

Effet des vitesses de dessiccation de la graine et des basses températures sur la germination du pois protéagineux

Marie-Paule Raveneau

▶ **To cite this version:**

Marie-Paule Raveneau. Effet des vitesses de dessiccation de la graine et des basses températures sur la germination du pois protéagineux. Biologie végétale. Université d'Angers, 2012. Français. NNT : . tel-00989810

HAL Id: tel-00989810
https://theses.hal.science/tel-00989810

Submitted on 12 May 2014

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.

Université d'Angers **Année 2012**
N° d'ordre 1218

Effet des vitesses de dessiccation de la graine et des basses températures sur la germination du pois protéagineux.

Thèse de doctorat

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire végétale
ECOLE DOCTORALE : Végétal, Environnement, Nutrition, Mer (VENAM)

Présentée et soutenue publiquement
Le : 27 mars 2012
à : PRES L'UNAM – Groupe ESA Angers
par : Marie-Paule Raveneau

Devant le jury ci-dessous :

Françoise CORBINEAU,	**Rapporteur,**	**Professeur, UPMC Paris6**
Alain BOUCHEREAU,	**Rapporteur,**	**Professeur, Université Rennes 1**
Christophe LECOMTE,	**Examinateur,**	**Ingénieur de recherche, INRA Dijon**
Alain VIAN,	**Président,**	**Professeur, Université d'Angers**
David MACHEREL	**Directeur de thèse**	**Professeur, Université d'Angers**
Carolyne DÜRR	**Co-Directrice de thèse**	**Ingénieur de recherche, INRA Angers**

Laboratoire UMR 1191 PMS- Physiologie Moléculaire des Semences (Université d'Angers, Agrocampus Ouest, INRA) 16, boulevard Lavoisier 49045 Angers.
Laboratoire LEVA Laboratoire d'écophysiologie et agroécologie (Groupe ESA) 55, rue Rabelais 49007 Angers.

ED N° 495

Université d'Angers **Année 2012**
N° d'ordre 1218

Effet des vitesses de dessiccation de la graine et des basses températures sur la germination du pois protéagineux.

Thèse de doctorat

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire végétale
ECOLE DOCTORALE : Végétal, Environnement, Nutrition, Mer (VENAM)

Présentée et soutenue publiquement
Le : 27 mars 2012
à : PRES L'UNAM – Groupe ESA Angers
par : Marie-Paule Raveneau

Devant le jury ci-dessous :

Françoise CORBINEAU,	**Rapporteur,**	**Professeur, UPMC Paris6**
Alain BOUCHEREAU,	**Rapporteur,**	**Professeur, Université Rennes 1**
Christophe LECOMTE,	**Examinateur,**	**Ingénieur de recherche, INRA Dijon**
Alain VIAN,	**Président,**	**Professeur, Université d'Angers**
David MACHEREL	**Directeur de thèse**	**Professeur, Université d'Angers**
Carolyne DÜRR	**Co-Directrice de thèse**	**Ingénieur de recherche, INRA Angers**

Laboratoire UMR 1191 PMS- Physiologie Moléculaire des Semences (Université d'Angers, Agrocampus Ouest, INRA) 16, boulevard Lavoisier 49045 Angers.
Laboratoire LEVA Laboratoire d'écophysiologie et agroécologie (Groupe ESA) 55, rue Rabelais 49007 Angers.

ED N° 495

Remerciements

Je remercie tout d'abord le groupe ESA pour m'avoir permis dans le cadre des thématiques du LEVA, de réaliser une thèse, d'avoir accepté une décharge partielle de mes activités et d'avoir assuré le financement de mon salaire pour cette formation. J'ai une pensée particulière pour Yves Crozat initiateur de ce projet qui aurait apprécié la concrétisation scientifique du pont entre les thématiques des deux équipes du LEVA et de PMS. Je remercie ses successeurs à la responsabilité du LEVA, Alain Bourgeois, pour le démarrage, Abraham Escobar et Joëlle Fustec ensuite, pour avoir œuvré au bon déroulement de ce projet. Je remercie également la région Pays de la Loire dont le financement accordé dans le cadre du programme COSAVE a permis de financer partiellement la réalisation des travaux. Je remercie également Olivier Leprince de m'avoir accueillie comme thésarde dans son laboratoire à PMS.

Ce travail de thèse ne prendra toute sa dimension qu'après avoir été confronté aux différents éclairages des membres du jury, aussi je remercie Françoise Corbineau, Alain Bouchereau en tant que rapporteurs, Christophe Lecomte et Alain Vian en tant qu'examinateurs d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier David Macherel, mon directeur de thèse et Carolyne Dürr ma co-directrice de thèse, pour leur engagement à l'encadrement de la thèse permettant d'allier l'approche agronomique et l'approche physiologique. David, je tiens à te remercier pour l'ambiance de travail stimulante, pour ton incitation à progresser, pour ton apport de nuances dans mes approches parfois schématiques, pour ton enthousiasme communicatif sur le « modèle anhydrobiose », et pour ton soutien indéfectible lors des « sautes d'humeur » de la Dionex! Carolyne, je te remercie de m'avoir laissé une certaine latitude tout en étant la gardienne du cap, de ton soutien important pour la publication de l'article et de ton incitation à créer des liens entre différents aspects.

Mes remerciements vont aussi aux membres de mon comité de pilotage de thèse, Isabelle Lejeune-Hénaut, Abraham Escobar et Alain Bourgeois pour leurs questions, leurs remarques et leurs précieux conseils.

Je souhaite remercier Abdel Benamar, pour m'avoir initiée aux mesures de respiration, pour sa confiance dans la manipulation des sondes!, pour son doigté dans l'isolement des mitochondries, pour son aide dans le vieillissement des graines, plus généralement pour son aide technique quand j'avais un problème et pour sa présence tardive au laboratoire qui me permettait de terminer mes manips avant la fermeture des portes.

Un grand merci va à l'équipe technique du LEVA, Solange Renaud, Anthony Machet, Vincent Oury, Sylvain Pineau, Christine Goyer, Pierre Huynh, Vincent Moreau pour m'avoir épaulé dans le suivi des germinations et dans l'excision des axes embryonnaires de pois. Vous avez répondu présent dans les moments difficiles notamment pour recommencer les germinations pour le dosage des adénylates. J'ai apprécié la qualité de votre travail, votre bonne humeur et même vos blagues! J'aurai plaisir à travailler avec vous sur la démarche qualité.

Je remercie aussi différents stagiaires Juliette Kolopp, Nicolas Denoyer, Romain Davière et Yann Paulet qui ont contribué par leur travail à la détermination des températures cardinales.

Merci à Marie-Hélène Wagner pour la réalisation des tests de facultés germinatives et de détérioration contrôlée, à Rosemonde Devaux et Isabelle Lejeune pour la production de graines à Mons, les personnes de la FNAMS et tout particulièrement Frank Ruault pour la production des graines sur Angers, à Yohann Grelet pour son aide pour l'extraction et détection de la LEAm, à Pascale Satour pour m'avoir formée au dosage des sucres et à Nicole Payet pour la mise au point des dosages des adénylates.

Je souhaite remercier également les autres personnes qui m'ont fait profiter de leur expérience, Myriam Reveillère et Mario Cannavacciuolo pour leurs précieux conseils en statistiques, Françoise Coste pour nos échanges agronomiques, Julia Buitink pour sa parfaite connaissance de la Dionex, à Matthieu Floriot pour son aide dans le choix de variétés contrastées de génotypes de pois, Véronique Biarnès pour les données UNIP.

Mes remerciements s'adressent aussi aux personnes qui ont suivi, il n'y a pas si longtemps ce même chemin : Christophe, Cyril, Marie-Pierre, Emilie, Johann ou qui réalisent ce parcours : Benoît, Romain, Christel, Adrien, Julien, Emmanuel, Pauline et avec qui j'ai eu plaisir à échanger sur les avancées, les enthousiasmes et les embuches de la thèse.

Je voudrais aussi exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont manifesté un intérêt à l'avancement de ce projet, mes collègues à l'ESA en particulier Véronique, Guenaelle, Béatrice, Christine, Guillaume Pi., Françoise, Joëlle, Emmanuel, Frédérique P., Roseline, Frédérique J. et à l'équipe des accompagnateurs que j'anime en particulier Sylvie, Myriam, Anne-Marie et Gwenaelle, à mes collègues de PMS pour leur accueil chaleureux en particulier Pascale, Abdel, Béatrice, Marie-Hélène, Françoise, Benoît, Julia, Mickaela, Jérome mais aussi toutes les autres personnes que j'ai côtoyées pendant cette période.

Enfin toute ma reconnaissance va à mon mari, Thierry et mes enfants, Guillaume et Ronan qui m'ont supportée, tout au long de cette aventure, dans tous mes états:

- *Pois cassé* errant dans l'immensité peuplée d'ombres à la recherche d'un directeur de thèse.
- *Pois grimpant* avec la bonne progression des manips.
- *Pois fourrager* pour démêler les vrilles de la bibliographie.
- *Pois sauteur* pour rebondir après des situations difficiles ou pour attraper l'ATP !
- *Pois potager* moelleux pour apprendre à encaisser les coups et pour déguster le côté sucré de l'entraide.
- *Pois ridé* lors de la programmation de nuit, de certaines mesures de germination !
- *Pois déshydraté*, léger, euphorique ayant trop abusé de l'oxygène, lors de l'obtention de résultats intéressants, mais jamais « mito » !
- *Pois chiche* partant pour le monde de l'anhydrobiose.
- *Pois de senteur* avec une explosion d'hypothèses ou d'explications soulevées.
- *Pois gourmand* pour apprécier le croquant de certaines situations.

Dédicace

A Thierry, Guillaume et Ronan : Il n’y a pas d’âge pour se lancer des défis !

A mes étudiants : *Il est bien des choses qui ne paraissent impossibles que tant qu’on ne les a pas tentées (*André Gide).

Préface

La vie engendre la vie
L'énergie produit l'énergie.
C'est en se dépensant soi-même que l'on devient riche.

Sarah Bernhardt

Table des Matières

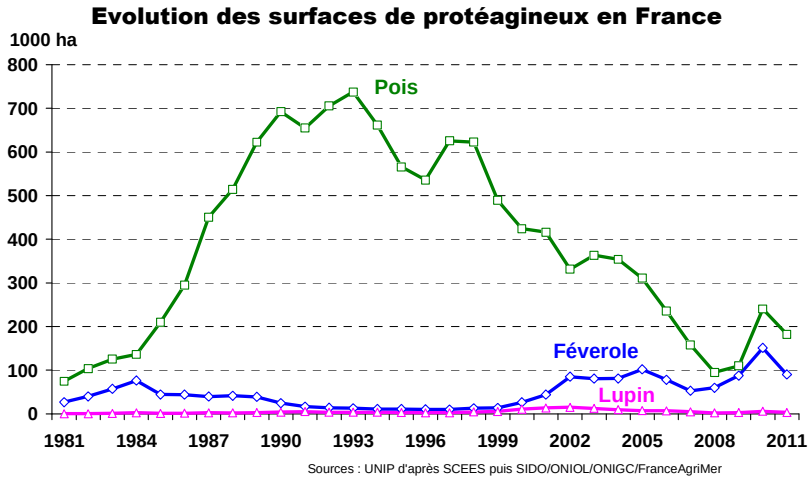
1. INTRODUCTION 11
   1.1. Contexte et enjeux 12
   1.2. Objectifs de la thèse 13
2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 15
   2.1. Importance agro-économique du pois 16
      2.1.1. Culture dépendante des politiques 16
      2.1.2. Services éco-systémiques du pois 16
      2.1.3. Les défis à relever 17
   2.2. Germination 18
      2.2.1. L'imbibition 18
      2.2.2. Températures cardinales, température de base et temps thermique 19
      2.2.3. Aptitude à la conservation 20
   2.3. Reprise du métabolisme énergétique 21
      2.3.1. Respiration 21
      2.3.2. Adenylates 24
   2.4. Oligosaccharides de la famille du raffinose (RFO) 25
      2.4.1. Composition des graines 27
      2.4.2. Rôle des RFO 28
   2.5. Stress et mécanismes de réparation 29
      2.5.1. Stress chez les graines 29
      2.5.2. Stress au cours de la phase de dessiccation 31
      2.5.3. Effet des basses températures 32
3. EFFETS DE LA VITESSE DE DESSICCATION ET DU FROID SUR LA GERMINATION DU POIS 33
   3.1. Problématique 34
   3.2. Matériel et méthodes 34
      3.2.1. Production des graines 34
      3.2.2. Caractéristiques des graines 36
      3.2.3. Caractéristiques germinatives 37
      3.2.4. Analyses des données 38
      3.2.5. Analyses statistiques 39
   3.3 Germination des trois génotypes aux différentes températures 40
   3.4. Impact des vitesses de dessiccation sur la germination 42
      3.4.1. Modifications morphologiques 42
      3.4.2. Germination et faculté germinative 43
      3.4.3. Vitesse d'imbibition 44
      3.4.4. Aptitude à la conservation 46
   3.5. Discussion 48
4. PHYSIOLOGIE ET METABOLISME DE LA GERMINATION 52
   4.1. Problématique 53
   4.2. Matériel et méthode 54
      4.2.1. Respiration des fragments et des axes embryonnaires. 54
      4.2.2. Respiration des graines entières 55
      4.2.3. Fonctionnement des mitochondries 56
      4.2.4. Dosage des adénylates 57
      4.2.5. Dosage des sucres 60
      4.2.6. Analyses Statistiques 62
   4.3. Respiration mitochondriale 63
      4.3.1. Respiration des fragments 63
         4.3.1.1. Imbibition des fragments 63
         4.3.1.2. Reprise de la respiration des fragments au cours de l'imbibition 64

4.3.1.3. Influence de la température sur la respiration des fragments 66
4.3.2. Respiration des axes 70
4.3.3. Respiration des graines entières 70
4.3.4. Stimulation de la respiration et réponses au stress 72
4.3.5. Altérations ou mécanismes de réparation 73
4.4. Adénylates 75
4.4.1. Composition initiale 75
4.4.2 …. Evolution des adénylates et production d'ATP dans la graine entière au cours de la germination 76
4.4.3. Cinétique de production d'ATP dans l'axe embryonnaire au cours de la germination 77
4.4.4. Evolution de la charge énergétique des adénylates (AEC) 79
4.4.5. Métabolisme énergétique et anhydrobiose 80
4.4.5.1. AMP forme de stockage des adénylates 80
4.4.5.2. AMP indispensable à l'amorce de la production d'ATP 82
4.4.5.3 …. Modèle de la régulation du métabolisme au cours de la dessiccation –réhydratation 84
4.5. Glucides 88
4.5.1. Composition initiale en sucres solubles 88
4.5.2. Evolution des RFO au cours de la germination 89
4.5.3. Evolution des RFO totaux et du saccharose au cours de la germination 91
4.5.4. Utilisation des sucres 93
4.6. Relations entre les différents aspects de la reprise du métabolisme 96
4.6.1. Contribution de la respiration à la production des ATP. 96
4.6.2. Contribution de la mobilisation des sucres à la respiration. 97
4.6.3. Contribution de la mobilisation des sucres à la production d'ATP. 98
4.7. Vitesse de germination et reprise du métabolisme 99
4.8. Discussion 101
5. DISCUSSION GENERALE 110

1. Introduction

1.1 Contexte et enjeux

Le pois est une légumineuse à fort intérêt économique en Europe, cependant, pendant plusieurs années consécutives une baisse importante des surfaces de production en France est constatée avec moins 70% entre 2004 et 2008 (Fig. 1). Les raisons de cette diminution des surfaces sont de deux ordres, une liée au contexte politique et l'autre aux rendements irréguliers de cette culture (Fig. 1). Au niveau politique, le soutien de cette culture et des protéagineux en général, est épisodique. En raison de différents accords, la France et l'Europe ont privilégié les cultures de céréales alors que l'Amérique, en particulier les USA, développait les cultures de protéagineux. Au début des années 70, suite à l'embargo américain, la volonté politique de développement en France et en Europe des protéagineux s'est manifestée afin d'éviter l'augmentation de la dépendance au soja américain pour les aliments riches en protéines (Cavaillès 2009). La réforme de la PAC (Politique Agricole commune) de 2006, supprimant le lien entre aides et production pour 75% des subventions, a entrainé une réduction des aides de 4% en 2006 et de 5% en 2007 pour les protéagineux. Au niveau agronomique, les rendements fluctuent d'une année sur l'autre en raison de stress biotiques ou abiotiques (Fig. 1).



Source UNIP.

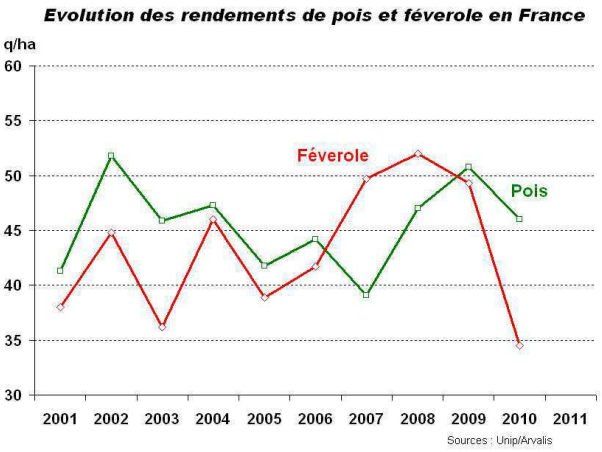


Figure 1: Evolution des surfaces cultivées et des rendements du pois.

http://www.unip.fr/marches-et-reglementations/statistiques-france/surfaces-rendeme nts-et-productions.html

La culture du pois peut présenter des atouts considérables, permettant de répondre aux problématiques actuelles de recherche de produits riches en protéines, de plantes écologiques avec des cultures à faibles intrants en particulier sur la nutrition azotée puisque le pois est capable de fixer l'azote atmosphérique, tout en permettant de réduire les apports azotés sur la culture suivante. De même, le positionnement de son cycle dans nos pays tempérés en fait une culture peu gourmande en eau.

La mobilisation des politiques, des sélectionneurs, des chercheurs et de l'interprofession a permis la relance de la culture du pois en 2010 avec le doublement de la sole (Omnès 2011). Cependant l'enjeu reste fort car les aides financières sont programmées jusqu'en 2012, et la filière protéagineux doit pérenniser cette relance en particulier en améliorant la maîtrise des rendements et de la qualité des graines de la culture.

Une des stratégies envisagées pour limiter la fluctuation des rendements est la réalisation de semis précoces qui permet d'allonger le cycle des pois de printemps Vocanson et Jeuffroy 2008), d'éviter les stress hydriques et thermiques de fin de cycle (Siddique et al. 2001, Felter et al. 2006, Annicchiarico et Iannucci 2008) de plus en plus fréquents avec le changement climatique, et de limiter les ravageurs en préconisation bio (pucerons et sitones : srva.ch/docs/ft/132.pdf fiche 10.52). Le raisonnement sur l'allongement du cycle de développement et sur l'évitement des stress de fin de cycle est poussé à son maximum en envisageant le développement de pois semés à l'automne, appelés aussi pois d'hiver (Lejeune-Hénaut et al. 2005). Les semis d'automne permettent d'augmenter le rendement en grain d'environ 1t/ha (Vocanson et Jeuffroy 2008). Dans ce contexte, l'un des objectifs majeurs de la sélection des pois d'hiver est d'améliorer la tolérance au gel au stade végétatif. Cependant, l'installation de la culture est un point important dans le déroulement du cycle cultural (Schneider 1998). Les basses températures lors des semis précoces de printemps peuvent handicaper l'établissement de la culture (lenteur, pertes importantes de plantules; Hou et Romo 1998). Aussi est-il nécessaire d'approfondir les connaissances sur les réponses et les mécanismes qui conduisent à la germination et à l'installation des plantules en conditions de basses températures, et sur la variabilité génétique existant au cours du déroulement de ces étapes très précoces afin de chercher à en assurer un meilleur déroulement.

1.2 Objectifs de la thèse

Le changement des conditions de semis des pois protéagineux implique une meilleure connaissance des mécanismes conduisant à la première phase de l'installation de la culture : la germination.

Le premier objectif est d'étudier le comportement de différents génotypes, et d'identifier s'ils présentent des différences de réponse en fonction de la température, au cours de la germination. Pour séparer la part génotypique de la part environnementale de la réponse, différentes conditions de production des graines ont été étudiées. Par ailleurs, en raison des effets du changement climatique, la graine au cours de sa formation risque de plus en plus fréquemment de subir un stress thermique de fin de cycle qui accélère sa

vitesse de dessiccation après le stade fin de remplissage du grain (FRG). Un second objectif est donc de déterminer l'impact de la vitesse de dessiccation à température relativement élevée (30 °C) sur les caractéristiques des graines, leur germination en conditions optimales ou aux basses températures ainsi que sur leur conservation. Chez le haricot, Moreau-Valancogne et al. (2007) ont en effet montré qu'une augmentation des vitesses de dessiccation entraînait une baisse de l'aptitude à la conservation des graines.

Dans un deuxième temps, nous avons exploré différents mécanismes de la reprise du métabolisme énergétique pour mieux comprendre le déroulement de la germination en condition optimale et aux basses températures pour les différents génotypes étudiés et selon leur vitesse de dessiccation. Plus globalement, nous essayerons d'identifier les étapes clés précoces qui conduisent à une vitesse de germination rapide des pois protéagineux.

Les objectifs sont tout d'abord replacés dans le cadre d'une étude bibliographique. L'importance économique du pois, le contexte et les enjeux de ce travail seront évoqués. Ensuite, différents éléments de la germination comme l'imbibition, les températures cardinales et l'aptitude à la conservation seront présentés. La reprise du métabolisme, les stress et les mécanismes de réparation seront plus particulièrement détaillés. La présentation des travaux menés dans la thèse fait l'objet ensuite de deux grandes parties, la première sur les effets de la vitesse de dessiccation et du froid sur la germination du pois et la seconde sur la physiologie et le métabolisme de la germination du pois. Chaque partie comprend la démarche utilisée, les résultats obtenus et une discussion. La discussion générale permettra d'esquisser un schéma global avec les étapes clés de la germination intégrant l'impact des conditions environnementales étudiées.

2. Etude bibliographique

2.1 Importance agro-économique du pois

2.1.1 Culture dépendante des politiques

Dans les années 70, lors de la mise en place de l'embargo sur les oléagineux par les Etats-Unis, l'Europe et la France prennent conscience de leur trop forte dépendance au soja américain. En effet, les tourteaux de soja américains constituaient la principale ressource de matières riches en protéines pour l'alimentation animale. Cette situation a entraîné la mise en place de dispositifs européens garantissant des prix compétitifs pour les légumineuses à graines, contribuant à une forte augmentation des surfaces cultivées (x8 entre 1974 et 1988). Cet élan s'arrêtera avec la réforme de la PAC de 1992 qui s'avère défavorable aux protéagineux. La chute des surfaces ne pourra pas être enrayée par la prime « protéagineux » en 2004. L'indexation de son prix à celui du blé et du tourteau de soja, la plus faible progression de rendement par rapport à celle du blé et l'infestation des parcelles à haut rendement par un champignon (Aphanomyces euteiches) a abaissé la compétitivité du pois.

Néanmoins, dans un contexte changeant incluant une prise en compte de l'impact environnemental de la production agricole, la réflexion sur le coût et l'impact du transport des produits, une hausse des prix des intrants, une réduction des aides aux céréales, et une vigilance accrue sur la sécurité alimentaire, les cultures de légumineuses retrouvent un intérêt au niveau des politiques. La mise en œuvre du bilan santé de la PAC va dans ce sens et une enveloppe de 40 millions d'euros par an est consacrée au financement d'aides de 2010 à 2012 pour trois cultures de légumineuse à graines, le pois, la fèverole et le lupin (Cavaillès 2009).

2.1.2 Services éco-systémiques du pois

Outre l'intérêt de l'intégration du pois dans les régimes alimentaires des animaux d'élevage (des ruminants Salawu et al. 2002, Vander Pol et al. 2009 ; des ovins Adesogan et al. 2002 ou de la volaille Palander et al. 2006) l'utilisation du pois permet une bonne lisibilité par rapport au label biologique garantissant un produit non OGM ou bien adapté à la croissance plus lente des volailles avec des labels rouge ou fermier (Munier-Jolain et Carrouée 2003). De plus, une bonne digestibilité de l'azote et des phosphores permet de réduire les problèmes d'eutrophisation liés aux rejets des élevages. En plus de ces critères qualité, la culture du pois présente différents atouts éco-systémiques. Cette culture est moins consommatrice en eau qu'une culture de soja ou de maïs de part la position de son cycle cultural, elle est à faible consommation en énergie fossile et en intrants chimiques (Munier-Jolain et Carrouée 2003). L'économie des engrais azotés est possible grâce à la capacité de fixation de l'azote atmosphérique du pois. Cet atout est particulièrement exploité dans les systèmes d'association de culture comme les cultures associées pois-céréales qui permettent d'optimiser les apports azotés et de combiner une haute productivité et des services écologiques (Naudin et al. 2010) tout en limitant le développement des adventices (Corre-Hellou et al. 2011). De façon plus générale, les impacts de l'introduction des légumineuses à graines dans les successions de cultures ou de leur introduction plus élevée dans l'alimentation animale ou humaine, évalués par l'étude des cycles de vie, montrent une réduction de l'énergie utilisée, du potentiel de réchauffement global, de la formation d'ozone, de l'acidification des sols, et une

augmentation de la marge brute (Munier-Jolain et Carrouée 2003, Nemecek et al. 2008). La relance des légumineuses permettrait la diversification des successions de cultures entrainant une réduction de la pression parasitaire, une amélioration de la qualité des sols, un maintien de la biodiversité (Cavaillès 2009), et une meilleure gestion de la flore adventice (Munier-Jolain et Carrouée 2003). Comme pour les autres cultures, les lixiviations avant et après la culture du pois doivent être maîtrisées. La culture des pois d'hiver, quand elle est possible, permet de réduire le lessivage de l'azote de la culture précédente. Cependant il existe un risque important de lessivage après la récolte du pois. La culture d'une céréale d'hiver, de betterave ou de culture intermédiaire piège à nitrates (Cipan) doivent viser à empêcher de telles fuites de nitrates et à valoriser cet azote fixé par les légumineuses, sachant de plus que la majorité de la minéralisation des tiges et racines de pois se déroule au printemps (Munier-Jolain et Carrouée 2003).

2.1.3 Les défis à relever

La culture des légumineuses à graines présente des atouts considérables pour répondre aux attentes de la société et des utilisateurs mais des avancées doivent être faites pour le maintien du rendement et de la qualité des grains. Un des préjudices important pour la culture du pois est le développement de la maladie provoquée par un champignon du sol Aphanomyces euteiches pour lequel aucun moyen de lutte efficace n'est connu (Munier-Jolain et Carrouée 2003, Cavaillès 2009). Les autres facteurs affectant le rendement dans nos régions sont le froid durant les premiers stades, la sécheresse et les fortes températures en fin de cycle. Les performances de nombreux cultivars de pois sont considérablement affectées par le froid, en particulier les variétés précoces, les lignées avec de long entre-nœuds, des surfaces foliaires importantes ou avec des graines ridées (Cousin 1997). Les lignées tolérantes au froid sont issues du transfert du caractère quantitatif de résistance au froid d'un faible nombre de génotypes provenant d'espèces de pois sauvage ou de pois fourrager comme Champagne et Haute-Loire en France (Cousin 1997). La réussite d'une culture de pois d'hiver est un compromis entre un semis précoce à l'automne mais qui n'entraîne pas un développement végétatif trop important, la meilleure tolérance au froid de l'hiver se situant au stade rosette (Lejeune et al. 2005, Dumont et al. 2011). Elle demande surtout une maîtrise de la floraison, l'initiation florale et la floraison étant dépendants de la température et/ou de la photopériode. La présence d'un gène dominant Hr, dans le génome de ces variétés, permet de contrôler l'initiation florale grâce à leur sensibilité à la photopériode (Lejeune-Hénaut et al. 1999). Les plantes n'évoluent vers une phase de reproduction que lorsque la durée du jour dépasse le seuil de 13,5 h (en avril). Ce gène provient des pois fourragers et de nombreuses variétés de pois d'hiver dérivent de Champagne : Kasar, Amac, Frisson, Frimas (Lejeune-Hénaut et al. 1999). La culture du pois d'hiver a permis l'extension de la zone de production en France et l'allongement du cycle, permettant ainsi d'augmenter le potentiel du rendement dans le cas d'une bonne maîtrise des parasites et des adventices (Munier-Jolain et Carrouée 2003). L'autre facteur important est la sécheresse qui selon la période où elle se produit peut compromettre la fixation de l'azote et diminuer la production de biomasse (Cousin 1997) mais aussi raccourcir la période de floraison en bloquant la production de nouveaux nœuds reproducteurs entrainant une baisse de rendement (Guilioni et Jeuffroy 2005).

2.2 Germination

La germination est une étape primordiale qui comprend l'imbibition et la reprise du métabolisme de la graine et au final l'émergence de la radicule de l'embryon. Ce rétablissement métabolique, l'émergence de la radicule et la préparation pour la croissance ultérieure de la plantule supposent des processus de synthèse et de protection impliquant les composants initialement stockés dans la graine (Bewley et Black 1994, Nonogaki et al. 2010).

La germination se décompose en trois grandes phases (Fig. 2). La phase I est caractérisée par une entrée importante d'eau et une consommation forte en oxygène permettant la reprise du métabolisme. La phase II correspond au plateau métabolique, avec la mise en place des évènements métaboliques pour la préparation de l'émergence de la radicule. La phase III indique la fin du processus de germination avec la percée de la radicule à travers le tégument de la graine et est caractérisée par la croissance de la plantule. La mobilisation des réserves lipidiques et amylacées de la graine se font tardivement alors que la dégradation des oligosaccharides est terminée après trois jours de germination (Pois-chiche: El-Adawy 2002).

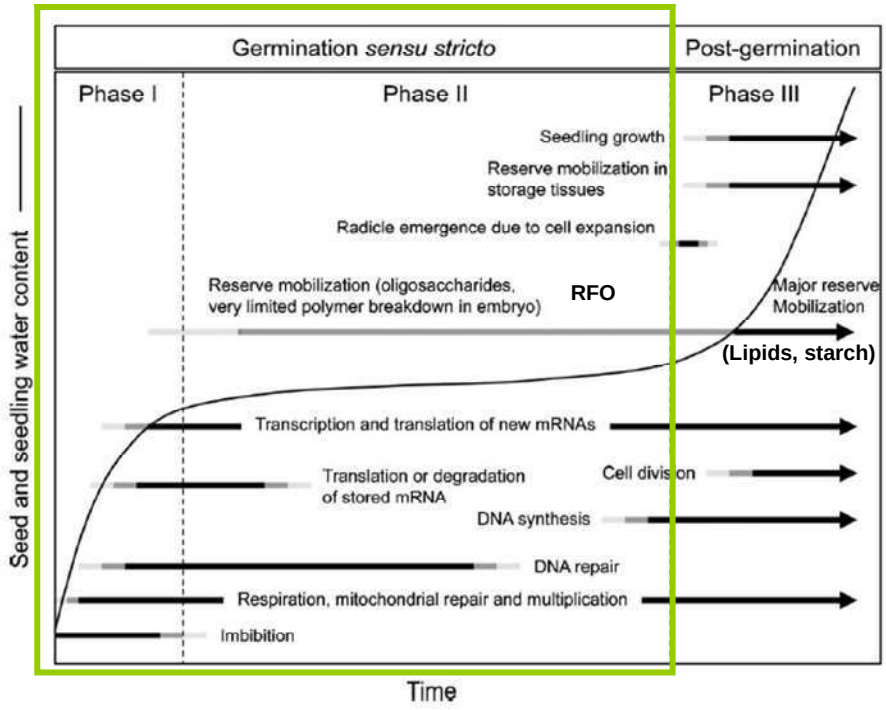


Figure 2: Déroulement dans le temps des évènements physiques et métabolique pendant la germination (phases I et II) et le début de la croissance de plantule (Phase III) (d'après Nonogaki et al. 2010, El-Adawy 2002).

2.2.1 L'imbibition

Pour la reprise du métabolisme, il est indispensable que les cellules soient réhydratées. Cependant, l'imbibition des graines doit se faire progressivement pour éviter les dégâts d'imbibition, en particulier chez les légumineuses qui sont sensibles à ce problème. Les dégâts sont particulièrement sévères lorsque les teneurs en eau initiales de la graine sont inférieures à 11% (soja: Hobbs et Obendorf 1972, haricot: Wolk et al. 1989) et

ils sont moins importants lorsque les graines de soja ont une teneur en eau de 12-17% au moment où elles commencent leur imbibition (Koizumi et al. 2008). Le rôle du tégument de la graine est important car il régule l'entrée d'eau dans les tissus de la graine, évitant des destructions cellulaires en début d'imbibition (Duke et Kakefuda 1981, Duke et al. 1983). Cette entrée d'eau contrôlée permet la reconstitution de l'organisation membranaire (Koizumi et al. 2008). Au stade graine sèche, avec une teneur en eau de 9%, seuls les axes embryonnaires montrent quelques traces d'eau sur les images RMN (Résonance magnétique nucléaire ; Wojtyla et al. 2006). L'eau entre par le hile et le micropyle chez le pois (Wojtyla et al. 2006) et le lupin (Garnczarska et al. 2007) alors que chez le soja l'eau pénètre en premier sur la face dorsale, à l'opposé du hile puis gagne le hile et micropyle (Koizumi et al. 2008). Chez les trois espèces, au bout d'une heure d'imbibition, l'eau est présente entre le tégument et les cotylédons, et se retrouve très rapidement dans l'axe embryonnaire. Chez le pois, l'hydratation de l'embryon commence par la radicule (Wojtyla et al. 2006). L'hydratation des cotylédons est similaire chez le pois, le lupin et le soja; elle commence par la face abaxiale (parties bombées) et progresse vers l'intérieur, un espace rempli d'air entre les faces adaxiales des cotylédons est maintenu pendant les six premières heures d'imbibition (Wojtyla et al. 2006, Koizumi et al. 2008).

2.2.2 Températures cardinales, température de base et temps thermique

La vitesse de germination est influencée par des facteurs environnementaux, en particulier la température. La courbe de réponse à la température peut être ajustée à différentes fonctions mathématiques qui sont utilisées pour estimer les trois températures cardinales : la température minimale, optimale et maximale. Les températures minimale et maximale, interceptant l'axe des abscisses indiquent les températures seuils ne permettant plus la germination. La température optimale est la température permettant la plus grande rapidité de germination. Différents modèles mathématiques peuvent être appliqués. Des modèles intégrant deux régressions linéaires, la température optimale étant donnée par l'intersection des deux droites, sont simples d'utilisation mais pas toujours précis et surestiment dans certains cas la valeur de la température minimale ou maximale. Des modèles non linéaires ont été utilisés comme la fonction Beta permettant de retrouver les courbes, en forme de cloche asymétrique, obtenues expérimentalement, avec une accélération de la vitesse aux basses températures, une section linéaire avant un optimum et une chute rapide après l'optimum (Fig. 3; Yin et al. 1995).

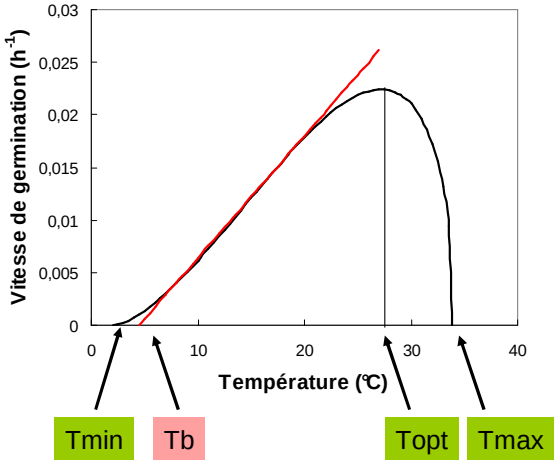


Figure 3: Fonction Beta pour modéliser la vitesse de développement en fonction de la température (d'après Yin et al. 1995).

La température de base de germination est calculée en prenant en compte la partie linéaire de la courbe de réponse à la température de la partie ascendante qui conduit à la température optimale (Gummerson 1986, Dahal et Bradford 1994). Cette valeur seuil donnée par ajustement mathématique correspond à la température en deçà de laquelle la vitesse de germination est considérée comme nulle. Cette température de base (Tb) est une notion très utilisée en agronomie pour le calcul du temps thermique (degrés-jours) permettant d'estimer la durée des différentes phases de développement, et donc d'en prédire les dates, bien que le climat puisse varier d'une année sur l'autre ou d'un lieu à l'autre (Bonhomme 2000, Trudgill et al. 2005). Ce temps thermique reste un bon outil de prévision car les valeurs pour une phase sont identiques malgré des différences de températures (Covell et al. 1986, Gummerson 1986, Wang et al. 2004), à condition qu'une relation linéaire existe entre la vitesse de développement et la température, du calcul correct de la valeur seuil et de l'absence d'autre facteur limitant (Bonhomme 2000).

La capacité à germer et à émerger précocement au printemps grâce à une température seuil de germination (minimale ou de base) basse est l'une des adaptations possibles pour la survie et l'établissement dans des zones présentant des conditions environnementales difficiles (Hou et Romo 1998b, Wang et al. 2004).

2.2.3 Aptitude à la conservation

La qualité d'une graine ne se résume pas à une bonne qualité sanitaire ou à une bonne capacité à germer, mais elle doit aussi maintenir cette capacité à germer au cours du stockage. Cette capacité est appelée aptitude à la conservation ou longévité. Le test de détérioration contrôlée permet d'estimer expérimentalement cette aptitude à la conservation en accélérant considérablement la vitesse de vieillissement des graines (Clerkx et al. 2003, Rajjou et Debeaujon 2008). Les graines, après équilibration à 85% d'humidité relative (HR) à 15°C, sont placées dans des enceintes à 85% d'HR à 40°C pendant des temps variables. Elles sont ensuite séchées à 32% HR à 20°C. Après semis, le pourcentage final de germination est mesuré après 14 jours (Clerkx et al. 2004). Bien que ce test permette d'obtenir une valeur prédictive de la longévité de la graine, ces auteurs ont montré que ce test ne mime pas complètement la détérioration se produisant au cours du stockage sous des conditions ambiantes (Clerkx et al. 2004). La raison invoquée est que les cinétiques de vieillissement des graines et l'importance des processus de dégradation provoqués, varient en relation avec la température mais aussi avec la teneur en eau des graines (Walters 1998). Avec une humidité élevée de 100% et 45°C pour des conditions de vieillissement des graines, la teneur en eau des graines de soja atteint 26% dès le cinquième jour (Krishnan et al. 2004). Des tests de détérioration contrôlée sur des graines à teneur en eau constante (16%) ont également été mis au point pour le haricot (Moreau-Valancogne et al. 2007).

Le maintien d'une aptitude à la conservation élevée dépend de différents facteurs environnementaux et génétiques. Au sein de la graine, une grande diversité de systèmes existe pour la conservation de ce haut potentiel germinatif. Rajjou et Debeaujon (2008) les ont classés en trois grandes catégories (Fig. 4). Le premier système implique la protection contre les stress abiotique ou biotique avec un rôle important des téguments de la graine, des composés chimiques et des protéines de protection. Le deuxième type de système assure les réparations des structures importantes de la cellule (membranes, ADN, protéines, …). Le troisième système joue sur la détoxification par élimination de composés toxiques à haute concentration comme les ROS (Reactive oxygen species).

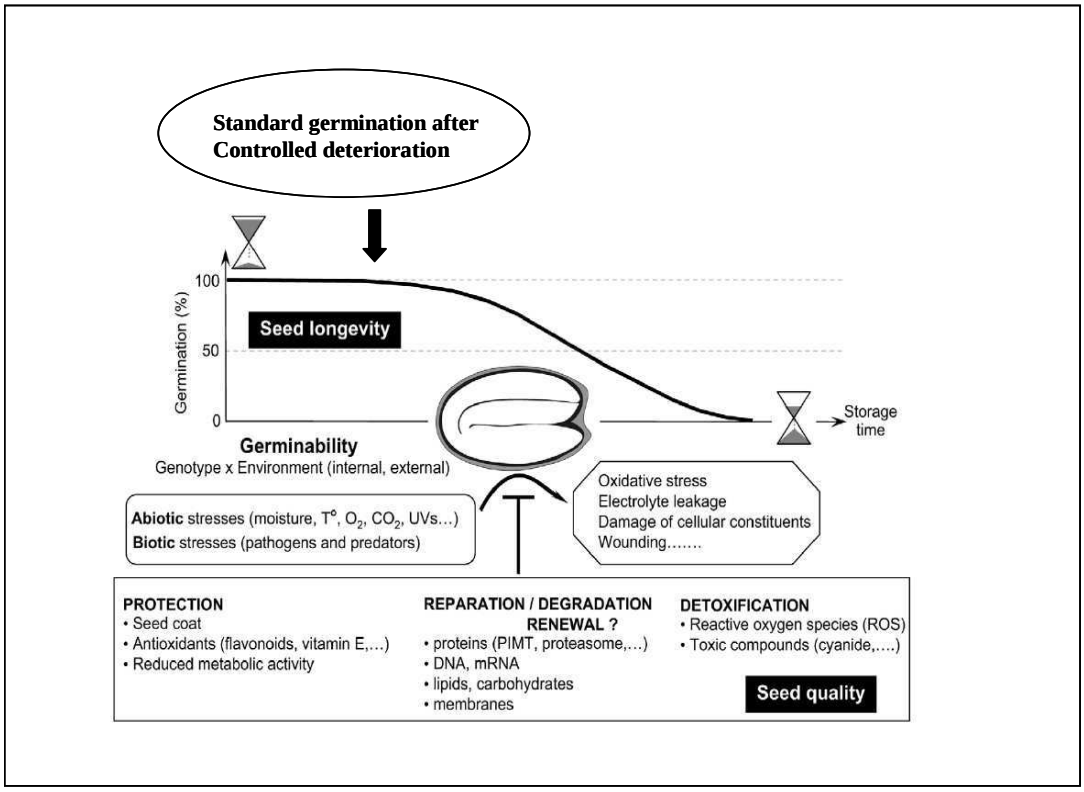


Figure 4 : Eléments influençant la longévité de la graine (d'après Rajjou et Debeaujon 2008, Clerkx et al. 2003).

2.3 Reprise du métabolisme énergétique

Le basculement de l'état quiescent vers l'état de métabolisme très actif se manifeste en particulier par une forte consommation en oxygène, une reprise de la phosphorylation oxydative et par la mobilisation des réserves (Wojtyla et al. 2006).

