Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Samples were treated with RNase H (Fermentas, France) at 37°C for 15 min and non-incorporated deoxyribonucleotides were removed by passage through Sephadex G50. An aliquot of each of the synthesized cDNAs was analysed on a 6% denaturing polyacrylamide gel in order to verify the quality of the synthesized cDNA.

*Array hybridization.* Prehybridisation (1h at 65°C) and hybridisation (3 days at 65°C) were performed in 0.5 M  $\text{NaHPO}_4$ , pH 7.2; 1 mM EDTA; 7% SDS and 1% BSA. After hybridisation, macroarrays were washed in 40 mM  $\text{NaHPO}_4$ , pH 7.2, 1mM EDTA and 7% SDS at room temperature for 10 min followed by 65°C washing for 5 min. After one to two weeks of exposure to Fujifilm Imaging Plates, the plates were analysed using a Phosphoimager (Fujifilm FLA-8000) and the accompanying software (ArrayGauge).

### Protein analyses

Total protein was extracted from developing seeds in eppendorf tubes by 3 cycles of freezing in liquid nitrogen and grounding during thawing after addition of 100  $\mu$ l of extraction buffer (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 2,5% (w/v) SDS, 2% (w/v) DTT, 10% (v/v) Glycerol). After centrifugation at 16000xg for 15 min. the supernatant was recovered and the pellet was again grounded with 50  $\mu$ l extraction buffer. After centrifugation of the second extraction the supernatants were combined and cleaned by re-centrifugation at 16000 xg for 25 min. Proteins were precipitated from the final supernatant by adding 5 volumes of acetone.

Protein concentrations have been determined using the protocol of Esen (1978) and equal quantities of protein have been used for immunoblot analyses of specific proteins. Gel blot analyses of proteins was performed after separation on 7% denaturing polyacrylamide gels (Laemmli, 1970) for proteins over 30 kDa or after separation on 14% polyacrylamide gels (Schägger, 2006) for small ribosomal proteins. After transfer onto Nitrocellulose (0,2 m, BioRad), proteins were revealed after immunodecoration using the ECL detection kit (GE Healthcare). Antibodies were obtained from Agrisera (anti-RBCL, anti-PSBB, anti-ATPB and anti-ATPH) and from Uniplastomic (anti-ACCD, anti-RPS7, anti-RPL2 and anti-RPOB). Most of our own antibodies (anti-SIG2, anti-RPOTmp, anti-RPOTP) have been purified on the corresponding peptides before usage.

### **Acknowledgements**

Financial support was obtained from the French agency of research (GENOPLANTE project ANR-07-GPLA-013-001), the Centre National de la Recherche Scientifique and the French Ministry of Education.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Developmental stages of Arabidopsis seeds (ecotype Columbia).

DAF = days after fertilization, stage 0 = dry seeds

**Figure 2.** Changes in plastid transcriptome profiles of DAF2/4, DAF6/11 and DAF13/15 seeds.

Autoradiographs and schematic presentation of mRNA expression profiles of different functional groups. To obtain relative expression values for each functional group, the sum of all mRNA values has been divided by the number of mRNAs representing the group. Mean values and standard deviations are reported in Supplemental Table I. The spotting schema of the macroarray is indicated in Supplemental Figure 1.

ATP = ATP synthase, PSI = photosystem I, PSII = photosystem II, B6f = cytochromeB6f, TK = transcription, TL = translation

**Figure 3.** Confirmation of changes in transcript abundance for some selected mRNAs.

**(A)** Primer extension. 10µg (lanes 2-9) or 2 µg (lanes 10-12) of total RNA have been used for primer extension analysis using *rbcl* (lanes 2-4), *clpP* (lanes 4-6) *psbE* (lanes 7-9) and 16S rRNA (lanes 10-12) specific primers. RNA was isolated from DAF2/4 (lanes 2, 4, 7 and 10), DAF6/11 (lanes 3, 5, 8 and 11) and DAF13/15 (lanes 4, 6, 9 and 12) seeds, and the synthesized cDNAs were analysed by separation on 6% denaturing polyacrylamide gels. Lane 1 = molecular size standards in bp, Lo = loading control. cDNAs are marked by arrows. The number of bases indicates the distance of the 5'-end of the corresponding mRNA's from the ATG translation codon. **(B)** Quantification. The bands corresponding to the radiolabelled cDNAs, marked by arrows in (A), have been quantified using ImageJ software. Quantities of cDNAs in stages 2/4 (lanes 2', 5', 8' and 11') and 13/15 (lanes 4', 7', 10' and 13') have been calculated as percentage of stage 6/11 values that have been taken as 100% (lanes 3', 6', 9' and 12').

**Figure 4.** Changes in transcript abundance of selected plastid-encoded mRNAs and nucleus-encoded mRNAs coding for plastid-localized proteins.

Total RNAs have been purified from stage 2/4 (lane 1), stage 6/11 (lane 2), stage 13/15 (lane 3) and dry seeds (lane 4) and analysed by RT-PCR using 18S RNA as internal standard. **(A)** Abundance of mRNAs encoding components of the three different plastid RNA polymerases.

**(B)** Analysis of mRNAs encoding sigma-like transcription factors of PEP. **(C)** Abundance of nucleus-encoded mRNAs corresponding to plastid-localized photosynthesis-related proteins. **(D)** Analysis of plastid-encoded mRNAs that are transcribed preferentially by PEP (*rbcL* and *psbB*) or by NEP (*accD* and *clpP*). PCR products were run on 2% Agarose gels and revealed by ethidium bromide staining.

**Figure 5.** Changes in protein levels for components of the plastid transcriptional machinery and some other plastid proteins.

30 µg each of total proteins of stage 2/4 (lane 1), 6/11 (lane 2), 13/15 (lane 3) and dry seeds (0, lane 4) were analysed after separation on 7% denaturing polyacrylamide gels and transfer to Nitrocellulose membranes. **(A)** Staining with Coomassie Brilliant Blue. **(B) – (D)** Antibody reactions. Protein profiles are revealed by antibody decoration to reveal sigma-like transcription factors (B), subunits of plastid RNA polymerase (C) and some other plastid proteins (D).

**Figure 6.** Changes in plastid protein levels after normalisation of protein quantities corresponding to equal number of siliques.