2.3.1 Respiration

Un des tout premiers processus de la germination, concomitant à l'imbibition est la reprise de la respiration avec le rétablissement du fonctionnement des mitochondries (Fig. 5). La consommation d'oxygène au cours des premières phases de germination est en lien avec la respiration mitochondriale (Attuci et al. 1991, Benamar et al. 2003). Dans les cellules déshydratées, les mitochondries apparaissent très réduites et les enveloppes membranaires sont peu visibles au microscope électronique (Attuci et al. 1991). Après imbibition, la mitochondrie retrouve sa forme initiale avec une membrane externe, perméable aux ions et à différentes petites molécules, et avec une membrane interne dont les invaginations forment des crêtes dans la matrice de la mitochondrie (Fig. 5). Au niveau de la membrane interne, plusieurs complexes de I à V forment la voie respiratoire de la cytochrome oxydase (COX) (Vedel et al. 1999, Moore et al. 2002). Les complexes de I et II sont des déshydrogénases (du NADH pour le complexe I, du succinate pour le complexe II) qui transfèrent des électrons à l'ubiquinone (UQ), qui les transmet au complexe III. Les

électrons transitent ensuite via le cytochrome c vers le complexe IV, la COX, qui catalyse la réaction finale de la chaine respiratoire avec la réduction de l'oxygène en eau. D'autres déshydrogénases supplémentaires (ND2, Type II NAD(P)H déshydrogénase) existent dans les mitochondries végétales, assurant également la réduction des UQ. La libération d'énergie au cours du transfert des électrons permet l'expulsion de protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire, créant un gradient avec une concentration extérieure plus forte par rapport à la matrice puisque la membrane interne est imperméable aux protons. L'énergie potentielle de ce gradient est appelée force proton-motrice car elle sera utilisée avec le retour des protons vers la matrice, pour la formation d'ATP par le complexe V, une ATP synthétase. La formation de l'ATP dépend de cette force proton-motrice établie par le transfert d'électron, il y a donc couplage entre le transfert l'électron et la phosphorylation.

Une forte consommation d'ATP par le métabolisme maintient ce gradient en stimulant le transfert des électrons et l'expulsion des protons vers l'espace inter-membranaire et donc accroit la consommation en oxygène. Lorsque ce gradient est trop élevé, provoqué par une inhibition du retour des protons en lien avec une faible utilisation de l'ATP formé, le transfert des électrons va ralentir ainsi que la consommation en oxygène. Des voies de découplage existent naturellement avec la présence de protéines UCP (uncoupling protein : protéines découplante) Fernie et al. 2004, Voinikov et al. 2006, Atkin et Macherel 2008, Grant et al. 2008) ou PUMP (Calegario et al. 2003, Grabelnych et al. 2003), protéines qui permettent aux protons de revenir vers la matrice sans passer par l'ATP synthétase. Ces gènes ne sont pas inductibles par le froid (Grabelnych et al. 2003) mais les protéines sont régulées par les acides gras libres qui augmentent avec les basses températures. Les céréales ont un système thermogénique avec les protéines CSP310 qui transfèrent les électrons du complexe I au complexe IV limitant l'expulsion des protons, l'énergie est libérée sous forme de chaleur (Voinikov et al. 2006). Cette protéine est inductible par le froid chez le blé d'hiver mais est absente chez le pois (Voinikov et al. 2006). Des produits chimiques peuvent aussi assurer le découplage comme le FCCP (Le p-trifluoromethoxy-carbonyl-cyanide-phenyl hydrazone) en dissipant artificiellement le gradient. Le transfert des électrons n'est alors plus dépendant de la formation d'ATP qui est l'étape la plus limitante et donc le transfert des électrons peut s'exprimer à son maximum. Différents facteurs, comme les basses températures, la limitation en phosphates, la concentration en dioxyde de carbone peuvent ralentir la Cytochrome oxydase (COX) (Millenaar et Lambers 2003), ou l'inhiber comme les sulfures ou l'oxyde nitreux (Grabelnych et al. 2003, Millenaar et Lambers 2003), le cyanure (Leopold et Musgrave 1979, Azcon-Bieto et al. 1983, Amable et Obendorf 1986).

Une autre particularité des mitochondries végétales, outre la présence des déshydrogénases de type ND2, est celle d'une deuxième voie respiratoire qui implique une autre oxydase, l'oxydase alternative (AOX), qui prélève directement des électrons des ubiquinones pour réduire l'oxygène en eau (Moore et al. 2002, Millenaar et Lambers 2003, Gupta et al. 2009, Rasmusson et al. 2009). Cette voie n'est pas sensible aux mêmes facteurs que la voie COX. Elle est en particulier insensible au cyanure mais est inhibée par l'acide salicyl-hydroxamique (SHAM) (Leopold et Musgrave 1979, Azcon-Bieto et al. 1983, Amable et Obendorf 1986, Attuci et al. 1991, Ito et al. 1997). Cette voie est en concurrence avec celle de la COX pour les électrons, au niveau des ubiquinones, les électrons sont déviés vers l'AOX au lieu de passer par le complexe III de la voie COX. Cette voie consomme de l'oxygène mais ne permet pas l'expulsion des protons et donc n'est pas phosphorylante, l'énergie étant dissipée sous forme de chaleur (Moore et al. 2002, Millenaar et Lambers 2003). Cependant, cette concurrence pour l'oxygène n'est pas

pénalisante car l'affinité pour l'oxygène est dix fois plus élevée pour la COX (McDonald et al. 2002, Gupta et al. 2009). L'AOX a de multiples rôles et semble stratégique dans la réponse aux stress. Un de ces premiers rôles est, comme pour les déshydrogénases, de maintenir un transport des électrons élevé pour éviter que des électrons s'accumulant au niveau des différents transporteurs (essentiellement complexes I et III) et génèrent des ROS (Fung et al. 2004, Gupta et al. 2009). L'engagement de la voie de l'AOX permettrait ainsi de limiter la production de ROS par la stabilisation de l'état rédox du pool d'ubiquinone mitochondrial, tout en permettant à la voie COX de contribuer à la phosphorylation oxydative (Millenaar et Lambers 2003, Rasmusson et al. 2009). Cette situation est également avantageuse, car en maintenant un flux important d'électrons indépendamment de la demande énergétique, les voies alternatives (ND2, AOX) permettent au cycle des acides tricarboxyliques (TCA ou cycle de Krebs) situé en amont (Fig. 6), de maintenir son activité (Moore et al. 2002, Millenaar et Lambers 2003, Fernie et al. 2004, Vanlerberghe et al. 2009). Ce découplage entre métabolisme du carbone et phosphorylation oxydative permet ainsi de fournir de précieux intermédiaires carbonés provenant du cycle TCA, qui sont nécessaires à différentes biosynthèses.

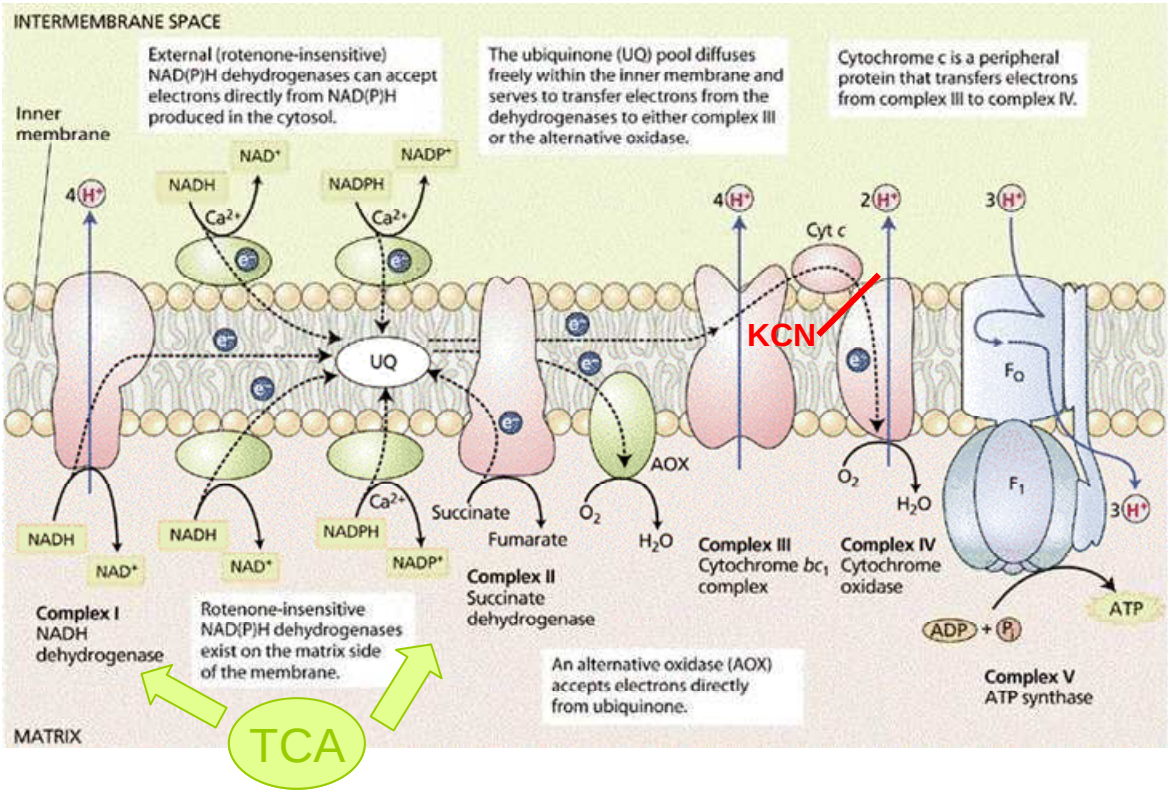


Figure 5 : Transport des électrons dans la chaine respiratoire (d'après Rasmusson et al. 4e.plantphys.net).

Différents travaux étayent l'idée que la voie de la respiration via l'AOX joue un rôle primordial dans la réponse à des stress abiotiques ou biotiques, ainsi que dans la régulation des voies de signalisation via la production de ROS (Vanlerberghe et al. 2009, Lei et al. 2010). En effet, l'AOX peut être induite par différents traitements comme les blessures, le froid, la sécheresse, le stress osmotique, les attaques de pathogènes mais aussi avec des traitements à l'acide salicylique, H_2O_2 et avec les inhibiteurs de la chaine respiratoire (Vanlerberghe et McIntosh 1992, Moore et al. 2002). Chez Arabidopsis exposé à des basses

températures, les plantes transgéniques avec des niveaux altérés de protéines AOX montrent une surface foliaire réduite alors que les plantes sur-exprimant l'AOX présentent une surface plus importante par rapport au témoin, ces différences disparaissant à températures ambiantes (Fiorani et al. 2005). La voie de l'AOX bien qu'elle ne soit pas phosphorylante intervient dans l'efficacité du transfert des électrons mitochondriaux car elle n'est pas liée à la force proton-motrice, et permettrait donc une adaptation rapide et flexible de la respiration mitochondriale. Cet ajustement de la respiration garantirait une charge énergétique stable et donc une croissance pratiquement constante sous des conditions environnementales variables (Hansen et al. 2002, Moore et al. 2002, Lei et al. 2010).

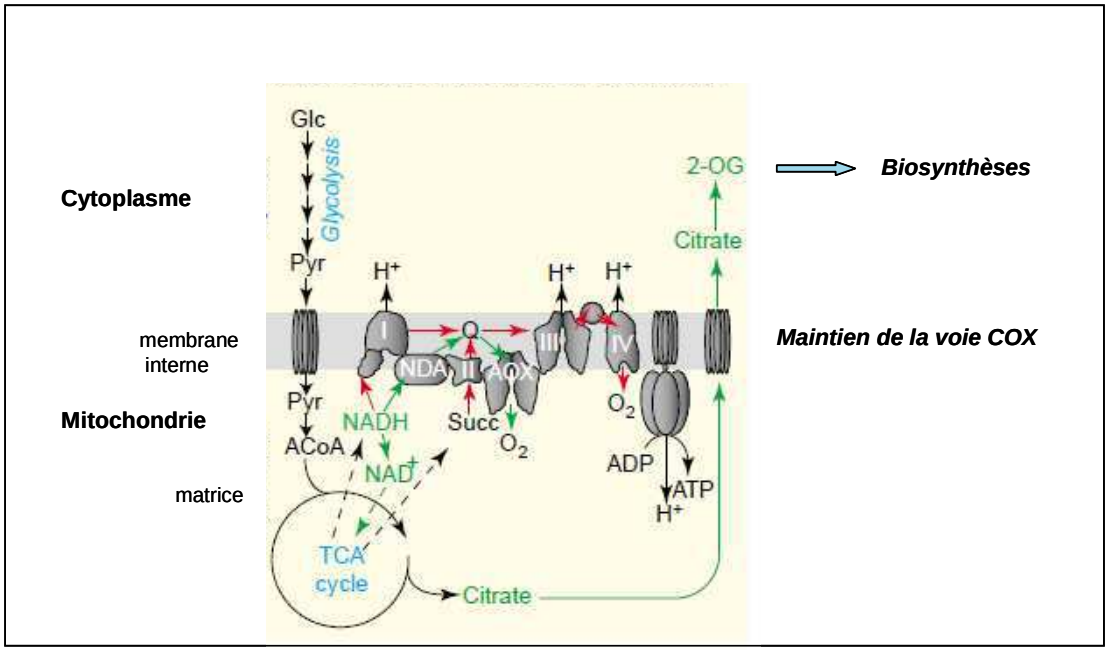


Figure 6 : Lien entre chaine respiratoire, cycle TCA et Glycolyse (d'après Fernie et al. 2004, Millenaar et Lambers 2003, Rasmusson et al. 2009).

2.3.2 Adenylates

La phase II de la germination est caractérisée aussi par la transcription et la traduction des ARN, par l'amorce de synthèses et la mobilisation des réserves en particulier des oligosaccharides (Fig. 2). Cette reprise de l'activité demande une production importante d'ATP. Dès l'imbibition des graines, la phosphorylation oxydative est le principal mécanisme de production d'ATP grâce à l'ATP synthétase utilisant la force proton-motrice (Fig. 5) (Attuci et al. 1991). Cependant un autre système, l'adénylate kinase (AK), localisée, entre autre, dans l'espace inter-membranaire des mitochondries végétales, permet aussi la production d'ATP (Fig. 7) (Attuci et al. 1991, Busch et Ninnemann 1997). Les deux systèmes peuvent être en concurrence pour un même substrat, l'ADP. La production d'ATP par l'AK est importante lorsque les concentrations en ADP sont élevées, reflétant un besoin énergétique important non satisfait par l'activité de la phosphorylation oxydative (Busch et Ninnemann 1997). Le fonctionnement de l'AK dépend aussi fortement de la présence d'AMP et de magnésium (Busch et Ninnemann 1997).

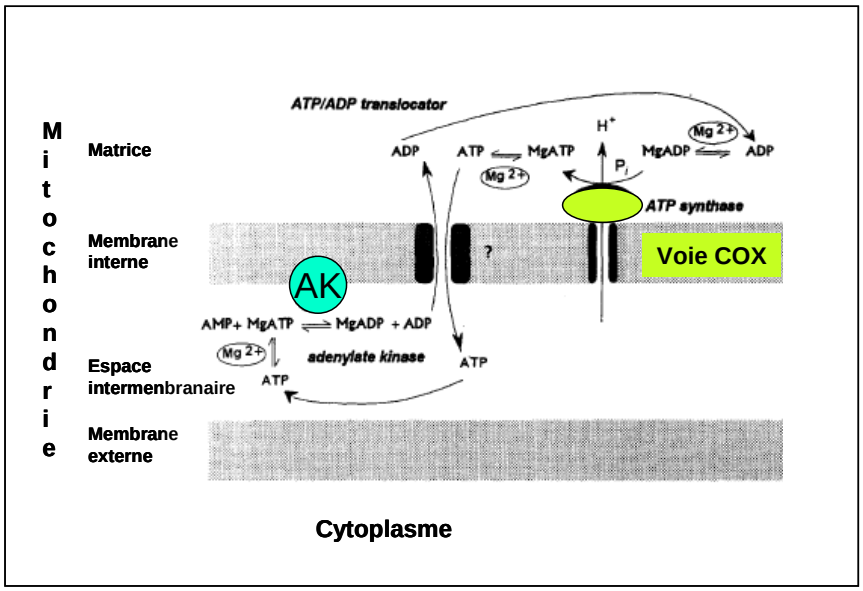


Figure 7 : Lien entre l'ATPase et l'AK (d'après Busch et Ninnemann 1997).

La charge énergétique en adénylate (AEC) permet d'estimer l'état énergétique d'un tissu ou d'un organisme (Pradet et Raymond 1983). L'AEC représente la saturation relative en liaisons phosphoanhydres du pool des adénylates. Lorsque l'AK est à l'équilibre, les groupements terminaux phosphates de l'ADP et de l'ATP sont considérés comme métaboliquement équivalents et l'AEC s'exprime par ce rapport : AEC = (ATP+ 0,5 ADP)/ (ATP+ADP+AMP). Les adénylates sont impliqués dans la régulation d'activités enzymatiques et l'AEC est aussi considéré comme un paramètre physiologique permettant la régulation de l'activité métabolique (Pradet et Raymond 1983, Oresnik et Layzell 1994, Borisjuk et al. 2003). Le pool d'ATP ou le rapport ATP/ADP sont deux autres indicateurs de l'état énergétique, ces deux indicateurs sont corrélés lorsque l'activité de l'adénylate kinase est à l'équilibre (Fader et Koller 1984, Borijuk et al. 2003). En effet, plus l'AEC augmente et plus l'activité des enzymes régulant les voies de l'utilisation de l'ATP, les enzymes « U », est élevée, alors que plus l'activité des enzymes régulant les voies de régénération de l'ATP, enzymes « R », decroît (Pradet et Raymond 1983). La régulation par les adénylates ou rapports d'adénylates se manifeste surtout pour les processus cellulaires à forte demande en énergie. La teneur en adénylates totaux et les rapports d'adénylates sont affectés par la concentration en oxygène (Oresnik et Layzell 1994). Cependant, au cours de la formation de la graine de soja, l'AEC n'est pas significativement corrélée avec la respiration des parois de la gousse, ou des cotylédons (Fader et Koller 1984). Dans la graine sèche, l'AEC est très faible de l'ordre de 0,24 pour le tournesol car les teneurs en AMP sont fortes (Corbineau et al. 2002).

2.4 Oligosaccharides de la famille du raffinose (RFO)

Les réserves glucidiques de la graine de pois sont constituées d'amidon et de glucides solubles. La majorité des glucides solubles sont présents sous forme de saccharose et d'oligosaccharides de la famille du raffinose (RFO) (Kuo et al. 1988), stockés dans la vacuole (Buckerdge et Dietrich 1996). Les graines sèches sont pratiquement dépourvues de

monosaccharides (Frias et al. 2003, Zalewski et al. 2010). Les RFO sont constitués de galactose fixé sur du saccharose, une unité de galactose pour le raffinose, deux unités pour le stachyose et trois unités pour le verbascose (Fig. 8, Fig. 9). Les RFO sont synthétisés par un groupe de galactosyl-transférases, qui ajoutent des galactoses au saccharose, produisant du raffinose et ses dérivés stachyose et verbascose, ces RFO sont accumulés au cours du remplissage de la graine (Fig. 10) (Peterbauer et al. 2001). Le repérage du stade FRG sur les courbes d'évolution des teneurs en eau des deux génotypes de pois, à environ 23 jours pour SD1 et 33 jours pour RRRbRb, montre que la synthèse du verbascose se poursuit après la fin du remplissage des grains.

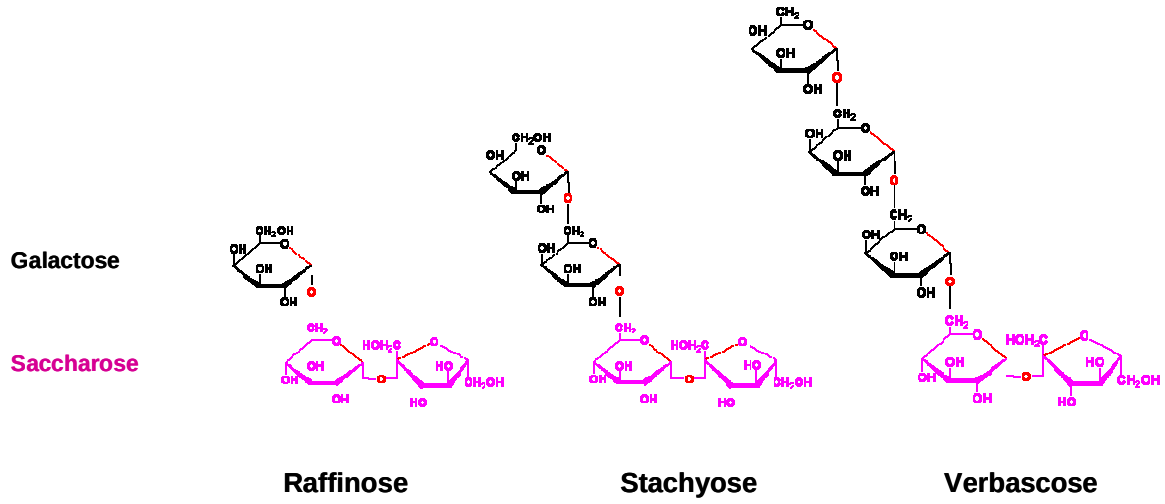


Figure 8 : Structure du raffinose, stachyose et verbascose (www.uky.edu/~dhild/biochem/10/lect10.html.

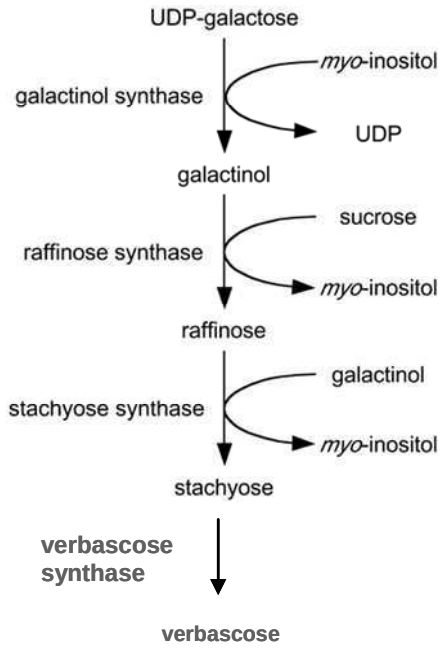


Figure 9 Voie de biosynthèse du galactinol, du raffinose, du stachyose chez les plantes (d'après Nishizawa et al. 2008, Peterbauer et al. 2001).

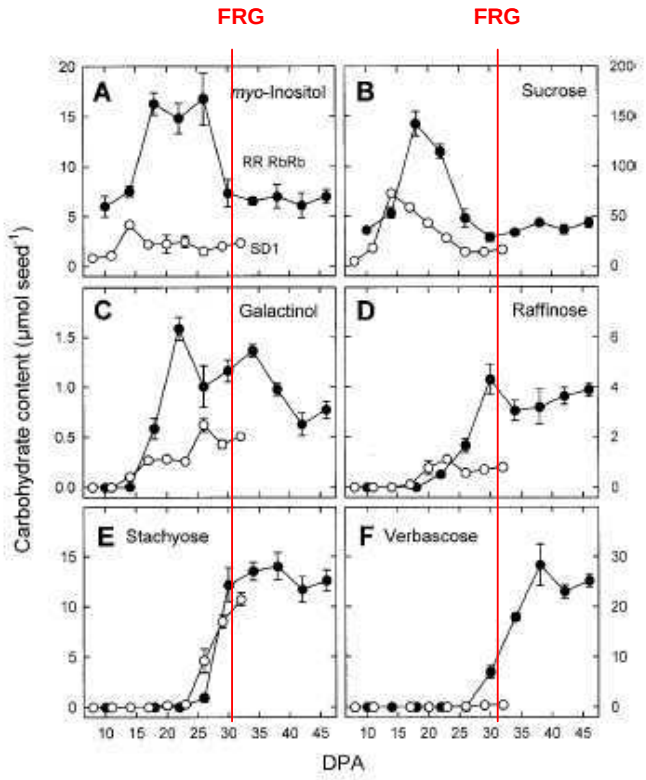


Figure 10 : Evolution des oligosaccharides au cours de la formation de la graine de deux génotypes de pois.

(RRRbRb symbole en noir, SDI symbole Blanc, d'après Peterbauer et al. 2001).

2.4.1 Composition des graines

Les RFO se rencontrent chez de nombreuses espèces avec des valeurs de 2% à 9% pour le coton, les légumineuses, le tournesol et certaines cucurbitacées, et avec des valeurs plus basses, inférieures à 1% pour le tabac, les céréales de grandes cultures, l'épinard et la betterave (Kuo et al. 1988). Au sein des légumineuses, les graines de pois et de soja présentent à maturité des quantités importantes de RFO (pois : 5,2-6,3 % et soja : 5,6 %) par rapport à d'autres légumineuses comme le haricot (0,61-3,3 %), la lentille (2,8 %) ou la fève (2,4 %) (Kuo et al. 1988, Vidal-Valverde et al. 2002). Une autre légumineuse, le lupin, s'avère très riche en RFO avec des teneurs de 5-16% (Piotrowicz-Cieslak 2006, Martinez-Villaluenga et al. 2005, Zalewski et al. 2010). La forme prédominante des sucres solubles dans la graine mature est variable d'une espèce à l'autre: le saccharose chez l'arachide et le haricot; le raffinose chez le coton et le tournesol; le stachyose chez *Vigna sinensis*, le soja et la lentille ; le verbascose chez le pois (Kuo et al. 1988, Vidal-Valverde et al. 2002, Tahir et al. 2011). Le verbascose, la forme des RFO la plus polymérisée, ne se retrouve pas chez toutes les espèces. Sur 29 espèces analysées appartenant à huit familles différentes, seules certaines légumineuses contiennent du verbascose: le pois potager (*Pisum sativum*), la dolique (*Vigna sinensis*), le haricot mungo (*Phaseolus aureus*), la fève (*Vicia faba*) et le lupin (*Lupinus albus*, L. *luteus* et L. *angustifolius*) (Kuo et al. 1988, Martinez-Villaluenga et al. 2005). Bien qu'appartenant aux légumineuses, les graines de soja, de luzerne, d'arachide, de haricot ou de lentille ne contiennent pas de verbascose ou uniquement à l'état de traces (Kuo et al. 1988, Vidal-Valverde et al. 2002).

La composition en RFO des graines varie selon le génotype et la taille des graines (Tableau 1) mais aussi selon les conditions de production (Burbano et al. 1999, Nikolopoulou et al. 2007, Kumar et al. 2010, Tahir et al. 2011). Des températures élevées au cours de la maturation entrainent une baisse de la teneur en RFO, alors que des

températures avec de fortes alternances jour-nuit stimulent la formation de RFO (Piotrowicz-Cieslak 2006).

Tableau 1 : Répartition des sucres solubles chez les graines de pois de différents génotypes.

Génotypes	Verb.	Stach.	Raf.	RFO	Sacch.	Unités	Ref
Little Marvel (potager)	1,91	3,2	1,2	6,3	6,2	%	Kuo et al. 1988
Esla	2,4	2,2	0,6	5,2	1,7	%	Vidal-Valverde et al. 2002
Lignée RRRbRb Axes	4,6	6,6	2,0	13,2	7,0	%	Lahuta et al. 2007
Lignée RRRbRb Cotylédons	3,5	1,4	0,5	5,4	2,7	%	Lahuta et al. 2007
Pois grimpant à maturation précoce cv. X475	P : 0,15 G : 0,08	P : 0,06 G : 0,23	P : 0,12 G : 0,38	P : 0,34 G : 0,69	P : 27,3 G : 21,0	%	Ekvall et al. 2006
Pois grimpant à maturation tardive cv. Finett	P : 0,24 G : 0,09	P : 0,14 G : 0,46	P : 0,17 G : 0,43	P : 0,55 G : 0,98	P : 25,4 G : 21,3	%	Ekvall et al. 2006
Profi	2,83	3,28	0.96	7,07	4.18	%	Kadlec et al. 2001
Kelvedon Wonder				21	20	µmol/ graine	Blöchl et al. 2007
Progreta (très lisse)	2.9	1.9	0.7	5.5	3.4	%	Cousin 1997
Countess (très lisse)	2.1	2.4	0.8	5.3	3.5	%	Cousin 1997
Alaska (lisse)	0,76	0,84	0,61	2.21	2,2	%	Monerri et al. 1986
Alaska	3	8,5	0,3	11,8	5	%	Koster et Leopold 1988
Madria (lisse)	1.9	2.2	0.7	4.8	2.2	%	Cousin 1997
Amac (lisse)	2.9	1.8	0.6	5.3	1.8	%	Cousin 1997
Amino (lisse)	2.7	1.7	0.5	4.9	2.4	%	Cousin 1997
Frisson (lisse)	3.0	1.7	0.5	5.2	2.2	%	Cousin 1997
776 (lisse)	2.1	2.3	0.8	5.2	2.3	%	Cousin 1997
744 (lisse)	1.8	2.6	0.8	5.2	2.4	%	Cousin 1997
Finale (lisse)	2.1	2.3	0.7	5.1	2.2	%	Cousin 1997
Solara (lisse)	2.0	2.4	0.8	5.2	2.4	%	Cousin 1997
Micro (ridé ra/ra)	3.9	2.8	1.0	7.7	4.7	%	Cousin 1997
Stampede (ridé ra/ra)	4.0	3.1	1.1	8.2	3.8	%	Cousin 1997
Mini (ridé ra/ra)	5.2	2.8	0.6	8.6	4.6	%	Cousin 1997
Alfi (ridé ra/ra)	4.2	2.4	0.8	7.4	4.5	%	Cousin 1997
Alaska Sweet (ridé rb/rb)	6.1	4.2	0.9	11.2	3.0	%	Cousin 1997
667 (ridé rb/rb)	6.1	3.4	0.9	10.4	2.8	%	Cousin 1997
Cennia (ridé rb/rb)	4.4	3.1	1.2	8.7	3.3	%	Cousin 1997
831 (ra rb/ra rb)	6.4	4.9	1.7	13	4.6	%	Cousin 1997
Progress (ridé)	1,68	1,25	0,46	3,39	4,4	%	Monerri et al. 1986

Verb., verbascose; Stach., stachyose, Raf., raffinose, Sacch., saccharose, P petites graines ; G grosses graines.

2.4.2 Rôle des RFO

Les RFO peuvent être impliqués dans le transport de métabolites chez différentes familles de végétaux (Bachmann et al. 1994, Bachmann et Keller 1995, Turgeon et Medville 2004), dans le stockage de glucides (Bachmann et Keller 1995), dans la tolérance à la dessiccation et dans la longévité des graines (Kuo et al. 1988, Blackman et al. 1992, Horbowicz et al. 1998, Obendorf et al. 1998, Corbineau et al. 2000, Gurusinghe et Bradford 2001), et dans la tolérance ou l'acclimatation au froid (Bachmann et al. 1994, Liu et al. 1998, Gilmour et al. 2000, Taji et al. 2002, Cunningham et al. 2003). Cependant d'autres auteurs ont montré que les RFO n'étaient pas indispensables à l'acquisition de la tolérance, n'avaient pas de rôle spécifique dans la longévité et ne diminuaient pas la mobilité moléculaire cellulaire à l'état vitreux (Black et al. 1999, Buitink et al. 2000).

Les RFO semblent jouer un rôle précoce dans la mobilisation des réserves au cours de la germination puisque la mobilisation de la majorité de l'amidon se produit après la

sortie de la radicule (Monerri et al. 1986, Morohashi et al. 1989, Dirk et al. 1999, El-Adawy 2002, Nonogaki et al. 2010). Les premiers sucres mobilisés outre le saccharose sont donc les RFO et les galactosyl cyclitols dont la dégradation est pratiquement complète avant la sortie de la radicule (Peterbauer et al. 2001). La dégradation des RFO, galactosyl cyclotols et galactomannes peut être régulée par la α-galactosidase (Buckeridge et Dietrich 1996, Peterbauer et al. 2001, Blöchl et al. 2008). Des inhibiteurs spécifiques de l'α-galactosidase comme la 1-deoxygalactonojirimycin, (DGJ) chez le pois (Blöchl et al. 2007) ou un ester méthylé de l'acide jasmonique (JA-ME) chez le lupin (Zalewski et al. 2010) inhibent la α-D-galactosidase et ralentissent la vitesse de dégradation de RFO (stachyose et verbascose) entrainant un retard de la germination des graines. Pour ces graines, la rapidité de la germination dépend de la mobilisation des RFO. Par contre, ces RFO ne semblent pas indispensables à la germination des graines de soja (Dierking et Bilyeu 2009). Un rapport Saccharose /(raffinose + stachyose) faible est associé à l'acquisition de la capacité à germer mais ne permet pas une forte croissance des plantules de soja in vitro (Obendorf et al. 1998).

Au cours de stress comme la dessiccation ou le froid, le saccharose et certains RFO jouent un rôle important d'osmoprotectant (Taji et al. 2002), en maintenant l'intégrité membranaire avec le développement d'interactions au niveau des têtes des phospholipides, limitant la fusion des membranes après réhydratation (Hincha et al. 2003) ou en protégeant les cellules contre les dégâts oxydatifs (Nishizawa et al. 2008). Un degré de polymérisation élevé accroît la protection contre la fuite des solutés par la réduction de la fusion des membranes (Hincha et al. 2003). Cette protection serait en lien avec une augmentation de l'activité de la galactinol synthétase (première étape de la biosynthèse des RFO) chez le haricot et le soja après une exposition au froid (Castillo et al. 1990, Liu et al. 1998,) ou avec une augmentation des ARNm transcrits (*Arabidopsis* : Liu et al. 1998, luzerne : Cunningham et al. 2003). Cependant, ce rôle des RFO n'est pas toujours très clair car des expérimentations sur des lignées transgéniques d'Arabidopsis sur-exprimant un gène de galactinol synthétase ont montré que la tolérance au gel n'était pas accrue avec l'augmentation de raffinose dans les feuilles (Zuther et al. 2004). Différents auteurs (Koster et Leopold 1988, Liu et al. 1998) évoquent une autre hypothèse sur un rôle indirect des RFO avec une action de prévention de cristallisation du saccharose au moment de la perte d'eau, le saccharose ayant un rôle primordial dans la protection des plantes. Cependant, Buitink et al. (2000) relèvent qu'aucune publication ne fait référence à cette cristallisation in vivo dans les graines.

2.5 Stress et mécanismes de réparation

2.5.1 Stress chez les graines

Les graines, comme les plantes, sont capables de percevoir les facteurs de stress qui déclenchent une série de réactions impliquant des voies de signalisation. Kranner et al. (2010) ont proposé un nouveau concept de stress adapté à la graine comprenant trois phases, l'alarme, la résistance et l'épuisement (Fig. 11). La première phase est une phase d'alarme avec la perception des stress et certains changements induits comme les voies de signalisation. Ces voies de signalisation entrainent des changements dans le transcriptome, et la machinerie de protection et de réparation est activée. Même si la graine n'est pas hydratée, la production de ROS peut être non enzymatique et contribuer à ces voies de

signalisation. De plus, l'ADN, les lipides membranaires, les protéines sont les cibles préférentielles des stress oxydatifs. Plus globalement, la déshydratation et la réhydratation de la graine imposent des stress considérables sur ces composants cellulaires et sur les organites cellulaires, en particulier les mitochondries (Nonogaki et al. 2010). Une des priorités au début de la germination sera de réparer ou de remplacer ces composants cellulaires (Fig. 2, Nonogaki et al. 2010). La restauration de la structure et du fonctionnement mitochondrial est favorisé par les techniques d'osmopriming (Benamar et al. 2003, Sun et al. 2011).

La deuxième phase est atteinte lorsque le stress continue au cours du temps ou lorsqu'il s'intensifie, c'est la phase de résistance. Malgré les stress subis, la graine est capable de germer. La résistance inclut la capacité à induire des protections ou des protectants, comme des antioxydants qui souvent servent de marqueurs de stress (Kranner et al. 2010). En plus des mécanismes de protection ou de réparation, des adaptations de traits multifonctionnels sont présents, comme la présence des téguments, la tolérance à la dessiccation et les phénomènes de dormances. L'acclimatation et l'évolution des adaptations contribuent au maintien de la viabilité de la graine (Kranner et al. 2010) ou de la plantule en conditions de températures négatives (Hou et Romo 1998b). Les graines osmoprimées ont une capacité de transport des électrons plus élevée que chez le témoin, et la stimulation est en lien avec la durée du traitement (Sun et al. 2011).

La troisième phase est la phase d'épuisement caractérisée par l'échec des mécanismes de réparation et de protection, par l'importance de la mort cellulaire programmée (Kranner et al. 2010). Elle se traduit par une perte de vigueur dans le meilleur des cas et peut aller jusqu'à la perte de viabilité ou de capacité à germer. Par exemple, au cours du stockage, la graine peut se détériorer et au moment de la germination ne pas être capable de récupérer ses potentialités de départ. Au cours de cette phase, l'importance de l'effet en cascade au niveau métabolique, ou de l'impact d'un facteur environnemental, ne doivent pas être sous-estimés (Kranner et al. 2010). Ces auteurs soulignent l'intérêt de suivre le stress sur les trois phases pour ne pas donner de conclusions erronées. En effet la courbe de réponse est en forme de cloche avec une augmentation de la concentration en marqueurs de stress au cours de la phase d'alarme, puis quasiment un plateau pour la phase de résistance, et enfin, une diminution pour la phase d'épuisement. Le niveau du marqueur peut être identique en phase d'alarme et d'épuisement mais le devenir de la cellule ou de la graine est très différent.

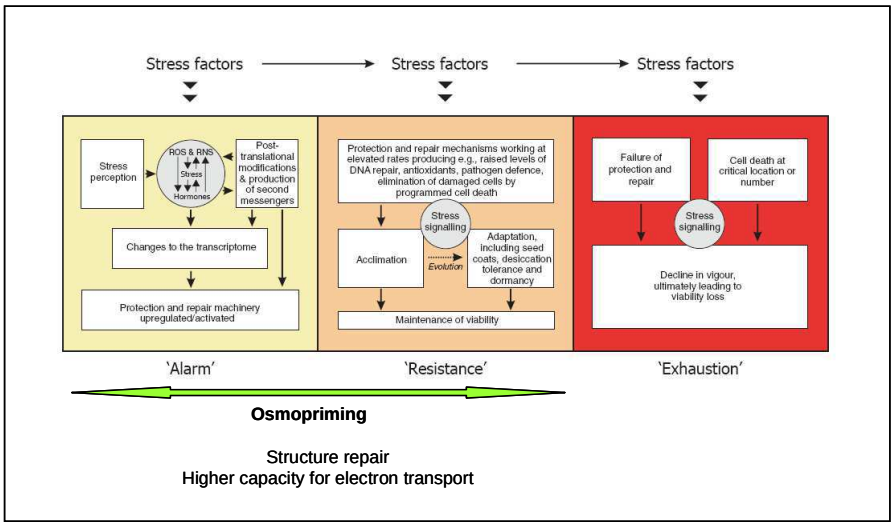


Figure 11 : Concept de stress appliqué à la graine (d'après Kranner et al. 2010, Sun et al. 2011).

2.5.2 Stress au cours de la phase de dessiccation

La dernière phase du développement de la graine est la phase de dessiccation, caractérisée par une forte perte d'eau, et elle conduit à la graine sèche quiescente. L'expression des gènes et le métabolisme sont toujours actifs en début de phase, tant que la teneur en eau est suffisante. Cette phase de transition est importante car elle est associée à des changements transcriptionnels et métaboliques importants. Les principaux changements sont, en plus de la perte d'eau, la fin de l'accumulation de réserves ou de remaniements de composés, la fin de l'acquisition de la tolérance à la dessiccation, la reprogrammation de la transcription mais aussi la diminution des teneurs en oxygène et en molécules énergétiques (Fig. 12, Angelovici et al. 2010). En effet, à l'entrée en oxygène limitée par le tégument, s'ajoute une consommation en oxygène élevée avec un métabolisme très actif au moment de la mise en réserve. Au cours de la dessiccation, la limitation en oxygène et en énergie s'accroit avec l'élévation de la viscosité du cytoplasme. Cependant une faible concentration en oxygène permet de limiter les dégâts oxydatifs des membranes et des systèmes enzymatiques (Angelovici et al. 2010). Cette phase semble être aussi une phase de préparation à la phase de germination avec la présence et le stockage de certains ARN de certaines protéases, de protéines associées au métabolisme énergétique, de protéines associées à la réparation de l'ADN et à la dégradation des lipides (Angelovici et al. 2010). Les conditions de dessiccation entrainent des conséquences sur la germination ou sur la conservation des graines. En effet, la capacité de germination est meilleure avec un séchage lent (Obendorf et al. 1998, Corbineau et al. 2000). Une vitesse de dessiccation rapide (Moreau-Valancogne et al. 2007) ou des températures élevées (Pukacka et Wojkiewicz 2003) au cours de la dessiccation des graines, entrainent une diminution de la longévité des graines. Plus le séchage est rapide et plus la fuite des solutés est importante, indiquant de forts dégâts au niveau des membranes (Corbineau et al. 2000).

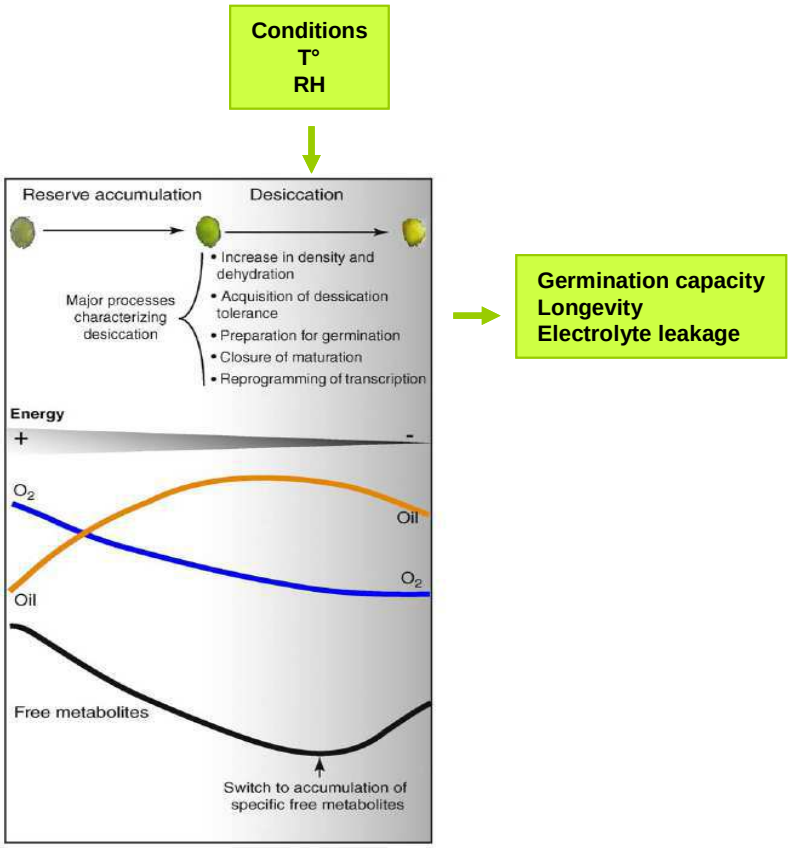


Figure 12 : Principaux processus caractérisant la dessiccation de la graine (d'après Angelovici et al. 2010, Corbineau et al. 2003, Pukacka et Wojkiewicz 2003, Moreau-Valancogne et al. 2007).

2.5.3 Effet des basses températures

La germination est une étape qui peut être sensible aux basses températures, ce qui peut se traduire par une faible levée (Nykiforuk et Johnson-Flanagan 1999). L'imbibition des graines varie en fonction de la température, plus la température est élevée et plus l'imbibition est rapide (Duke et al. 1977, Gowen et al. 2007ab, Cheng et al. 2009, Khazaei et Mohammadi 2009). Les basses températures augmentent les dégâts d'imbibition particulièrement chez les graines de soja à faibles teneurs en eau (Hobbs et Obendorf 1972). Ces basses températures entrainent des lésions au moment de l'entrée d'eau, pendant la réorganisation des membranes, provoquant la fuite de solutés (Hobbs et Obendorf 1972, Leopold et Musgrave 1979). L'intégrité des membranes est cruciale et constitue une barrière régulatrice de l'entrée d'eau. La vitesse de germination lors d'une imbibition à basse température peut fortement augmenter grâce à des traitements d'osmopriming (Sun et al. 2011). Zhuo et al. (2009) suggèrent que la membrane plasmique retrouve toutes ses potentialités au cours du priming et que les ATPases membranaires sont impliquées dans la tolérance au froid des graines. L'utilisation du temps thermique (DJ) est un bon outil pour distinguer le retard du à des différences dans le développement par rapport à un décalage temporel résultant du ralentissement des activités enzymatiques par les conditions suboptimales (Nykiforuk et Johnson-Flanagan 1999).

Une autre conséquence des basses températures est la réduction de la respiration (Duke et al. 1977, Leopold et Musgrave 1979), provoquée par différentes modifications au niveau des mitochondries avec en particulier un pourcentage d'acides gras insaturés plus élevé et une plus faible activité de la voie COX (De Santis et al. 1999), mais aussi une adaptation de l'activité de la voie AOX (cf. paragraphe 2.3.1). Chez le soja, des diagrammes d'Arrhénius montrent deux discontinuités dans la respiration de graines de soja, une à 31°C et une autre à 8°C indiquant des modifications importantes des mécanismes selon les gammes de température (Duke et al. 1977).

Le génotype Champagne possède une meilleure tolérance au froid que le génotype Térèse, au stade végétatif. L'acclimatation au froid de Champagne au stade plantule est le résultat d'une plus forte expression constitutive de protéines d'entretien et d'une augmentation de certains enzymes en lien avec le cycle des acides tricarboxyliques relié à la production d'ATP (Dumont et al. 2011). Pour ces auteurs, la tolérance au froid de Champagne s'expliquerait par une réorientation du métabolisme énergétique vers des mécanismes de détoxification cellulaire, comme la photorespiration, en période de limitation de croissance provoquée par les basses températures. Un QTL pour la concentration en raffinose a été trouvé dans la population recombinante issue d'un croisement entre Champagne et Térèse lors de l'acclimatation au froid. Ce QTL co-localise avec le QTL de dégât de gel suggérant une forte implication du raffinose dans la tolérance au gel (Dumont et al. 2009).

3. Effets de la vitesse de dessiccation et du froid sur la germination du pois

3.1 Problématique

Des légumineuses comme le pois et la fèverole peuvent répondre aux nouveaux défis français et européen d'amélioration de l'autonomie de la production d'aliments riches en protéines et de la prise en compte de contraintes environnementales fortes. Cependant, la relance des protéagineux ne sera durable, après la diminution des aides financières, que si les rendements sont stables. Pour stabiliser le rendement, il est important de bien maîtriser le cycle de culture et en particulier d'éviter les effets néfastes des stress de fin de cycle. Les fortes températures lors de la formation de la graine de pois, ainsi que la tendance au semis précoce pour avancer le cycle de culture, impliquent une connaissance plus approfondie du comportement de la graine en fonction de la température au moment de la germination mais aussi de mieux comprendre l'impact de l'augmentation des vitesses de dessiccation sur les caractéristiques des graines et leur capacité à germer.

Afin d'étudier l'existence d'une éventuelle diversité génétique sur l'aptitude à germer à basses températures, nous avons testé l'hypothèse que les génotypes sélectionnés pour leur tolérance au froid au stade jeune plante pourraient avoir une réponse de germination à la température, différente des pois de printemps, sensibles au froid au stade jeune plante.

Par ailleurs, nous avons étudié si une vitesse de dessiccation rapide après le stade fin de remplissage du grain (FRG) modifiait les potentialités de germination de la graine obtenue dans ces conditions.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Production des graines

Les génotypes ont été choisis pour leur tolérance au gel différente au stade végétatif, qui pouvait éventuellement être associée à un comportement également différent en conditions de basses températures positives au moment de la germination. Champagne[1], pois d'hiver, présente une bonne tolérance au gel alors que Baccara et Térèse sont sensibles à ce stress. Baccara et Térèse sont des génotypes de printemps, et dans notre étude, les deux génotypes ont été retenus car ils présentaient des intérêts différents. Baccara était un génotype de référence pour de très nombreuses études dans différentes équipes de recherche, dont les laboratoires de PMS et du LEVA. Cela permettait d'utiliser différentes méthodes mises au point sur ce génotype comme l'isolement de mitochondries, la respiration de fragments (Benamar et al. 2003) et le prélèvement des graines au stade FRG (Coste et al. 2005) ainsi que la dessiccation contrôlée des grains. Le génotype Térèse était aussi intéressant à étudier car il est le second parent d'une population de lignées recombinantes avec Champagne, réalisée par l'INRA de Mons.

Pour l'étude des températures cardinales, plusieurs lots de chaque génotype ont été produits pour étudier la part environnementale et la part génotypique de la réponse à la température. Les pois ont été produits sur la station de la fédération nationale des

[1] Champagne est à l'origine un pois fourrager. Dans notre étude il sera assimilé à un pois protéagineux car il est un ascendant de différentes variétés de pois protéagineux d'hiver (Doré et al. 2006) et des résultats de ce génotype sont présentés dans le livre Agrophysiologie du pois protéagineux (Lejeune et al. 2005).

agriculteurs multiplicateurs (FNAMS à côté d'Angers 47°27'N, 0°25'W en 2006 et 2007 et à l'INRA de Mons en Chaussée (Nord de la France, 49°52N, 3°00'E) en 2006. Les gousses ont été récoltées manuellement à maturité à la mi-juillet. Après un écossage manuel, les graines ont été stockées à 5°C et à 50% d'humidité relative avant les mesures.

Pour étudier l'effet des vitesses de dessiccation et du froid, les trois génotypes sont produits en 2008, dans les mêmes conditions que précédemment. Pour la dessiccation en conditions contrôlées, les graines sont récoltées au stade début de la phase de dessiccation des graines correspondant au stade fin de remplissage du grain (FRG) et à 55% de teneur en eau à l'aide d'un spectrocolorimètre portable (CM503i® - Minolta) en utilisant la relation couleur de gousse et teneur en eau du grain (Coste et al. 2005). Pour un angle de la valeur de la teinte compris entre 90 et 95 degrés pour la gousse de pois de Baccara et Champagne et 94-98 degré pour Térèse, la teneur en eau moyenne de la graine est de 1,18 g g^{-1}MS (55%) correspondant à la teneur en eau de la graine au stade FRG. Le séchage est réalisé dans différentes enceintes permettant de contrôler la température et l'humidité relative, facteurs affectant la vitesse de dessiccation (Moreau-Valancogne et al. 2007). Des vitesses de dessiccation plus rapides des graines que lors du séchage sur pied au champ (lot Ch) sont obtenues à 30°C, dans des enceintes ventilées grâce à l'utilisation d'une solution de NaCl saturée permettant d'obtenir une humidité relative (HR) de 75% (lot Na), ou en présence de Silicagel (HR 10%) qui entraine la vitesse de dessiccation la plus rapide (lot Si). Les témoins (lot Ch) sont récoltés à maturité au champ. Afin d'avoir des lots homogènes la récolte n'a été effectuée que sur le deuxième étage foliaire. Les graines ayant une teneur en eau inférieure à 16% sont stockées dans des sacs étanches à 5°C.

Dans chaque essai, la protection, la fertilisation et l'irrigation de la culture ont été gérées pour maximiser la croissance des pois. Dans le but de généraliser les résultats de germination, différents lots commerciaux de pois comprenant une grande diversité de caractéristiques ont été utilisés (Tableau 2).

Tableau 2 : Caractéristiques des cultivars de pois.

Nom des cultivars	Type de pois	PMG (g)	Couleur des grains	Tolérance au froid	Obtenteur	Remarques
Enduro (EN)	protéagineux d'hiver	200-220	jaune	Bonne	Florimond Desprez	Régularité de rendement.
Lucy (LUC)	protéagineux d'hiver	170-185	vert	Moyenne	Serasem	Casserie-oisellerie.
James (JA)	protéagineux d'hiver	175	jaune	Assez tolérant	Serasem	Forte teneur en protéine.
Cartouche (CA)	protéagineux d'hiver	165	jaune	Bonne	Serasem	Résistance fusariose.
Isard (IS)	protéagineux d'hiver	195	jaune	Très bonne	Agri-Obtentions	Rendement élevé sur l'ensemble du territoire.
Assas (AS)	pois fourrager	210	marron	Assez tolérant	Agri-Obtentions	La référence depuis plusieurs années.
Crackerjack (CR)	protéagineux printemps	280	vert		Agri-Obtentions	Casserie
Bluemoon (Bl)	protéagineux printemps	255	vert		Agri-Obtentions	Casserie
Metaxa (ME)	protéagineux printemps	270	vert		Agri-Obtentions	Référence pois vert Bonne tenue de tige
Goldfinger (GO)	protéagineux printemps	315	jaune		Agri-Obtentions	Variété haute
Hardy (HA)	protéagineux printemps	265	jaune	Faible	Sérasem	Très résistant à la verse-productive
Lumina (LUM)	protéagineux printemps	260	jaune		Nikerson	Productive
Standal (ST)	protéagineux printemps	295	vert	Très bonne rusticité	Laboulet	Productive

3.2.2 Caractéristiques des graines

Le poids de mille grains (PMG), a été mesuré sur trois répétitions de 10 graines pour chaque lot de graines. La surface et le volume ont été calculés à partir de l'estimation du diamètre moyen (d) de la graine en prenant perpendiculairement deux mesures sur la graine de pois. Ces mesures ont été effectuées au pied à coulisse (France Métrologie précision : 1/10ème de millimètre) sur 10 graines. La surface a été calculée à l'aide de la formule $S=\pi d^2$ et le volume avec la formule $V= (\pi/6)*d^3$ correspondant au volume d'une sphère. Le bien fondé de ces calculs ont été vérifiés par des mesures au planimètre pour la surface et par des mesures volumétriques en immergeant des lots de dix graines dans l'eau.

La couleur des graines des différents lots a été mesurée au spectrocolorimètre (CM503i® - Minolta). La mesure au spectrocolorimètre permet d'obtenir une notion de couleur plus objective que l'œil humain avec des données de couleur numériques permettant la comparaison des différents lots. Le spectrocolorimètre, grâce à ses capteurs multiples mesure la réflectance spectrale de la graine pour chaque longueur d'onde et calcule les valeurs tristimulus correspondant à la sensibilité de l'œil humain. La couleur est un système à trois dimensions pouvant être mesurée indépendamment (Fig. 13). La première, la teinte (h) est la notion de couleur couramment utilisée comme le vert de l'herbe, le rouge des cerises et le bleu du ciel. La deuxième dimension est la clarté (L) qui peut se représenter selon un axe allant des couleurs claires aux couleurs foncées en comparant leur luminosité. La troisième est la notion de saturation ou intensité (C) allant des couleurs vives (le jaune du citron) aux couleurs ternes (le jaune de la banane). Pour obtenir ces données, l'espace L*C*h est utilisé (Fig. 14). La mesure de chaque graine est la moyenne entre les valeurs effectuées sur deux faces opposées de la graine de pois, et ceci a été réalisé sur 10 graines de chaque lot.

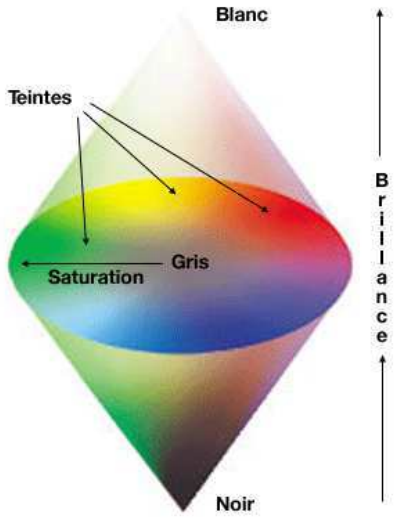


Figure 13 : Solide des couleurs (vetopsy.fr)

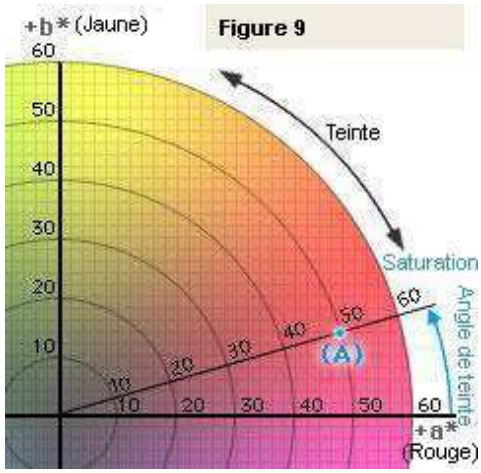


Figure 14 : Détermination de l'angle de teinte (2.konicaminolta.eu)

Le calcul de la vitesse de dessiccation des graines au cours de la phase de dessiccation a été effectué avec le suivi de la perte d'eau des graines au cours de cette phase. Que ce soit au cours de la dessiccation au champ ou sous conditions contrôlées, des

échantillons de 30 graines sont prélevés cinq à sept fois tout au long de la phase de dessiccation, pour déterminer la teneur en eau. Pour cela, les graines sont pesées avant et après passage à l'étuve à 80°C, pendant 48 h. Des cinétiques de perte de teneur en eau sont réalisées et des régressions linéaires sont établies entre la première valeur de teneur en eau au stade FRG et le dernier point à une teneur en eau de l'ordre de 0,25 g g^{-1}MS. La pente de ces droites donne la vitesse de dessiccation des différents lots. La vitesse de dessiccation au champ est similaire pour les trois génotypes étudiés (Tableau 3). Les mêmes conditions de séchage ont été appliquées aux trois génotypes mais en raison de la plus petite taille des graines de Champagne les vitesses de dessiccation sont supérieures.

Tableau 3 : Vitesse de dessiccation au cours de la phase de dessiccation

mg H_2O .g^{-1}MS.h^{-1}	**Baccara**	**Térèse**	**Champagne**
Ch	6	5	6
Na	33	39	53
Si	63	69	109

3.2.3 Caractéristiques germinatives

Pour l'étude des températures cardinales, la germination a été effectuée à plusieurs températures : 5, 10, 15, 20, 25, 27, 30, 33°C. Quatre répétitions de 25 graines ont été semées dans des boites en plastiques (55 x 120 x 180 mm) sur du buvard plissé déposé sur un buvard lisse imbibé de 80 mL d'eau déminéralisée (Fig. 15). Les boites ont été mises dans des enceintes à la température voulue et à l'obscurité. La germination est constatée lorsque le tégument est rompu et la radicule dépasse d'au moins 1 mm (Fig. 16). La fréquence d'observation varie en fonction de la température et doit permettre d'obtenir une cinétique de germination et de calculer une vitesse de germination. Pour les lots commerciaux, les germinations ont été effectuées aux températures proches de l'optimum (20°C) et aux basses températures (5°C).

L'imbibition des graines s'est déroulée en buvard plissé dans les mêmes conditions que les essais de germination. A 20°C, le prélèvement des graines a été réalisée à 0, 3, 6, 12, 18, 24 h alors qu'aux basses températures le nombre de prélèvements est plus important pour pouvoir au même temps, disposer de mesures en heures et en degrés-jours (DJ). Les prélèvements à 5°C ont été effectués à 0, 6, 12, 18, 24, 48, 62, 83 h, permettant d'avoir pour les deux températures des temps thermiques équivalents de 0, 3, 5, 11, 16, 21 DJ. La détermination de la teneur en eau s'est faite sur trois répétitions de sept graines, et après dissection sur 3x7 paires de cotylédons et 3x7 axes, en réalisant des pesées avant et après passage à l'étuve 80°C pendant 48 h. Le volume des boites de germination étant trop important pour la mesure de la consommation de l'oxygène par les graines, nous avons du, aussi, suivre l'imbibition des graines dans les petits flacons utilisés pour la détermination de la respiration. Les flacons utilisés, d'un volume moyen 11,6 mL, sont posés horizontalement et contiennent 10 graines avec 3,5 mL d'eau déminéralisée pour les génotypes à grosses graines Baccara et Térèse et 1,5 mL d'eau pour Champagne, le génotype à petite graine. Des pesées des dix graines ont été réalisées chaque heure lors des 10 premières heures de l'imbibition et à 24 h. Après 24 h le passage de ces graines à l'étuve à 80°C pendant 48 h a permis d'obtenir la masse sèche et de pouvoir calculer la teneur en eau pour chaque prélèvement. Trois répétitions ont été réalisées pour un lot de graines.

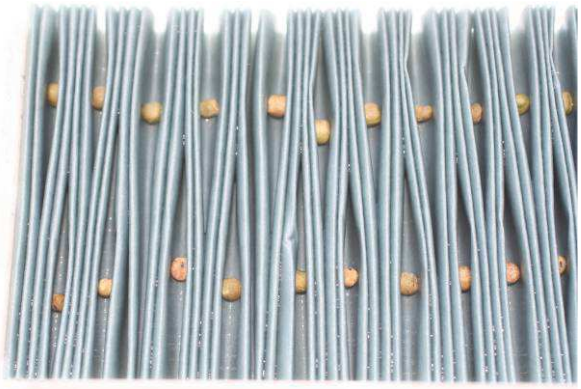


Figure 15 : Boite de germination avec Champagne



Figure 16 : Graine de Baccara considérée comme germée

L'estimation des effets des vitesses de dessiccation se fait en déterminant la faculté germinative, la perméabilité des membranes obtenues par des mesures de conductivité, et l'aptitude à la conservation par la faculté germinative après l'application d'un test de détérioration contrôlé. Les tests de faculté germinative se sont déroulés à la SNES, selon les règles de l'ISTA (ISTA, 2005) en semant quatre répétitions de 25 graines dans du sable humidifié à 9% et incubé à 20°C avec une photopériode de 8 h. Le taux de plantules normales est évalué selon les recommandations de l'ISTA (ISTA, 2003) après sept jours de culture. La détérioration contrôlée des lots, 4x25 graines pour un lot, se fait après équilibration de la teneur en eau des graines à 16% (soit 0,19 $g.g^{-1}$MS). Ces graines dont la teneur en eau reste constante tout au long du test, sont incubées à 40°C pendant 11 jours. Les effets de la détérioration sont évalués par un test de faculté germinative comme décrit précédemment.

La conductivité a été réalisée graine à graine sur 3x7graines et suivie pendant 24 h dans des cupules contenant 3,5 mL d'eau MilliQ (Conductimètre matriciel CM100, FR Afrique du Sud). Outre des graines entières, des graines dépourvues de leur tégument ont aussi été testées pour vérifier que les membranes des cotylédons et des axes ont été affectée par les vitesses de dessiccation et pas uniquement le tégument. La conductivité est exprimé en $mS.g^{-1}$ (Pukacka et Wojkiewicz 2003 ; Clerkx et al. 2003 ; Clerkx et al. 2004).

3.2.4 Analyses des données

Pour l'étude des températures cardinales, pour chaque température et chaque répétition, la germination cumulée est ajustée grâce à la fonction de Gompertz

$$G(t) = G_{max} \exp [-\exp (b - c.t)]$$

Ou G(t) est la germination cumulée au temps t à partir du semis en heures, G_{max} le maximum de germination cumulée, *b* et *c* sont des paramètres de forme.
Cet ajustement a permis de déterminer la vitesse de germination à 50% de germination ($1/t_{g50}$). Cette vitesse de germination a été exprimée en fonction des températures. Le modèle de Yin (Yin et al., 1995) permet de calculer les températures cardinales :

$$1/t_{g50} = \exp(\mu) \cdot (T\text{-}Tmin)^{\alpha} \cdot (Tmax\text{-}T)^{\beta}$$

T est la température, T*min* and T*max* sont les températures minimum et maximum au delà desquelles la germination n'est plus possible, c'est à dire lorsque la courbe coupe l'axe des abscisses. α, β et μ sont les paramètres de l'équation. L'estimation de la température optimale est donnée par l'équation ci-dessous qui intègre les paramètres de la courbe:

$$Topt = ((\beta * Tc) + (\beta * Tmin)) / (\alpha + \beta)$$

La température de base, est calculée en utilisant les données de vitesse de germination qui augmentent linéairement avec la température, en minimisant la somme des carrés des erreurs entre les valeurs de logit des pourcentages de germinations observés et les pourcentages simulés. Les valeurs simulées proviennent de l'équation suivante :

$$y = a \, Log \, [(T - Tb) * t / 24] + b$$

T est la température, Tb la température de base, t le temps à partir du semis (en heures), a et b sont les paramètres de l'équation linéaire.
Pour chaque lot et chaque répétition, la température de base a été calculée. Les valeurs moyennes de chaque lot sont statistiquement comparées par une analyse de variance ($p < 0,05$) et un test de comparaison multiple, le test de Newman-Keuls, est appliqué si nécessaire. Pour les lots sans différences significatives une température de base est estimée et utilisée pour calculer le temps thermique. Ensuite, les pourcentages de germination pour chaque répétition sont ajustés à l'aide de la fonction de Gompertz avec un temps calculé comme un temps thermique (degrés-jours, DJ) :

$$TTi = \sum_{d=1}^{d=i} (Tmd - Tb_{germ})$$

TTi est le temps thermique cumulé au jour i à partie du jour du semis (d=1) et *Tmd* est la température moyenne journalière. Le temps thermique pour atteindre 50% de germination est déterminé ($TT_{50\%}$).

3.2.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant GraphPad Prism 5®. Lorsque les valeurs sont distribuées selon une loi Normale avant ou après transformation des données (1/y), des tests d'analyse de variance à deux voies ont été effectués pour la comparaison des génotypes et des conditions de production. Les données qui n'étaient pas conformes à une distribution Normale après des essais de transformation ont été comparées à l'aide du test non-paramétrique de Kruskal –Wallis.

3.3 Germination des trois génotypes aux différentes températures

Nos résultats montrent que le pois est capable de germer dans une large gamme de température de 5°C à 30°C avec un pourcentage final de germination très élevé (>95). La vitesse de germination augmente avec l'élévation de température jusqu'à 20°C puis diminue après cet optimum (Fig. 17). Les deux pois de printemps, Baccara et Térèse, présentent une courbe similaire alors que Champagne, le pois d'hiver, a une vitesse de germination supérieure, des basses températures (+ 51%) jusqu'à l'optimum (+ 42%). Cette vitesse plus élevée se retrouve lors de différentes années de production, en 2006 et 2007 (Fig. 18) et dans des lieux de production différents, Angers ou Mons (Fig. 19). Bien que le classement ne soit pas affecté, la variation de ces facteurs environnementaux modifie l'amplitude de la vitesse (+15% à Mons/Angers) ou le maintien des fortes vitesses vers des températures plus élevées (20-26°C à Mons).

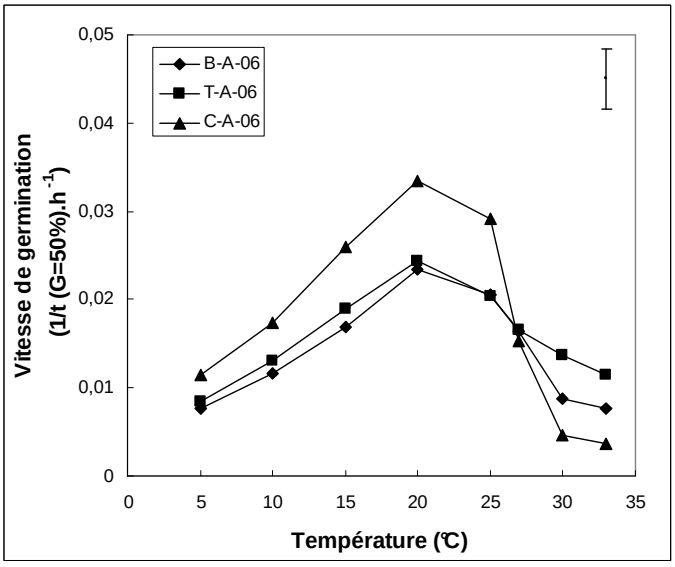


Figure 17 : Vitesse de germination des trois génotypes produits en Anjou en 2006 en fonction de la température. B = Baccara, T = Térèse, C = Champagne; A = Angers; -06= 2006.

Barre verticale= écart-type moyen

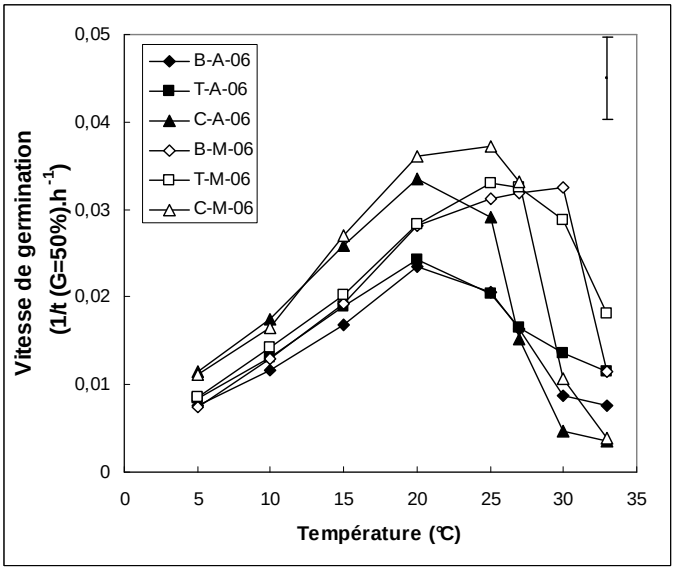


Figure 18: Vitesse de germination des trois génotypes produits en Anjou en 2006 ou en 2007 en fonction de la température. B = Baccara, T = Térèse, C = Champagne; A = Angers; -06 = 2006, -07 = 2007.

Barre verticale= écart-type moyen

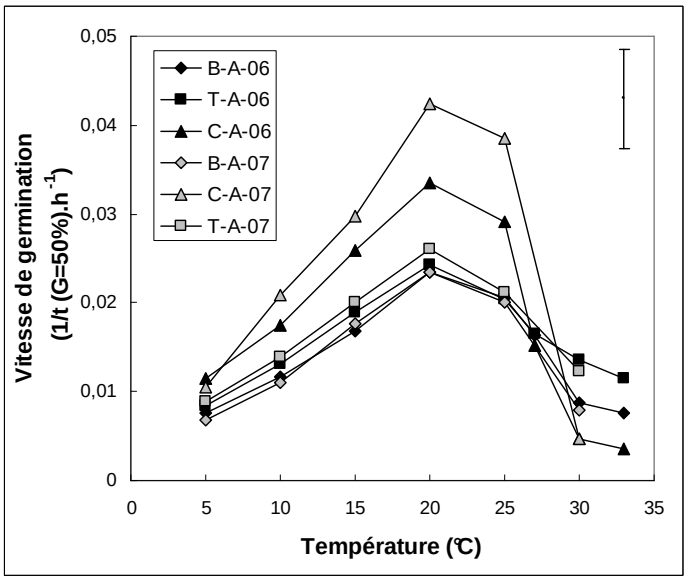


Figure 19: Vitesse de germination des trois génotypes produits en Anjou ou à Mons en 2006 en fonction de la température. A = Angers; M = Mons

Les températures cardinales calculées grâce au modèle de Yin (Yin et al. 1995) pour les températures minimales et optimales sont identiques pour les différents génotypes et ne varient pas en fonction du lieu de production ni de l'année de production (Tableau 4). Par contre, la température maximale est plus basse chez Champagne (30°C) par rapport aux deux pois de printemps (35°C). Au delà de 30°C la germination du pois d'hiver Champagne est sérieusement compromise. La température de base de la germination du pois est très basse (-1,1°C) et ne diffère pas significativement entre les génotypes ou les conditions de production (lieux ou années) (Tableau 4). Par contre, le temps thermique requis pour atteindre 50% de germination ($TT_{50\%}$) est toujours significativement plus court pour Champagne (25 DJ) par rapport à Térèse ou Baccara (34-38 DJ).

Tableau 4 : Paramètres de germination pour différents génotypes et lots de graines de pois.

Lots de graines	Tmin. (°C)	Topt. (°C)	Tmax. (°C)	Tbgerm (°C)	TT50% (DJ)
C-A-06	-3,8 ± 0,1 ns	21 ± 1 ns	29 ± 1 d	-2,0 ± 0,5 ns	26 ± 1 d
C-M-06	-3,7 ± 0,1 ns	24 ± 1 ns	30 ± 1 d	-0,8 ± 0,3 ns	25 ± 1 d
C-A-07	-3,9 ± 0,1 ns	22 ± 1 ns	30 ± 1 d	-0,0 ± 0,4 ns	22 ± 1 e
B-A-06	-3,8 ± 0,1 ns	20 ± 1 ns	37 ± 1 b	-0,5 ± 1,8 ns	39 ± 1 a
B-M-06	-1,5 ± 0,2 ns	26 ± 1 ns	33 ± 1 c	-1,0 ± 0,7 ns	34 ± 1 b
B-A-07	-3,5 ± 0,2 ns	22 ± 1 ns	31 ± 1 cd	-0,5 ± 1,1 ns	40 ± 1 a
T-A-06	-2,0 ± 0,7 ns	21 ± 1 ns	40 ± 1 a	-1,9 ± 1,8 ns	36 ± 1 b
T-M-06	-3,0 ± 0,4 ns	27 ± 1 ns	34 ± 1 c	-1,1 ± 0,6 ns	32 ± 1 b
T-A-07	-3,7 ± 0,1 ns	21 ± 1 ns	34 ± 1 c	-1,9 ± 0,7 ns	34 ± 1b

C = Champagne, B = Baccara, T = Térèse, A = Angers, M = Mons, 06 = 2006, 07 = 2007, Paramètres estimés par le modèle de Yin : Tmin. = Température minimale, Topt.= Température optimal, Tmax. = température maximale, Tb_{germ} = Température de base de germination, $TT_{50\%}$ = Temps thermique pour 50% de germination.

Nous avons comparé sept génotypes d'hiver et neuf génotypes de printemps, aux caractéristiques très contrastées (en termes de taille, de couleur de grain et de résistance au froid, …) afin de vérifier si la rapidité de germination observée chez Champagne est un trait particulier des génotypes d'hiver. Il apparaît que le groupe de pois d'hiver germe plus rapidement que le groupe de pois de printemps à 20°C (Fig. 20). Par contre, aucune différence significative n'a été trouvée à 5°C (Fig. 20); Champagne ne reflète pas un comportement général des pois d'hiver à basse température.

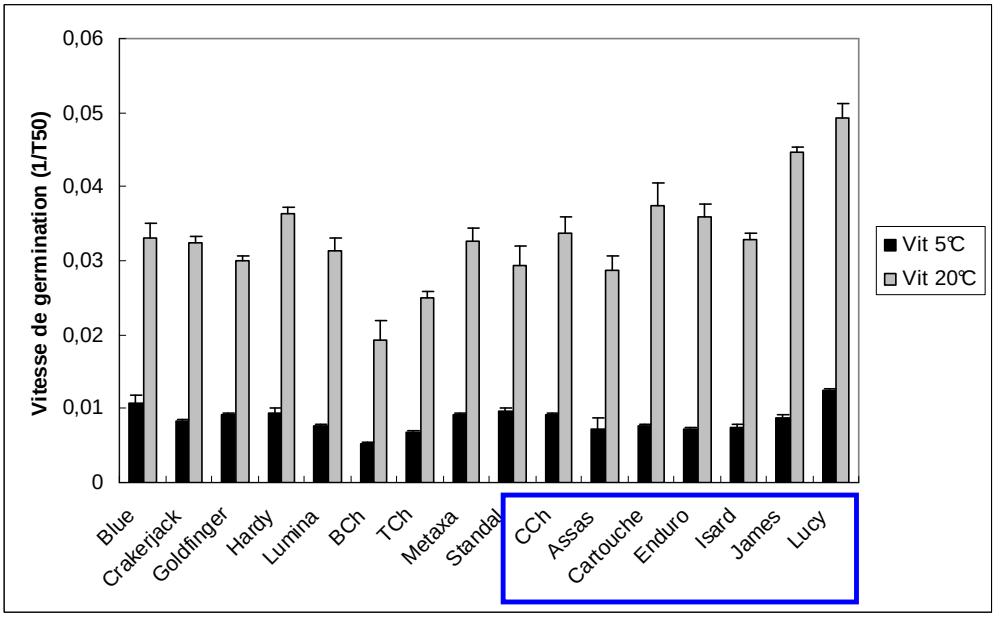


Figure 20 : Vitesse de germination à 5 et 20°C des deux populations de génotypes de printemps et de génotypes d'hiver (encadrés).

3.4 Impact des vitesses de dessiccation sur la germination

3.4.1 Modifications morphologiques

Les génotypes de printemps de couleur beige ont des gros grains avec un PMG de 315 g pour Baccara et un peu moins élevé pour Térèse 276 g. Le génotype d'hiver, Champagne, de couleur brune, est un génotype présentant un petit grain avec un PMG d'environ 116 g.

Une modification notable, en lien avec la dessiccation, concerne la couleur des graines au stade récolte chez les trois génotypes étudiés. Lorsque des vitesses de dessiccation rapides sont appliquées, les graines conservent leur couleur verte au niveau du tégument qui en temps normal devient beige pour Baccara et Térèse et légèrement brun pour Champagne (Fig. 21 et Fig. 22). De plus, les téguments de Champagne normalement marbrés présentent un nombre très restreint de taches sombres. Une corrélation a pu être établie: plus la vitesse de dessiccation est rapide et plus la teinte (h) des graines est élevée (Fig. 22). La coloration verte se retrouve aussi au niveau des cotylédons mais de façon plus hétérogène et le plus souvent elle se limite au niveau de la périphérie des cotylédons.

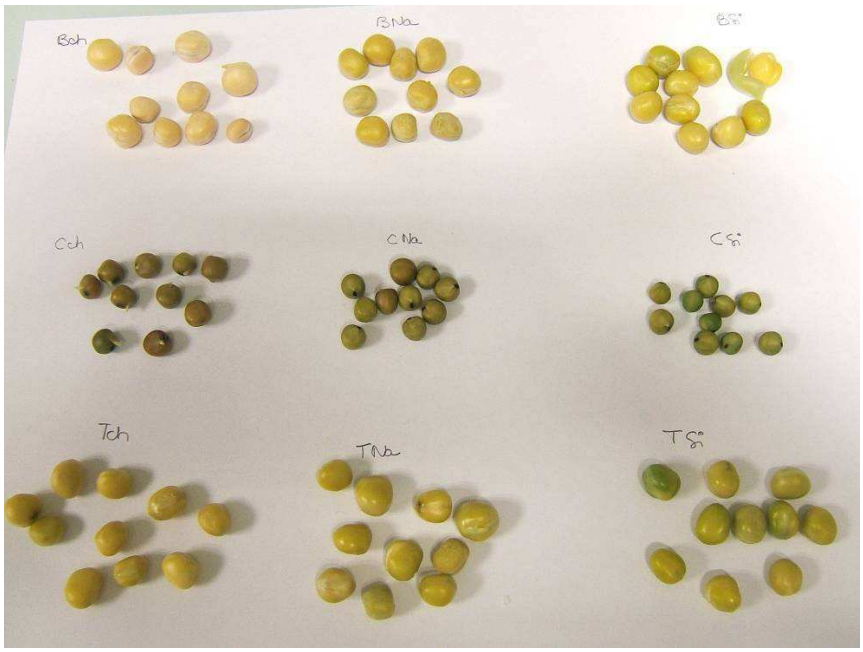


Figure 21 : Les graines des différents génotypes après 25 h d'imbibition dans les flacons utilisés pour la mesure de la respiration.

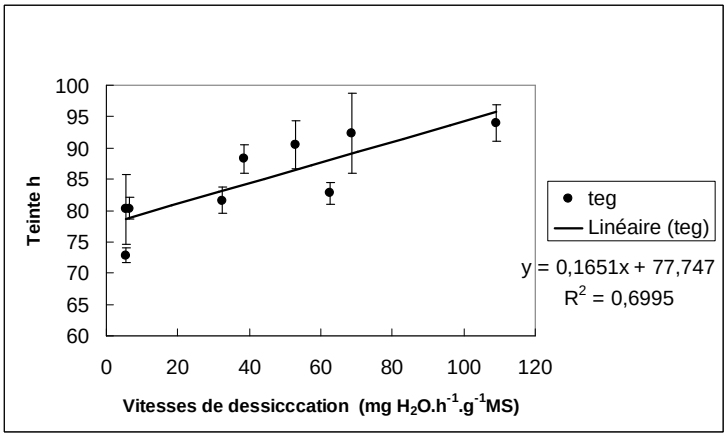


Figure 22 : Evolution de la couleur (teinte = h) des graines entières avec tégument en fonction de la vitesse de dessiccation.

3.4.2 Germination et faculté germinative

Le premier paramètre de la germination considéré est le pourcentage final de germination. L'application de vitesse de dessiccation rapide ou de températures froides ne modifie pas le pourcentage de graines germées qui est de 100% (Fig. 23). Par contre, le cumul de la vitesse de dessiccation rapide et du froid a tendance à diminuer le pourcentage final pour Baccara et Térèse de l'ordre de 10%.

Les résultats confirment que Champagne germe plus rapidement à 5°C et à 20°C que les pois de printemps (+75% par rapport à Baccara et + 36% par rapport à Térèse) et ils montrent que le génotype est le premier facteur de variation de la vitesse de germination (Fig. 23). Une vitesse de dessiccation rapide accélère légèrement la vitesse de germination des deux pois de printemps, Baccara (+13%) et Térèse (+ 6%) mais n'affecte pas celle du pois d'hiver, Champagne. L'effet du froid sur les vitesses de germination (1/T50%) se manifeste par un léger retard significatif pour Champagne (-9%) et Térèse (-7%). Ce retard se rencontre particulièrement après un séchage rapide (Fig. 24). La faculté germinative est très élevée et proche de 100% pour les trois génotypes.

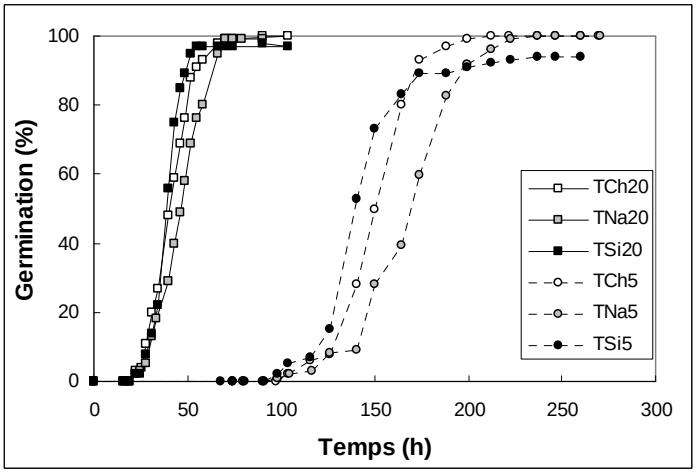


Figure 23: Cinétique de germination de Térèse à 5 et 20°C.

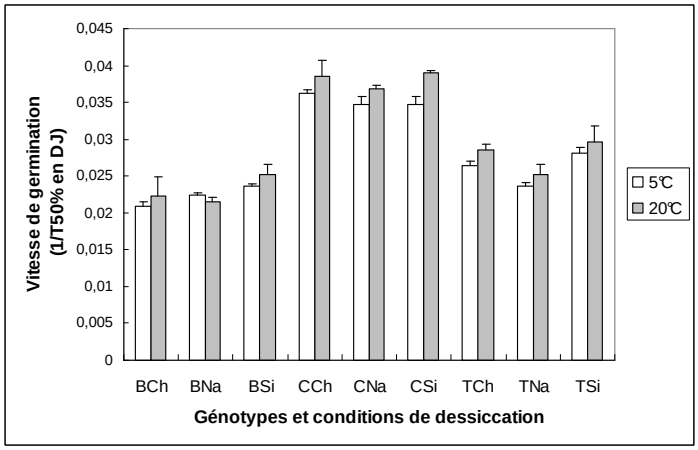


Figure 24: Vitesse de germination exprimée en temps thermique en fonction des génotypes et des modalités de dessiccation.

3.4.3 Vitesse d'imbibition

L'imbibition a été réalisée avec deux méthodes différentes. La première, normalisée et recommandée par l'ISTA se déroule en buvard plissé alors que la deuxième imposée par les conditions de réalisation des mesures de respiration de la graine entière se déroule dans un petit flacon où les graines sont en contact direct avec l'eau.

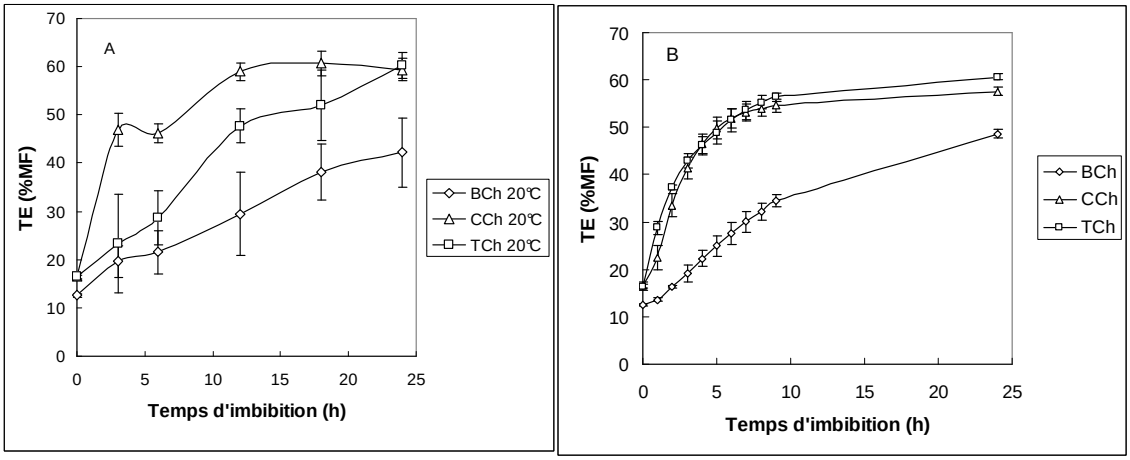


Figure 25 : Evolution de la teneur en eau (TE) en % matière fraîche des graines entières en fonction du temps d'imbibition exprimé en heures, A imbibition réalisée en buvard plissé, B imbibition réalisée en flacon.

L’imbibition en buvard plissé s'effectue différemment selon les génotypes : les graines de Champagne s’imbibent plus rapidement que celles de Térèse ou de Baccara dès les premières heures (Fig. 25A). La graine de Champagne atteint 47% de teneur en eau au bout de 3 h d’imbibition contre 20 et 23% pour Térèse et Baccara. A 12h, l’imbibition est terminée pour Champagne, avec une teneur en eau d'environ 60%. Les deux autres génotypes présentent une imbibition plus régulière dans le temps. L’imbibition en flacon, présente des résultats très différents dans le classement de Champagne et Térèse. Les deux génotypes s’imbibent à la même vitesse (Fig.25 B). Cependant, cette imbibition plus rapide n’entraîne pas une vitesse de germination plus rapide.

L’imbibition des cotylédons suit le même profil que celui des graines entières, alors que les axes s’imbibent plus rapidement (Fig. 26). La comparaison de l’imbibition des axes embryonnaires montre que les axes du génotype Champagne s’imbibent plus rapidement dans les 12 premières heures par rapport à Térèse et Baccara (Fig. 27).