**(A)** Determination of the quantity of protein per silique. Proteins obtained from three times 10 siliques have been determined. Values corresponding to 1 silique have been normalized by taking stage 6/11 as reference. **(B)** Analysis of ACCD and RPOTmp protein levels by immunodecoration in total protein extracts prepared from stages 2/4, 6/11, 13/15 and in dry seeds (0) by using protein quantities corresponding to 3 siliques each. **(C)** Verification that high molecular weight proteins are not underrepresented in stage 13/15 and dry seeds. Protein quantities of stage 2/4 (lane 1), stage 6/11 (lane 2), stage 13/15 (lane 3) and dry seeds (0, lane 4) corresponding to 10 siliques each have been separated on denaturing polyacrylamide gels and stained by Coomassie Brilliant Blue.

## REFERENCES

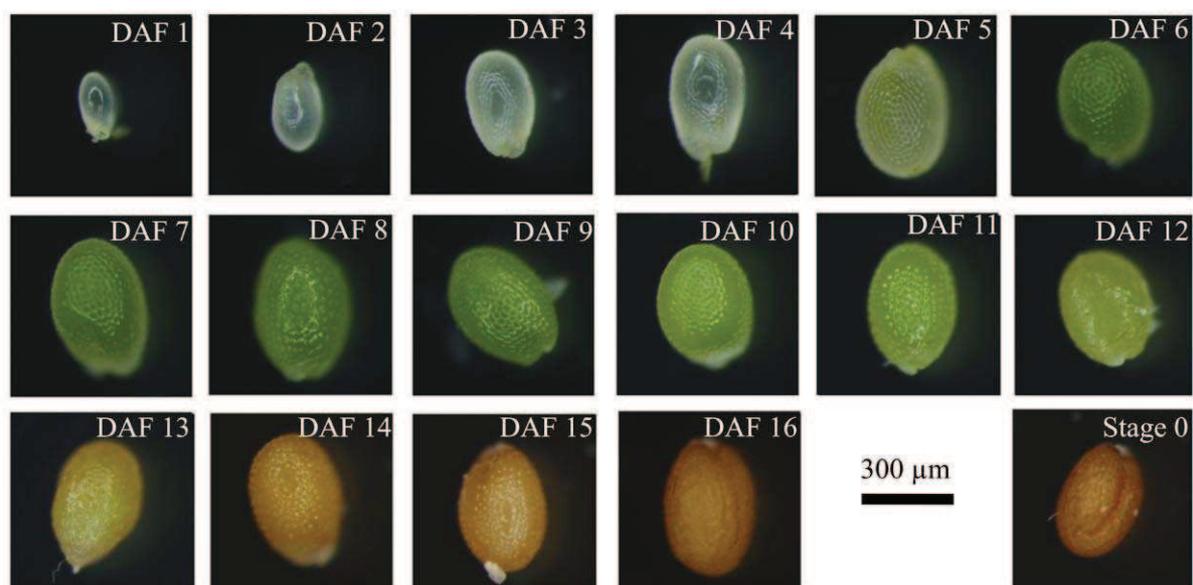
- Allorent, G., Lambert, E., Lerbs-Mache, S. and Courtois, F.** (2010) RNA isolation from developing *Arabidopsis thaliana* seeds suitable for gene expression analyses. *J. Endocytobiosis & Cell Res.* **20**: 36-33.
- Bryant, N., Lloyd, J., Sweeney, C., Myouga, F. and Meinke, D.** (2011) Identification of nuclear genes encoding chloroplast-localized proteins required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **155**: 1678-1689.
- Budziszewski, G.J., Lewis, S.P., Glover, L.W., Reineke, J., Jones, G., Schlate Ziemnik, L., Lonowski, J., Nyfeler, B., Aux, G., Zhou, Q., McElver, J., Patton, D.A., Martienssen, R., Grossniklaus, U., Ma, H., Law, M. and Levin, J.Z.** (2001) *Arabidopsis* genes essential for seedling viability: Isolation of insertional mutants and molecular cloning. *Genetics*, **159**: 1765-1778.
- Cahoon, A.B., Harris, F.M. and Stern, D.B.** (2004) Analysis of developing maize plastids reveal two mRNA stability classes correlating with RNA polymerase type. *EMBO reports*, **5**: 801- 806.
- Courtois, F., Merendino, L., Demarsy, E., Mache, R. and Lerbs-Mache, S.** (2007) Phage-type RNA polymerase RpoTmp transcribes the *rrn* operon from the PC promoter at early developmental stages in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **145**: 712-721.
- Demarsy, E., Courtois, F., Azevedo, J., Buhot, L. and Lerbs-Mache, S.** (2006) Building-up of the plastid transcriptional machinery during germination and early plant development. *Plant Physiol.* **142**: 993-1003.
- Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K.M. and Koornneef, M.** (2000) Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **122**: 403-413.
- Debeaujon, I., Lepiniec, L., Pourcel, L. and Routaboul, J.-M.** (2007) Seeds coat development and dormancy. In : *Seed development, dormancy and germination*. Bradford, K. and Nonogaki, H. (eds.), Blackwell Publishing, Vol. 27, 24-43.
- Dure, L. and Waters, L.** (1965) Long-lived messenger RNA: Evidence from cotton seed germination. *Science* **147**: 410-412.
- Esen, A.** (1978) A simple method for quantitative, semiquantitative and qualitative assay of protein. *Anal. Biochem.*, **89**: 264-273.
- Filée, J. and Forterre, P.** (2006) Viral proteins functioning in organelles: a cryptic origin? *Trends Microbiol.* **13**: 510-513.