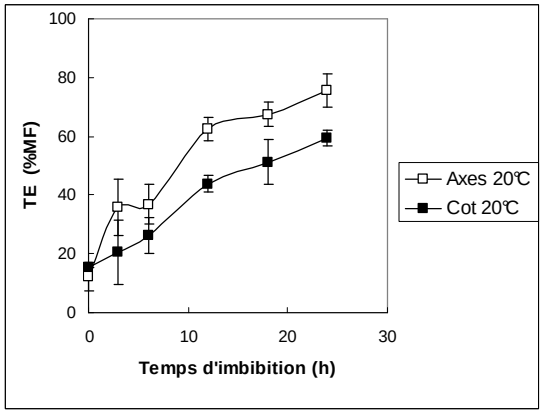


Figure 26 : Evolution de la teneur en eau dans les axes embryonnaires et les cotylédons du génotype Térèse.

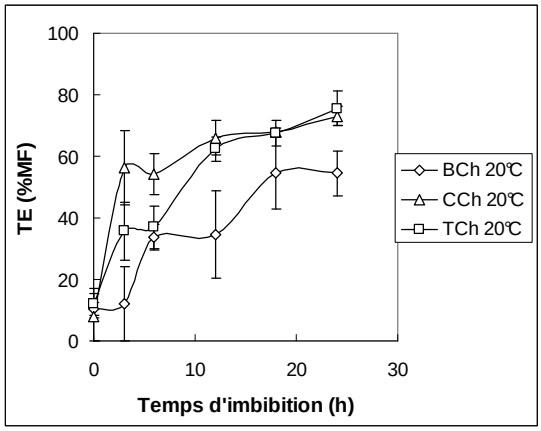


Figure 27: Evolution de la teneur en eau des axes des trois génotypes.

Une vitesse de dessiccation rapide se traduit par une imbibition plus rapide des graines entières dans les premières heures pour Baccara et Térèse. Cette accélération de l’imbibition est encore plus nette lorsque l’imbibition se fait dans des flacons où la graine est en contact direct avec l’eau, ce qui est également visible pour Champagne. Cette accélération d’hydratation dans les premières heures d’imbibition, pour des vitesses de dessiccation élevées lors du séchage des graines, se retrouve au niveau des axes embryonnaires de Baccara (+ 61% à 6 h) et Térèse (+29% à 6 h) (Fig. 28). Par contre, la vitesse d'imbibition des axes embryonnaires de Champagne n'est pas modifiée. Les basses températures retardent l’imbibition des graines entières, des cotylédons et des axes lorsque la cinétique est exprimée en heures mais ce retard disparaît si cette cinétique d’imbibition

est exprimée en temps thermique (Fig. 29). La température intervient sur la vitesse des réactions métaboliques mais aussi sur l'entrée d'eau.

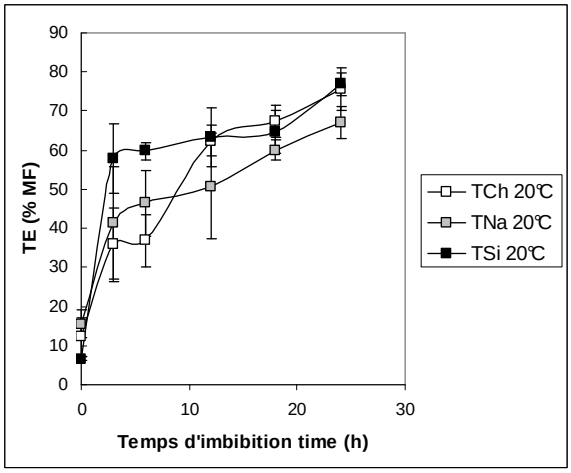


Figure 28: Evolution de la teneur en eau des axes du génotype Térèse en fonction des conditions de dessiccation.

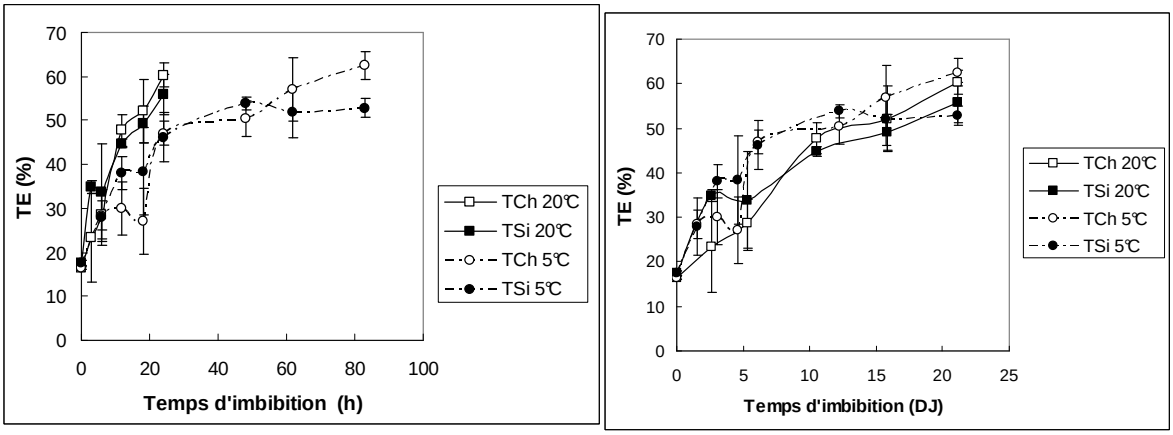


Figure 29: Evolution de la teneur en eau des graines du génotype Térèse, A exprimé en h, B exprimé en DJ.

3.4.4 Aptitude à la conservation

La faculté germinative (FG) des génotypes Baccara et Champagne est élevée quelle que soit la vitesse de dessiccation alors que le génotype Térèse montre une baisse de la faculté germinative (18%) dès un séchage à 40 mg $H_2O.h^{-1}.g^{-1}MS$ (Fig. 30). Après l'application du test de détérioration contrôlée, la faculté germinative (FGDC11) chute fortement pour les trois génotypes et la chute est d'autant plus forte que la vitesse est rapide. Le degré de perte de la faculté germinative varie en fonction des génotypes, Champagne résiste bien aux vitesses de dessiccation élevées avec une perte de 40% contre 80 à 90% pour Baccara et Térèse. Cette diminution de l'aptitude à la conservation apparait très tôt chez Térèse. Pour une vitesse de dessiccation de 40 $mgH_2O.h^{-1}.g^{-1}MS$, ce génotype ne présente plus que 40% de plantules normales alors que pour les deux autres génotypes cette diminution des plantules normales n'est visible qu'à la vitesse la plus rapide.

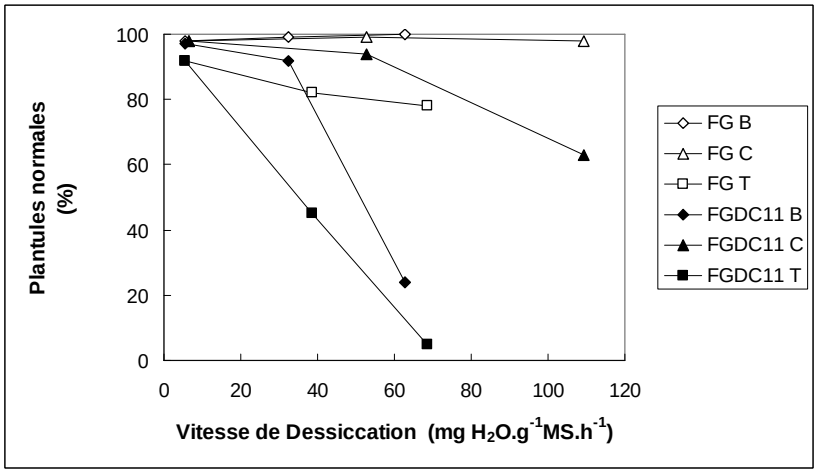


Figure 30: Faculté germinative (FG) et faculté germinative après détérioration contrôlée (FGDC11) exprimée en % de plantules normales pour les trois génotypes. B = Baccara, C = Champagne, T = Térèse.

La mesure de la conductivité de la solution de trempage de la graine permet d'estimer les fuites d'électrolytes au travers des membranes cellulaires, et donc d'estimer leur intégrité. Après la dessiccation au champ, Champagne présente une plus forte conductivité (53 µS.g^{-1}MS) que les génotypes de printemps (B : 36 et T : 40 µS.g^{-1}MS) (Fig. 31). La vitesse de dessiccation affecte très fortement la fuite des solutés, plus la vitesse de dessiccation est élevée et plus la conductivité est importante. Cependant, Champagne, malgré une vitesse de dessiccation plus élevée que celles des autres génotypes, présente une augmentation de la conductivité plus faible. La conductivité des graines reflète l'état des membranes et confirme les résultats obtenus après détérioration contrôlée. Champagne est le génotype le moins affecté par les vitesses de dessiccation alors que Térèse est le plus touché. Ce classement est confirmé par la conductivité des graines dépourvues de leur tégument montrant que la perméabilité des systèmes membranaires cellulaires, en plus de celle du tégument, est affectée par la vitesse de dessiccation. Bien que tenant compte de la différence de masse des différents génotypes dans l'expression de la conductivité, il est également judicieux de comparer ces génotypes en exprimant la conductivité par unité de surface reflétant mieux la surface d'échange avec l'extérieur. En effet, les petites graines ont plus de surface de tégument par unité de masse de graine que les grosses graines. La comparaison grâce au test de Kruskal-Wallis n'indique alors plus un effet génotype lors de la dessiccation au champ mais confirme un effet vitesse de séchage.

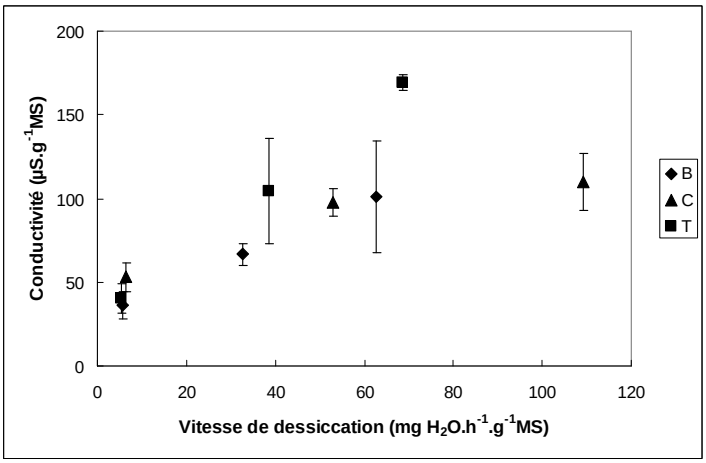


Figure 31: Evolution de la conductivité après 23 h en fonction de la vitesse de dessiccation pour les trois génotypes. B = Baccara, C = Champagne ; T = Térèse

Les trois génotypes étudiés, Baccara et Térèse pois de printemps et Champagne pois d'hiver ont une température de base de germination identique et très basse de -1.1°C Par contre, ils diffèrent par la vitesse de germination, plus rapide chez Champagne, des basses températures à l'optimum. Cette différence de vitesse de germination ne s'explique pas uniquement par une rapidité d'imbibition. De plus, Champagne présente pour la germination, une sensibilité aux températures élevées, en effet sa Tmax est plus basse que celle des deux autres génotypes. Une vitesse de dessiccation élevée dans la dernière phase de développement de la graine, entraîne des modifications métaboliques avec un arrêt de la disparition de la chlorophylle. Cette vitesse de dessiccation élevée n'affecte ni la germination ni la formation de plantules normales pour Baccara et Champagne mais elle réduit fortement l'aptitude à la conservation des trois génotypes. La baisse de l'aptitude à la conservation et l'élévation de la conductivité indiquent que l'augmentation de la vitesse de dessiccation entraine des dégâts cellulaires en particulier au niveau des membranes. Des basses températures retardent la germination, cependant si l'échelle de temps est exprimée en temps thermique (DJ) la vitesse de germination (1/T50%) est identique. Le froid, cumulé à des vitesses de dessiccation élevées, peut diminuer le taux final de germination.

3.5 Discussion

Ces données sur les effets de la température sur la germination sont importantes pour comprendre et gérer l'établissement des cultures de pois. En particulier, elles sont indispensables pour renseigner les modèles de simulation d'émergence sous des conditions variées de conditions de semis comme cela a été fait sur le haricot (Moreau-Valancogne et al. 2008). Ces données peuvent être aussi utilisées plus généralement dans des modèles de prédiction du rendement des cultures. La réussite de la culture passe par une germination des lots de semences et une émergence des plantules rapides et homogènes (Covell et al. 1986). Une meilleure compréhension et la modélisation de ces effets faciliterait la répartition des lots de graines en fonction des stress environnementaux pouvant s'exprimer dans les différentes zones de semis.

Dans notre étude, la vitesse de germination dépend fortement du génotype, la part environnementale étant plus faible. Champagne germe très rapidement, cette capacité se retrouve globalement au niveau du groupe de sept génotypes de pois d'hiver par rapport aux neuf variétés de pois de printemps dans des conditions de germination optimales. En conditions sub-optimales, cette plus grande rapidité de germination de Champagne ne se retrouve pas dans le groupe des génotypes d'hiver étudié, cependant il faudrait vérifier que c'est bien un effet génotype et non un effet lot. Cette vitesse de germination plus rapide pourrait être en lien avec la sélection de caractères permettant de résister au stade jeune plante ou bien à la présence d'un ascendant commun aux pois protéagineux d'hiver. En effet, Champagne a permis d'introduire la tolérance au froid dans des variétés de pois de conserve (Gallais et Bannerot 1992, Doré et Varoquaux 2006) qui ont été utilisées pour transférer cette tolérance aux pois protéagineux d'hiver (Doré et Varoquaux 2006). Les pois protéagineux d'hiver ont des graines plus petites que les pois de printemps.

Cependant, l'influence de la taille de la graine sur la vitesse de germination n'est pas claire ; des petites graines de maïs germent plus vite que des grosses (Schneider 1998) alors que chez *Eurotia lanata*, ce sont les plus grosses qui germent plus rapidement (Wang et al. 2004), et sur un large panel d'adventices testées (Gardarin et al. 2011) ou sur *Echinacea purpurea* (Chiu et al. 2006), la taille de la graine n'a pas d'influence sur la vitesse de germination (Hou et Romo 1998a).

Les températures cardinales des deux génotypes de pois de printemps estimées dans notre étude sont proches de celles obtenues sur le cultivar Puget (Olivier et Annandale 1998). La température minimale est très basse chez le pois, en moyenne -3,2°C contre 5 à 8,9°C pour le haricot (Raveneau et al. 2011). Des études physiologiques indiquent que le pois a une remarquable tolérance aux températures extrêmement basses pendant la germination (Stupnikova et al. 2006) et sa capacité de germination sur la glace a été démontrée (Macherel et al. 2007). Le comportement du pois se rapproche de celui de la lentille avec une température optimale de 24°C et une température maximale de 32-34°C (Covell et al. 1986) alors que celles du pois chiche, du haricot et du soja sont plus élevées (températures optimales respectives de 32°C, 33°C et 34°C, et température maximale de 56°C, 48°C et 51°C) (Covell et al. 1986, Raveneau et al. 2011). La variabilité des réponses est présente au sein d'une même espèce, Champagne, pois d'hiver, a un comportement un peu différent des pois de printemps avec une température maximale plus basse. La généralisation à l'ensemble des génotypes d'hiver demanderait plus de températures testées pour les treize autres génotypes étudiés afin d'estimer correctement la température maximale. Les températures cardinales du pois sont moins affectées par les conditions environnementales que celles du haricot (Raveneau et al. 2011). Les températures optimales varient pour un même génotype de haricot en fonction de l'année du semis mais ne sont pas significativement différentes chez le pois quel que soit le lieu de production ou l'année de production.

La température de base obtenue pour la germination chez le pois est très basse mais en accord avec les résultats obtenus sur d'autres génotypes (0°C, Olivier et Annandale 1998 et 1,4°C, Angus et al. 1981). Les faibles températures de base semblent être liées à l'appartenance au groupe des Galégoides (Young et al. 2003) comprenant aussi le pois chiche (0°C Covell et al. 1986, Ellis et al. 1986, Finch-Savage et al. 2005) la lentille (1,5-2,5°C Angus et al. 1981, Covell et al. 1986, Ellis and Barret 1994, Andrews et al. 2001) et *Medicago truncatula* (2,5-3°C, Brunel et al. 2009). Des températures de bases plus élevées sont constatées chez les espèces comme le haricot (White et Montes-R 1993, Machado Neto et al. 2006, Raveneau et al. 2011) et le soja (Angus et al. 1981, Covell et al. 1986) qui appartiennent au groupe des Phaséoloides. Le temps thermique pour atteindre 50% de germination du pois est assez long : 30-40 DJ par rapport au haricot 10-15 DJ (Raveneau et al. 2011) ou même la lentille 20-24 DJ (Covell et al. 1986, Ellis et Barrett 1994). Comme pour la température de base, le temps thermique est en lien avec l'appartenance aux groupes des Galégoides et Phaséoloides (Raveneau et al. 2011). En fait, il existe une corrélation négative entre la valeur de la température de base et le temps thermique pour atteindre 50% de germination. Cette corrélation négative a été trouvée chez de nombreuses espèces (Angus et al. 1981), et s'explique par une adaptation thermique des enzymes (Trudgill et al. 2005). Cette relation entre température de base et temps thermique conduit chaque espèce à être adaptée à un environnement thermique particulier (Trudgill et al. 2005).

La préparation des graines à la germination commence très tôt et se produit en partie dès la phase de dessiccation (Angelovici et al. 2010). Une vitesse de dessiccation rapide entraine des modifications visibles au niveau des graines des génotypes étudiés comme la couleur et l'imbibition mais surtout, engendre des dégâts mis en évidence par la détérioration contrôlée et les mesures de conductivité. Les valeurs élevées de conductivité obtenues après une dessiccation rapide indiquent une fuite importante de solutés liée à des téguments et des membranes cellulaires plus perméables à cause des dégâts engendrés. En condition de séchage sur la plante, cette fuite des solutés est très faible après le stade FRG (Pois : Corbineau et al. 2000 ; haricot : Bailly et al. 2001). De plus, des températures élevées au moment de la dessiccation (30°C/15°C) entraînent une fuite des solutés plus importante (Pukacka et Wojkiewicz 2003). Cependant, les dégâts provoqués par les vitesses de dessiccation rapide n'empêchent pas une bonne germination des trois génotypes. Après une vitesse de dessiccation importante, la couleur plus verte des téguments de nos pois semble indiquer que la dégradation de la chlorophylle n'a pas été complète et que la synthèse ou l'oxydation de certains composés phénoliques n'a pas eu lieu. En effet, pendant la phase de dessiccation les flavonoïdes accumulés dans les téguments de la graine s'oxydent et rendent les téguments plus imperméables à l'eau (Pourcel et al. 2007). Cette plus grande perméabilité facilite l'imbibition des graines. Toutefois, une réhydratation plus rapide n'est pas forcément un avantage car elle peut provoquer des ruptures de membranes (Duke et Kakefuda 1981), tout particulièrement dans l'axe embryonnaire qui s'imbibe plus rapidement que les cotylédons (Wojtyla et al. 2006). Cependant le pois comme l'arachide semblent plus résistant que le haricot ou le soja (Duke et Kakefuda 1981). Dans notre étude, cette réhydratation plus rapide ne pénalise pas la germination mais pourrait expliquer la diminution de 10% de la faculté germinative de Térèse, exprimée en pourcentage de plantules normales, avec l'augmentation de la vitesse de dessiccation. La dessiccation dans nos conditions, à 30°C et à une humidité relative inférieure à 10%, n'entraine pas une perte de la faculté germinative alors que le séchage de graines de pois à 25°C et à une humidité relative de 20% empêche le développement des plantules normales (Corbineau et al. 2000). Cependant, dans notre étude, la dessiccation s'est déroulée après FRG à 54,5% pour Baccara et Champagne et 56,2% pour Térèse de teneur en eau alors que dans l'étude menée par Corbineau (2000) les graines étaient prélevées à 63,2% de teneur en eau donc avant FRG, phase plus sensible à la dessiccation.

L'impact le plus important des vitesses de dessiccation porte sur l'aptitude à la conservation comme l'indiquent les résultats sur la faculté germinative après détérioration contrôlée. Moreau-Valancogne (2007) a mis en évidence une relation linéaire entre la vitesse de dessiccation et l'aptitude à la conservation des graines de haricot. Le test de détérioration subi par les graines de pois dans notre étude, implique l'application de températures élevées (40°C). A des températures élevées, les graines sont exposées à un stress oxydatif qui provoque des modifications dans les constituants des membranes pouvant affecter la sensibilité des membranes à l'attaque des radicaux libres pendant le stockage (Pukacka et Wojkiewicz 2003). En fin de cycle, dans les dernières phases de maturation, des conditions climatiques chaudes et sèches favorisent l'apparition de graines vertes chez le soja, ce qui entraîne un déclassement des lots (Gomes et al. 2003, Pizzolante de Padua et al. 2007). Comme dans notre étude, des graines vertes de soja peuvent être obtenues après des séchages artificiels rapides bloquant le processus de dégradation de la chlorophylle (Gomes et al. 2003, Sinnecker et al. 2005). Les effets négatifs des grains verts sur le potentiel de germination ne sont pas toujours observés quand le semis se déroule peu de temps après la récolte mais la présence de grains verts aggrave les effets d'un stockage dans des conditions non contrôlées (Pizzolante de Padua et al. 2007). La perturbation dans

la conservation de la graine a été retrouvée dans différents mutants tégumentaires d'Arabidopsis (mutant graine verte (*grs*) et mutant *abberant tests shape* (*ats*), montrant l'importance d'un tégument fonctionnel pour la longévité de la graine (Debeaujon et al. 2000, Clerkx et al. 2003, 2004). Les génotypes de printemps, en particulier Térèse, sont très sensibles aux vitesses de dessiccation alors que le génotype d'hiver Champagne a une aptitude à la conservation qui se maintient bien.

L'application de basses températures entraine une légère diminution de la vitesse de germination mais n'affecte pas la cinétique d'imbibition des graines ou des axes lorsque ces cinétiques sont exprimées en temps thermique. Le pois résiste bien aux basses températures car l'effet du froid n'agit que sur les vitesses de réactions métaboliques et n'empêche pas le bon déroulement de la germination. Alors que pour d'autres plantes comme le colza, à cet effet thermique s'ajoute un effet sur le développement avec un retard de 60 DJ (pour obtenir 75% de germination) entre la germination à 22°C et 6°C et certaines graines ne germent pas (Nykiforuk et Johnson-Flanagan 1999). Le froid peut provoquer des dégâts d'imbibition et de faibles températures favorisent la fuite des solutés (Bramlage et al. 1978, Leopold et Musgrave 1979). Les basses températures cumulées à une vitesse de dessiccation rapide affectent le pourcentage final, cependant les valeurs obtenues sont plus faibles (10%) par rapport à ce que l'on a pu obtenir précédemment en 2005 (40%). Les dégâts d'imbibition peuvent être réduits si les graines ont une teneur en eau élevée avant l'imbibition à basse température, en dessous d'une teneur en eau de 13% chez le soja, cette sensibilité au froid augmente linéairement lorsque la teneur en eau diminue (Hobbs et Obendorf 1972). La teneur en eau des graines utilisées dans cette étude a augmenté au cours du stockage et les lots BSi et TSi avait une teneur en eau de 17,5% alors qu'en 2005, les graines avaient une teneur en eau plus basse d'environ 12,7%. Ce qui pourrait expliquer le pourcentage de germination à 5°C plus élevé avec les lots de 2008. Après vieillissement les graines sont encore plus sensibles aux dégâts d'imbibition (Duke et Kakefuda 1981, Veselova et al. 2003) et présentent une augmentation de la perméabilité des membranes cellulaires (Golovina et al. 1997).

L'installation des cultures demande une germination rapide mais aussi une phase de croissance rapide pour une bonne levée. La température de base d'élongation du pois est plus élevée que la température de base de germination (Raveneau et al. 2011), et lorsque l'on considère le temps thermique nécessaire après semis pour obtenir un épicotyle de pois de 5 cm, la différence entre les génotypes d'hiver et de printemps s'efface. Le temps thermique nécessaire à la croissance est plus élevé chez Champagne par rapport aux pois de printemps. La germination et la croissance précoce des plantules sont deux phases devant être étudiées séparément dans les programmes de sélection pour améliorer les vitesses de levée et de façon plus globale l'installation des cultures.

Les résultats indiquent des différences importantes au niveau de la vitesse de germination en fonction du génotype, et de la vitesse de dessiccation sur l'aptitude à germination après conservation. Comment peut-on expliquer ces différences au niveau de la physiologie et du métabolisme de la graine? Au cours de l'imbibition, en parallèle avec l'hydratation des tissus de la graine, la consommation en oxygène augmente indiquant une reprise du métabolisme. L'étude a donc été ciblée sur l'état initial de la graine, la reprise du métabolisme énergétique et la mobilisation des glucides solubles.

4. Physiologie et métabolisme de la germination

4.1 Problématique

Une installation homogène et rapide des cultures découle d'un bon déroulement de la germination mais aussi de sa rapidité. Nous avons montré dans la partie précédente, que dans des conditions pouvant se rencontrer dans la nature au moment des semis en France, Champagne germe plus rapidement que d'autres génotypes, en particulier les génotypes de printemps. Cette vitesse de germination plus rapide ne s'explique pas uniquement par une imbibition plus rapide, l'exploration des mécanismes physiologiques est donc indispensable pour expliquer cette capacité. Dès le début de la germination, la graine a besoin de réactiver son métabolisme, cette réactivation passe par une réhydratation des tissus et par une reprise de la respiration. Le redémarrage cellulaire et les nouvelles biosynthèses nécessaires à la germination demandent de l'énergie fournie par la production d'ATP, et des squelettes carbonés fournis notamment par le cycle tricarboxylique (TCA) mitochondrial. La production d'ATP dans la chaine respiratoire mitochondriale est dépendante du transfert d'électron et de l'apport en oxygène, mais aussi de l'approvisionnement en substrats comme le succinate provenant du cycle TCA. Le cycle TCA est relié à la glycolyse qui, par dégradation des hexoses, produit du pyruvate, qui va fournir l'acetyl-CoA qui alimente le cycle (Fig. 6). Au cours de la germination, les sucres solubles jouent un rôle prépondérant car l'amidon est dégradé plus tardivement et cette dégradation est considérée comme un évènement post-germinatif, se déroulant après l'élongation radiculaire (Monerri et al. 1986, Dirk et al. 1999, Bialecka et Kepczynski 2007).

Nous avons testé l'hypothèse qu'une vitesse de germination rapide pourrait être liée à une production importante d'ATP dépendante d'un bon approvisionnement en oxygène et en acides organiques. La mobilisation précoce des sucres solubles au cours des premières heures de la germination permettrait d'une part d'alimenter la chaine respiratoire en substrats et d'autre part de fournir des squelettes carbonés pour les nouvelles biosynthèses, via la glycolyse et le cycle TCA. Pour les légumineuses, ces sucres solubles sont des oligosaccharides appartenant à la famille du raffinose (RFO).

Bien que le développement de l'embryon et la phase de remplissage du grain soient terminés, une activité métabolique est présente au début de la phase de dessiccation, notamment, la dégradation de la chlorophylle et la synthèse de certains RFO comme le verbascose (Peterbauer et al. 2001). L'autre hypothèse testée est qu'un stress provoqué par l'application de vitesses de dessiccation rapides induirait une modification des potentialités de la graine sèche. Cette vitesse de dessiccation rapide empêcherait le bon établissement des protections, les synthèses complètes, en particulier la polymérisation des oligosaccharides vers le verbascose, et un état énergétique favorable à la reprise du métabolisme.

Les modifications engendrées par les vitesses de dessiccation rapides pourraient pénaliser plus fortement la germination des graines lors de son déroulement en conditions sub-optimales. Outre le rôle des RFO dans l'apport énergétique au moment de la germination, différents auteurs ont mis en évidence une corrélation entre l'accumulation de RFO dans la plante et la robustesse au froid (Castillo et al. 1990, Peterbauer et al. 2001; Bourion et al. 2003, Cunningham et al. 2003). D'autre part, Mizuno et al. (2008) ont montré que le froid (4°C) entrainait une diminution de la respiration chez le blé.

Cependant, le retour à l'état initial de la respiration par la voie COX était plus rapide chez le cultivar de blé tolérant au froid que chez le cultivar sensible au froid. La dernière hypothèse testée est que le froid entrainant une accumulation de RFO dans les plantes, la mobilisation des sucres solubles au moment de la germination risque d'être affectée par les basses températures, limitant la formation d'ATP et la fourniture de squelettes carbonés. Cependant, Champagne, pois d'hiver pourrait avoir une respiration plus importante que les génotypes de printemps aux basses températures.

4.2 Matériel et méthode

4.2.1 Respiration des fragments et des axes embryonnaires.

La respiration est l'un des tout premiers processus de la reprise d'activité de la graine au début de l'imbibition. Les graines sèches (environ 0,11g H_2O g^{-1} MS, 12% de teneur en eau) sont broyées au broyeur à billes (Retsch, Haan, Germany) et des fragments de 0,7 mm de diamètre sont récupérés à travers un tamis. Ces fragments (100 mg) sont imbibés, dans une boite hermétique, sur un pont de papier Whatman 3MM posé sur un portoir ajouré et dont les deux extrémités trempent dans de l'eau distillée permettant une imbibition régulière, répétable et homogène. La température d'imbibition est de 23°C et la durée d'imbibition est de 20, 40, 60, 80, 120 min pour la reprise du métabolisme et de 40 min pour l'étude de la température sur la respiration. Afin de mieux appréhender l'effet des basses températures, l'imbibition a été aussi réalisée à 5°C toujours pendant 40 min. De même, pour la respiration des axes embryonnaires, l'imbibition de huit axes s'est déroulée dans les mêmes boites pendant 40 min. A chaque fois, trois répétitions ont été effectuées.

La consommation en oxygène des fragments et des axes embryonnaires a été mesurée grâce à une électrode à oxygène calibrée de type Clark (Oxytherm, Hansatech, King's Lynn, UK) (Benamar et al. 2003). La mise sous tension de l'électrode permet la création et le maintien d'une différence de potentiel de 0,6-0,7V entre l'anode en argent (+) et la cathode de platine (-) (Fig. 32). L'oxygène dissous dans le tampon contenu dans la cuve diffuse au travers de la membrane en téflon hydrophobe vers la solution de chlorure de potassium (KCl), milieu baignant l'électrode. L'oxygène est alors réduit au niveau de la cathode de platine, tandis qu'au niveau de l'anode, l'argent est oxydé et réagit avec le chlore, provoquant un dépôt de chlorure d'argent. Le courant résultant de ces réactions est faible mais proportionnel à la concentration d'oxygène contenu dans la cuve contenant l'échantillon. Ce signal peut être amplifié et enregistré.

Pour les différents échantillons, lorsque la vitesse de consommation de l'oxygène est constante, du cyanure de potassium (KCN: 1mM) est ajouté dans la cuve pour inhiber le transfert des électrons par la voie COX et révéler la capacité de la voie AOX. La respiration totale est donnée par la pente de la consommation de l'oxygène constante avant l'ajout de KCN. La capacité de la voie AOX est donnée par la pente de la consommation en oxygène après ajout de KCN. L'ordre de grandeur de la capacité de la voie COX est estimé en retranchant à la valeur de la respiration totale la valeur de la capacité de la voie AOX. Ces trois valeurs sont exprimées par gramme de matière sèche pour tous les échantillons.

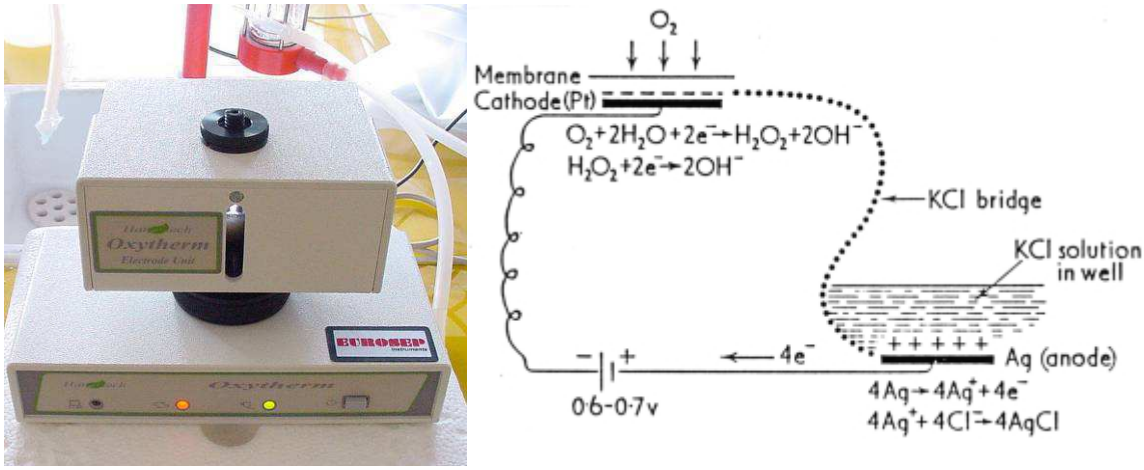


Figure 32 : A gauche vue externe de l'oxygraphe, à droite le schéma de fonctionnement de l'électrode à oxygène. http://www.hansatech-instruments.com/oxygen_general_principles.htm.

Dans l'étude de la respiration en fonction de la température, la loi d'Arrhenius permet de décrire la variation de la vitesse de la respiration et donc de mettre en évidence, par des ruptures de pente, des processus biochimiques différents liés à la température. Les diagrammes d'Arrhenius sont construits en mettant en ordonnée le logarithme Népérien de la vitesse de respiration totale en fonction de l'inverse de la température exprimée en degré Kelvin. Le calcul de la pente (P) des droites obtenues permet de calculer l'énergie d'activation (Ea) exprimée en $KJ.mol^{-1}$.

$Ea = -P \times R$

avec R, la constante des gaz parfaits (8,314 $J.mol^{-1}.k^{-1}$).
Cette énergie d'activation a des conséquences sur la réalisation des réactions, la réaction sera d'autant plus rapide que l'énergie d'activation sera faible.

Afin de découpler la respiration de la formation d'ATP, le transfert des électrons n'est plus limité par l'activité de phosphorylation grâce à l'ajout d'un agent découplant, le FCCP (p-triFluoromethoxy-Carbonyl-Cyanide-Phenylhydrazone). La respiration des fragments est étudiée en présence et en absence de ce protonophore (2µM) permettant la dépolarisation des membranes.

4.2.2 Respiration des graines entières

La respiration des graines entières prend en compte le déroulement de l'imbibition. Dix graines sont placées dans un flacon d'environ 11,6 mL, contenant 3,5 mL d'eau déminéralisée pour les grosses graines Baccara et Térèse et 1,5 mL pour Champagne génotype à petite graine (Fig. 33). Le flacon est fermé par un bouchon plastique souple et posé horizontalement en répartissant le plus possible les graines contre la paroi au contact de l'eau. Les mesures sont effectuées toutes les 10 min pendant 24 h, dans l'air du flacon grâce à une sonde micro fibre à oxygène (Pst1; PreSens, Allemagne) dont la précision est de 0,4% à 21% et 0,05% à 0,2% de dioxygène. Les valeurs sont récupérées et enregistrées via un récepteur de microfibre optique à oxygène (Microx TX3; PreSens, Allemagne).

La valeur est enregistrée en % d'O_2 dans l'air. L'air atmosphérique contient 21% d'O_2, soit 210 µl d'O_2 dans 1 mL d'air, soit 210/22,414 = 9,37 µmole O_2 par mL d'air à 273K, car 1mole correspond à 22,414l.
A la température de la mesure (environ 20°C) la quantité d'oxygène dans le flacon, exprimée en $\mu molO_2.l^{-1}$, est :

((O%*10)/22,414)*(273/T)* (Vf/MS)

O% = valeur du % d'oxygène enregistrée, *10 pour avoir en µl dans 1 mL d'air, 22,414 volume en l pour 1mole d'O2, T= température réelle de la mesure en K, Vf = volume du flacon, MS = Matière sèche des 10 graines.

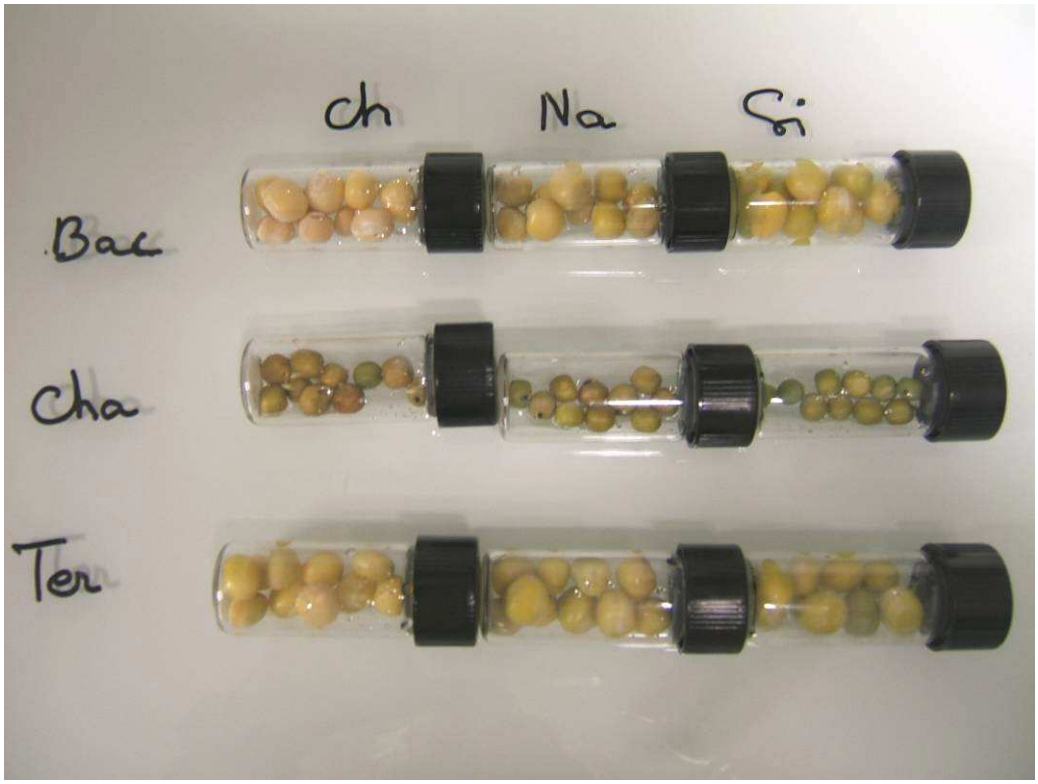


Figure 33 : Graines des différents génotypes après 24 h d'imbibition dans les flacons utilisés pour la mesure de la respiration.

4.2.3 Fonctionnement des mitochondries

Afin de vérifier si les vitesses de dessiccation entrainaient un dysfonctionnement mitochondrial, l'intégrité et l'activité mitochondriale ont été étudiées. Les mitochondries ont été isolées de graines de pois du génotype Baccara (2006) après 22 h d'imbibition comme décrit par Benamar et al. (2003). Deux répétitions ont été effectuées, la première répétition avec 400 graines et la seconde répétition avec 200 graines. L'intégrité de la membrane externe mitochondriale a été mesurée avec de l'ascorbate-cyt c (Benamar et al. 2003). Les propriétés oxydatives mitochondriales ont été étudiées en utilisant différents substrats : succinate (5 mM), NADH (1,5 mM) and Malate/Glutamate (7,5 mM chacun). Les activités mitochondriales ont été mesurées à vitesse constante de consommation

d’oxygène sans ADP (Etat 4) et après stimulation avec de l’ADP (Etat 3) (Fig. 34). Le calcul du rapport entre Etat 3/Etat 4 permet d’estimer le contrôle respiratoire (RC) qui est un indicateur de la capacité mitochondriale à phosphoryler l’ADP en ATP. Afin d’étudier l’adénylate kinase, des mitochondries ont été isolées à partir de 400 graines de Baccara produites en 2009, le substrat respiratoire est du succinate et la respiration se déroule à 25°C. L’inhibiteur de l’activité de l’adénylate kinase utilisé est le Ap_5A (P1,P5-di(adenosine-5’) pentaphosphate) (Roberts et al. 1997).

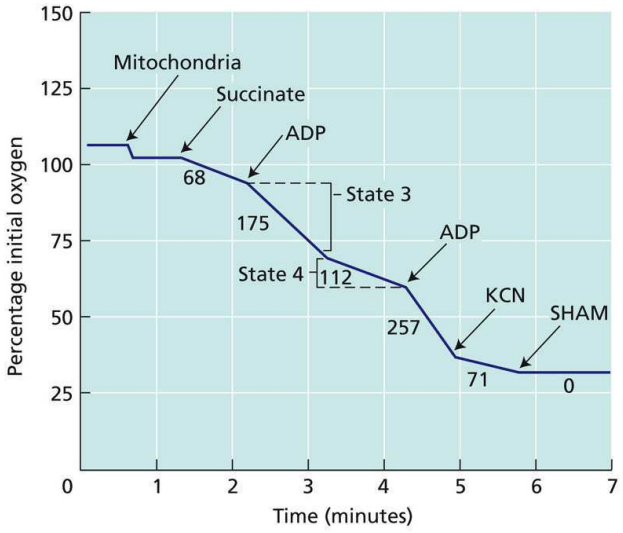


Figure 34 : Différents états mitochondriaux. (Data courtesy of Steven J. Stegink.) Moller et Rasmusson dans Plant Physiology 5e édition Taiz L. Zeiger E. http://5e.plantphys.net/article.php?ch=11&id=495&search=mitochondria

De même, pour savoir si la mise en place des protections avait été affectée par les vitesses de dessiccation rapides, l’expression de la protéine LEAM a été suivie. Pour les graines du génotype Baccara ayant subi des dessiccations en conditions contrôlées (BNa et BSi, 2006) des graines ont été prélevées à différents moment au cours du séchage, mis dans l’azote liquide et stocké à -80°C avant utilisation. Pour les graines dont la dessiccation s’est déroulée au champ (BCh, 2006) un seul prélèvement a été réalisé, celui de la fin de dessiccation. L’extraction protéique et la détection par immunologie de la protéine LEAM par western-blot a été réalisée selon le protocole de Grelet (Grelet et al. 2005).

4.2.4 Dosage des adénylates

Comme pour la respiration, les fragments permettent l’étude rapide de la reprise du métabolisme énergétique cellulaire dans des conditions plus homogènes de réhydratation des cellules. Les graines entières complètent les informations recueillies sur fragments en donnant une cinétique de l’évolution des adénylates au cours de la germination de la graine. L’axe embryonnaire est un compartiment de la graine très actif lors de la germination et il est intéressant de voir si son comportement est similaire à la graine entière. Les différents génotypes et les différentes espèces sont étudiés pour vérifier si certains résultats peuvent être généralisables aux graines de pois protéagineux, aux légumineuses, aux végétaux et au final aux anhydrobiotes.

La préparation des échantillons est différente selon les organes ou les espèces étudiées mais tous les échantillons après prélèvement sont plongés dans l'azote liquide et conservés à -80°C avant extraction. Les fragments (100 mg), de diamètre 0,7 mm, sont mis à imbiber dans des boites de Pétri contenant un buvard rond humidifié avec 3,5 mL d'eau et 2 papiers filtres blancs. Les fragments sont déposés sur les papiers blancs et les boites de Pétri sont incubées à 20°C ou 0°C pendant des durées variables de 0 à 60 min.

Les graines sont mises à imbibées dans les mêmes conditions que pour les essais de germination avec 0, 6, 12, 18 h d'imbibition pour les graines entières des génotypes Baccara, Térèse et Champagne à 20°C. Pour les axes embryonnaires, après le temps sélectionné d'imbibition à 20 et 5°C, les graines sont disséquées et les axes embryonnaires prélevés (Fig. 35). Pour les lots commerciaux de pois protéagineux et les différentes espèces, les dosages ont été réalisés sur les graines sèches après lyophilisation et sur les graines imbibées à 20°C pendant 18 h pour les différents génotypes de pois et 12 h pour les différentes espèces (Haricot Mungo, *Medicago*, embryon de triticale ou de maïs, colza et tournesol) en raison de la très grande rapidité de germination de certaines espèces comme le haricot mungo. Pour les céréales, les quantités d'adénylates étant très faibles dans la graine entière, nous avons éliminé les réserves. Cette élimination des réserves est complète chez le maïs car le prélèvement de l'embryon est relativement facile. Par contre, pour le triticale, l'embryon n'a pas été dégagé de l'albumen mais la graine a été sectionnée à l'extrémité de l'embryon. La partie utilisée contient l'embryon mais aussi une petite partie des réserves. Pour les embryons enkystés d'*Artemia franciscana*, un sachet d'*Artemia* salzmix de 18 g a été acheté en jardinerie sous la marque Artemia-mix SERA®. Pour éliminer le sel, le mélange est mis en solution dans 100 mL d'eau, et les kystes sont récupérés par filtration puis lyophilisés. Ils sont alors broyés au broyeur à billes dans un microtube avec deux billes métalliques de 5 mm pendant 30 s.



Figure 35 : Dissection des graines de Baccara

L'étude de graines pré-germées ou de graines vieillies permet de connaître l'évolution du stock des adénylates des graines dans des conditions favorables ou défavorables à la germination. Pour les graines pré-germées, les graines de Baccara récoltées au champ sont imbibées pendant 18 h puis séchées sur du Silicagel (2,4% d'eau $.h^{-1}$), des prélèvements étant effectués au cours de la dessiccation. Le vieillissement accéléré des graines a été réalisé par exposition des graines à 45°C pendant différentes durées dans une enceinte contenant une solution de NaCl saturée maintenant une humidité relative de 76% (Benamar et al. 2003). Ensuite les graines sont séchées rapidement, la teneur en eau obtenue est de 15% MF, valeur un peu supérieure à leur teneur en eau initiale.

Les graines sèches (absence d'imbibition) sont plongées dans l'azote liquide, lyophilisées puis broyées à température ambiante au broyeur à bille pendant 2 min. A la fin du temps d'imbibition désiré, les échantillons (fragments, graines entières, axes embryonnaires) sont plongés dans l'azote liquide et broyés sans décongélation avec de l'azote liquide au broyeur à bille, respectivement pendant 30 s, 2 min et 2 min.

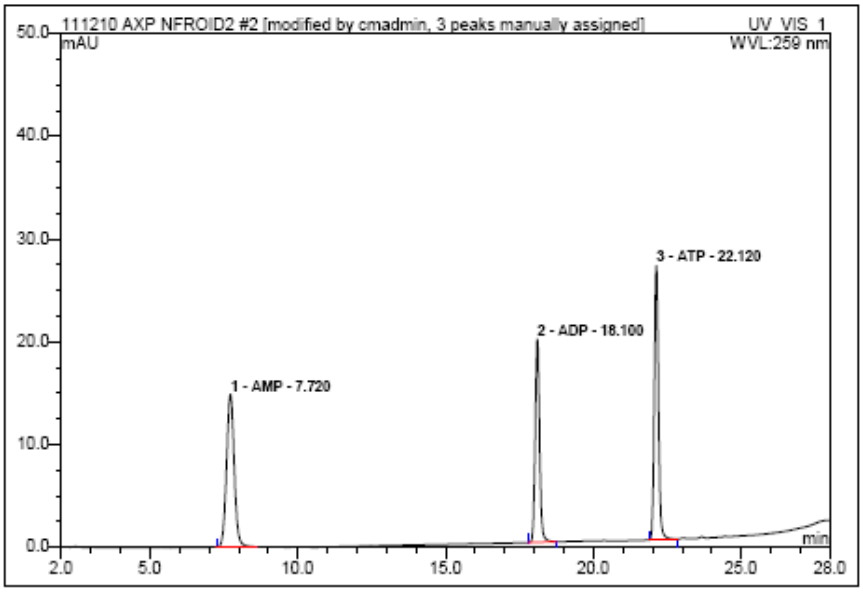
Afin de mimer le rôle de l'adénylate kinase dans la gestion des pools d'adénylates au cours de la déshydratation et l'imbibition, des réactions enzymatiques sont réalisées in vitro, dans 250 µL de tampon 50mM tri-ethanolamine (pH 7,5), 10mM KCl, 2mM $MgCl_2$ maintenu à 30°C. Pour l'essai adenylate kinase-hexokinase (AK-HK), le mélange réactionnel contient 400 mM glucose, 5 mM ADP, 2,5 mM ATP, 2,5 mM ATP, 2,5 mM AMP et 5 U d'adénylate kinase (Sigma réf M3003) et 8U d'hexokinase (Sigma réf H5500). Pour l'essai adénylate kinase-hexokinase (AK-PK), le mélange réactionnel contient 20 mM AMP, 10 µM ADP, 20 mM Phosphoenolpyruvate, 2,5 U d'AK (Sigma réf M3003) et 2.8 U de PK (Sigma réf P9136). Pour l'analyse des adénylates, des aliquotes de 5 ou 10 µL sont prélevées et les enzymes inactivées par chauffage (5 min à 90°C). L'extrait est dilué 100 fois dans l'eau distillée et les adénylates directement dosés par HPLC.

Les adénylates sont extraits à partir des différents matériels biologiques (graines, tissus, cystes d'*Artemia*, …) par broyage et extraction méthanolique. Le broyage en poudre fine du matériel sec ou congelé est réalisé à l'aide d'un broyeur à billes (TissueLyser Qiagen Retsch). Dans le cas de matériel congelé, la congélation est maintenue par ajout d'azote liquide. La poudre (ex. 50 mg) est alors projetée dans 400 µL de chloroforme méthanol (1:1 v/v). Après agitation et incubation de 10 min sur la glace, 200 µL d'eau sont ajoutés, et après mélange l'extrait est centrifugé (13400 g, 10 min, 4°C). La phase supérieure (390 µL) est alors recueillie pour être analysée par HPLC (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA) sur une colonne IonPac AS11 (Dionex). La séparation est réalisée à 30°C, avec un débit de 0,38 $mL.min^{-1}$. L'élution successive des adénylates (AMP, ADP, ATP), détectés par absorbance à 259 nm, est obtenue par une solution de soude appliquée par le générateur de gradient EG-3000 (Dionex) selon le programme suivant:
17 mM NaOH, 8 min.
17-100 mM NaOH, 13 min (Gradient concave courbe 6).
100 mM NaOH, 5 min.

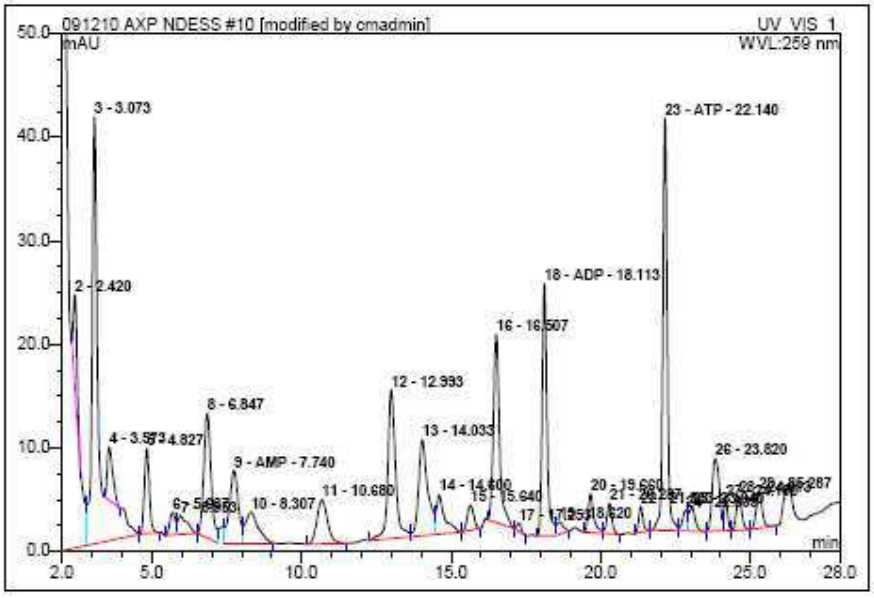
L'identification des pics correspondant aux adénylates dans les chromatogrammes est vérifiée par un ajout de standard dans l'extrait (spiking) (Fig. 36). La quantité d'adénylate dans l'extrait injecté est calculée en utilisant une gamme étalon de 0 à 100 µM des différents adénylates. Afin d'éliminer la dérive du détecteur par vieillissement de la lampe UV au cours du temps, la valeur est corrigée en tenant compte des deux standards qui encadrent la mesure.

$Q = (Vd*QStd)/(Std1+Std2/2)$

Vd = valeur de la quantité donnée par la Dionex, calculée à partir de la gamme étalon, QSdt est la quantité de l'adénylate dans le standard et Std1 et Std2 sont les valeurs données par la Dionex pour les deux standards encadrant la mesure. Un calcul est effectué pour déterminer la quantité des différents adénylates qui est exprimée en $nmol.g^{-1}MS$. La teneur en eau des différentes poudres, des organes ou des fragments est obtenue par pesée avant et après passage à l'étuve à 96°C pendant 48 h.



A



B

Figure 36 : Chromatogramme du standard (A) et chromatogramme de l'extrait de pois Baccara champ après 18 h d'imbibition (B).

4.2.5 Dosage des sucres

Les différents lots de graines ont été mis à germer selon la même procédure que les cinétiques de germination à 20°C et à 5°C. A 20°C, le prélèvement des graines a été réalisée à 0, 3, 6, 12, 18, 24 h alors qu'aux basses températures le nombre de prélèvements est plus important pour pouvoir comparer au même temps, en heures et en degrés-jours. Les prélèvements à 5°C ont été effectués à 0, 6, 12, 18, 24, 48, 62, 83 h, permettant d'avoir pour les deux températures des temps thermiques équivalents de 0, 3, 5, 11, 16, 21 DJ. Après le temps d'imbibition désiré, 21 graines pour chacun des lots sont rapidement disséquées, le tégument est enlevé, l'axe embryonnaire est délicatement séparé des cotylédons et chaque compartiment est plongé dans de l'azote liquide. Les tubes contenant

soit les axes soit les cotylédons sont placés dans un lyophilisateur (Heto PowerDry LL3000, Thermo Electron Corporation) pendant 60 h. Après lyophilisation, le matériel végétal est pulvérisé au broyeur à billes (2 min à haute fréquence 30 mouvements/sec). Des quantités précises de poudre sont mesurées (10-15 mg pour les axes embryonnaires, 20 mg pour les cotylédons), avec trois répétitions pour un échantillon donné. L'extraction des sucres se fait en présence de 1mL de méthanol 80% (v/v) et du standard interne (mélizitose 40 µL à 4 $g.L^{-1}$) pendant 15 min au bain-marie à 76°C. Après séchage au speed-vac (40°C, environ 2h) le culot est repris avec de l'eau MilliQ puis centrifugé 5 min à 14 000 rpm, à 4°C. Le surnageant est conservé à -20°C jusqu'à l'analyse.

L'analyse se fait grâce à l'HPLC Dionex CarboPac PA1 permettant la séparation des monosaccharides et des oligosaccharides par chromatographie d'échange d'anions à pH élevé, couplé à une détection électrochimique pulsée (PAD). La quantité de sucre X (saccharose, raffinose, …) de l'échantillon (QE) est calculée en se basant sur l'aire du pic de l'échantillon (APE, Fig. 37) et la correspondance entre l'aire des deux pics des standards encadrant l'échantillon (APS, Fig. 37) et la concentration connue en mgL^{-1} de la solution standard (QS).

$QE = APE * QS/APS$

Cette quantité est corrigée par l'écart possible entre la valeur théorique du standard interne (QTSi) et la quantité calculée de ce standard interne (QCSi) pour l'échantillon. Ensuite la valeur est exprimée en g de matière sèche (MS) pour obtenir la teneur en sucre de l'échantillon (TXE).

$TXE= (QTSi/QCSi) * (QE/MS)$.

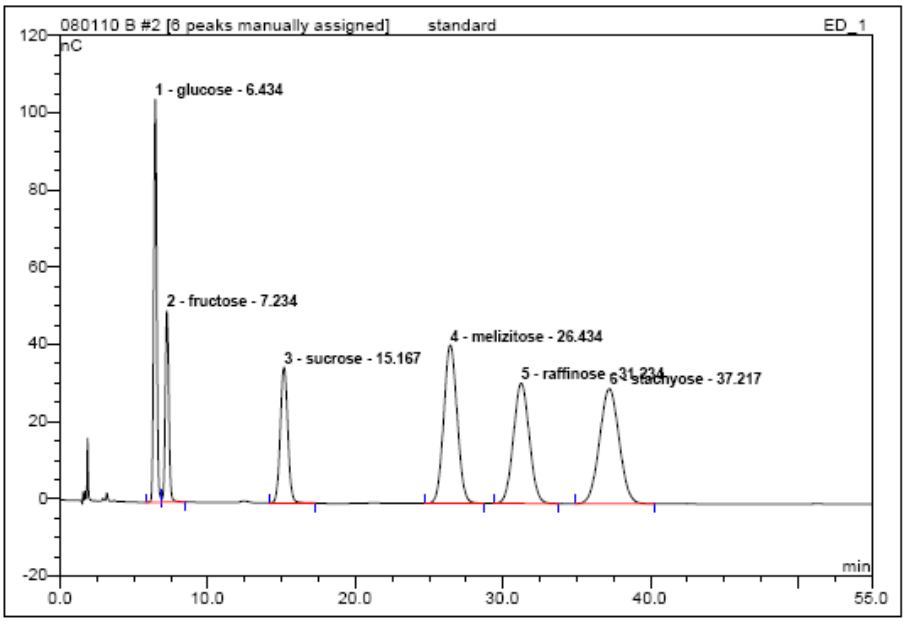
Pour pouvoir additionner les différents sucres et faire un bilan carboné, la conversion des teneurs en sucres en unités mole de carbone a été réalisée. Pour chaque type de sucre X :

$X= (TXE/PM)* NC$

Avec X la teneur en mole de carbone pour un type de sucre donné, TXE la teneur en sucre par $g.g^{-1}$MS, PM le poids moléculaire du sucre donné et NC le nombre de molécule de carbone dans le sucre donné.

Pour explorer plus finement les évolutions des différents sucres, des calculs ont été réalisés pour estimer les teneurs en saccharose et galactose incorporés dans les RFO dans les graines sèches et dans les graines imbibées (24 h à 20°C et 83 h à 5°C). Pour le saccharose, le calcul se fait à partir d'une mole de saccharose présente dans une mole de raffinose, stachyose ou verbascose. Pour le galactose, une mole est présente dans le raffinose, deux moles dans le stachyose et trois moles dans le verbascose. La différence entre la teneur calculée en saccharose piégé dans les RFO de la graine sèche et celle de la graine avant germination (24 h pour l'imbibition à 20°C et 83 h pour l'imbibition à 5°C) permet d'obtenir la teneur de saccharose libéré par les RFO au cours de l'imbibition. A cette valeur est ajoutée la teneur en saccharose présent dans la graine sèche, permettant ainsi d'estimer le pool théorique de saccharose avant la germination. De ce pool théorique est retranché le saccharose présent dans les graines imbibées, permettant de calculer l'utilisation de ce saccharose.

A



B

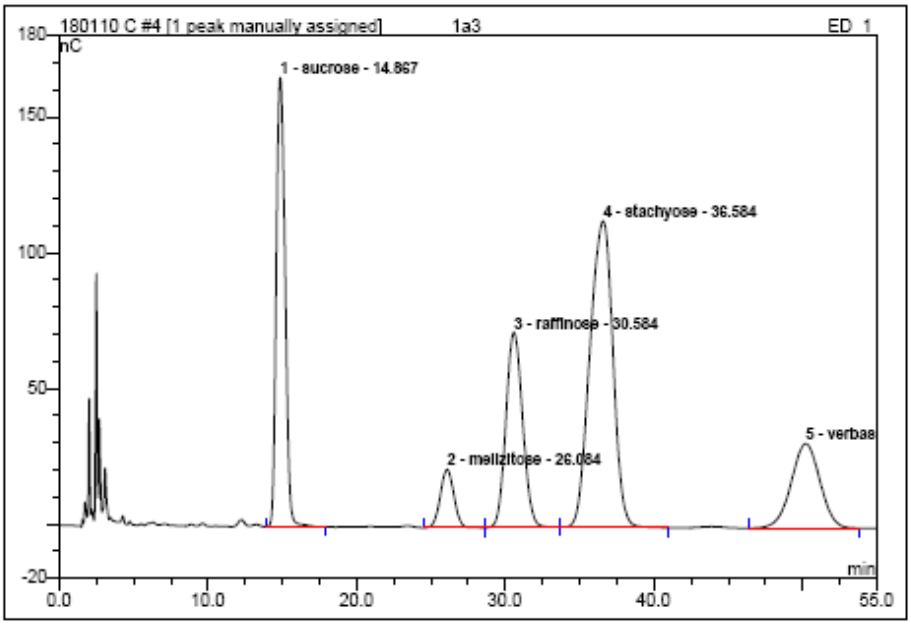


Figure 37 : Chromatogramme du standard des sucres (A) et chromatogramme d'un extrait d'axes de graines sèches de pois Baccara (B).

4.2.6 Analyses Statistiques

Le calcul des vitesses de dégradation des sucres a été réalisé sous Excel. La comparaison des pentes est effectuée après vérification de l'égalité des variances résiduelles des deux lots en calculant dans un premier temps la variance résiduelle commune (Couty et al. 1990) :

$\sigma^2 = (n-2)\ S^2_R + (n'-2)S'^2_R/(n+n'-4)$

avec n : le nombre de points pour le lot1 et S^2_R la variance résiduelle du lot1
et n' : le nombre de points pour le lot2 et S'^2_R la variance résiduelle du lot2.
puis la valeur T calculée, à comparer avec la valeur $t_{0,05}$ de la table de Student, si T> t0.05 la différence des pentes est significative.

$T = (a-a')/ \sigma\sqrt{((1/(n*var)+(1/(n'*var')}$

Avec a et a' les pentes des lots 1 et 2 respectivement
σ la racine carrée de la variance commune
var et var' la variance de la teneur en sucre du lot1 et 2 respectivement.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R, à une date donnée, après vérification de la distribution normale des données. Lorsque les données n'étaient pas distribuées selon une loi normale, les données ont été comparées à l'aide du test non – paramétrique de Kruskal-Wallis.

4.3 Respiration mitochondriale

Au cours de la germination, l'imbibition des graines est progressive, les cellules les plus externes retrouvent rapidement une activité, alors que celle qui sont plus à l'intérieur subissent un décalage dans leur reprise d'activité. Pour s'affranchir de cette imbibition irrégulière, et donc de la reprise hétérogène du métabolisme des cellules, des mesures de respiration ont été réalisées sur des fragments de graines calibrés qui s'imbibent rapidement et de façon plus homogène. Afin de mieux comprendre les phénomènes se déroulant au sein de la graine, des mesures de respiration seront réalisées sur les axes embryonnaires. De manière à tenir compte de la réalité d'une imbibition plus rapide de certains génotypes nous avons également suivi la respiration sur la graine entière au cours de l'imbibition.

4.3.1 Respiration des fragments

4.3.1.1 Imbibition des fragments

L'augmentation de la teneur en eau des fragments est très importante pendant les premières minutes d'imbibition (Fig. 38). La teneur en eau passe de 12% environ à 30% en 10 minutes. Baccara est un peu plus lent que les deux autres génotypes dans les cinq premières minutes. Au-delà de 20 minutes, aucune différence significative n'a été trouvée entre les génotypes et en fonction des différentes vitesses de dessiccation. A 40 minutes d'imbibition les fragments sont à environ 42% de teneur en eau et la comparaison de la respiration peut ainsi s'affranchir de l'état de réhydratation de la graine.

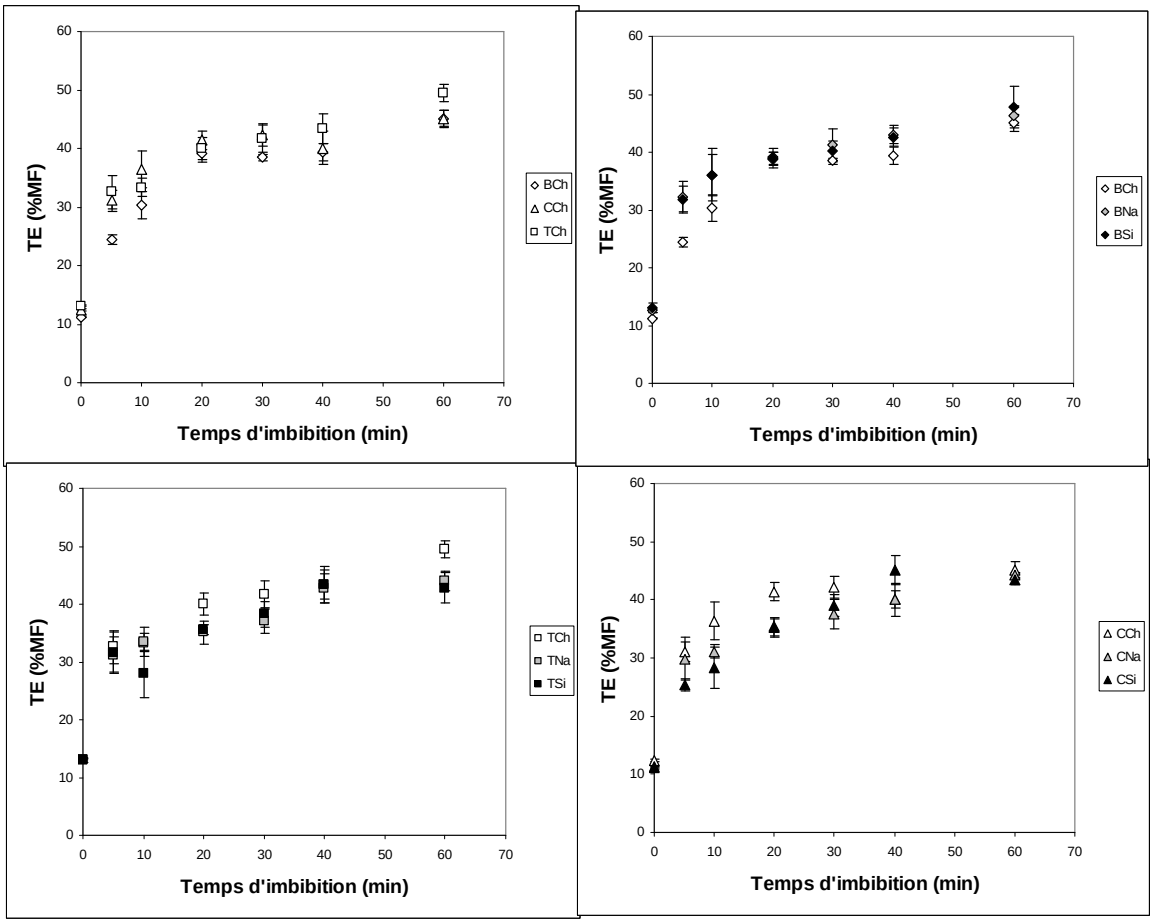


Figure 38 : Evolution de la teneur en eau (en % MF) des fragments en fonction du temps d'imbibition.

B = Baccara, C = Champagne T = Térèse ; En haut à gauche comparaison des trois génotypes ; en haut à droite Baccara ; en bas à gauche Térèse et en bas à droite Champagne avec les trois modalités de dessiccation : Ch = dessiccation au champ, Na = dessiccation à 30°C et à une humidité relative de 75%, Si = dessiccation à 30°C et à une humidité relative inférieure à 10%.

4.3.1.2 Reprise de la respiration des fragments au cours de l'imbibition

La respiration des fragments augmente de façon pratiquement linéaire avec le temps d'imbibition pour les trois génotypes ayant subi la dessiccation au champ. La pente de la droite exprimant la vitesse de consommation d'O_2 de Térèse est la plus élevée (0,738 nmol $O_2.min^{-2}.g^{-1}MS$), celle de Champagne a une valeur intermédiaire (0,681 nmol $O_2.min^{-2}.g^{-1}MS$) et Baccara a la pente la plus faible avec (0,568 nmol $O_2.min^{-2}.g^{-1}MS$), cependant ces différences ne sont pas significatives. Pour une même durée d'imbibition le génotype Baccara présente une respiration significativement plus faible sauf à 60 minutes. A 120 minutes, c'est le génotype Térèse qui présente la plus forte respiration. La dessiccation en conditions artificielles (Na et Si) accélère fortement la vitesse de respiration des lots quelque soit le génotype ou la durée d'imbibition (Fig. 39, Fig. 40). C'est avec la vitesse de dessiccation intermédiaire (Na) pour Térèse et Champagne que l'on a les vitesses de respiration les plus élevées (+40%). Cela suggèrerait qu'une vitesse de dessiccation modérée, correspondant à un état de stress modéré, entraine une augmentation de la

respiration, mais au-delà d'un optimum de stimulation, la respiration décroîtrait avec l'augmentation de l'intensité du stress (Fig. 40).

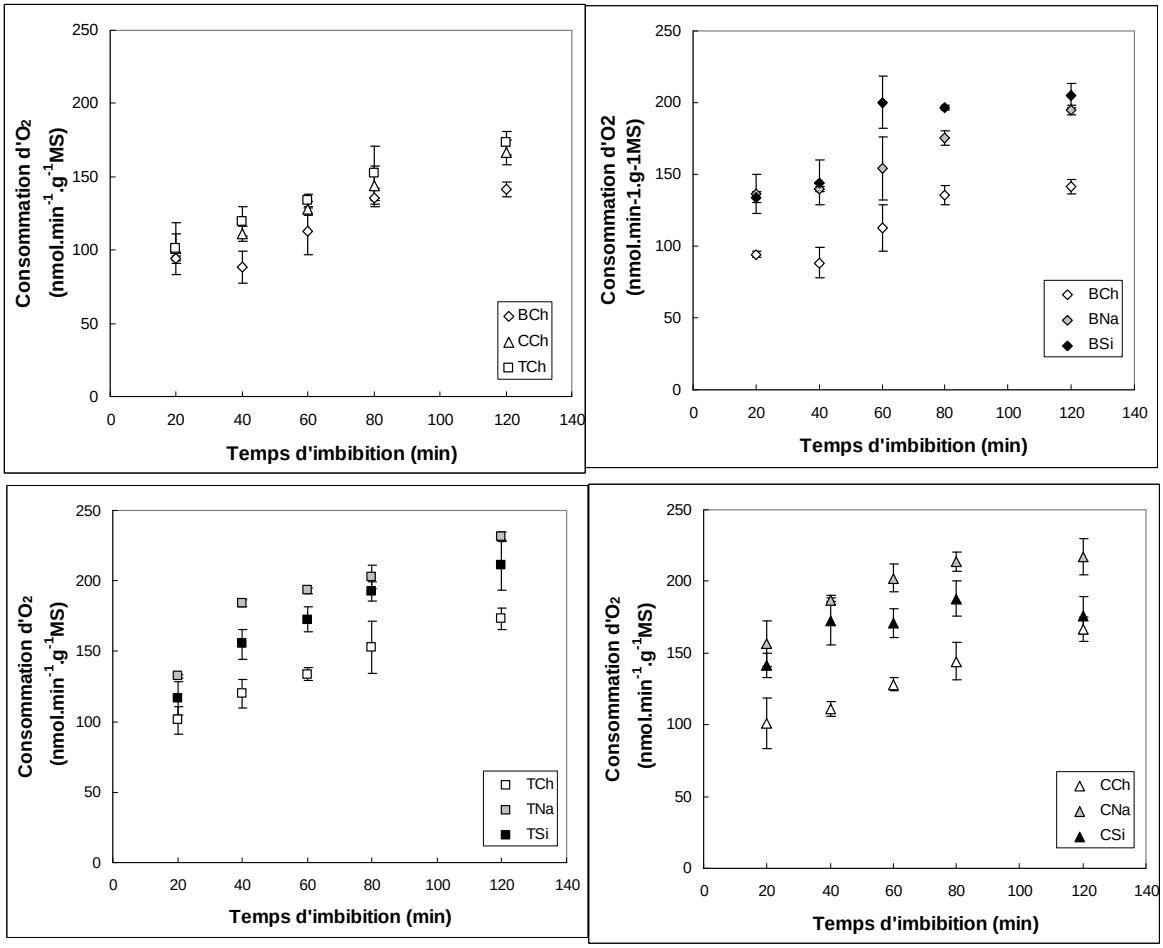


Figure 39: Evolution de la consommation en oxygène des fragments en fonction du temps d'imbibition. B = Baccara, C = Champagne T= Térèse ; En haut à gauche comparaison des trois génotypes ; en haut à droite Baccara ; en bas à gauche Térèse et en bas à droite Champagne avec les trois modalités de dessiccation : Ch = dessiccation au champ, Na = dessiccation à 30°C et à une humidité relative de 75%, Si = dessiccation à 30°C et à une humidité relative inférieure à 10%.

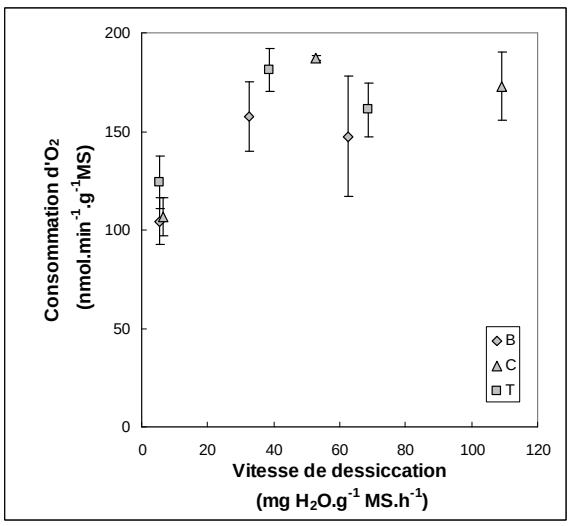


Figure 40: Effet des vitesses de dessiccation sur l'intensité respiratoire

4.3.1.3 Influence de la température sur la respiration des fragments

La respiration totale augmente fortement avec la température et atteint à 35°C une valeur d'environ 170 nmol $O_2.min^{-1}.g^{-1}MS$ pour Baccara et Champagne et de 260 nmol $O_2.min^{-1}.g^{-1}MS$ pour Térèse (Fig. 41). Les seules différences observées se manifestent à 5 et 15°C, où Champagne, après dessiccation au champ, a une respiration totale plus forte (respectivement +80% et +40%) par rapport aux génotypes de printemps. A 20°C, température optimale de germination, il n'y a aucune différence entre les trois génotypes, la respiration est d'environ 100 nmol $O_2.min^{-1}.g^{-1}MS$. Au-delà de 20°C, Térèse a tendance à avoir une respiration totale forte mais la différence n'est pas significative car l'écart type est très important. En tenant compte des lots séchés artificiellement, Baccara présente globalement une respiration plus faible à 25 et 35°C par rapport aux autres génotypes (respectivement +14% et +36%).

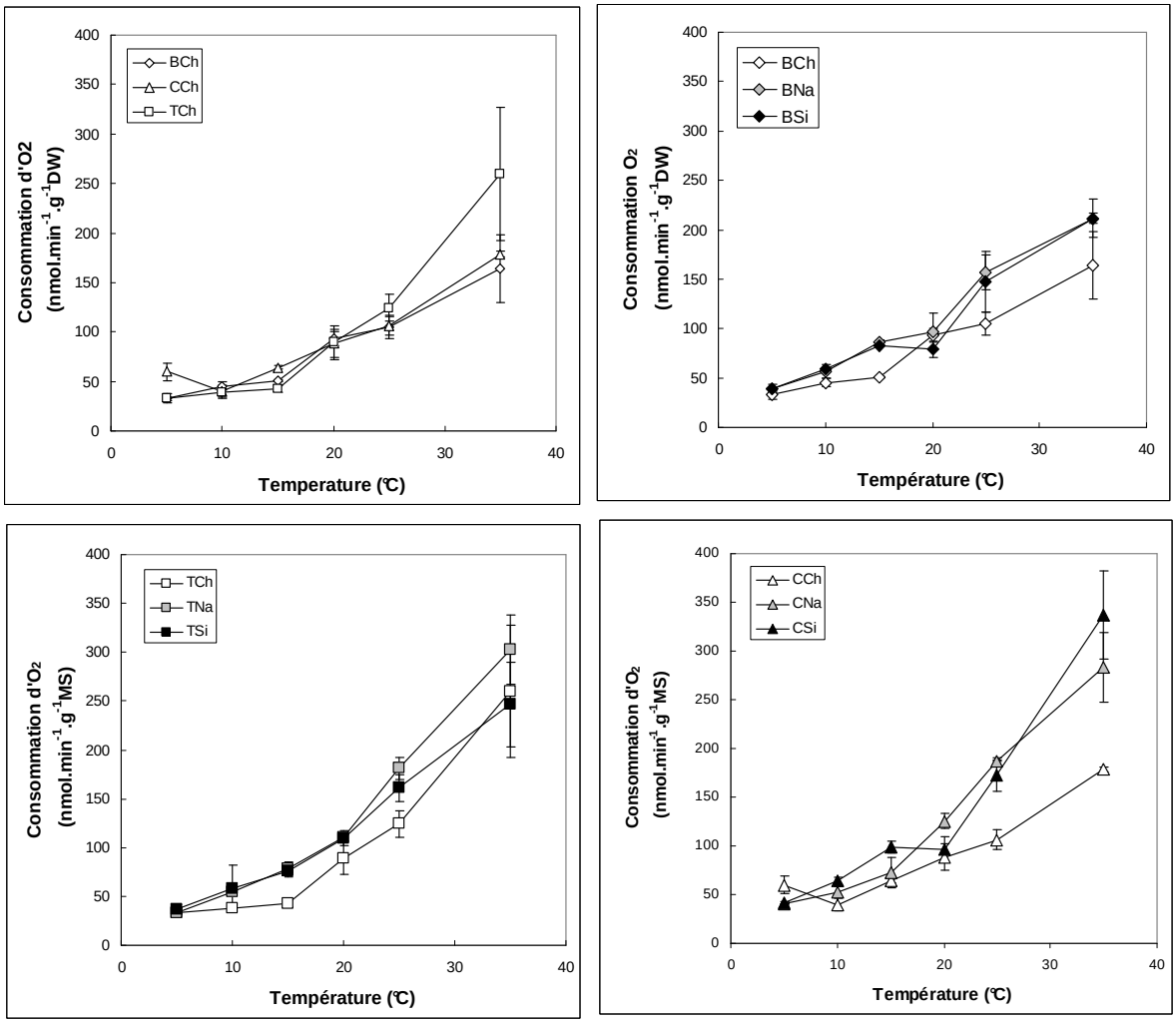


Figure 41: Evolution de l'intensité respiratoire des fragments en fonction du temps d'imbibition

B = Baccara, C = Champagne T = Térèse ; En haut à gauche comparaison des trois génotypes ; en haut à droite Baccara ; en bas à gauche Térèse et en bas à droite Champagne avec les trois modalités de séchage : Ch = dessiccation au champ, Na = dessiccation à 30°C et à une humidité relative de 75%, Si = dessiccation à 30°C et à une humidité relative inférieure à 10%.

Les vitesses de dessiccation contrôlées, plus rapides qu'au champ, accélèrent la respiration quelque soit le génotype considéré ou la température sauf chez Champagne où à 5°C, une diminution de la respiration est observée. Cette stimulation de la respiration est plus forte aux températures élevées, elle est de +51% à 25°C et +37% à 35°C. Cette accélération de la respiration se manifeste aussi au niveau de la capacité de la voie COX, voie produisant de l'ATP. A partir de 15°C, la capacité de la respiration de la voie AOX de Champagne est toujours significativement supérieure à celle des deux autres génotypes. Les vitesses de dessiccation ont un effet sur la respiration par la voie AOX à des températures au-delà de 20°C, elle stimule cette respiration chez les génotypes de printemps (Fig. 42).

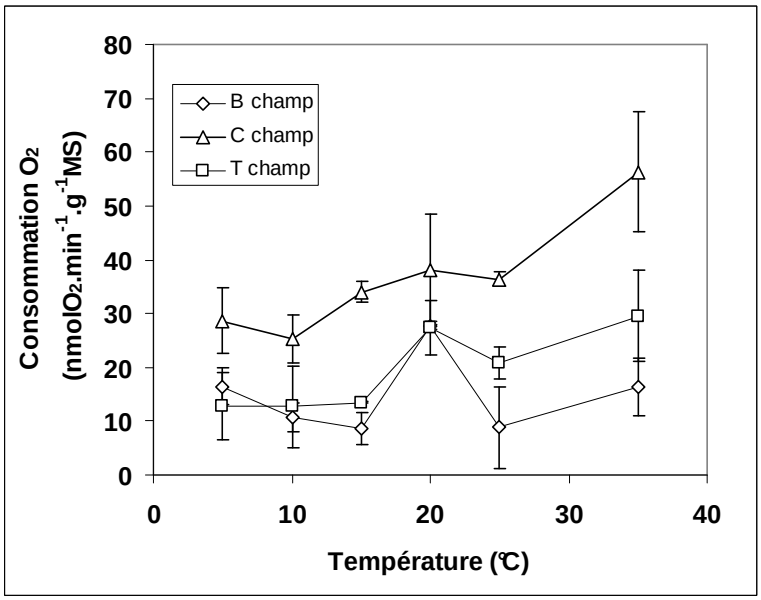


Figure 42: Capacité respiratoire de la voie AOX

Les diagrammes d'Arrhénius confirment la grande capacité de respiration aux basses températures pour Champagne, sans forte diminution entre 15 et 5°C. Baccara ne présente pas de rupture de pente, la respiration diminue avec la température de façon régulière (Fig. 43). Pour Champagne et Térèse, la vitesse de la respiration change lorsque la température diminue en dessous de 15°C. Champagne a la plus grande capacité à maintenir une respiration malgré les basses températures. Une vitesse de dessiccation rapide supprime la rupture de pente chez Champagne et Térèse, ces génotypes perdent leur capacité à limiter la chute de la respiration à basses température (ex TSi, Térèse vitesse de dessiccation rapide, Fig. 43). L'énergie d'activation de la respiration est basse pour Champagne et Baccara (respectivement 37,0 $KJmol^{-1}$ et 39,3 $KJmol^{-1}$), alors qu'elle est plus élevée pour Térèse (68,7 $KJmol^{-1}$). Ces énergies d'activation sont modifiées par la vitesse de dessiccation pour Champagne et Térèse, pour Champagne on a une augmentation (47,8 $KJmol^{-1}$) alors que chez Térèse c'est une diminution de cette énergie d'activation qui est observée (44,8 $KJmol^{-1}$).

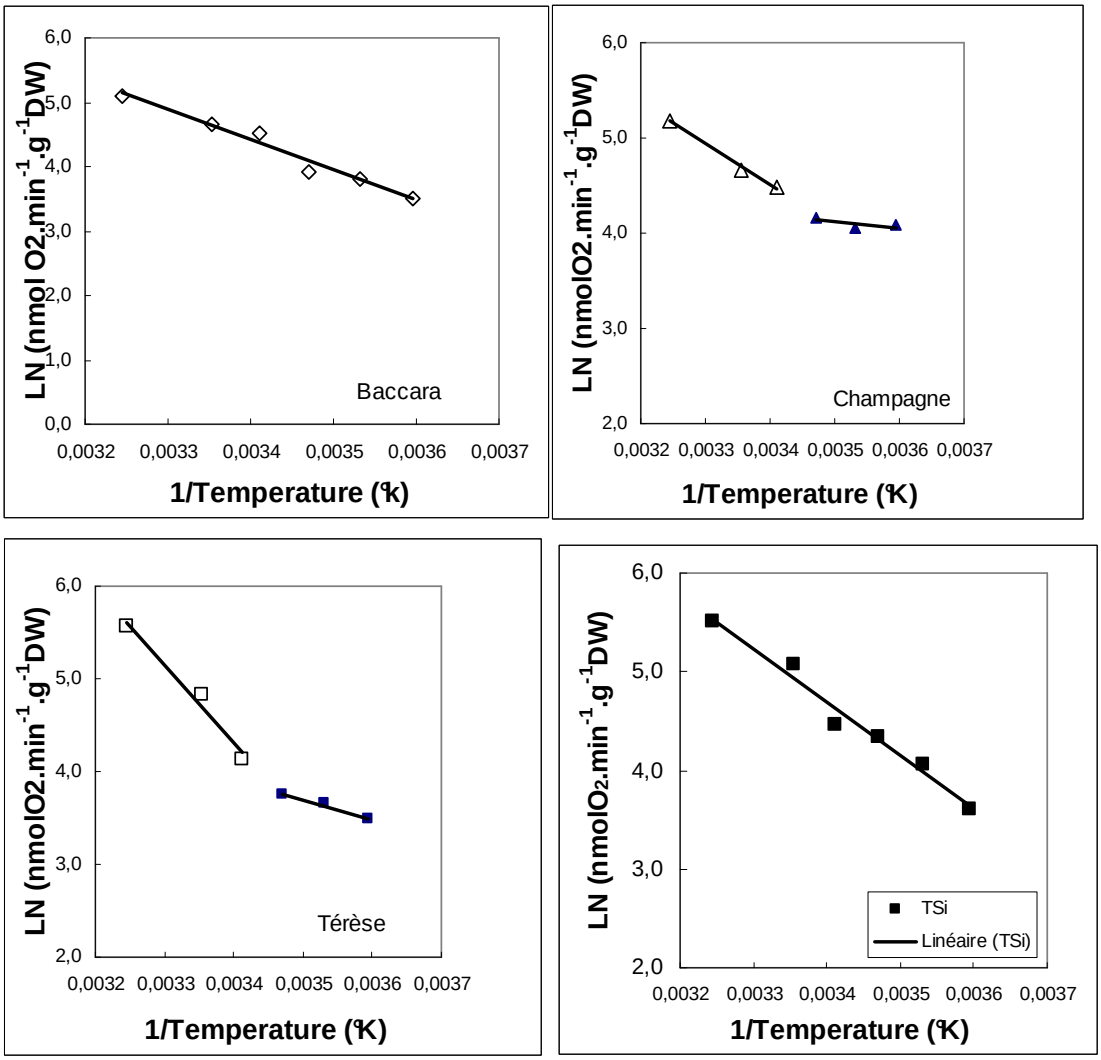


Figure 43: Diagramme d'Arrhénius

La respiration a été mesurée à deux températures (5°C et 25°C), et en particulier à basse température pour mieux comprendre l'installation des cultures dans des conditions difficiles. Cependant l'activité métabolique étant liée à la température, la respiration à 5°C est faible et elle est comprise entre 33 et 60 nmol d'O_2.min^{-1}.g^{-1}MS. Afin de mieux cerner l'effet des basses températures, l'imbibition a été aussi réalisée à basse température. Quelque soit le génotype ou la modalité de dessiccation, la respiration totale est plus élevée (+35%) quand l'imbibition a lieu à 23°C par rapport à 5°C (Fig. 44). L'imbibition à basse température limite la respiration même lorsque les fragments sont placés dans des conditions optimales de respiration (25°C). Cette imbibition en conditions sub-optimales modifie durablement le métabolisme puisque la respiration mitochondriale semble affectée. La dessiccation en conditions artificielles entraine une augmentation de la respiration totale d'environ 47% par rapport au séchage au champ, l'augmentation est observée chez chaque génotype et pour les deux températures d'imbibition. L'effet génotype est présent, Champagne a une respiration plus importante (+22%) que celle de Baccara. L'imbibition à 5°C diminue aussi la respiration par la voie COX, voie productrice d'ATP. Comme pour la

respiration totale, les vitesses de dessiccation élevées stimulent la respiration. Par contre aucune différence significative n'a été trouvée entre les différents génotypes. Quant à la respiration par la voie AOX, elle n'est pas affectée significativement par la température d'imbibition, ni par la vitesse de dessiccation, par contre elle est plus importante (+55%) chez Champagne par rapport aux génotypes de printemps.