- Geigenberger, P.** (2003) Response of plant metabolism to too little oxygen. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 247-256.
- Hajdukiewicz, P.T.J., Allison, L.A. and Maliga, P.** (1997) The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartment transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J.* **16**: 4041-4048.
- Hennig, L., Gruissem, W., Grossniklaus, Köhler, C.** (2004) Transcriptional programs of early reproductive stages in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **135**: 1765-1775.
- Hricova, A., Quesada, V. and Micols, J.L.** (2006) The *SCABRA3* nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **141**, 942-956.
- Hsu, S-C., Belmonte, M.F., Harada, J.J. and Inoue, K.** (2010) Indispensable roles of plastids in *Arabidopsis thaliana* embryogenesis. *Curr. Genomics* **11**: 338-349.
- Ishizaki, Y., Tsunoyamz, Y., Hatano, K., Ando, K., Kato, K., Shinmyo, A., Kobori, M., Takeba, G., Nakahira, Y. and Shiina, T.** (2005) A nuclear-encoded sigma factor, *Arabidopsis* SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulated early chloroplast development in cotyledons. *Plant J.* **42**: 133-144.
- Kanamaru, K., Nagashima, A., Fujiwara, M., Shimada, H., Shirano, Y., Nakabayashi, K., Shibata, D., Tanaka, K. and Takahashi, H.** (2001) An *Arabidopsis* sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **42**: 1034-104.
- Kühn, K., Richter, U., Meyer, E.H., Delannoy, E., de Longevialle, A.F., O'Toole, N., Börner, T., Millar, A.H., Small, I.D. and Whelan, J.** (2009) Phage-type RNA polymerase RPOTmp performs gene specific transcription in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **21**: 2762-2779.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Le, B.H., Cheng, C., Bui, A.Q., Wagmaister, J.A., Henry, K.F., Pelletier, J., Kwong, L., Belmonte, M., Kirkbride, R., Horvath, S., Drews, G.N., Fischer, R.L., Okamoto, J.K., Harada, J.J. and Goldberg, R.B.** (2010) Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proc. Natl. acad. Sci. U.S.A.* **107**: 8063-8070.
- Loschelder, H., Schweer, J., Link, B. and Link, G.** (2006) Dual temporal role of plastid sigma factor 6 in *Arabidopsis* development. *Plant Physiol.* **142**: 642-650.

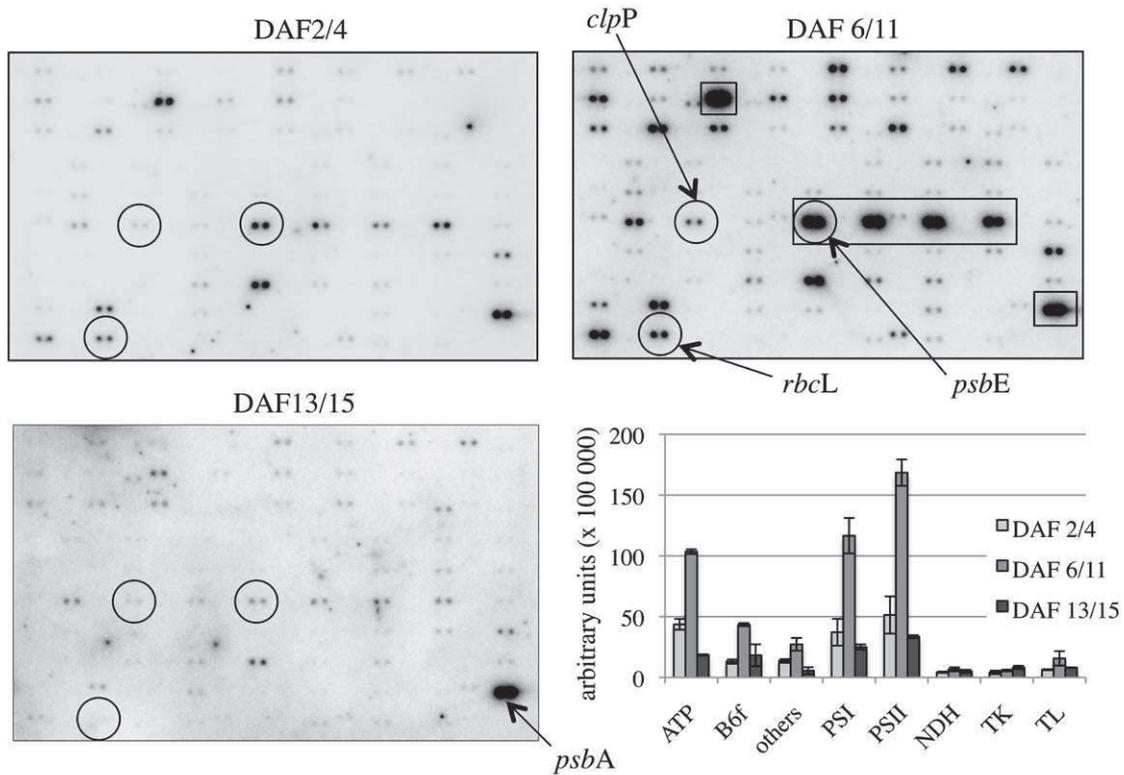
- Mansfield, S.G. and Briarty, L.G.** (1991) Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Can. J. Bot.* **69**: 461-476.
- Mansfield, S.G. and Briarty, L.G.** (1992) Cotyledon cell development in *Arabidopsis thaliana* during reserve deposition. *Can. J. Bot.* **70**: 151-164.
- Mullet, J. E., Orozco, E. M. and Chua N.-H.** (1985) Multiple transcripts for higher plant *rbcL* and *atpB* genes and localization of the transcription initiation sites of the *rbcL* gene. *Plant Mol. Biol.* **4**: 39-54.
- Nagashima, A., Hanaoka, M., Motohashi, R., Seki, M., Shinozaki, K., Kanamaru, K., Takahashi, H. and Tanaka, K.** (2004) DNA microarray analysis of plastid gene expression in an *Arabidopsis* mutant deficient in a plastid transcription factor sigma, SIG2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 694-704.
- Privat, I., Hakimi, M.-A., Buhot, L., Favory, J.-J., and Lerbs-Mache, S.** (2003) Characterization of *Arabidopsis* plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3. *Plant Mol. Biol.* **55**: 385-399.
- Rajjou, L., Gallardo, K., Debeaujon, I., Vandekerckhove, J., Job, C. and Job, D.** (2004) The effect of  $\alpha$ -amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiol.* **134**: 1598-1613.
- Ruuska, S.A., Girke, T. Benning, C. and Ohlrogge, J.B.** (2002) Contrapuntal Networks of Gene Expression during *Arabidopsis* Seed Filling. *Plant Cell* **14**: 1191-1206.
- Schägger, H.** (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* **1**: 16-22.
- Shiina, T., Tsunoyama, Y., Nakahira, Y. and Khan, M.S.** (2005) Plastid RNA Polymerases, Promoters, and Transcription Regulators in Higher Plants. *Int. Rev. Cytol.* **244**: 1-68.
- Sreenivasulu, N., Altschmied, L., Radchuk, V., Gubatz, S., Wobus, U. and Weschke, W.** (2004) Transcript profiles and deduced changes of metabolic pathways in maternal and filial tissues of developing barley grains. *Plant J.* **37**:539-553.
- Spencer, M.W.B., Casson, S.A. and Lindsey, K.** (2007) Transcriptional profiling of the *Arabidopsis* embryo. *Plant Physiol.* **143**: 924-940.
- Suzuki, Y., Kawazu, T. and Koyama, H.** (2004) RNA isolation from siliques, dry seeds, and other tissues of *Arabidopsis thaliana*. *BioTechniques* **37**: 542-544.
- Weber, H., Borisjuk, L. and Wobus, U.** (2005) Molecular Physiology of Legume Seed Development. *Ann. Rev. Plant Biol.* **56**: 253-279.
- Yao, J., Roy-Chowdhury, S. and Allison, L.A.** (2003) AtSig5 Is an essential nucleus-encoded *Arabidopsis*  $\sigma$ -like factor. *Plant Physiol.* **132**: 739-747.

**Zghidi, W., Merendino, L., Cottet, A., Mache, R. and Lerbs-Mache, S.** (2007) Nucleus-encoded plastid sigma factor SIG3 transcribes specifically the *psbN* gene in plastids. *Nucleic Acids Res.*, **35**: 455-464.

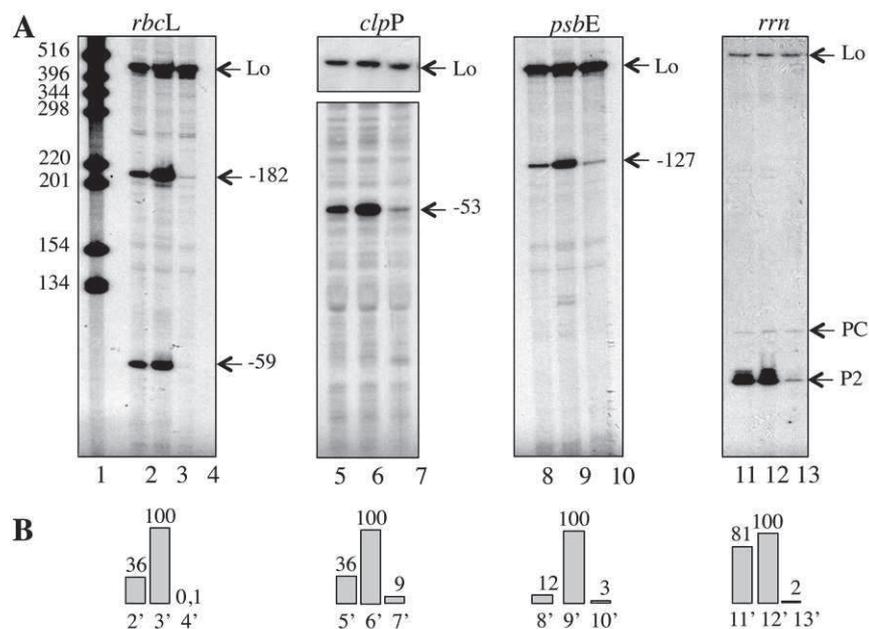
**Zghidi-Abouzid, O., Merendino, L., Buhr, F., Ghulam, M.M. and Lerbs-Mache, S.** (2011) Characterization of plastid *psbT* sense and antisense RNAs. *Nucleic Acids Res.*, **39**: 5379-5387.



**Figure 1.** Developmental stages of *Arabidopsis* seeds (ecotype Columbia).  
DAF = days after fertilization, stage 0 = dry seeds

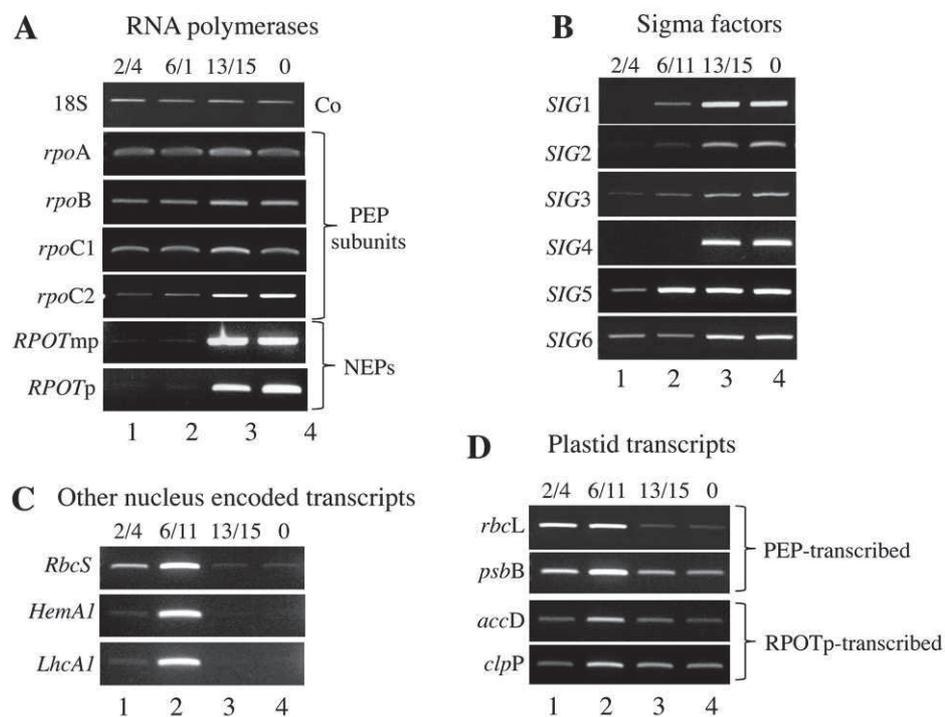


**Figure 2.** Changes in plastid transcriptome profiles of DAF2/4, DAF6/11 and DAF13/15 seeds. Autoradiographs and schematic presentation of mRNA expression profiles of different functional groups. To obtain relative expression values for each functional group, the sum of all mRNA values has been divided by the number of mRNAs representing the group. Mean values and standard deviations are reported in Supplemental Table I. The spotting schema of the macroarray is indicated in Supplemental Figure 1. ATP = ATP synthase, PSI = photosystem I, PSII = photosystem II, B6f = cytochromeB6f, TK = transcription, TL = translation