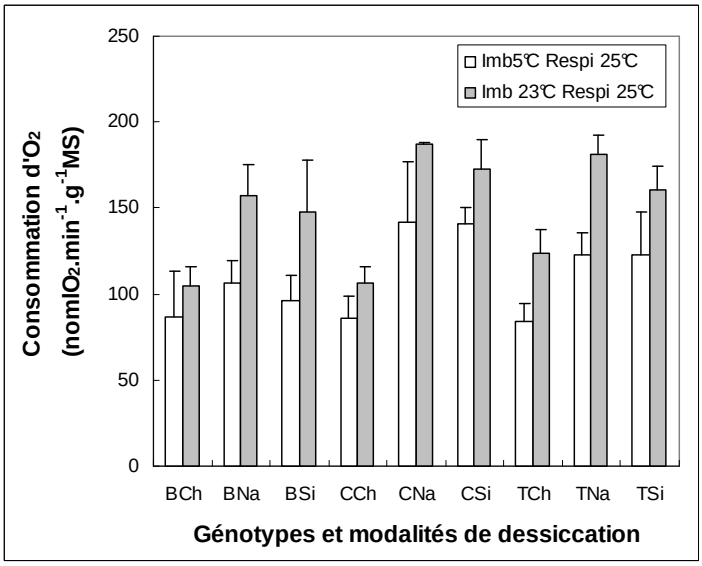


Figure 44: Influence de la température d'imbibition (5 ou 23°C) sur l'intensité respiratoire à 25°C des différents génotypes ayant subi différentes modalités de dessiccation.

B = Baccara, C = Champagne T = Térèse ; les trois modalités de séchage : Ch = dessiccation au champ, Na = dessiccation à 30°C et à une humidité relative de 75%, Si = dessiccation à 30°C et à une humidité relative inférieure à 10%.

Pour la respiration à 5°C, l'imbibition à 23°C favorise la respiration totale (Fig. 45), la respiration par la voie COX et la voie AOX par rapport à une imbibition à 5°C. Cette stimulation de la respiration totale et par la voie COX est accentuée par l'application de vitesses de dessiccation rapide. Au contraire des vitesses de dessiccation rapides limitent la respiration de la voie AOX (-66%) à 5°C quand l'imbibition se fait à 23°C. Champagne a une respiration alternative plus importante que les génotypes de pois de printemps, + 40% par rapport à Baccara et +63% par rapport à Térèse.

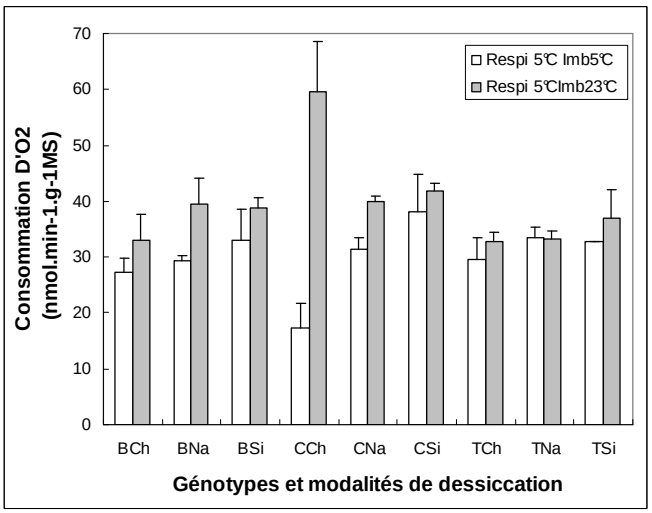


Figure 45: Influence de la température d'imbibition (5 ou 23°C) sur l'intensité respiratoire à 5°C des différents génotypes ayant subi différentes modalités de dessiccation. .

B = Baccara, C = Champagne T = Térèse ; les trois modalités de séchage : Ch = dessiccation au champ, Na = dessiccation à 30°C et à une humidité relative de 75%, Si = dessiccation à 30°C et à une humidité relative inférieure à 10%.

4.3.2 Respiration des axes

La respiration des axes est environ six fois plus importante que celle des fragments. Comme pour les fragments, l'augmentation de la vitesse de dessiccation stimule la respiration (Fig. 46) La respiration totale est plus importante chez les axes embryonnaires de Champagne par rapport à Baccara lorsque les graines ont subi une vitesse de dessiccation rapide. Quand la respiration par la voie COX est considérée, il n'y a plus de différence entre génotype mais la stimulation du séchage est significative. Pour la respiration AOX, comme pour les fragments, Champagne a une respiration plus forte et les dessiccations rapides abaissent cette respiration (Fig. 46).

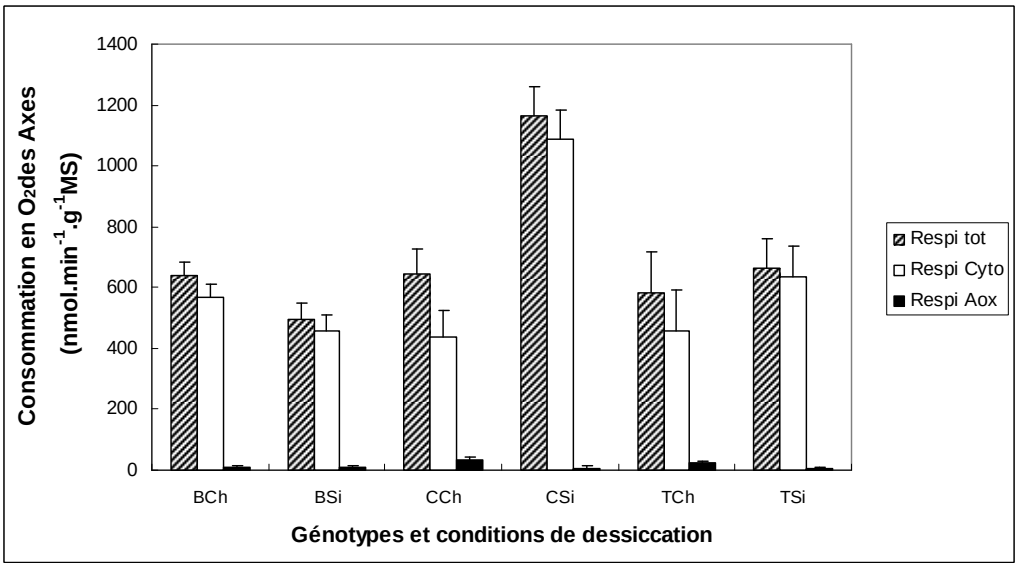


Figure 46: Influence des génotypes et des vitesses de dessiccation sur l'intensité respiratoire des axes embryonnaires. B = Baccara, C = Champagne T = Térèse ; les trois modalités de séchage : Ch = dessiccation au champ, Na = dessiccation à 30°C et à une humidité relative de 75%, Si = dessiccation à 30°C et à une humidité relative inférieure à 10%.

4.3.3 Respiration des graines entières

Afin de mesurer en continu l'évolution de la quantité d'oxygène au cours du temps, les graines sont enfermées dans un petit flacon contenant de l'eau pour permettre l'imbibition. Lors de cette imbibition, l'évolution de la teneur en eau est similaire entre Champagne et Térèse, par contre Baccara présente un retard important dès le début de l'imbibition. La quantité d'oxygène dans le flacon varie en fonction du volume laissé libre par les graines; Champagne ayant des graines plus petites, le volume d'air est plus important : de 10,6 mL contre 9 mL pour Baccara. Le suivi de la consommation d'O_2 montre deux phases caractérisées par des pentes de consommation de l'oxygène différentes (Fig. 47). Lors de la première phase, la graine commence à s'imbiber et la consommation en oxygène est constante mais relativement faible. Ensuite, en début de deuxième phase, la vitesse de la consommation en oxygène s'accélère et devient constante au cours du temps tant que la quantité d'oxygène n'est pas limitante. Cette vitesse de consommation de l'oxygène reflète la respiration des graines et varie en fonction du génotype. Parmi les trois génotypes étudiés, Champagne a une respiration plus élevée (49 $nmolO_2.min^{-1}.g^{-1}MS$) par rapport aux génotypes de printemps (respectivement 40 et 18 $nmolO_2.min^{-1}.g^{-1}MS$ pour

Térèse et Baccara) (Fig. 48). De même, en considérant la consommation maximale (Vmax, Tableau 5), Champagne présente une vitesse maximale de consommation de l'oxygène toujours plus élevée que celle des pois de printemps, indépendamment de la vitesse de dessiccation. Comme pour les fragments, des vitesses de dessiccation rapides entraînent une augmentation de la respiration des graines entières (Fig. 48), de la vitesse maximale qui se produit plus précocement au cours de l'imbibition (-5 h pour les génotypes de printemps, -3 h pour Champagne ; Tableau 5). Le calcul du moment de la rupture de pente par la détermination de l'accélération maximale permet d'avoir un indicateur de la précocité de la mise en place de la deuxième phase de la respiration caractérisée ci-dessus. Pour les graines des génotypes de printemps (Baccara et Térèse) dont la dessiccation s'est déroulée au champ, le moment de la rupture de pente est de 3,3 h, pour Champagne ce temps est plus court, il est de 2 h (Tableau 5). Des vitesses de dessiccation très rapides (lots Si) entrainent un déclenchement plus précoce de cette phase. Ces modifications du moment de démarrage de cette phase de respiration élevée, seraient-elles à rapprocher de l'imbibition plus rapide pour les lots Si ? Cependant en mettant les teneurs en eau correspondantes, la rupture de pente ne semble pas dépendre d'une valeur de teneur en eau (Tableau 5). Champagne présente une accélération dans la consommation d'oxygène beaucoup plus élevée que les génotypes de printemps (Tableau 5).

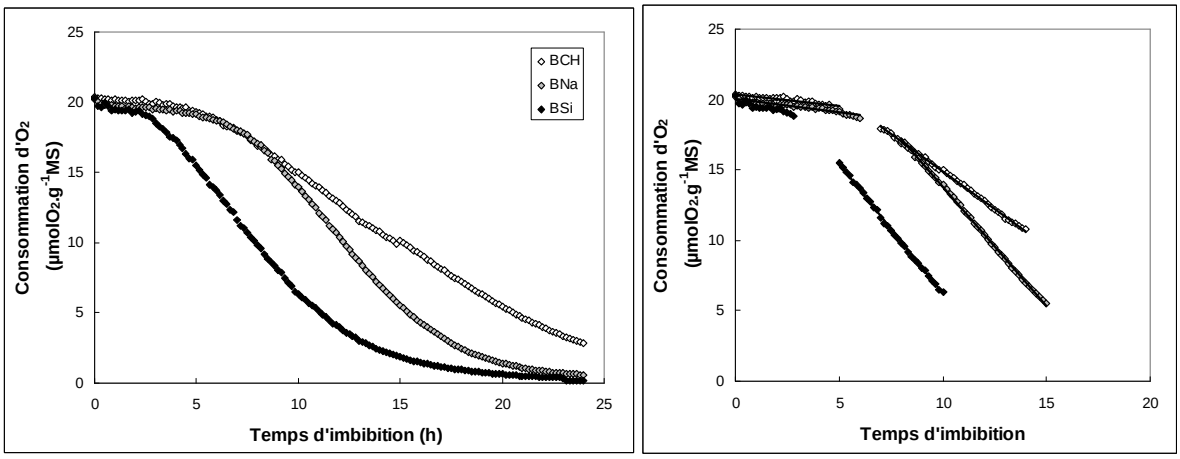


Figure 47: Evolution de la respiration de la graine entière au cours de l'imbibition du génotype Baccara. A gauche : données observées, à droite données observées utilisées pour le calcul des 2 pentes.

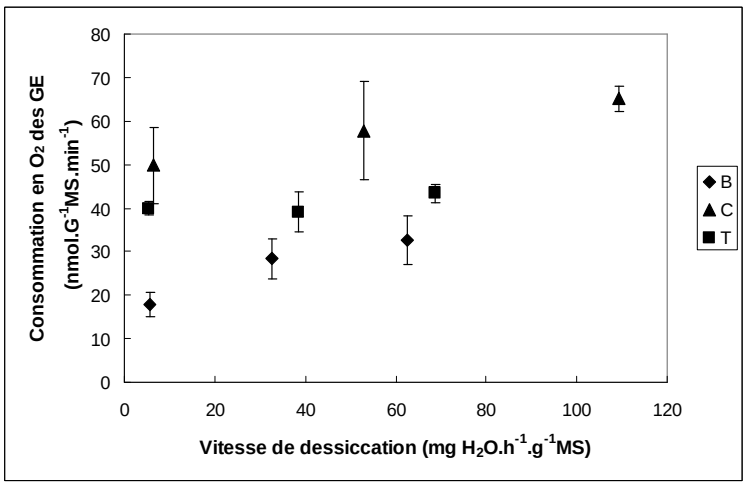


Figure 48: Influence de la vitesse de dessiccation sur l'intensité respiratoire des trois génotypes. GE = graines entières.

Tableau 5: Vitesse maximale (Pente2) et accélération maximale de la consommation en oxygène par les différents génotypes Estimation du moment de démarrage de la phase de respiration rapide.

	h	Vmax (μmol $O_2 g^{-1}MS\ h^{-1}$)	TE (%MF)	h	Accélération max (μmol$O_2 g^{-1}MS\ h^{-2}$)	TE (%MF)
BCh	11,50	-1,03	40,16	3,33	-0,73	20,55
BNa	11,67	-1,78	48,81	6,67	-0,29	37,42
BSi	6,67	-2,01	50,58	3,17	-0,44	42,48
CCh	13,00	-3,08	58,63	2,00	-9,35	33,54
CNa	11,33	-3,51	55,40	1,33	-1,69	17,38
CSi	9,83	-4,03	57,57	1,33	-5,88	35,68
TCh	10,00	-2,50	57,47	3,33	-0,37	44,00
TNa	10,67	-2,19	52,39	4,83	-0,28	38,67
TSi	4,83	-2,72	52,16	0,83	-2,70	33,77

4.3.4 Stimulation de la respiration et réponses au stress

Le test de détérioration contrôlée entraine une perte de l'aptitude à la conservation des graines sous un effet cumulatif de 11 jours à haute température (Partie1). Ces conditions très pénalisantes, auront-t-elles les mêmes conséquences que celles des vitesses de dessiccation en augmentant la respiration dans les premiers jours de cette détérioration contrôlée ?

Après détérioration, la respiration diminue significativement dès le troisième jour de détérioration (Fig. 49) et c'est la capacité de respiration de la voie COX qui est touchée et non la capacité de respiration par la voie AOX. Si la stimulation de la respiration par la détérioration contrôlée existe, elle se situerait avant le troisième jour de DC. Champagne ne se distingue pas des autres génotypes, mais Térèse a une respiration plus élevée que Baccara. L'effet stimulateur des vitesses de dessiccation ne se retrouve pas en cours de détérioration.

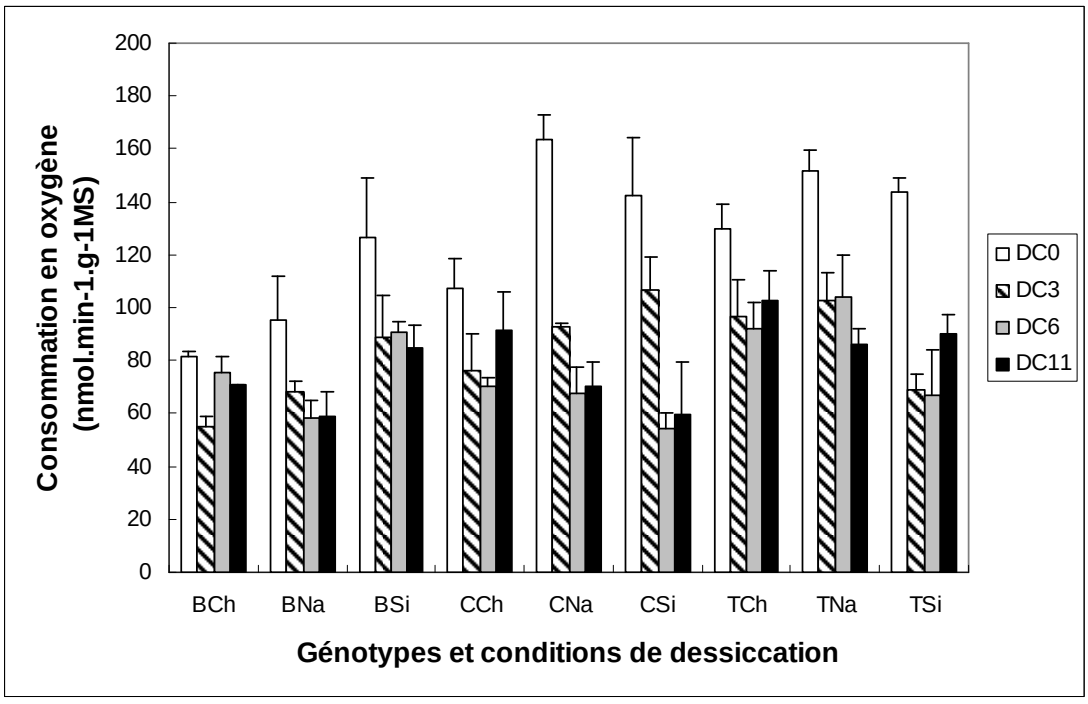


Figure 49: Influence de la durée de détérioration contrôlée sur l'intensité respiratoire de différents génotypes ayant subi différentes modalités de dessiccation.

4.3.5 Altérations ou mécanismes de réparation

L'augmentation de la respiration reflète-t-elle un mauvais fonctionnement des mitochondries ou est-elle liée à la mise en place de mécanismes de réparation ? Dans cette étude, quatre éléments sont pris en compte pour appréhender d'éventuels dysfonctionnements mitochondriaux : les potentialités des mitochondries en présence d'un agent découplant, le FCCP ; l'intégrité de la membrane externe de la mitochondrie ; le contrôle respiratoire (RC) indicateur de l'activité de phosphorylation ; et la présence de protéines de protection au cours de la dessiccation.

L'utilisation de FCCP, agent découplant de la respiration, permet en annihilant le gradient de protons, de supprimer son contrôle de la vitesse de transfert d'électrons vers l'oxygène. Le transfert des électrons et la consommation d'oxygène sont alors à leur maximum, permettant d'exprimer la capacité totale de la chaine de transfert d'électrons des mitochondries. En effet, le FCCP rend la membrane mitochondriale interne perméable aux protons, détruisant ainsi le gradient de protons. L'absence du gradient de protons empêche la formation d'ATP et la vitesse de transfert des électrons, donc la consommation d'oxygène, n'est plus limitée par le gradient de protons et atteint sa valeur maximale. Les résultats obtenus sur la respiration en présence de FCCP sont toujours supérieurs aux valeurs de la respiration sans FCCP, montrant que dans tous les cas, le gradient de proton est limitant (Fig. 50). Le séchage en conditions contrôlées augmente les potentialités de respiration chez chacun des génotypes. Cependant, Champagne présente une respiration significativement supérieure aux autres génotypes. La respiration par la voie COX est stimulée par la présence du FCCP et par les vitesses de dessiccation intermédiaires (Na). Champagne a une respiration plus faible que les deux autres génotypes. Le FCCP ne semble pas affecter la respiration par la voie de l'AOX, ce qui semble logique car cette voie n'est pas phosphorylante. L'effet des vitesses de dessiccation se retrouve sur l'abaissement de cette respiration et tout particulièrement sur Champagne qui présente naturellement une forte respiration AOX. Les potentialités de respiration des différents génotypes ne sont pas réduites par l'application de vitesses de dessiccation rapides.

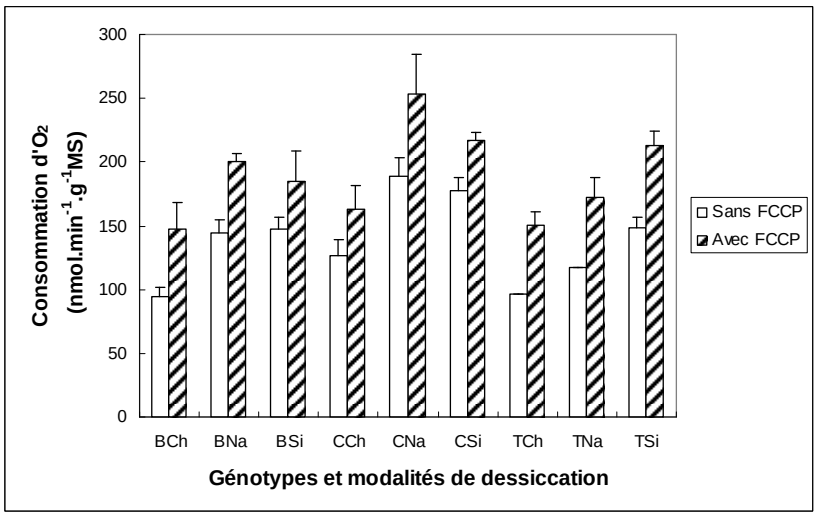


Figure 50: Effet du FCCP sur la consommation en oxygène des fragments en fonction des génotypes et des modalités de dessiccation

Afin de vérifier le bon fonctionnement des mitochondries des lots ayant subi différentes modalités de dessiccation, des mitochondries du génotype Baccara ont été isolées après 22 h d'imbibition. L'intégrité des membranes extérieures des mitochondries

des trois lots testés est élevée et les vitesses de dessiccation rapides n'affectent pas cette intégrité après 22 h d'imbibition (Tableau 6). De même aucune différence significative dans le contrôle respiratoire (RC) n'a été trouvée quels que soient les substrats testés, succinate, NADH and malate/glutamate (Fig. 51). Le contrôle respiratoire (RC) reflète la capacité des mitochondries à phosphoryler l'ADP. L'intégrité et la capacité de phosphorylation des mitochondries isolées juste avant la germination de Baccara ne sont pas affectées par les conditions de dessiccation.

Tableau 6: Intégrité de la membrane externe de la mitochondrie de graines de Baccara.

Integrité (%)	**Ch**	**Na**	**Si**
Répétition 1	94,4 ± 3,3	85,3 ± 2,1	99,7 ± 0,7
Répétition 2	97,4 ± 2,4	95,0 ± 1,1	97,0 ± 0,8

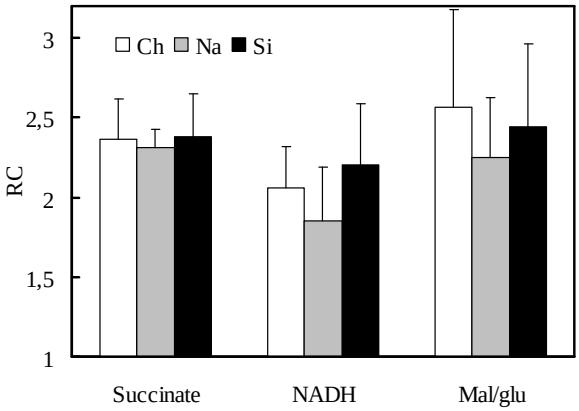


Figure 51: Le contrôle respiratoire des mitochondries du génotype Baccara évalué en utilisant trois substrats différents (Succinate, NADH, Malate/Glutamate) en fonction des trois modalités de dessiccation (Ch= Champ, Na, Si).

Un comportement distinctif des mitochondries est l'accumulation de protéines de stress pouvant être impliquées dans la tolérance à la dessiccation comme la protéine LEAm. L'application de vitesses de dessiccation rapides empêche-t-elle la bonne mise en place de ces systèmes de protections ou dégrade-t-elle ces systèmes ? Le profil d'expression de la protéine LEAm a été étudié par western blot. Les résultats montrent que la protéine est déjà exprimée au stade FRG, stade de début de la phase de dessiccation (Fig. 52). Cette expression reste inchangée pendant toute la durée de dessiccation et ne dépend pas des vitesses de dessiccation.

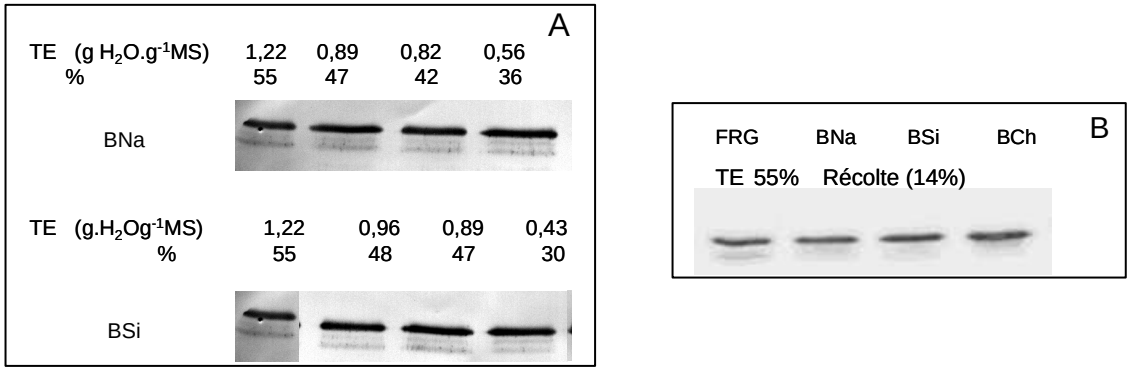


Figure 52 : Expression de la protéine LEAm chez la graine de pois Baccara (western blot) A/ au cours de la dessiccation à différentes vitesses (BCh, BNa et BSi), B/ Comparaison FRG et fin de dessiccation.

Les résultats de respiration en présence de FCCP, l'intégrité de la membrane externe de la mitochondrie, le contrôle respiratoire et la mise en place de systèmes de protection

comme la LEAm avant la phase de dessiccation ne vont pas dans le sens d'un dysfonctionnement mitochondrial. La consommation plus élevée d'oxygène est plutôt à relier à une demande énergétique plus importante en lien avec la mise en place de mécanismes de réparation.

Par rapport aux génotypes de printemps, Champagne ne présente pas un potentiel de respiration par la voie COX plus élevé, sur les fragments ou les axes embryonnaires, par contre, la respiration par la voie AOX est plus forte. L'augmentation des vitesses de dessiccation entraine une augmentation de la respiration (totale et de la voie COX) des fragments pour les trois génotypes et elle se produit tout au long de l'imbibition jusqu'à 42% de teneur en eau. Cette stimulation de la respiration se retrouve aussi très fortement chez les axes du génotype de Champagne. En plus, cette vitesse de dessiccation rapide entraine un abaissement de la consommation d'oxygène par la voie AOX dans les axes des trois génotypes. Une imbibition des fragments aux basses températures entraine une diminution de la capacité de respiration se déroulant à des températures favorables (25°C). La respiration sur graine entière est le résultat de l'expression de la vitesse d'imbibition et de la capacité à consommer l'oxygène et reflète mieux la situation au champ. Cette consommation en oxygène peut être découpée en deux phases caractérisées par des vitesses différentes, et le moment du démarrage de la deuxième phase semble indépendant de la teneur en eau. Le stress provoqué par le vieillissement n'entraine pas une stimulation de la respiration observée après trois jours, par contre le vieillissement des graines provoque une diminution de la respiration. Les résultats de respiration en présence de FCCP, l'intégrité de la membrane externe de la mitochondrie, le contrôle respiratoire et la mise en place de systèmes de protection avant la phase de dessiccation comme la protéine LEAm sont des éléments en faveur d'un bon fonctionnement mitochondrial. La consommation plus élevée d'oxygène serait plutôt à relier à une demande énergétique plus importante et non à un mauvais fonctionnement mitochondrial.

4.4 Adénylates

4.4.1 Composition initiale

Au stade graine sèche, Champagne ne se distingue pas des pois de printemps par sa teneur en adénylates totaux. Chez les trois génotypes, l'adénylate majoritaire est l'AMP (62-85%) (Fig. 53). Cependant, Champagne est plus riche que les pois de printemps en ADP (x1,5) et en ATP (x4,3). L'application de vitesses de dessiccation rapides entraine une augmentation de la teneur en adénylates totaux (AXP), en AMP, en ADP et en ATP. Cette augmentation est plus importante chez Champagne et Térèse par rapport à Baccara (Fig. 53), elle est de l'ordre de trois fois pour les AXP et AMP, et les valeurs doublent pratiquement pour les ADP et ATP. Dans les axes, les deux génotypes étudiés (Baccara et Champagne) ont la même teneur en adénylates totaux. Contrairement à la graine entière, l'adénylate majoritaire est l'ADP dans les axes des deux génotypes. Champagne possède plus d'ADP (+14%) et moins d'AMP (x3 moins) et d'ATP (x4,7 moins) que Baccara (Fig. 54). Des vitesses de dessiccation rapide entrainent une augmentation des teneurs en adénylates totaux (+46% pour B et +113% pour C) et en ADP (+68%) chez les deux génotypes et une très forte augmentation d'AMP (x8) uniquement chez Champagne (Fig. 54).

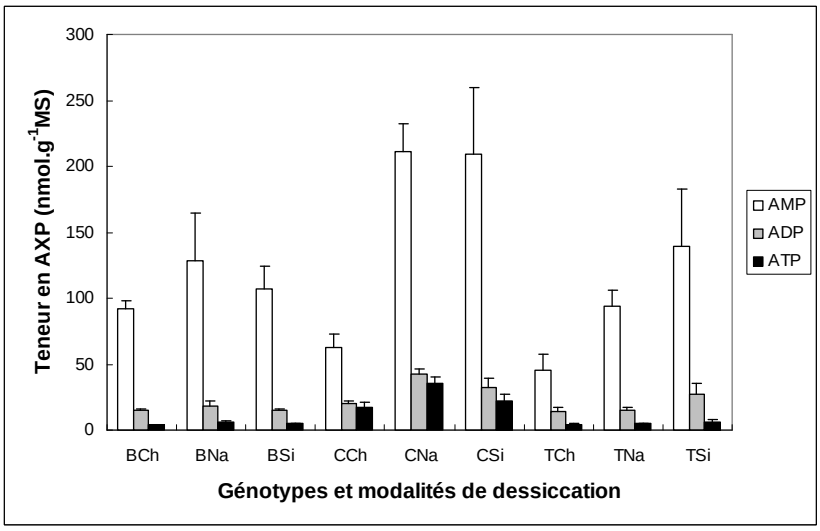


Figure 53: Teneur en adénylates dans les graines en fonction du génotype et des modalités de dessiccation.

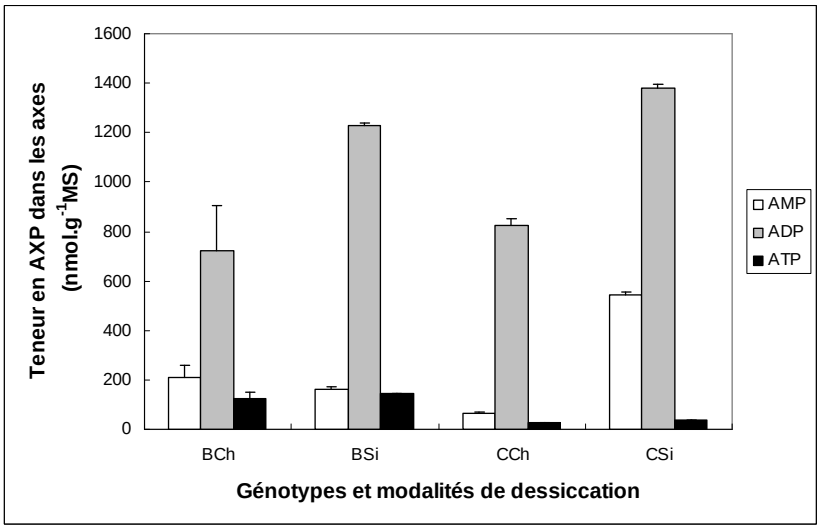


Figure 54: Teneur en AXP dans les axes embryonnaires en fonction des génotypes et des conditions de dessiccation.

4.4.2 Evolution des adénylates et production d'ATP dans la graine entière au cours de la germination

Les dosages d'adénylates sur les graines de Baccara récoltées au champ en 2009 permettent de suivre l'évolution de ces adénylates et tout particulièrement celle de la teneur en ATP au cours de l'imbibition (Fig. 55). La première modification observée est la diminution rapide de la teneur en AMP dans les quatre premières heures, qui se stabilise ensuite autour d'une valeur moyenne de 47 nmol.g^{-1}MS. L'AMP semble jouer un rôle important au tout début de l'imbibition. En parallèle, L'ADP a une teneur constante jusqu'à 8 h d'imbibition puis augmente jusqu'à 16 h et se stabilise à des teneurs en moyenne de 121 nmol.g^{-1}MS. L'augmentation de la teneur en ATP est perceptible dès 4 h d'imbibition et augmente très fortement jusqu'à 14 h puis cette teneur fluctue autour d'une valeur de 296 nmol.g^{-1}MS jusqu'à 26 h d'imbibition, moment à partir duquel peut se produire la sortie de la radicule.

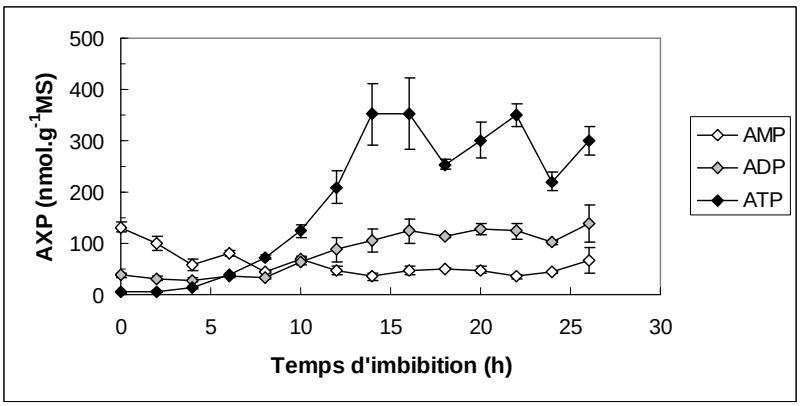


Figure 55: Evolution des différents adénylates au cours de la germination du génotype Baccara.

La comparaison des trois génotypes montre que la teneur en ATP augmente plus rapidement à 6 h pour Champagne et Térèse par rapport à Baccara (Fig. 56). Cette augmentation est très forte entre 6 et 12 h d'imbibition pour Champagne et Baccara. Aucune différence significative n'a été trouvée entre Champagne et Baccara. Cependant, il faut préciser que la teneur ne reflète à un instant donné que le bilan entre la production et l'utilisation d'ATP. L'application d'une vitesse de dessiccation rapide entraine une augmentation de la teneur en ATP dans les 12 premières heures d'imbibition chez les trois génotypes, à 18 h les écarts avec la dessiccation au champ s'estompent et même pour Térèse les teneurs du lot avec dessiccation au champ sont plus élevées.

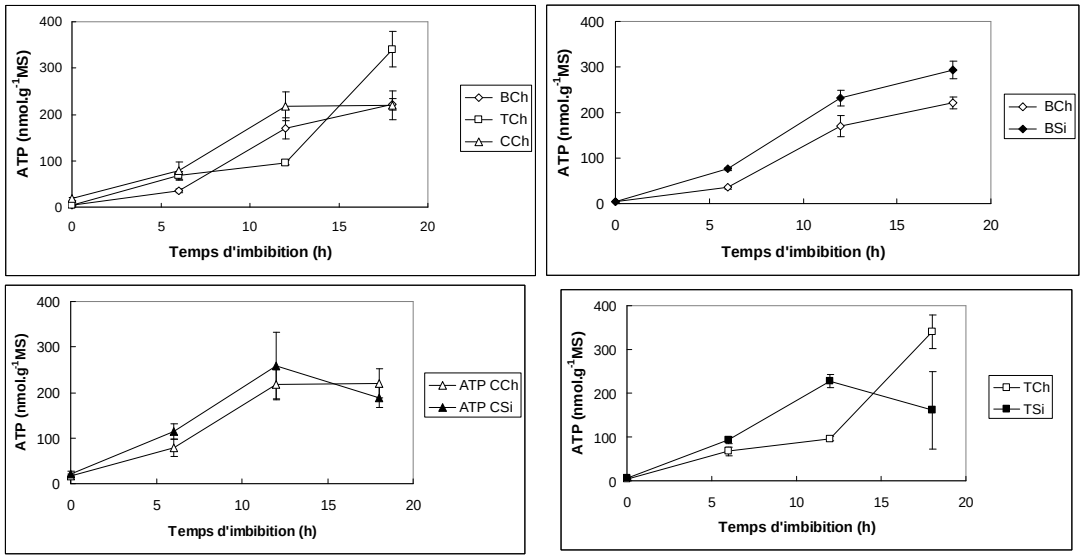
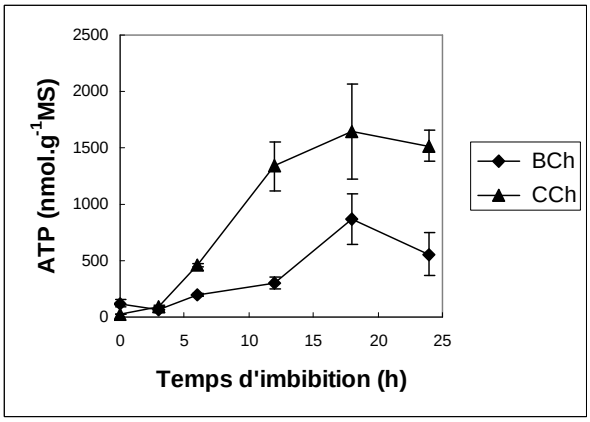
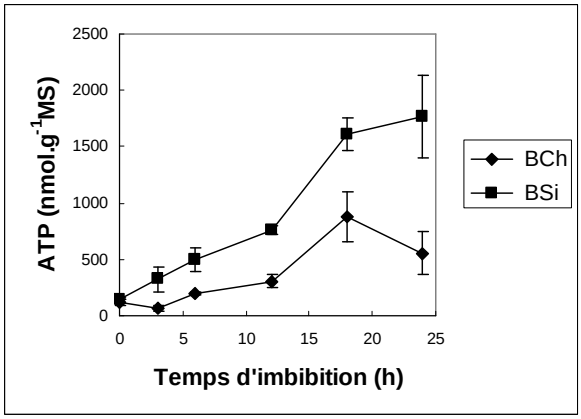


Figure 56: Evolution de l'ATP de la graine entière au cours de l'imbibition.

4.4.3 Cinétique de production d'ATP dans l'axe embryonnaire au cours de la germination

Au niveau des axes, après trois heures d'imbibition, les teneurs en ATP augmentent jusqu'à 18 h (Fig. 57). Cette augmentation est plus importante chez Champagne (x 2 fois à 18h) que chez Baccara. Une vitesse de dessiccation rapide augmente fortement la teneur en ATP dans les axes de Baccara quelque soit le temps d'imbibition. Pour Champagne, cette stimulation des teneurs en ATP n'est visible que dans les six premières heures, à 24 h les teneurs sont identiques.





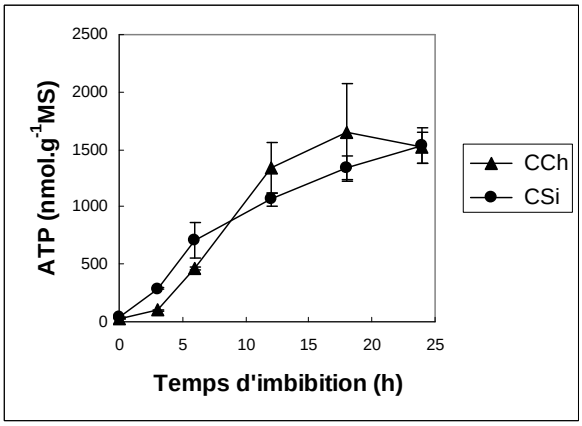


Figure 57: Evolution de la teneur en ATP dans les axes embryonnaires de Baccara et de Champagne sous différentes modalités de dessiccation.

En exprimant le temps d'imbibition en degrés-jour l'application de basses températures n'induit pas une diminution de la teneur en ATP dans l'axe embryonnaire de Baccara. Au contraire, à 21 DJ (24 h à 20°C et 83 h à 5°C), les teneurs sont plus importantes à 5°C (Fig. 58). Le comportement de Champagne est différent, à 21 DJ la teneur à 5°C est plus basse qu'à 20°C. Cependant, l'augmentation des teneurs en ATP à 5°C est plus importante chez Champagne par rapport à Baccara mais arrive à une valeur similaire pour les deux génotypes à 21 DJ. Les stress comme les vitesses de dessiccation ou les basses températures induisent une teneur plus importante d'ATP juste avant la période de sortie de la radicule.

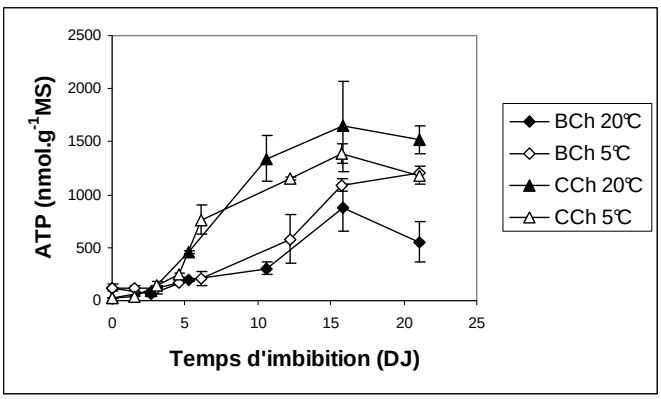


Figure 58: Evolution de la teneur en ATP dans les axes embryonnaires de Baccara et de Champagne sous différentes températures de germination (20 et 5°C).

4.4.4 Evolution de la charge énergétique des adénylates (AEC)

La charge énergétique en adénylates (AEC = ATP + 0,5 ADP / AMP + ADP + ATP) est un bon indicateur du statut énergétique de la cellule et donc de la reprise de l'activité cellulaire. Au cours de la germination, l'AEC augmente dans la graine entière de Baccara jusqu'à 14 h puis se stabilise à environ 0,77 jusqu'à la sortie de la radicule (Fig. 59). La reprise de l'activité de la graine de Baccara est donc effective après 14 h d'imbibition à 20°C. Dès 6 h d'imbibition, Champagne a une AEC plus forte que Baccara (+16%), cette différence se maintient à 12 h et s'estompe à 18 h. Une vitesse de dessiccation rapide stimule l'augmentation de l'AEC au début de l'imbibition pour Champagne (+23%) et jusqu'à 12 heures pour Baccara (respectivement +41% et +15% à 6 et 12 h) (Fig. 60). De plus, cette vitesse de dessiccation abaisse chez Champagne l'AEC de la graine sèche de 0,28 à 0,14 donc l'augmentation de l'AEC au cours de l'imbibition des graines de Champagne ayant subi une dessiccation rapide est d'autant plus rapide (Fig. 60).

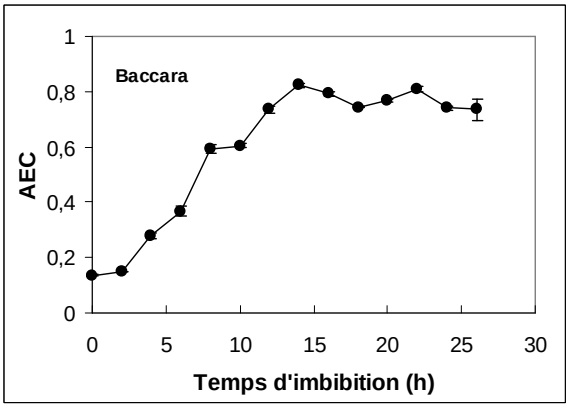


Figure 59: Evolution de l'AEC de la graine entière au cours de la germination de Baccara.

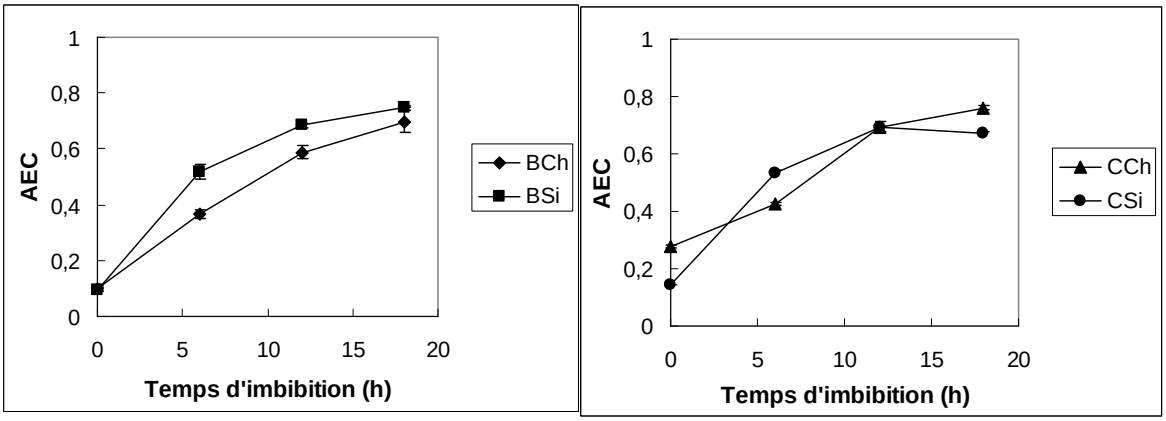


Figure 60: Evolution de l'AEC des graines entières au cours de la germination en fonction des génotypes et des modalités de dessiccation.

Au stade graine sèche, l'axe embryonnaire a une AEC de 0,47, valeur plus élevée par rapport à celle de la graine entière qui est de 0,18 pour Baccara et 0,28 pour Champagne. Cette valeur plus élevée est à relier à la teneur importante en ADP dans l'axe embryonnaire des deux génotypes par rapport à la graine entière. Après trois heures d'imbibition L'AEC augmente dans les axes embryonnaires (Fig. 61). Cette augmentation est forte chez Champagne et atteint à 12 heures le maximum de 0,74, alors que Baccara atteint ce niveau après 24 heures d'imbibition. Comme pour les graines entières, l'application d'une vitesse de dessiccation rapide abaisse l'AEC des axes de la graine sèche de Champagne mais ne

modifie pas celle de Baccara. Une vitesse de dessiccation rapide stimule l'augmentation de l'AEC pour Baccara mais pas pour Champagne. Les basses températures appliquées au cours de l'imbibition, entrainent une légère augmentation de l'AEC de l'ordre de 7% à 16 DJ (Fig. 62). L'application de basses températures au cours de la germination lorsque le temps est exprimé en temps thermique n'entraine pas de ralentissement dans la reprise de l'activité cellulaire.

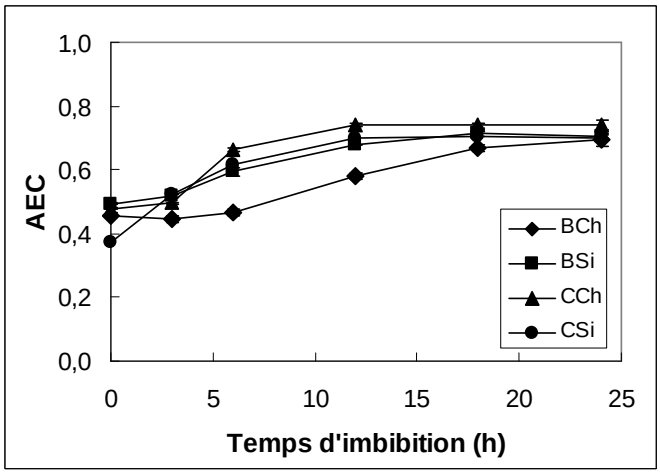


Figure 61: Evolution de l'AEC des axes embryonnaires au cours de la germination.

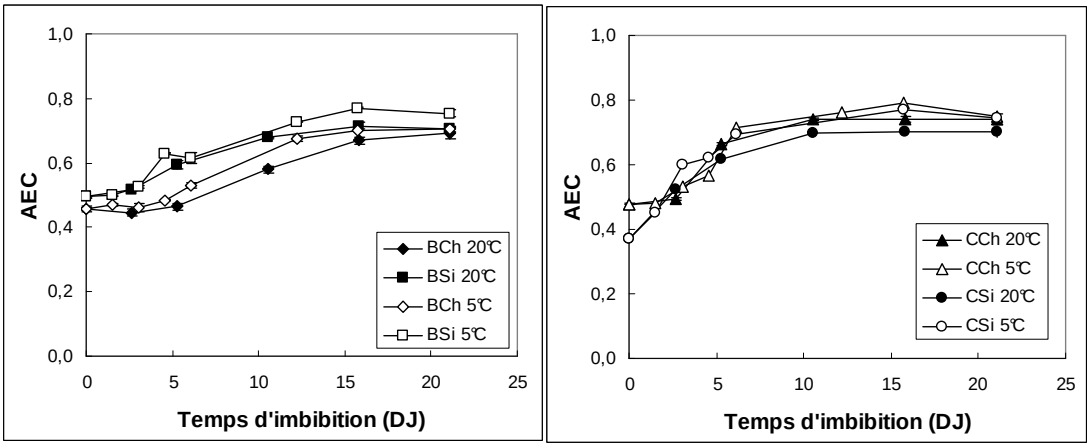


Figure 62: Evolution de l'AEC des axes embryonnaires au cours de la germination aux basses températures.

4.4.5 Métabolisme énergétique et anhydrobiose

4.4.5.1 AMP forme de stockage des adénylates

Les graines, en tant qu'organismes anhydrobiotes ont la capacité de se déshydrater et de se maintenir en vie dans un état métabolique quiescent pendant des périodes très longues. A la fin de la dessiccation, la charge énergétique est basse (0,12-0,35 pour les différents génotypes de pois) et les teneurs en ATP et ADP sont faibles. Par contre, les teneurs en AMP sont plus élevées dans la graine sèche (GS) que dans la graine imbibée (Fig. 63). L'AMP est l'adénylate de réserve préférentiel dans la graine sèche de pois et ne dépend pas du génotype (Fig. 64). L'évolution des adénylates après hydratation des graines de Baccara pendant 18 h puis séchage rapide à leur teneur en eau initiale, confirme ce rôle de stockage des adénylates sous forme d'AMP dans la graine sèche (Fig. 65). Au cours du

séchage, la teneur en ATP diminue fortement alors que les teneurs en AMP, faibles à 18 h d'imbibition, augmentent. Le séchage à 12% de teneur en eau ne permet pas de revenir au niveau initial des adénylates. Cette pré-germination a modifié le stock des adénylates, avec des quantités plus importantes en AMP, ADP et ATP, et donc aussi une charge énergétique en adénylate et un rapport ATP/ADP plus élevés. Cette accumulation d'AMP se retrouve chez les graines sèches de différents génotypes de pois, de différentes espèces (Fig. 66), ainsi que dans les cystes déshydratés de la crevette *Artemia franciscana*, organisme anhydrobiote (Fig. 66).

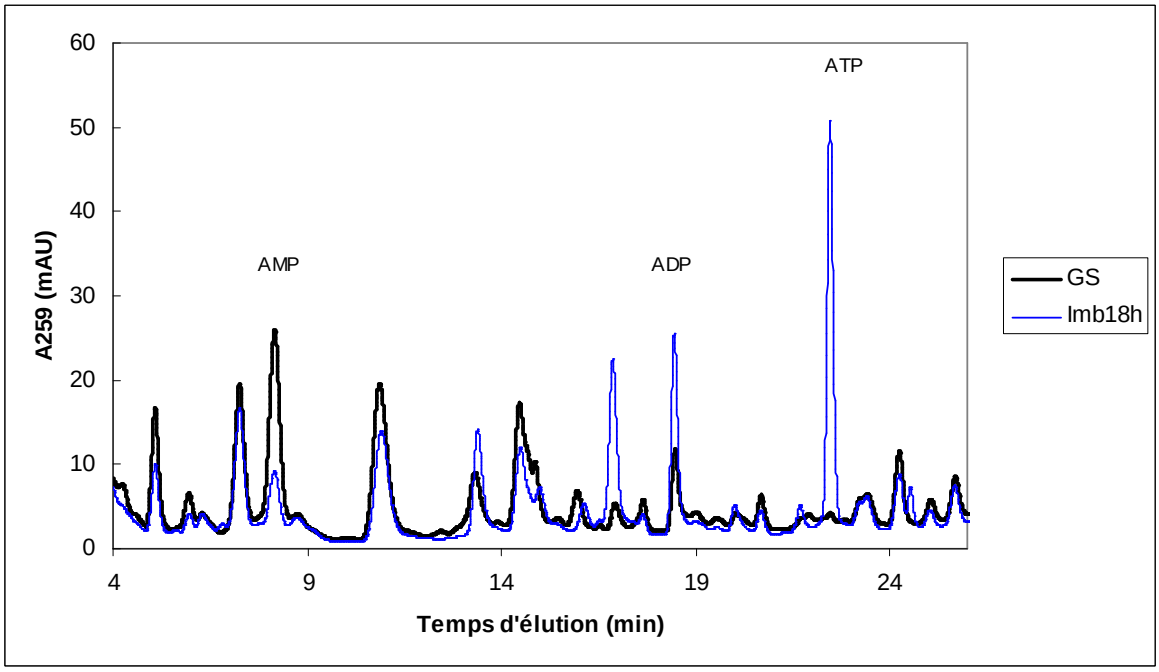


Figure 63 : Spectre HPLC pour des graines sèches (GS) et pour des graines imbibées18 h de Baccara.

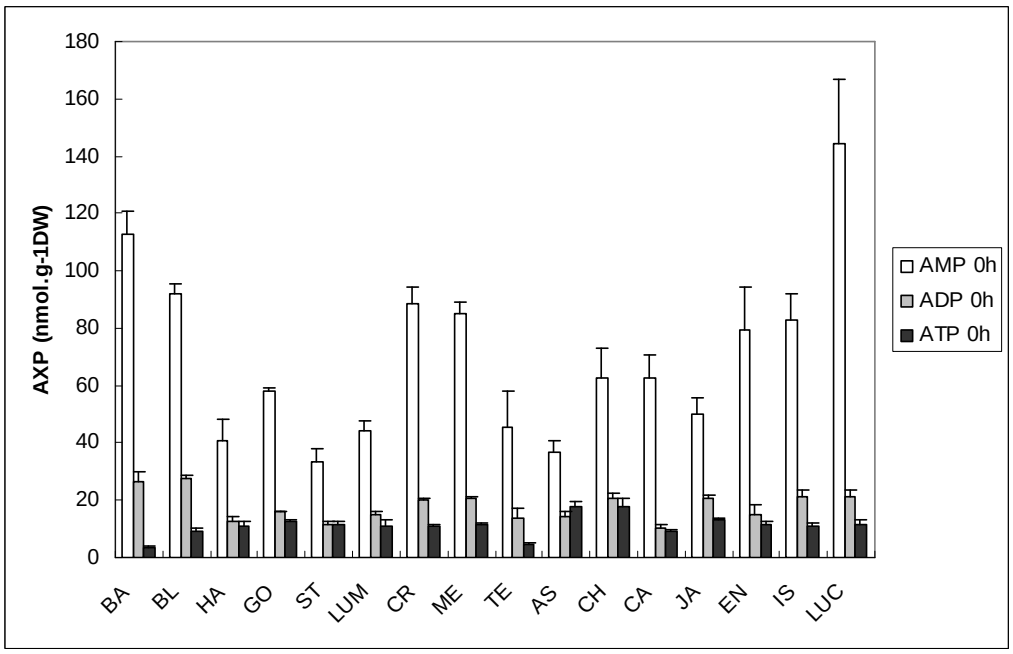


Figure 64 : Teneur en adénylates de différents génotypes de pois.

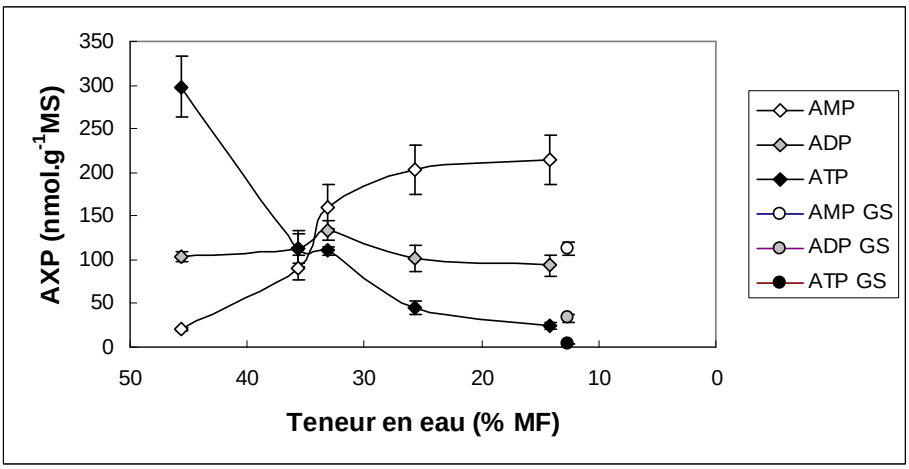


Figure 65 : Evolution des adénylates au cours du séchage de graines pré-imbibées pendant 18 h. GS = Graines sèches avant imbibition.

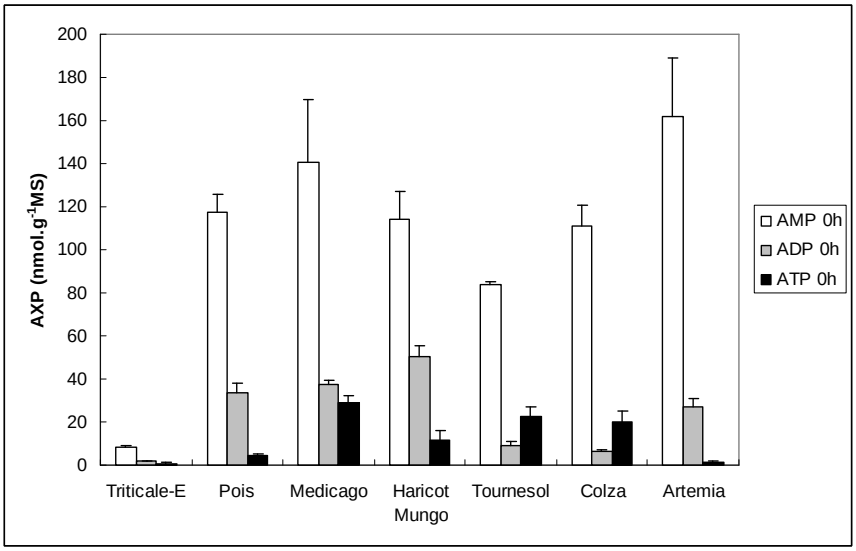


Figure 66 : Teneur en adénylates de différentes espèces végétales et d'un anhydrobiote, cystes déshydratés d'une crevette marine, Artemia. (E=1/3 de la graine contenant l'embryon)

4.4.5.2 AMP indispensable à l'amorce de la production d'ATP

Lors de la réhydratation, la reprise des activités cellulaires est dépendante du redémarrage du métabolisme énergétique. Afin de suivre plus finement ce redémarrage, les fragments de graines, qui s'imbibent rapidement, sont à nouveau utilisés. A la température optimale de 20°C, on constate une augmentation rapide et considérable de la teneur en ATP qui atteint en une heure des valeurs de l'ordre de 217 nmol.g^{-1}MS (Fig. 67) qui sont équivalentes à celles obtenues après 12 h d'imbibition (209 nmol.g^{-1}MS) des graines entières (Fig. 55). Ceci confirme bien que la restauration du métabolisme énergétique est très rapide à l'échelle des tissus hydratés. La teneur en ADP augmente progressivement pendant la première heure pour se stabiliser (Fig. 67). L'AMP, qui est abondant dans la graine sèche, voit sa teneur augmenter pendant les 15 premières minutes, avant de décroitre continuellement (Fig. 67). Lorsque l'imbibition est réalisée à 0°C, une température pour laquelle le métabolisme est extrêmement ralenti, on observe la même augmentation transitoire d'AMP en début d'imbibition, tandis que les teneurs en ADP et en

ATP ne changent pas au cours des 90 minutes d'imbibition (Fig. 67). Ceci confirme bien que les augmentations des pools d'ATP et d'ADP à 20°C sont bien dues à des évènements métaboliques. D'autre part, on peut en conclure que l'augmentation transitoire de la teneur en AMP des extraits en début d'imbibition, qui intervient de façon similaire à 20°C ou a 0°C, n'est pas due à des mécanismes enzymatiques, mais plutôt à un phénomène lié à une meilleure extractibilité de l'AMP du matériel hydraté par rapport à du matériel sec. L'évolution des différents adénylates dans les fragments dépend donc de l'hydratation et du fonctionnement des systèmes enzymatiques, et ces résultats confirment ceux trouvés sur les graines entières. L'AMP contribuerait à la formation rapide d'ATP disponible pour le fonctionnement cellulaire des graines au cours de l'imbibition.

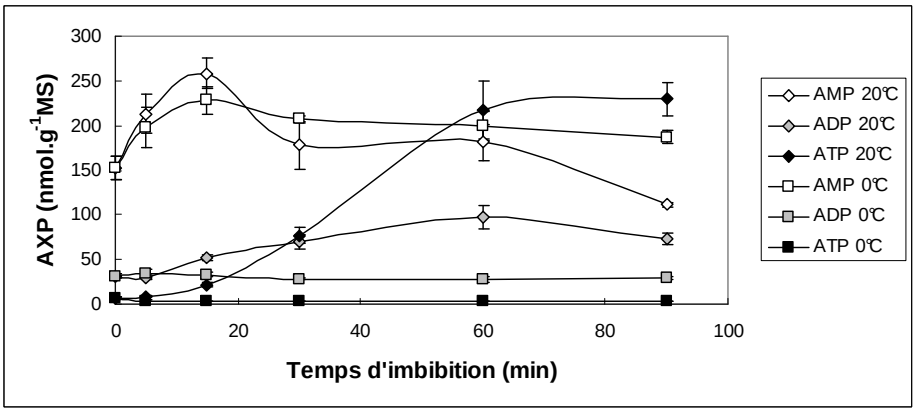


Figure 67 : Evolution des adénylates au cours du temps à 20°C et 0°C.

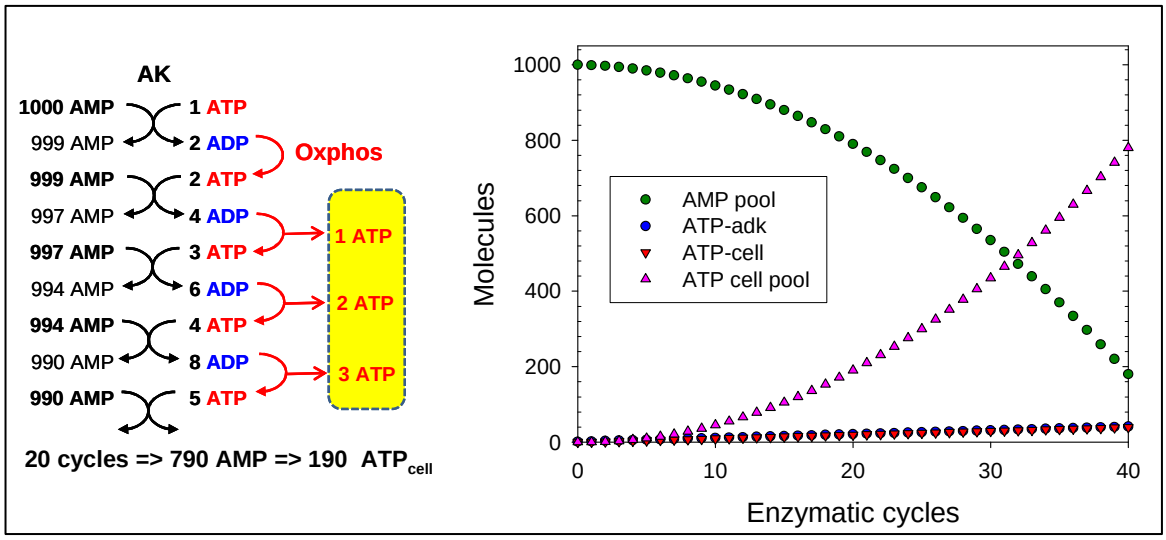


Figure 68: Reconstitution du pool d'adénylates. AK, adénylate kinase; Oxphos = phosphorylation oxydative.

Une simulation de l'évolution des pools d'AMP et d'ATP lors de la reprise du métabolisme a été réalisée, avec des quantités arbitraires de 1000 AMP et 1 ATP au départ (Fig. 68). L'adénylate kinase (AK) catalysant la réaction initiale permet de produire deux molécules d'ATP grâce à la phosphorylation oxydative. Ces deux molécules d'ATP produites peuvent être utilisées par l'AK pour convertir deux autres AMP en ADP, qui sont de nouveau convertis en ATP par la phosphorylation oxydative. Dans la simulation proposée, la séquence continue, avec à chaque "cycle", la mise à disposition d'un ATP

supplémentaire qui vient régénérer le pool cellulaire. Dans ce modèle arbitraire, on constate qu'en quelques cycles enzymatiques, la combinaison AK-phosphorylation oxydative permet de convertir les réserves d'AMP en ATP. Il est donc vraisemblable que la forte quantité d'AMP stockée dans la graine constitue une réserve qui permet de reconstituer très rapidement les pools d'adénylates au cours de l'imbibition de la graine.

4.4.5.3 Modèle de la régulation du métabolisme au cours de la dessiccation – réhydratation

A l'état hydraté, de l'oxygène est consommé et la phosphorylation oxydative mitochondriale permet la production d'ATP qui est consommé par le métabolisme (Fig. 69). La charge énergétique est élevée (0,75), les teneurs en AMP sont faibles et l'ADP est utilisé dans la phosphorylation oxydative pour la formation d'ATP. L'adénylate kinase mitochondriale ne joue alors que son rôle d'équilibrage des pools d'adénylates dans l'espace intermembranaire (Igamberdiev et Kleczkowski 2006).

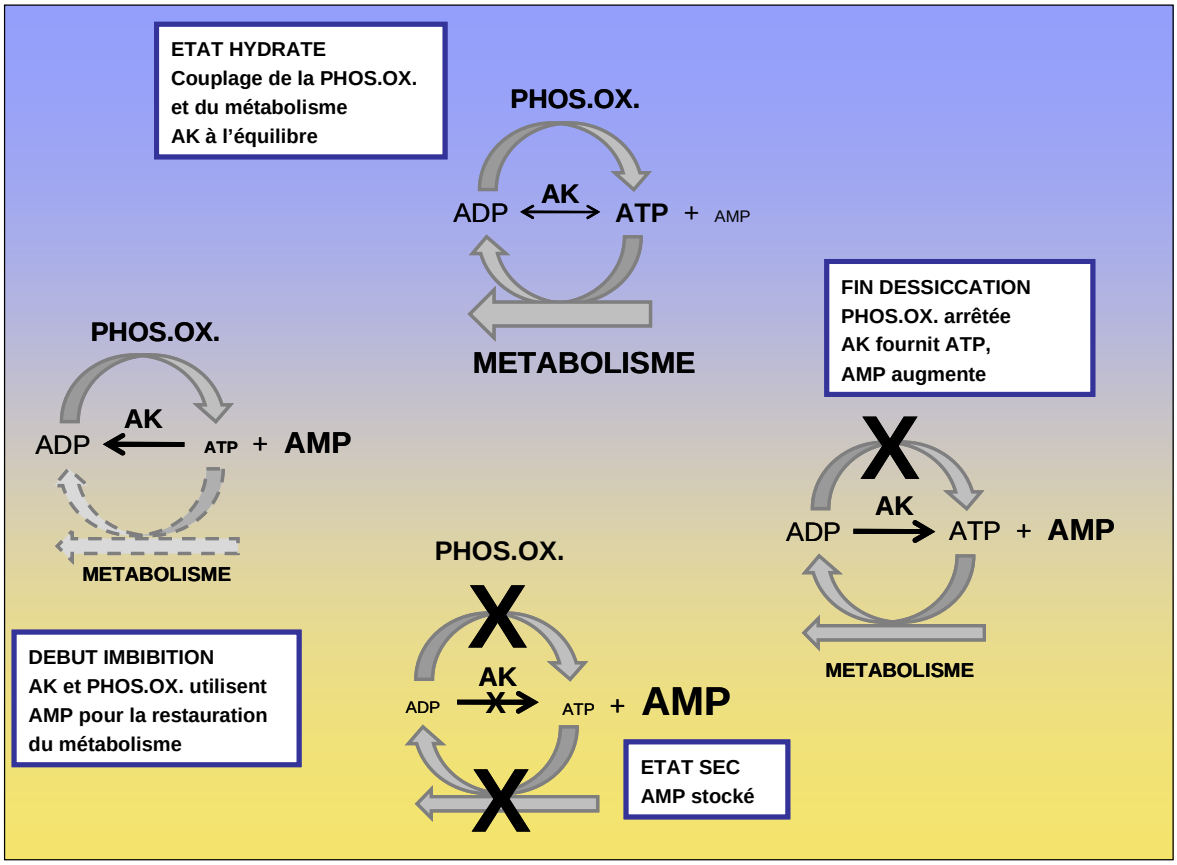


Figure 69 : Rôle de l'adénylate kinase (AK) et de la phosphorylation oxydative mitochondriale dans la régulation du métabolisme en lien avec l'anhydrobiose.

Au cours de la dessiccation de la graine, la diminution de la teneur en eau finit par provoquer l'arrêt des systèmes très complexes, comme la phosphorylation oxydative. Le métabolisme est moins actif mais des systèmes enzymatiques encore actifs continuent à utiliser de l'ATP, et donc la teneur en ADP a tendance à augmenter. Cette consommation de l'ATP par le métabolisme et la présence en grande quantité d'ADP non utilisé par la phosphorylation oxydative bloquée, entraine un déplacement de l'équilibre du fonctionnement de l'AK qui utilise 2 ADP afin de produire 1 ATP, et 1 AMP.

L’accumulation de l’AMP, en fin de dessiccation, résulte donc de l'activité de l'AK qui ne cesse de produire de l'ATP pour les besoins de diverses réactions métaboliques qui le consomment, avec à chaque réaction de l'AK, l'accumulation d'une nouvelle molécule d'AMP. A l’état sec, la phosphorylation oxydative mitochondriale, l’activité de l’adénylate kinase et le métabolisme ont cessé leur activité. L’AMP, bien que ne possédant pas de liaison phosphoanhydre, constitue alors la réserve énergétique dans la graine sèche. Au début de l’imbibition, l’hydratation des tissus permet la reprise d’activité de l’adénylate kinase, et dès que possible de la phosphorylation oxydative. Avec les fortes quantités d’AMP et des traces d’ATP, la combinaison AK-phosphorylation oxydative évoquée précédemment (Fig. 68) va catalyser la régénération des pools d'adénylates, permettant de restaurer une charge énergétique normale (Fig. 70).

Pour appuyer ce modèle, différentes expériences ont été réalisées. D’une part, la réponse des mitochondries isolées de pois à différents ajouts d’AMP a été observée montrant la coopération des deux enzymes impliquées dans la phosphorylation de l’AMP (Fig. 70). Les mitochondries oxydant le succinate, le premier ajout d’AMP ne stimule que très lentement, dans un premier temps, la consommation en oxygène. Cette stimulation apparaît tardivement car elle implique la mobilisation de stocks d'ATP mitochondrial, pour permettre la production d'ADP dans l'espace intermembranaire, qui est alors importé pour être phosphorylé, ce qui se traduit par l'accélération de la consommation d'O_2 (stade 3). Lorsque tout l'ADP est phosphorylé (et donc l'AMP entièrement consommé), la respiration se ralentit et passe au stade 4. Un second ajout d’AMP stimule alors immédiatement la consommation en oxygène, car cette fois l'ATP produit précédemment est disponible pour que l'AK le convertisse immédiatement en ADP, avec accélération de la respiration au stade 3. Une telle accélération est impossible en présence d’un inhibiteur de l’adénylate kinase (Ap5A : P^1,P^5-di(adénosine-5’) pentaphosphate).

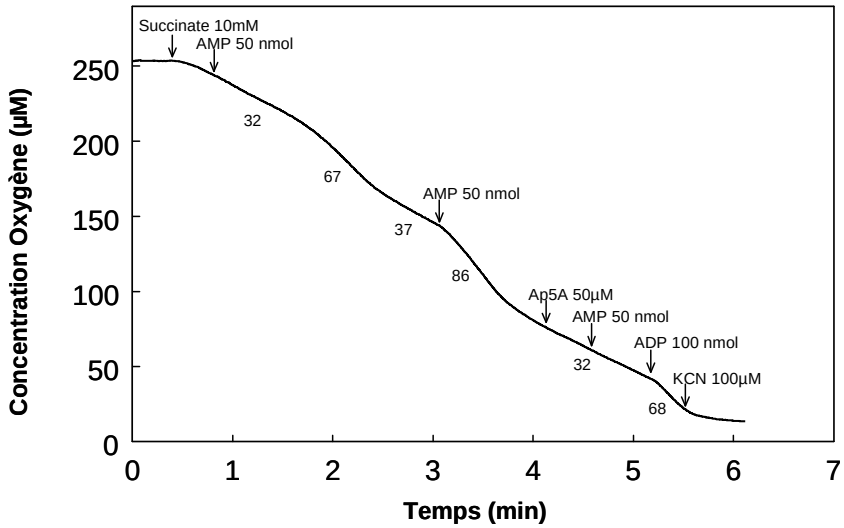


Figure 70 : Réponse des mitochondries isolées de pois Baccara 2009 aux apports d’AMP et rôle de l’adénylate kinase. Les chiffres en regard de la trace correspondent aux vitesses de consommation d'oxygène en mol O_2.min^{-1}.mg protéine^{-1}.

Les mitochondries de graines, à l'instar des mitochondries de pommes de terre (Roberts et al. 1997), sont donc parfaitement capables d'utiliser l'AMP pour produire de l'ATP. Dans le modèle proposé, les mitochondries dans la graine sont donc parfaitement capables de régénérer les pools d'adénylates à partir d'un stock cellulaire important d'AMP et de traces d'ATP. Nous avons justement observé que des mitochondries isolées de graines de pois après 22 h d'imbibition, maintenaient des stocks importants d'adénylates (AMP =

23 nmol.g-1protéines, ADP = 107 nmol.g-1 protéines, ATP = 208 nmol.g-1 protéines), ceci en dépit de la méthode d'isolement des organites qui dure environ 5 h. Il est donc très vraisemblable que malgré les faibles teneurs en ATP mesurées dans les graines sèches, des pools mitochondriaux (ou autres) demeurent, et sont largement suffisant pour relancer la régénération par le système AK-phosphorylation oxydative.

D'autre part, nous avons cherché à visualiser le rôle de l'AK in vitro, dans des situations mimant les phénomènes décrits lors de la déshydratation-réhydratation dans le modèle proposé (Fig. 69). Dans une première expérience, l'adénylate kinase est mise en présence de concentrations des trois adénylates de façon à être proche de l'équilibre, dans un milieu réactionnel avec une forte concentration de glucose (Fig. 71). Les prélèvements réalisés au cours des 10 premières minutes permettent de vérifier la stabilité du système. Après 10 minutes, de l'hexokinase est ajoutée, qui entraine une consommation d'ATP pour la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate et une libération d'ADP. L'accumulation d'ADP déplace l'équilibre de l'AK qui bascule vers la production d'ATP et d'AMP. L'ATP étant systématiquement utilisé par l'hexokinase, on observe effectivement une très forte accumulation d'AMP. Dans ce système artificiel, l'activité de l'hexokinase simule la consommation de l'ATP par le métabolisme et montre bien le déplacement de l'équilibre de l'adénylate kinase vers la production d'ATP et par conséquent vers l'accumulation d'AMP, phénomène observé au cours de la déshydratation.

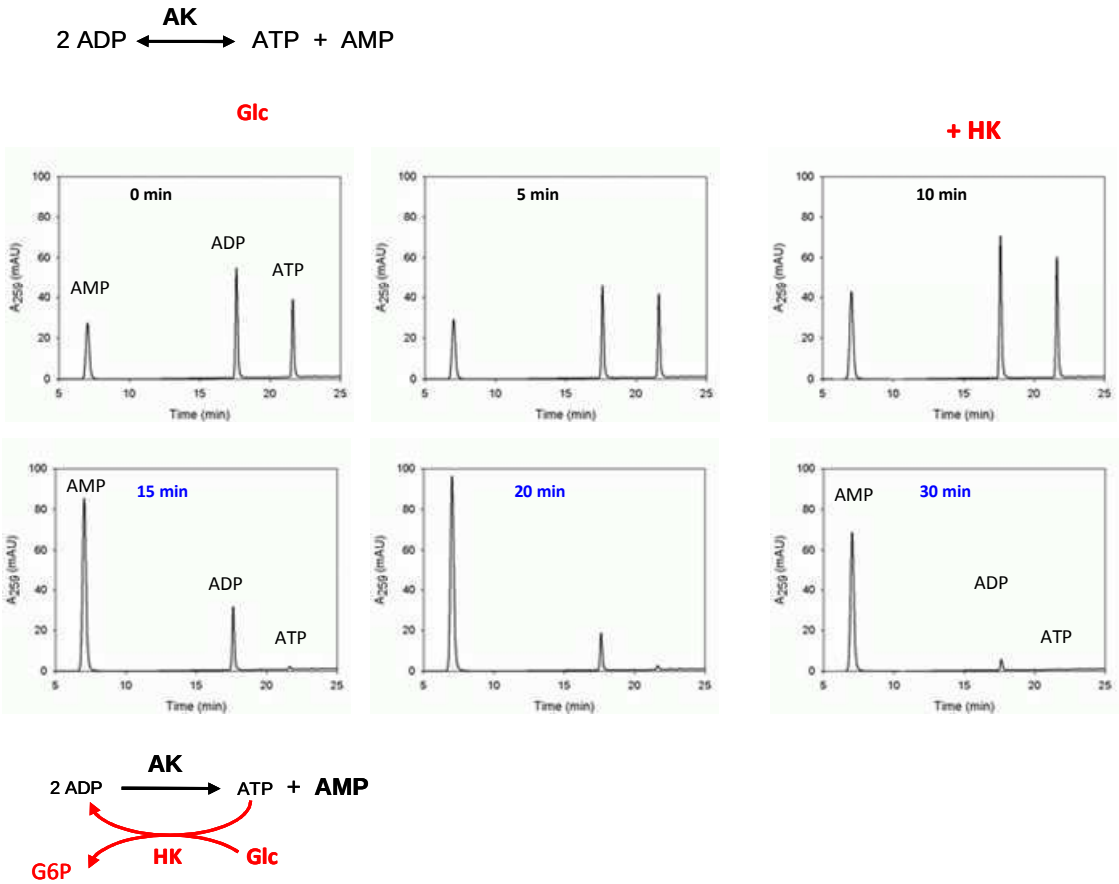


Figure 71 : Activité de l'AK mimant l'accumulation d'AMP pendant la déshydratation.

Dans une seconde expérience, une forte quantité d'AMP et une trace d'ATP sont mises en présence avec de l'AK et de la pyruvate kinase (Fig. 72). Après 10 min

d'incubation, on constate que le système est stable, l'AK étant incapable d'utiliser le stock d'AMP en absence de système régénérant l'ADP en ATP. L'ajout du substrat de la pyruvate kinase, le phosphoénolpyruvate, entraine la formation d'ATP en lien avec la déphosphorylation du phosphoénolpyruvate en pyruvate. Cette production d'ATP alimente ainsi l'AK qui peut alors fonctionner dans le sens de la production d'ADP. Après 30 minutes, le stock d'AMP a fortement diminué alors qu'une quantité importante d'ADP s'est accumulée (Fig. 72). Dans cet autre système artificiel, la production d'ATP par une enzyme qui mime la phosphorylation oxydative permet effectivement de simuler l'activité du système AK-phosphorylation oxydative pour régénérer les pools d'adénylates à partir de l'AMP lors de la réhydratation des graines

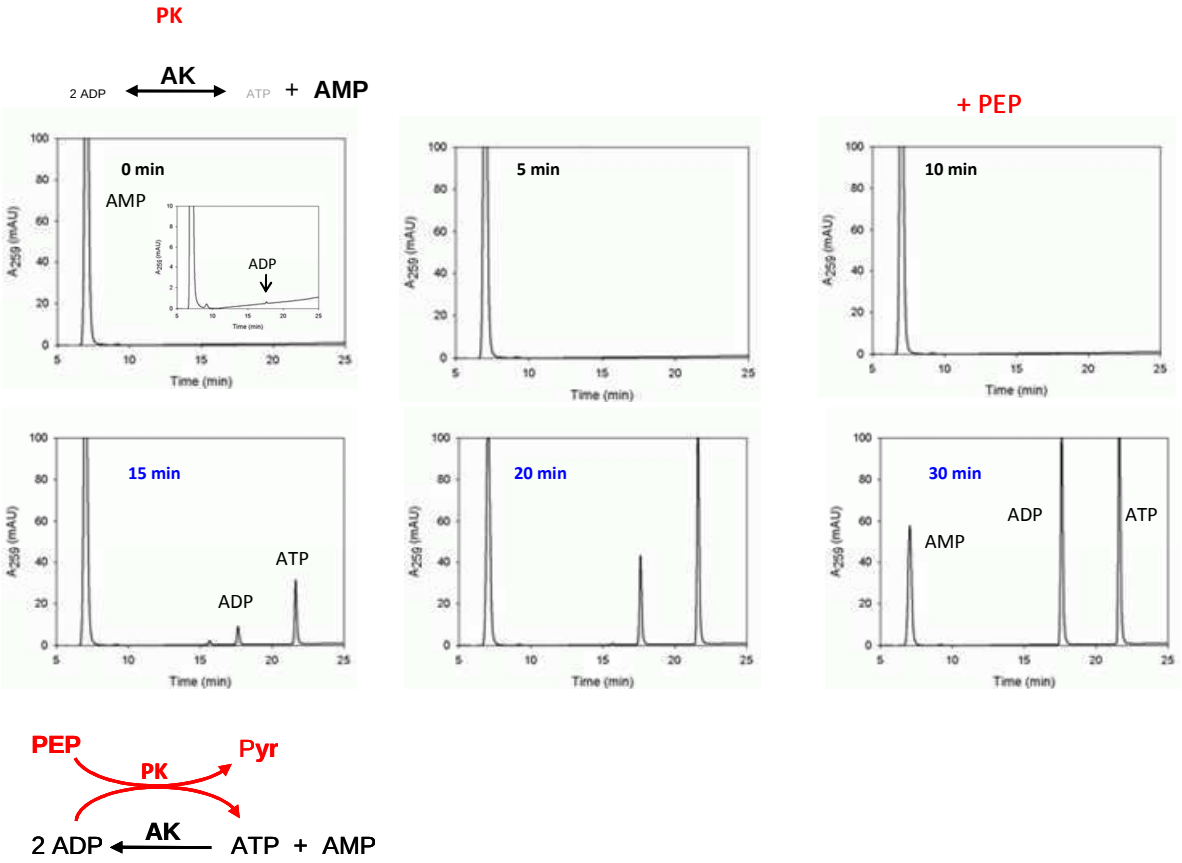


Figure 72 : Activité de l'AK mimant l'utilisation du stock d'AMP pour la production d'ADP lors de la réhydratation.

Une vitesse de dessiccation rapide entraine la présence en plus grande quantité d'adénylates dans la graine sèche. Cependant, le génotype Champagne n'est pas plus riche en adénylates que les pois de printemps. Dans tous les cas, l'adénylate majoritaire de la graine sèche est l'AMP. Cet AMP est la forme de stockage des adénylates chez les organismes anhydrobiotes et semble indispensable à l'amorce de la production d'ATP grâce au fonctionnement de l'AK. Au cours de l'imbibition, l'AEC augmente ainsi que la production d'ATP, cette augmentation est très forte dans l'axe embryonnaire. Cette production d'ATP est stimulée par une vitesse de dessiccation rapide et n'est pas ralentie par des basses températures lorsque les résultats sont exprimés en temps thermique. L'AK et la phosphorylation oxydative jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme énergétique en lien avec l'anhydrobiose.

4.5 Glucides

Les graines de pois possèdent comme réserves glucidiques de l'amidon et des carbohydrates solubles sous forme de saccharose et d'oligosaccharides de la famille du raffinose (RFO). La dégradation de l'amidon n'a pas été étudiée car elle se produit plus tardivement, après l'émergence racinaire. Par contre, la dégradation des RFO se déroule pendant la phase de germination et peut être pratiquement complète avant la sortie de la radicule.

4.5.1 Composition initiale en sucres solubles

Les dosages de sucres solubles totaux indiquent des valeurs similaires chez les différents génotypes, dans les cotylédons (84 $mg.g^{-1}MS$) et dans les axes (186 $mg.g^{-1}MS$). Cependant, la répartition est différente selon les génotypes d'hiver et de printemps. Chez les pois de printemps, le stachyose est l'oligosaccharide prédominant alors que chez Champagne l'oligosaccharide majoritaire est le verbascose dans les cotylédons, et en égale teneur avec le stachyose pour les axes (Fig. 73). Dans les cotylédons, Champagne a des teneurs supérieures en saccharose (+ 18% /B et + 44% /T) et en verbascose (+ 42% /T et + 76% /B), alors qu'il a des teneurs inférieures en raffinose (3 fois moins /T et 4 fois moins /B), en stachyose (2,3 fois moins /T et 2,5 fois moins /B) et en RFO totaux par rapport à Baccara (B) et Térèse (T). Les axes sont toujours plus riches quelque soit le sucre considéré par rapport aux cotylédons : 2,3 fois pour les sucres totaux (Fig. 73). Comme pour les cotylédons, Champagne est plus riche en verbascose (+ 35% /T et + 148% /B) et plus pauvre en raffinose (-54% /B et -27% /T) et stachyose (-14%/B et -27%/T) que les génotypes de printemps. Pour les teneurs en saccharose et RFO, les axes de Champagne ont des valeurs intermédiaires entre les deux génotypes de printemps. Que ce soit au niveau des cotylédons ou des axes, les graines de pois comportent très peu de fructose et de glucose et les teneurs trouvées sont inférieures à 0,07 $mg.g^{-1}MS$. Aucun autre sucre n'est détectable sur les spectres observés.

Une vitesse de dessiccation rapide augmente la teneur en stachyose (+18%) et abaisse la teneur en verbascose (-23%) dans les cotylédons et dans les axes des deux génotypes sans modifier le total des RFO ni la teneur en sucres totaux (Fig. 73). L'effet sur le saccharose, dans les cotylédons et dans les axes, est variable selon le génotype, il augmente chez Champagne et diminue chez Baccara.