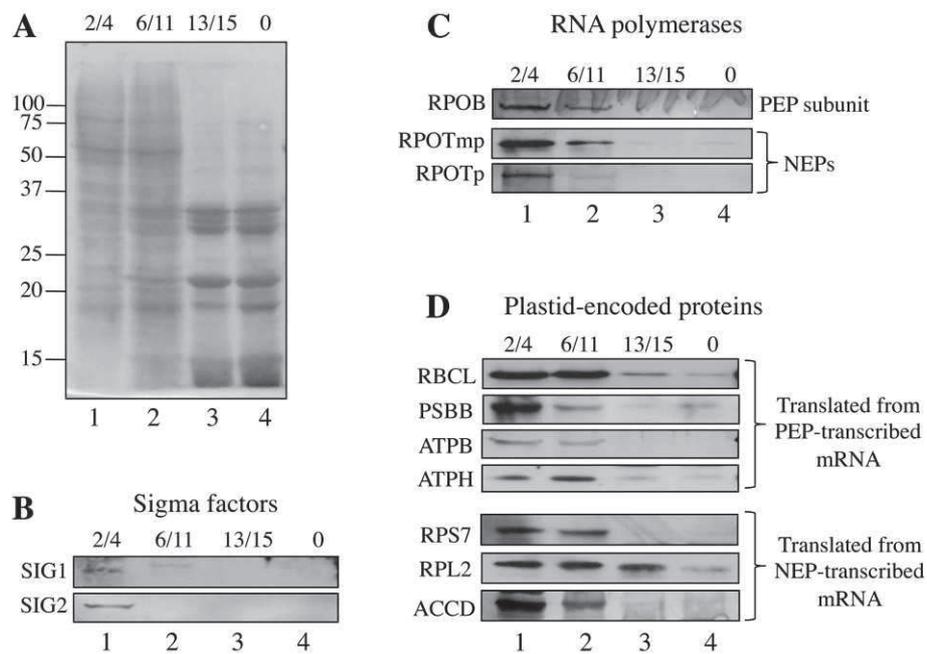
**Figure 3.** Confirmation of changes in transcript abundance for some selected mRNAs.

(A) Primer extension. 10  $\mu$ g (lanes 2-9) or 2  $\mu$ g (lanes 10-12) of total RNA have been used for primer extension analysis using *rbcL* (lanes 2-4), *clpP* (lanes 4-6) *psbE* (lanes 7-9) and 16S rRNA (lanes 10-12) specific primers. RNA was isolated from DAF2/4 (lanes 2, 4, 7 and 10), DAF6/11 (lanes 3, 5, 8 and 11) and DAF13/15 (lanes 4, 6, 9 and 12) seeds, and the synthesized cDNAs were analysed by separation on 6% denaturing polyacrylamide gels. Lane 1 = molecular size standards in bp, Lo = loading control. cDNAs are marked by arrows. The number of bases indicates the distance of the 5'-end of the corresponding mRNA's from the ATG translation codon. (B) Quantification. The bands corresponding to the radiolabelled cDNAs, marked by arrows in (A), have been quantified using ImageJ software. Quantities of cDNAs in stages 2/4 (lanes 2', 5', 8' and 11') and 13/15 (lanes 4', 7', 10' and 13') have been calculated as percentage of stage 6/11 values that have been taken as 100% (lanes 3', 6', 9' and 12').

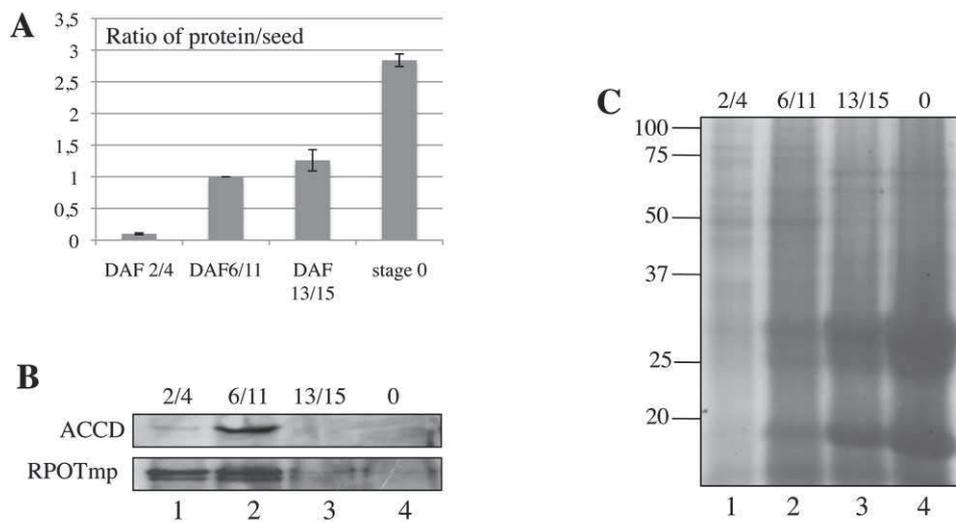


**Figure 4.** Changes in transcript abundance of selected plastid-encoded mRNAs and nucleus-encoded mRNAs coding for plastid-localized proteins.

Total RNAs have been purified from stage 2/4 (lane 1), stage 6/11 (lane 2), stage 13/15 (lane 3) and dry seeds (lane 4) and analysed by RT-PCR using 18S RNA as internal standard. **(A)** Abundance of mRNAs encoding components of the three different plastid RNA polymerases. **(B)** Analysis of mRNAs encoding sigma-like transcription factors of PEP. **(C)** Abundance of nucleus-encoded mRNAs corresponding to plastid-localized photosynthesis-related proteins. **(D)** Analysis of plastid-encoded mRNAs that are transcribed preferentially by PEP (*rbcL* and *psbB*) or by NEP (*accD* and *clpP*). PCR products were run on 2% Agarose gels and revealed by ethidium bromide staining.



**Figure 5.** Changes in protein levels for components of the plastid transcriptional machinery and some other plastid proteins. 30  $\mu$ g each of total proteins of stage 2/4 (lane 1), 6/11 (lane 2), 13/15 (lane 3) and dry seeds (0, lane 4) were analysed after separation on 7% denaturing polyacrylamide gels and transfer to Nitrocellulose membranes. **(A)** Staining with Coomassie Brilliant Blue. **(B) – (D)** Antibody reactions. Protein profiles are revealed by antibody decoration to reveal sigma-like transcription factors **(B)**, subunits of plastid RNA polymerase **(C)** and some other plastid proteins **(D)**.



**Figure 6.** Changes in plastid protein levels after normalisation of protein quantities corresponding to equal number of siliques. **(A)** Determination of the quantity of protein per silique. Proteins obtained from three times 10 siliques have been determined. Values corresponding to 1 silique have been normalized by taking stage 6/11 as reference. **(B)** Analysis of ACCD and RPOTmp protein levels by immunodecoration in total protein extracts prepared from stages 2/4, 6/11, 13/15 and in dry seeds (0) by using protein quantities corresponding to 3 siliques each. **(C)** Verification that high molecular weight proteins are not underrepresented in stage 13/15 and dry seeds. Protein quantities of stage 2/4 (lane 1), stage 6/11 (lane 2), stage 13/15 (lane 3) and dry seeds (0, lane 4) corresponding to 10 siliques each have been separated on denaturing polyacrylamide gels and stained by Coomassie Brilliant Blue.

gene	function	DAF 2/4				DAF 6/11				DAF 13/15			
		array 1	array 2	mean 2/4	STDV	array 1	array 2	mean 6/11	STDV	array 1	array 2	mean 13/15	STDV
atpB	ATPSynthase	65034	65885	65459	602	231302	97671	164486	94491	71421	66330	68875	3600
atpE	ATPSynthase	4444	44197	24321	28109	160075	33806	96940	89286	13879	34546	24212	14614
atpI	ATPSynthase	97909	172905	135407	53030	538586	483348	510967	39059	50696	183947	117321	94222
atpH	ATPSynthase	2176082	2395397	2285740	155079	4390239	5222805	4806522	588713	806139	722265	764202	59308
atpF	ATPSynthase	14964	64896	39930	35307	390820	225254	308037	117073	21484	38169	29827	11798
atpA	ATPSynthase	74631	64560	69596	7121	417916	227589	322752	134581	125772	86809	106290	27551
	ATP	<b>2433065</b>	<b>2807841</b>	<b>2620453</b>	<b>265006</b>	<b>6128937</b>	<b>6290473</b>	<b>6209705</b>	<b>114223</b>	<b>1089391</b>	<b>1132065</b>	<b>1110728</b>	<b>30176</b>
petG	electron transport	114094	151946	133020	26765	400653	256424	328539	101985	211814	30189	121002	128428
petL	electron transport	101344	219449	160397	83513	505373	539762	522568	24317	212198	26233	119215	131497
petA	electron transport	39269	72703	55986	23641	205431	207695	206563	1601	110873	77473	94173	23617
petD	electron transport	211374	198391	204882	9180	652763	676143	664453	16532	357377	219842	288609	97252
petB	electron transport	176232	198210	187221	15541	829793	846058	837925	11501	568364	345110	456737	157864
petN	electron transport	64520	15693	40106	34526	65726	26792	46259	27530	17971	14159	16065	2696
	<b>B6f</b>	<b>706832</b>	<b>856392</b>	<b>781612</b>	<b>105755</b>	<b>2659738</b>	<b>2552874</b>	<b>2606306</b>	<b>75564</b>	<b>1478596</b>	<b>713007</b>	<b>1095801</b>	<b>541353</b>
cemA	others	17694	18384	18039	488	61604	34898	48251	18884	8617	51516	30067	30334
ycf4	others	26397	17402	21899	6360	19826	12542	16184	5150	7161	0	3581	5064
rbCL	others	753143	731053	742098	15620	1370300	1101495	1235897	190074	30839	58905	44872	19846
accD	others	48142	29631	38887	13089	54348	62835	58592	6001	41086	15697	28391	17953
orf77	others	26955	63337	45146	25726	149906	102723	126314	33363	50722	43573	47147	5055
ycf2	others	67371	20451	43911	33178	25967	14191	20079	8327	21579	41880	31730	14355
ycf1	others	56664	131342	94003	52806	209232	242220	225726	23326	7360	13997	10679	4692
clpP	others	78379	84480	81430	4314	188467	155242	171854	23493	19459	158248	88853	98139
matK	others	52676	220780	136728	118868	705253	390398	547825	222637	133801	223060	178430	63116
	<b>others</b>	<b>1127420</b>	<b>1316862</b>	<b>1222141</b>	<b>133956</b>	<b>2784902</b>	<b>2116544</b>	<b>2450723</b>	<b>472601</b>	<b>320624</b>	<b>606875</b>	<b>463750</b>	<b>202410</b>
psaj	PSI	1302279	1367871	1335075	46380	4707441	3378839	4043140	939464	1183262	409097	796180	547417
psaI	PSI	33512	758307	395910	512507	0	2626940	1313470	1857527	2271	487719	244995	343263
psaC	PSI	56100	78440	67270	15797	266479	174219	220349	65238	15218	77382	46300	43957
psaA	PSI	24083	14476	19280	6793	157099	70433	113766	61283	7112	53624	30368	32888
psaB	PSI	50979	26846	38912	17064	181164	95509	138336	60567	121653	148388	135020	18905
	<b>PSI</b>	<b>1466953</b>	<b>2245940</b>	<b>1856447</b>	<b>550827</b>	<b>5312183</b>	<b>6345939</b>	<b>5829061</b>	<b>730976</b>	<b>1329515</b>	<b>1176209</b>	<b>1252862</b>	<b>108404</b>
psbB	PSII	176929	174016	175472	2059	483570	497683	490626	9980	136719	113845	125282	16174
psbH	PSII	56548	71158	63853	10331	145272	268741	207006	87306	19515	17567	18541	1377
psbT	PSII	390130	513486	451808	87225	1143179	2281092	1712136	804626	341773	293959	317684	34067
psbZ	PSII	219738	121203	170470	69674	603041	426918	514980	124538	478373	201866	340120	195520
psbC	PSII	572547	524774	548661	33780	1342435	1343368	1342901	660	580115	821454	700785	170653
psbD	PSII	189079	212456	200767	16530	749588	902957	826272	108449	965430	540806	753118	300255
psbI	PSII	93760	89748	91754	2837	484714	211779	348246	192994	129140	25671	77406	73163
psbK	PSII	245828	379854	312841	94771	1325328	1184118	1254723	99851	179374	127569	153472	36632
psbN	PSII	674177	130831	402504	384204	764770	584950	746860	127152	523169	418955	471062	73690
psbE	PSII	419650	1078901	749275	466161	2094922	2624854	2359888	374719	118098	201466	159782	58950
psbF	PSII	643580	1711909	1177745	755422	3507964	4704688	4106326	846211	168070	380809	274439	150430
psbL	PSII	660140	1679266	1169703	720631	4325807	3828629	4077218	351558	263911	351239	307575	61750
psbJ	PSII	831324	1006091	918707	123579	2982172	2600286	2791229	270034	373430	369213	371321	2982
psbM	PSII	505172	1014954	760063	360470	2566066	3207104	2886585	453282	539690	725489	632589	131380
	<b>PSII (-psbA)</b>	<b>5678600</b>	<b>8708647</b>	<b>7193624</b>	<b>2142567</b>	<b>22518827</b>	<b>24667167</b>	<b>23592997</b>	<b>1519106</b>	<b>4816805</b>	<b>4589545</b>	<b>4703175</b>	<b>160698</b>
psbA	PSII	6656498	1987203	4321850	3301690	6605530	5973578	6289554	446857	6333663	7086183	6709923	532112
ndhB	respiration	41690	50439	46064	6186	124743	70527	97635	38336	186676	174927	180802	8308
ndhI	respiration	0	0	0	0	61722	16929	39325	31673	12455	12292	12373	116
ndhG	respiration	25067	41229	33148	11429	73488	59483	66486	9903	10544	39586	25065	20536
ndhE	respiration	29860	49512	39686	13896	176553	96427	136490	56658	40145	41861	41003	1213
ndhD	respiration	26439	20172	23306	4432	36619	55559	46089	13393	9776	31348	20562	15254
ndhF	respiration	0	0	0	0	4865	9338	7101	3163	18338	14951	16644	2395
ndhC	respiration	108451	21922	65186	61185	28302	20897	24600	5236	3192	45246	24219	29737
ndhK	respiration	43164	48168	45666	3538	124310	113875	119092	7379	50413	110490	80451	92481
	<b>NDH</b>	<b>274671</b>	<b>231441</b>	<b>253056</b>	<b>30568</b>	<b>630601</b>	<b>443034</b>	<b>536818</b>	<b>132630</b>	<b>331538</b>	<b>470700</b>	<b>401119</b>	<b>48403</b>
rpoA	transcription	57026	123181	90103	46778	173727	97878	135802	53633	122775	144903	133839	15647
rpoC	transcription	37355	4885	21120	22960	17089	4158	10624	9144	17761	0	8880	12559
rpoB	transcription	18328	16588	17458	1230	28443	26830	27637	1141	42790	36742	39766	4277
rpoC1	transcription	10330	59620	34975	34853	29265	32667	30966	2405	109575	92186	100881	12296
	<b>TK</b>	<b>123039</b>	<b>204274</b>	<b>163656</b>	<b>57441</b>	<b>248524</b>	<b>161533</b>	<b>205029</b>	<b>61512</b>	<b>292901</b>	<b>272495</b>	<b>282698</b>	<b>14429</b>
rpl23	translation	59600	104506	82053	31753	270855	171904	221380	69969	54573	64123	59348	6753
rpl33	translation	50349	20376	35363	21194	74531	11755	43143	44390	32885	0	16442	23253
rps7	translation	40231	24382	32307	11207	63311	29697	46504	23769	96292	50052	73172	32697
rpl32	translation	96451	207959	152205	78848	1040677	668054	854365	263484	397741	135419	266580	185489
rpl2	translation	63328	231964	147646	119244	306612	299981	303297	4689	119575	93993	106784	18089
rps18	translation	43506	120937	82222	54752	181440	125472	153456	39575	64398	25090	44744	27795
rps15	translation	54570	32873	43721	15342	81408	32818	57113	34358	28031	11102	19566	11971
rps12	translation	60528	72958	66743	8789	229786	105967	167876	87554	151950	174680	163315	16073
rps19	translation	56441	47356	51898	6424	108961	30120	69541	55749	25025	67718	46372	30189
rpl22	translation	37802	24082	30942	9701	77560	54508	66034	16300	0	28336	14168	20036
rpl20	translation	55611	45589	50600	7087	71612	69909	70761	1204	138851	222904	180878	59434
rps3	translation	37881	98990	68435	43210	217147	116378	166762	71254	23290	72819	48054	35022
rpl16	translation	14311	42511	28411	19940	228652	92673	160662	96152	7923	12579	10251	3292
rpl14													

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
	<b>rpl23</b>		<b>ndhB</b>		<b>rps7</b>		<b>ycf5</b>		<b>rpl32</b>		<b>rpl2</b>		<b>petD</b>		<b>petB</b>		A
	rpl23		ndhB		rps7		ycf5		rpl32		rpl2		petD		petB		B
	<b>psbB</b>		<b>rpl33</b>		<b>psaJ</b>		<b>petG</b>		<b>petL</b>		<b>petA</b>		<b>cemA</b>		<b>ycf4</b>		C
	psbB		rpl33		psaJ		petG		petL		petA		cemA		ycf4		D
	<b>psbZ</b>		<b>psbC</b>		<b>psbD</b>		<b>petN</b>		<b>psbI</b>		<b>psbK</b>		<b>rps18</b>		<b>accD</b>		E
	psbZ		psbC		psbD		petN		psbI		psbK		rps18		accD		F
	orf77		rps15		ndhH		ndhA		ndhI		ndhG		ndhE		psaC		G
	<b>orf77</b>		<b>rps15</b>		<b>ndhH</b>		<b>ndhA</b>		<b>ndhI</b>		<b>ndhG</b>		<b>ndhE</b>		<b>psaC</b>		H
	ycf1		rps19		rpl22		rps3		rpl16		rpl14		rps8		rpl36		I
	<b>ycf1</b>		<b>rps19</b>		<b>rpl22</b>		<b>rps3</b>		<b>rpl16</b>		<b>rpl14</b>		<b>rps8</b>		<b>rpl36</b>		J
	psbN		clpP		rpl20		psbE		psbF		psbL		psbJ		atpB		K
	<b>psbN</b>		<b>clpP</b>		<b>rpl20</b>		<b>psbE</b>		<b>psbF</b>		<b>psbL</b>		<b>psbJ</b>		<b>atpB</b>		L
	ndhK		ndhJ		rps4		Ycf3		psaA		psaB		rps14		psbM		M
	<b>ndhK</b>		<b>ndhJ</b>		<b>rps4</b>		<b>Ycf3</b>		<b>psaA</b>		<b>psaB</b>		<b>rps14</b>		<b>psbM</b>		N
	rpoC2		rps2		atpI		atpH		atpF		atpA		rps16		matK		O
	<b>rpoC2</b>		<b>rps2</b>		<b>atpI</b>		<b>atpH</b>		<b>atpF</b>		<b>atpA</b>		<b>rps16</b>		<b>Ycf1-1</b>		P
	<b>psbH</b>		<b>psaI</b>		rps12		ndhD		rps11		atpE		rpoB		psbA		Q
	psbH		psaI		<b>rps12</b>		<b>ndhD</b>		<b>rps11</b>		<b>atpE</b>		<b>rpoB</b>		<b>matK</b>		R
	<b>psbT</b>		<b>rbcL</b>		ycf2		ndhF		rpoA		ndhC		rpoC1		Ycf1-1		S
	psbT		rbcL		<b>ycf2</b>		<b>ndhF</b>		<b>rpoA</b>		<b>ndhC</b>		<b>rpoC1</b>		<b>psbA</b>		T

Sense RNAs are indicated in green and anti-sense RNAs in black

Supplemental Figure 1. Spotting schema of macroarray.

### Résumé

L'expression du génome plastidial, un des trois génomes (nucléaire, mitochondrial et plastidial) qui coexistent dans les cellules végétales, est assurée par trois ARN polymérases. Deux NEP (Nuclear-Encoded RNA Polymerase) transcrivent la plupart des gènes de ménage tandis que la PEP (Plastid-Encoded RNA Polymerase) transcrit principalement les gènes liés à la fonction photosynthétique en s'associant à des facteurs de transcription d'origine nucléaire (facteurs sigma) importés dans le plaste.

De précédents travaux dans l'équipe ont montré que, contrairement aux observations généralement admises, les trois ARN polymérases sont nécessaires pour assurer une germination efficace des graines d'*Arabidopsis*. L'objectif de notre travail est de comprendre comment ces enzymes ont été mises en place au cours de la formation de la graine. Pour cela, nous avons analysé l'expression de l'appareil transcriptionnel et du transcriptome plastidial durant les trois phases de formation de la graine d'*Arabidopsis thaliana*, c'est à dire l'embryogenèse, la maturation (phase photosynthétique) et la dessiccation.

L'expression globale du transcriptome plastidial montre que les changements quantitatifs des transcrits sont les plus élevés pour les transcrits des gènes liés à la fonction photosynthétique. Ils sont très fortement exprimés pendant la phase de la maturation et diminuent ensuite, comme leurs protéines correspondantes. Nous observons également une forte accumulation des protéines codant les NEP et les sous unités de la PEP pendant la période de maturation des graines, suivie d'une forte diminution pendant la dessiccation. Cependant, les ARNm correspondants augmentent pendant la dessiccation. Le stockage de ces ARNm codant l'appareil transcriptionnel constitue une étape cruciale pour l'efficacité de la germination de la graine.

La quantité de matériel biologique disponible pour ces études étant très limitée, nous avons développé une nouvelle technique de détection des ADNc sur lame de quartz, utilisant la microscopie TIRF. Cette méthode augmente la résolution (elle permet la détection de molécules uniques) et diminue considérablement la quantité de matériel nécessaire à l'hybridation.

Finalement, nous avons analysé les conditions sous lesquelles se déroule la photosynthèse embryonnaire. Ces études ont montré que la photosynthèse dans l'embryon se déroule dans un environnement particulier, hypoxique, et sous un éclairage enrichi en longueurs d'onde vertes. Cependant, la structure et le fonctionnement de l'appareil photosynthétique sont semblables à ceux d'une feuille. Nous avons également montré que l'étape transitoire de la photosynthèse embryonnaire est indispensable à la vigueur germinative des graines.

Les résultats obtenus lors de ce travail apportent de nouvelles informations sur le fonctionnement de la transcription plastidiale au cours de la formation de la graine. L'importance de l'accumulation d'ARNm, de certaines protéines ainsi que celle de la photosynthèse embryonnaire dans la vigueur germinative ont été soulignées. Ces données permettent de comprendre comment l'efficacité de la germination est conditionnée par la phase de formation de la graine.

---

### Abstract

Transcription of the plastid genome, one of the three genomes (nuclear, mitochondrial and plastidial) that co-exist in the plant cell, is performed by three ARN polymerases. Two NEPs (Nucleus-Encoded Plastid RNA polymerases) transcribe mainly housekeeping genes and one PEP (plastid-encoded RNA polymerase) transcribes principally photosynthesis related genes. PEP needs transcription factors of the sigma type that are nucleus-encoded.

We have previously shown that all three RNA polymerases are present in dry seeds and are necessary for efficient germination. These findings raised the question of how these RNA polymerases come into the dry seeds and what is the importance of plastid gene expression during seed formation. To answer this question my work consisted in the characterization of plastid gene expression profiles and the expression of the components of the plastid transcriptional machinery during the three phases of seed formation, i. e. embryogenesis, maturation (embryonic photosynthesis) and desiccation.

The analysis of global plastid transcriptome patterns shows that mRNAs encoding proteins engaged in photosynthesis show the highest quantitative changes during seed formation. Highest mRNA levels are observed during maturation. During desiccation, photosynthesis related mRNA levels as well as the levels of the corresponding proteins strongly decrease. Concerning the expression of NEP and PEP components, we observe also a peak of protein accumulation during maturation that is followed by a strong diminution of the protein levels. On the other hand, the corresponding mRNAs increase continuously during desiccation. This means that these mRNAs accumulate without being translated. We conclude that the storage of mRNAs coding components of the plastid transcriptional machinery in dry seeds is important for efficient germination.

Regarding the limited amount of biological material that is available for these types of studies, we have developed a new method for cDNA analyses on microchips that utilises quartz plates and TIRF microscopy. In this way we can visualise single molecules and the amount of necessary material is considerable diminished.

Finally, we have also partially characterized the conditions under which embryonic photosynthesis is performed. These studies show that photosynthesis occurs in a special environment that is characterized by hypoxic atmosphere and green enriched light. However, the structure and functioning of the photosynthetic apparatus in seed chloroplasts seems to be very similar to that of chloroplasts in green leaves. This opens the question of how seed photosynthesis can be efficient. On the other hand we have shown that embryonic photosynthesis is indeed very important for efficient germination.

Altogether, results provide new information on the functioning of plastid photosynthesis and transcription during seed formation. They underline the importance of the accumulation of NEP and PEP coding mRNAs in dry seeds. We suggest that embryonic photosynthesis influences seed germination not only by providing reserve compounds but also by producing NEP and PEP proteins. Although the majority of these proteins are degraded during desiccation, traces persist and are stored in dry seeds thus assuring immediate transcription of the plastid genome during imbibition/stratification. Our results explain how efficiency of germination is conditioned during seed formation.