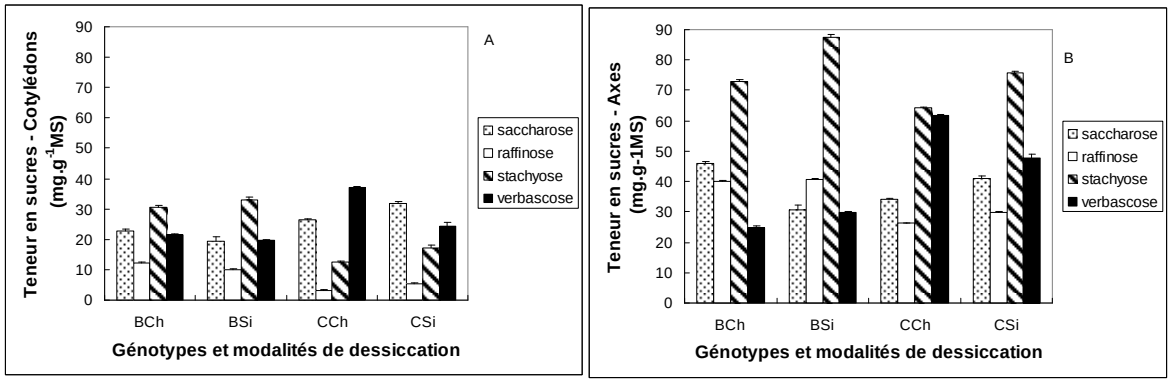


Figure 73: Composition initiale en sucres solubles des graines de différents génotypes de pois. A cotylédons ; B Axes.

4.5.2 Evolution des RFO au cours de la germination

La mobilisation des différents oligosaccharides dans les cotylédons est très faible et elle est similaire pour les trois génotypes, les comportements diffèrent par l'état initial (Fig. 74). Les plus grands changements portent sur la diminution du verbascose, les pentes sont de l'ordre de 0,35 $mg.g^{-1}MS.h^{-1}$. Le raffinose et le stachyose diminue très lentement (respectivement 0,09 et 0,02 $mg.g^{-1}MS.h^{-1}$). Après 24 h d'imbibition, il reste encore dans les cotylédons 90% des RFO chez Baccara et Champagne, un pourcentage un peu plus faible pour Térèse (73%).

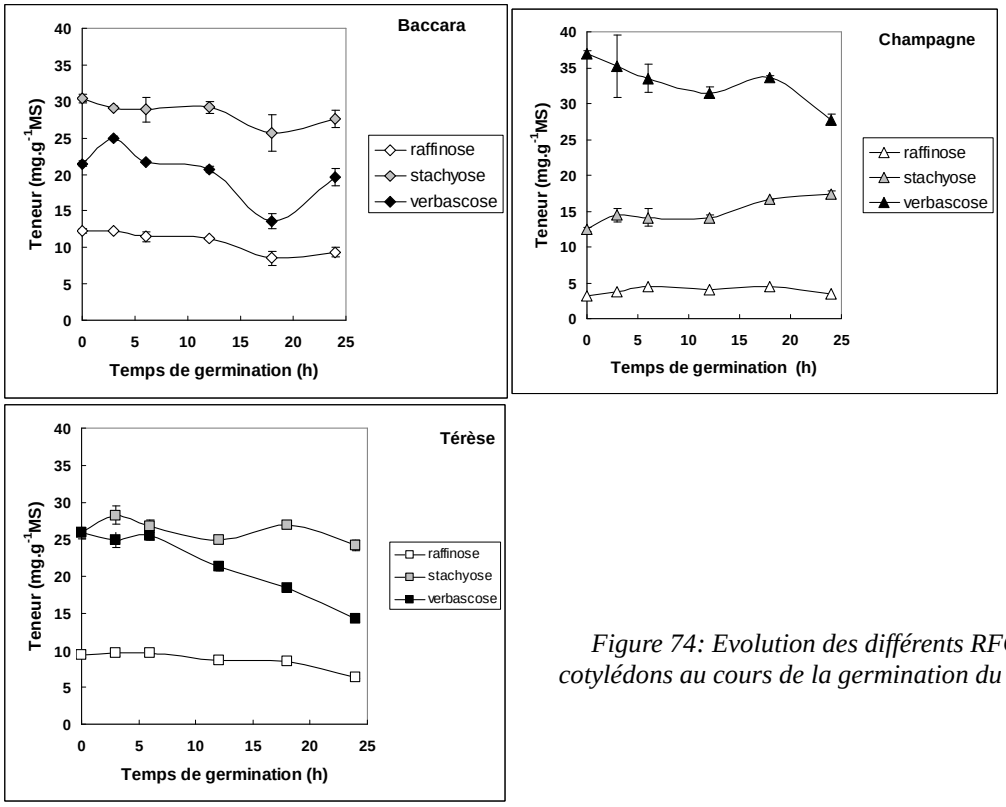


Figure 74: Evolution des différents RFO dans les cotylédons au cours de la germination du pois à 20°C.

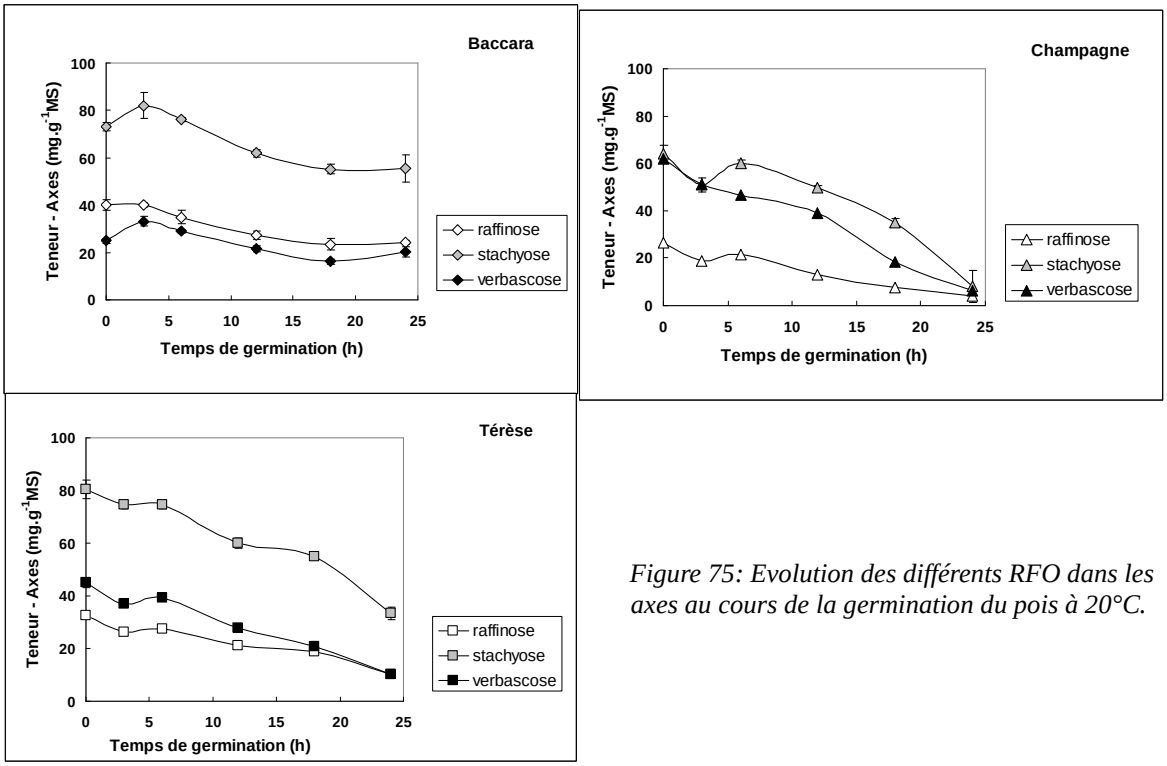


Figure 75: Evolution des différents RFO dans les axes au cours de la germination du pois à 20°C.

Au niveau des axes, contrairement aux cotylédons, la teneur des trois oligosaccharides diminue chez les trois génotypes au cours de l'imbibition (Fig. 75). Pour Champagne, l'oligosaccharide le plus fortement mobilisé est le verbascose alors que pour les pois de printemps c'est le stachyose. De plus, chez Champagne, la mobilisation du stachyose est forte (2,05 $mg.g^{-1}MS.h^{-1}$), elle est comparable à la mobilisation de cet oligosaccharide par le génotype Térèse (1,84 $mg.g^{-1}MS.h^{-1}$) et supérieure à celle du génotype Baccara (1,09 $mg.g^{-1}MS.h^{-1}$). La mobilisation du raffinose est identique chez les trois génotypes et elle est en moyenne de 0,83 $mg.g^{-1}MS.h^{-1}$. Après 24 h d'imbibition, les teneurs des différents oligosaccharides chez Champagne sont très faibles alors que chez les génotypes de printemps il reste encore beaucoup de stachyose, tout particulièrement chez Baccara (28 $mg.g^{-1}$MS dans les cotylédons et 56 $mg.g^{-1}$MS dans les axes).

Une vitesse de dessiccation rapide ne modifie pas la mobilisation des oligosaccharides dans les cotylédons, mais ralentit uniquement la mobilisation du verbascose dans les axes chez Champagne (Fig. 76).

Les basses températures ralentissent la mobilisation des différents oligosaccharides exprimée par heure pour les trois oligosaccharides et pour les trois génotypes. Par contre, si l'échelle de temps prend en compte la température en exprimant la vitesse en temps thermique, la mobilisation des oligosaccharides n'est pas modifiée dans les cotylédons. Dans les axes, seule la mobilisation du stachyose chez Champagne est ralentie par les basses températures (Fig. 76).

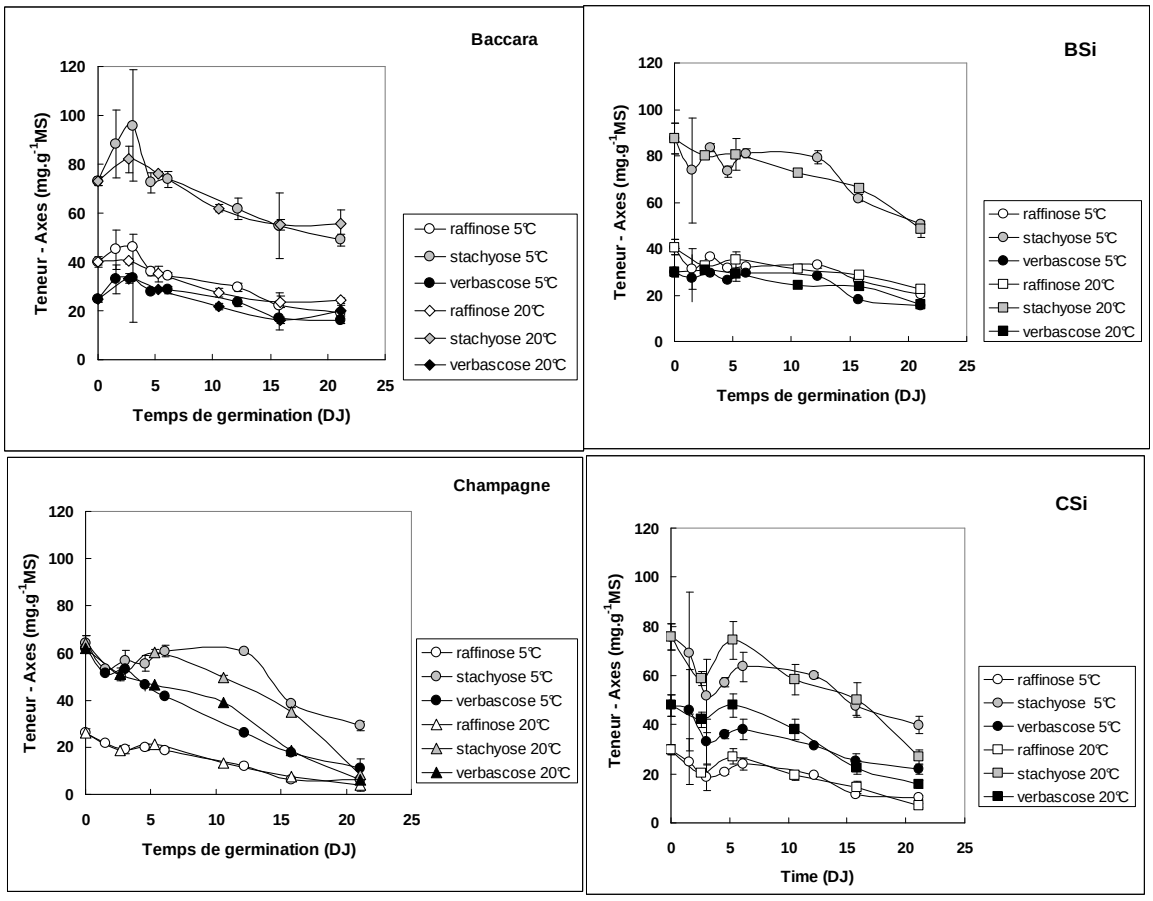


Figure 76: Effet des basses températures sur la mobilisation des différents oligosaccharides dans les axes embryonnaires de différents génotypes.

4.5.3 Evolution des RFO totaux et du saccharose au cours de la germination

L'observation de la disparition de RFO totaux confirme que globalement, la mobilisation des RFO est relativement faible dans les cotylédons. La dégradation des RFO est quasi inexistante chez Champagne (0,1 mg.g^{-1}MS.h^{-1}) alors qu'elle est pratiquement six à sept fois plus importante chez Baccara (0,55 mg.g^{-1}MS.h^{-1}) et Térèse (0,7 mg.g^{-1}MS.h^{-1}). Cependant, après 24 h d'imbibition, il reste encore dans les cotylédons 90% des RFO chez Baccara et Champagne, un pourcentage un peu plus faible pour Térèse (73%). Cette disparition de RFO est concomitante avec une augmentation de la teneur en saccharose. Cette augmentation en saccharose dans les cotylédons n'est pas significativement différente entre les trois génotypes et est de 0,24 mg.g^{-1}MS.h^{-1}. Bien que la teneur en saccharose soit plus élevée après 24 h d'imbibition, pour le génotype d'hiver, Champagne, cette teneur s'explique par des teneurs plus élevées dans la graine sèche et non par la mobilisation des RFO.

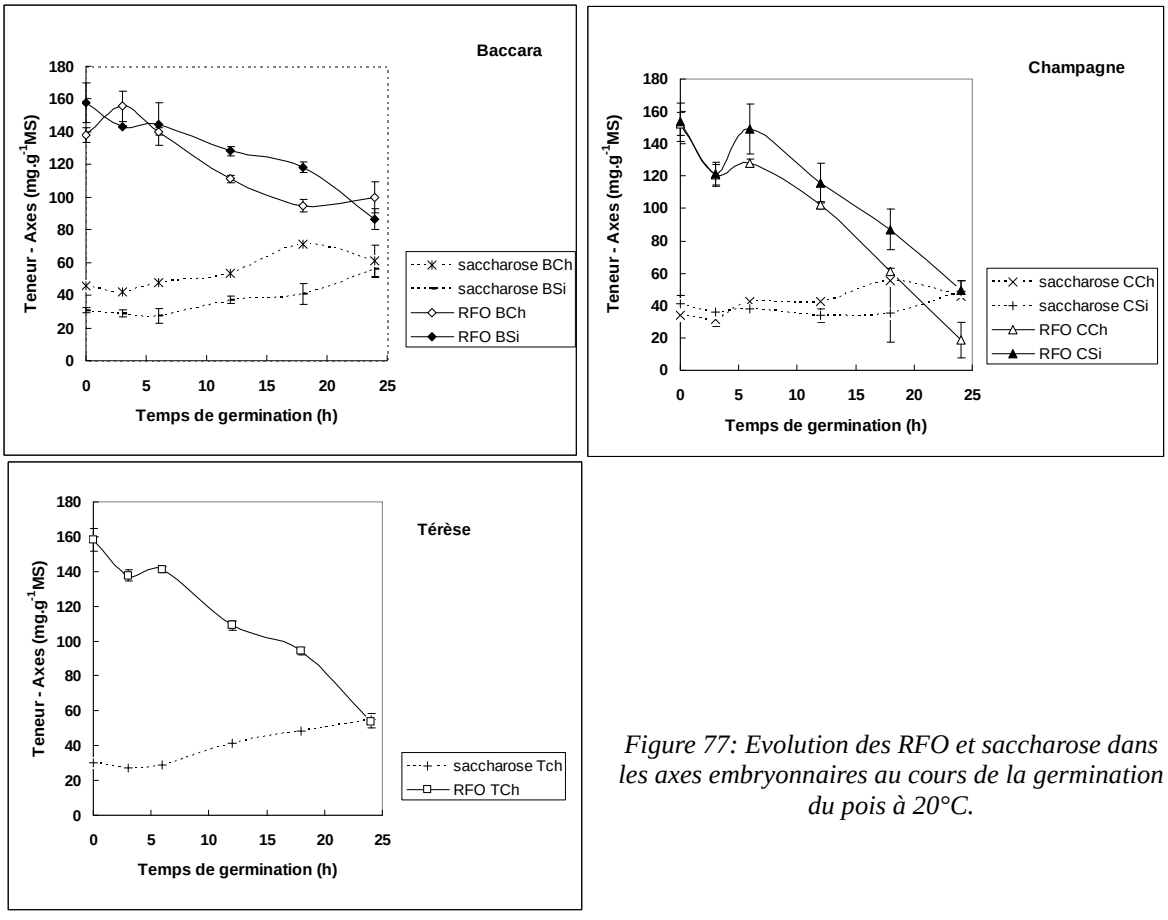


Figure 77: Evolution des RFO et saccharose dans les axes embryonnaires au cours de la germination du pois à 20°C.

Au contraire, la vitesse de mobilisation des RFO dans les axes est beaucoup plus rapide par rapport aux cotylédons, 52 fois chez Champagne, et de l'ordre de 5 fois pour Baccara et Térèse (Fig. 77). Champagne mobilise très rapidement les RFO (5,19 mg.g^{-1}MS.h^{-1}) alors que la vitesse est moins rapide pour Térèse (4,04 mg.g^{-1}MS.h^{-1}) et la vitesse la plus lente est observée pour Baccara (2,38 mg.g^{-1}MS.h^{-1}). Après 24 h d'imbibition, il ne reste plus beaucoup de RFO dans l'axe de Champagne 12% alors que 34% reste chez Térèse et 72% chez Baccara. Bien que la dégradation des RFO soit très importante chez

Champagne, cela ne se traduit pas par une vitesse d'accumulation de saccharose plus élevée que celles des génotypes de printemps (Fig. 77). Ceci est confirmé par la faible corrélation obtenue entre la teneur en RFO totaux et la teneur en saccharose (Fig. 78). Aucun autre sucre soluble n'est accumulé, les teneurs en glucose et fructose sont souvent très faibles et sont inférieures à 2 $mg.g^{-1}$ MS pour le glucose et 3 $mg.g^{-1}$MS pour le fructose. La dégradation des RFO ne conduit pas à une accumulation de galactose. En fait, la teneur en saccharose est le reflet de la dégradation des RFO mais aussi de son utilisation dans le métabolisme. L'utilisation de saccharose ou d'autres sucres solubles simples semble être plus importante chez Champagne par rapport aux deux autres génotypes. Entre 18 et 24 h d'imbibition, l'amorce d'une diminution de la teneur en saccharose chez Champagne et Baccara est observée (Fig. 77) indiquant une demande métabolique accrue, les valeurs des monosaccharides étant toujours très basses.

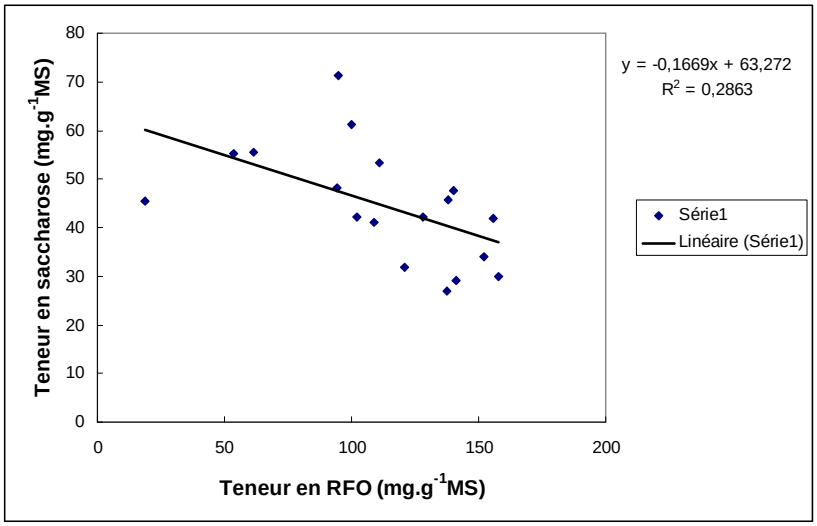


Figure 78: Relation entre Teneur en RFO et teneur en Saccharose

La vitesse de dessiccation des graines ne modifie pas la vitesse de mobilisation des RFO, ni la vitesse d'accumulation du saccharose dans les cotylédons des deux génotypes, ni dans les axes embryonnaires de Baccara (Fig. 79). Par contre, dans les axes embryonnaires du génotype Champagne, une vitesse de dessiccation rapide ralentit la mobilisation des RFO (-31%) et l'accumulation du saccharose (3 fois moins). Après 24 h d'imbibition, les axes des graines de Champagne ayant subi une vitesse de dessiccation rapide ont une teneur en RFO plus importante que celles qui ont subi une dessiccation lente au champ.

Exprimé en degré jour, les cinétiques de mobilisation des RFO totaux et de l'accumulation du saccharose sont très proches aux deux températures. Uniquement après 24 h d'imbibition, les basses températures retardent la mobilisation des RFO totaux dans les axes de Champagne (Fig. 79).

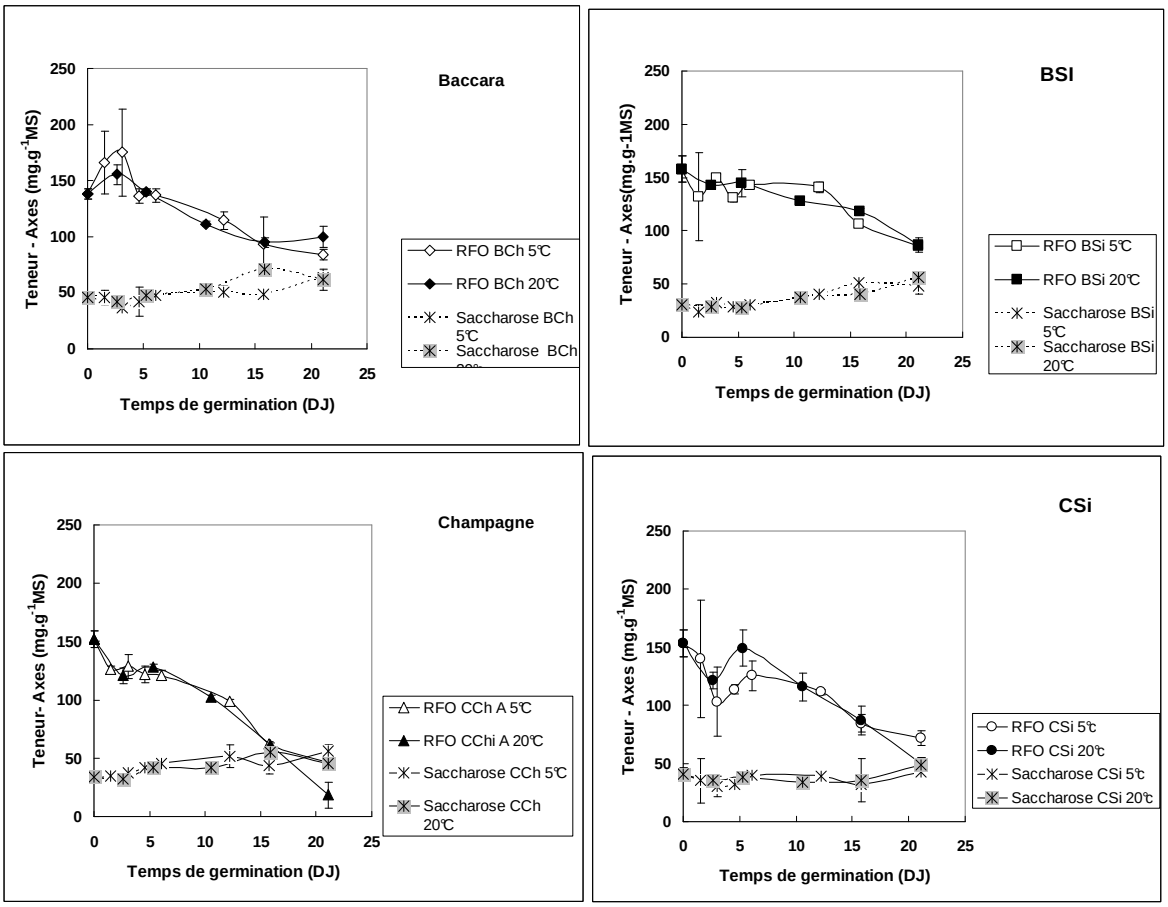


Figure 79 : Evolution des RFO et du saccharose dans les axes au cours du temps exprimé en degré-jour.

4.5.4 Utilisation des sucres

La dégradation des RFO ne conduit pas uniquement à l'accumulation de saccharose (cf. paragraphe précédent) mais des composés issus de cette dégradation peuvent contribuer à la germination, en particulier, la respiration, le maintien des structures en place, les biosynthèses et la croissance de la radicule. L'utilisation de ces composés issus de la dégradation des RFO et exprimée en mole de carbone, est estimée par la différence entre la dégradation des sucres solubles totaux et l'accumulation du saccharose. Au niveau des axes embryonnaires, le comportement des génotypes varie énormément. Champagne, quelle que soit la modalité de dessiccation ou les conditions de germination, mobilise de plus grandes quantités de sucres solubles non destinés à l'accumulation de saccharose (Fig. 80). Les valeurs négatives obtenues chez Champagne pourraient provenir d'une mobilisation de l'amidon plus précoce dans les cotylédons. Une vitesse de dessiccation rapide augmente l'utilisation des sucres solubles dans les cotylédons. Chez Champagne les basses températures ralentissent l'utilisation des sucres solubles sans doute en lien avec le retard de dégradation des RFO après 24 h d'imbibition et une teneur en saccharose légèrement supérieure.

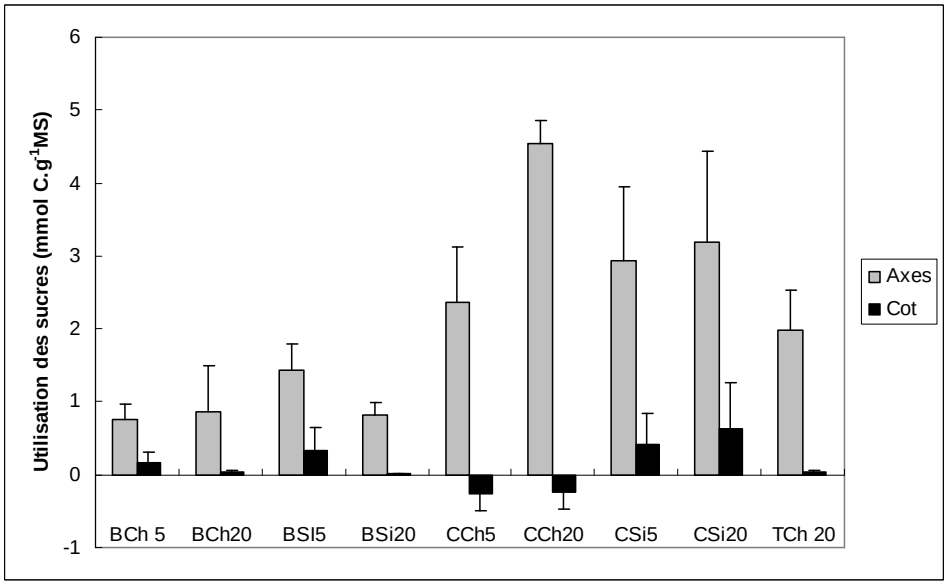


Figure 80: Utilisation des sucres solubles par les différents génotypes sous différentes modalités de dessiccation et de germination.

A cause de la faible mobilisation des sucres solubles dans les cotylédons, le rapport Sucres solubles dans les cotylédons /Sucres solubles dans les axes, n'est pas un bon indicateur de l'importance du transfert de carbohydrates solubles des cotylédons vers les axes. En effet les faibles valeurs obtenues pour ce rapport ne correspondent pas à un flux important vers les axes mais à cette absence de mobilisation des sucres dans les cotylédons. De même la faible augmentation de ce rapport n'est pas due à un ralentissement du transfert mais à une forte utilisation des sucres dans les axes.

L'hydrolyse enzymatique des RFO libère une à trois moles de galactose selon l'oligosaccharide considéré et une mole de saccharose. Le saccharose contribue-t-il aux besoins cellulaires ou n'est –il qu'un moyen de stockage des glucides pour la croissance de la plantule après la germination? L'effet cumulé de la plus forte libération de saccharose et une valeur plus élevée en saccharose dans la graine sèche permet à Champagne de posséder un pool de saccharose plus important pour la germination par rapport aux génotypes de printemps (Tableau 7).

Tableau 7 : Estimation de la contribution du saccharose aux besoins des cellules de l'axe embryonnaire

	Libération saccharose des RFO ($mg.g^{-1}MS$)	Pool théorique saccharose à 0h ($mg.g^{-1}MS$)	Pool mesuré de saccharose après imbibition ($mg.g^{-1}MS$)	Utilisation Saccharose ($mg.g^{-1}MS$)
BCh 20C	21,6	67,4	61,3	6,1
BCh 5C	30,3	76,1	63,8	12,3
BSi 20C	38,1	68,9	56,1	12,8
BSi 5C	38,7	69,5	48,0	21,5
CCh 20C	66,7	100,7	45,4	55,3
CCh 5C	52,8	86,7	56,3	30,4
CSi 20C	53,8	94,9	48,6	46,3
CSi 5C	42,4	83,5	42,7	40,8
TCh 20C	53,7	83,7	55,1	28,6

Champagne est le génotype qui utilise le plus de saccharose pour les besoins des cellules, au moins deux fois plus que les génotypes de printemps, même lorsque les graines ont subi une vitesse de dessiccation rapide. Le froid ralentit cette utilisation chez Champagne mais celle–ci reste à un niveau comparable à celle des pois de printemps à 20°C. Le saccharose peut être utilisé et n'est pas qu'un moyen de stockage. Le comportement de Baccara et de Champagne est différent. Chez Baccara, une vitesse de dessiccation rapide ou une germination au froid va entrainer une utilisation plus importante de saccharose (x 2) (Tableau 7). La combinaison des deux facteurs augmente encore plus cette utilisation (x 3,5). Pour Champagne, c'est l'inverse, plus les contraintes sont fortes et moins de saccharose est utilisé.

Aucune accumulation de galactose n'a été mise en évidence, ce qui suggère que le galactose est mobilisé pour le métabolisme de la graine. Cependant, il n'est pas exclu que ce galactose puisse être utilisé pour la synthèse de saccharose accumulé dans la graine. Un élément de réponse peut être donné en calculant l'utilisation du saccharose par deux voies différentes. La première considère que tout le galactose libéré par l'hydrolyse des RFO est utilisé, c'est à dire aucune molécule de galactose ne serait impliquée dans la synthèse de saccharose. L'estimation de l'utilisation du saccharose serait la différence entre l'utilisation totale des sucres solubles et la valeur de la libération du galactose par les RFO. La deuxième voie consiste à calculer l'utilisation du saccharose par différence entre les valeurs de saccharose libre et piégé dans les RFO à 0 h et à germination (24 h pour 20°C et 83 h pour 5°C). Lorsque la valeur obtenue par le premier calcul est inférieure à la valeur obtenue par la deuxième voie, une synthèse de saccharose via le galactose est possible. Champagne contrairement à Térèse ne semble pas utiliser le galactose libéré pour la synthèse de saccharose (Tableau 8). Les vitesses de dessiccation rapides et les basses températures favorisent la possibilité de la mise en réserve du galactose sous forme de saccharose.

Tableau 8 : Mise en évidence de la possibilité de synthèse de saccharose via le galactose.

Traitements	Libération de galactose (mmolC.g^{-1}MS)	Total sucre utilisé (mmolC.g^{-1}MS)	Utilisation saccharose Calcul1 (mmolC.g^{-1}MS)	Utilisation saccharose Calcul2 (mmolC.g^{-1}MS)	Calcul1 – Calcul2 (mmolC.g^{-1}MS)
BCh 20C	0,604	0,854	0,250	0,212	0,037
BCh 5C	0,878	0,752	-0,127	0,431	-0,557
BSi 20C	1,223	0,813	-0,410	0,447	-0,857
BSi 5C	1,221	1,441	0,219	0,755	-0,535
CCh 20C	2,480	4,548	2,068	1,939	0,129
CCh 5C	1,979	2,361	0,382	1,067	-0,685
CSi 20C	1,847	3,179	1,332	1,623	-0,291
CSi 5C	1,441	2,924	1,483	1,431	0,052
TCh 20C	1,869	1,988	0,120	1,004	-0,884

Les résultats montrent que le compartiment le plus riche et le plus impliqué dans les premières phases de mobilisation des sucres solubles est l'axe embryonnaire. Les différences entre Champagne et les pois de printemps, dans la composition initiale des axes, portent sur l'oligosaccharide majoritaire : le verbascose pour Champagne et le stachyose pour les pois de printemps. Bien que les trois oligosaccharides des axes soient mobilisés au cours de l'imbibition par les trois génotypes, Champagne se distingue par la disparition presque totale des RFO après 24 h d'imbibition alors qu'il reste plus du tiers des RFO chez les pois de printemps. Cette forte disparition des RFO chez Champagne ne se traduit pas par une accumulation de saccharose plus élevée que celle des pois de printemps. La mobilisation des RFO et l'accumulation du saccharose dans les axes embryonnaires de graines ayant subi des vitesses de dessiccation élevées sont ralenties. Les basses températures en ralentissant le métabolisme, retardent la mobilisation des RFO, cependant si cette cinétique est exprimée en temps thermique ce n'est qu'à 24 h d'imbibition que le ralentissement est observé dans les axes embryonnaires de Champagne. Le bilan carboné permet de mettre en évidence que Champagne mobilise de plus grandes teneurs en sucres solubles non destinés à l'accumulation de saccharose donc utilisés par le métabolisme.

4.6 Relations entre les différents aspects de la reprise du métabolisme

4.6.1 Contribution de la respiration à la production des ATP.

Si la voie COX est majoritaire, la consommation en oxygène pourrait refléter la production d'ATP. Une relation linéaire a été trouvée entre la teneur en ATP et la consommation en oxygène au cours de l'imbibition des fragments de graines de Baccara ou à celle des graines entières (GE) de Baccara et Champagne à 20°C (Fig. 81). La consommation en oxygène conduit bien à la production d'ATP et non à une fuite des électrons pour les graines qui ont subi une dessiccation rapide au cours de leur formation.

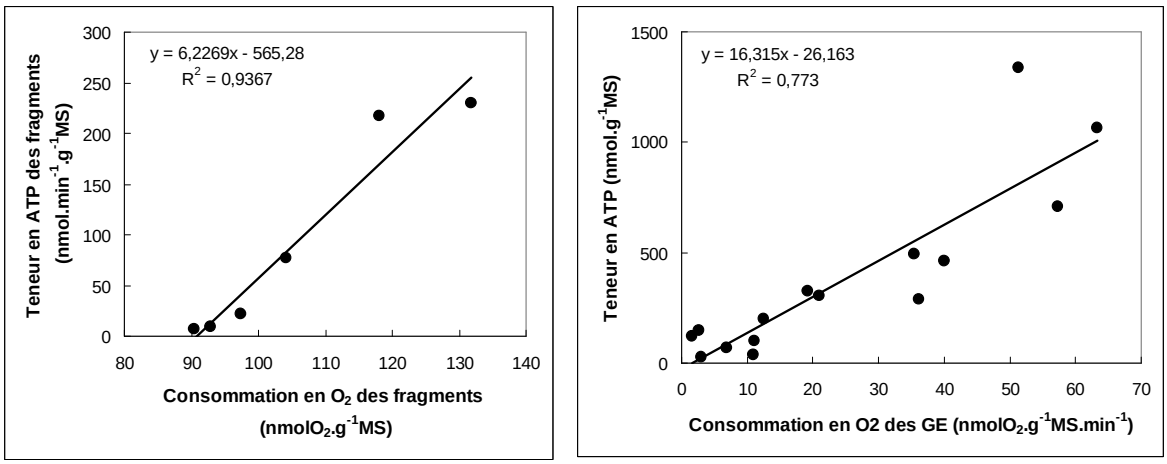


Figure 81 : Relation entre teneur en ATP et consommation en O_2.

Les dosages d'ATP donnent la teneur en ATP à un moment donné dans le déroulement de la germination de la graine, mais cette valeur résulte de la différence entre la quantité produite et la quantité utilisée par le métabolisme. Pour avoir une idée de la quantité produite d'ATP au cours de l'imbibition, une estimation peut être faite à partir du suivi de la respiration de la graine entière au cours de l'imbibition. Ce suivi permet d'avoir d'une part, la consommation cumulée d'oxygène par la graine après une période de 6 ou de 12 h d'imbibition. Cette consommation en oxygène peut être utilisée pour calculer le nombre d'ATP produits, en sachant qu'un atome d'oxygène permet théoriquement la synthèse de trois ATP (Raymond et al. 1985). D'autre part, le dosage de l'ATP donne le stock en ATP à un temps précis 6 ou 12 h au sein de la graine. La différence entre la production d'ATP et le stock permet d'estimer les teneurs en ATP utilisées par le métabolisme après un temps donné d'imbibition. Cette utilisation reflète mieux les potentialités des différents génotypes. Il est intéressant de voir que moins de 0,5% de l'ATP formé est présent dans la graine. Après 6 h d'imbibition, Champagne a consommé 7 fois plus d'ATP que Baccara et 1,7 fois plus que Térèse (Fig. 82). Après 12 h d'imbibition, bien que les différences soient moins marquées, le classement des génotypes est identique. L'application d'une vitesse de dessiccation rapide stimule la production et l'utilisation de l'ATP par le métabolisme (Fig. 82).

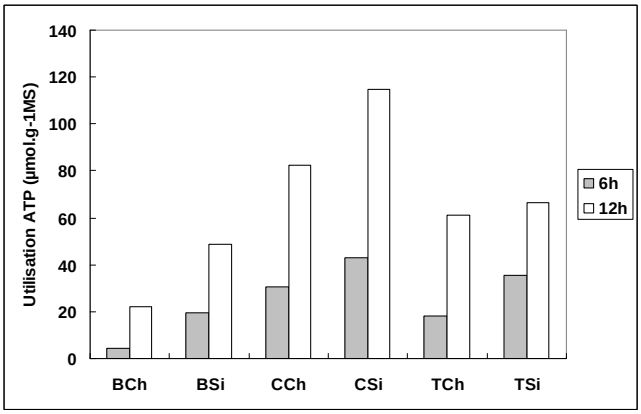


Figure 82: Utilisation de l'ATP formé depuis le début de l'imbibition.

La vérification de la justesse des valeurs absolues en ATP calculées à partir de la consommation en oxygène est difficile à faire dans notre étude. En effet, la teneur en ATP ne peut être calculée que par rapport à une vitesse de consommation d'oxygène, cela pose la question de quel pas de temps prendre pour le comparer au dosage d'ATP. En prenant la consommation d'oxygène des fragments de graine de Baccara, en une minute comme pas de temps, une surestimation de la concentration en ATP de 1,5 a été trouvée par rapport à la valeur mesurée.

4.6.2 Contribution de la mobilisation des sucres à la respiration.

Une mobilisation rapide des sucres devrait stimuler la respiration en apportant des substrats pour la chaine respiratoire. La corrélation obtenue avec un r^2 faible de 0,29, indique que la respiration des graines entières ne dépend pas de la teneur en RFO donc de la dégradation des RFO (Fig. 83).

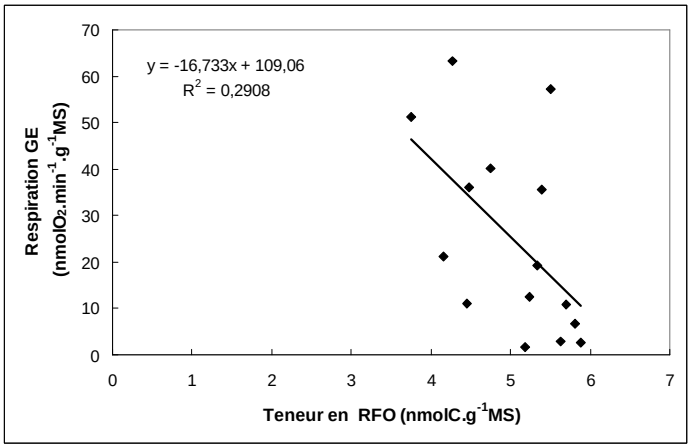


Figure 83: Relation entre respiration des graines entières et teneur en RFO.

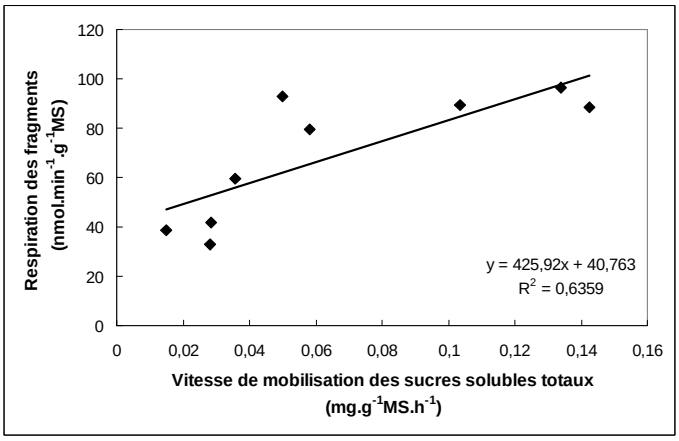


Figure 84: Relation entre respiration des fragments et la vitesse de mobilisation des sucres solubles.

La respiration des fragments à 20°C et 5°C peut être reliée à la vitesse de mobilisation des sucres solubles totaux avec un r^2 de 0,64 (Fig. 84). Même si la relation est meilleure, ce résultat indique que la vitesse de mobilisation des sucres est importante mais d'autres facteurs jouent sur la vitesse de consommation de l'oxygène.

4.6.3 Contribution de la mobilisation des sucres à la production d'ATP.

La relation entre la teneur en ATP et RFO est meilleure dans le cas du génotype Baccara ($r^2 > 0,8$) (Fig. 85). Pour Champagne, malgré une forte dégradation des RFO, ces sucres ne semblent pas être tous utilisés pour la fourniture d'énergie mais une partie, plus importante par rapport à celle de Baccara, doit servir aux biosynthèses. Pour une même teneur en RFO, la teneur en ATP est plus importante lorsque la germination se déroule aux basses températures et encore plus importante après des vitesses de dessiccation rapides appliquées au moment de la formation de la graine. Dans certaines conditions, ici dans les deux cas plus difficiles, la priorité semble être donnée à la fourniture d'énergie au détriment d'autres utilisations comme le montre une accumulation moins importante de saccharose lors de l'imbibition pour les graines de Champagne ayant subi une vitesse de dessiccation rapide.

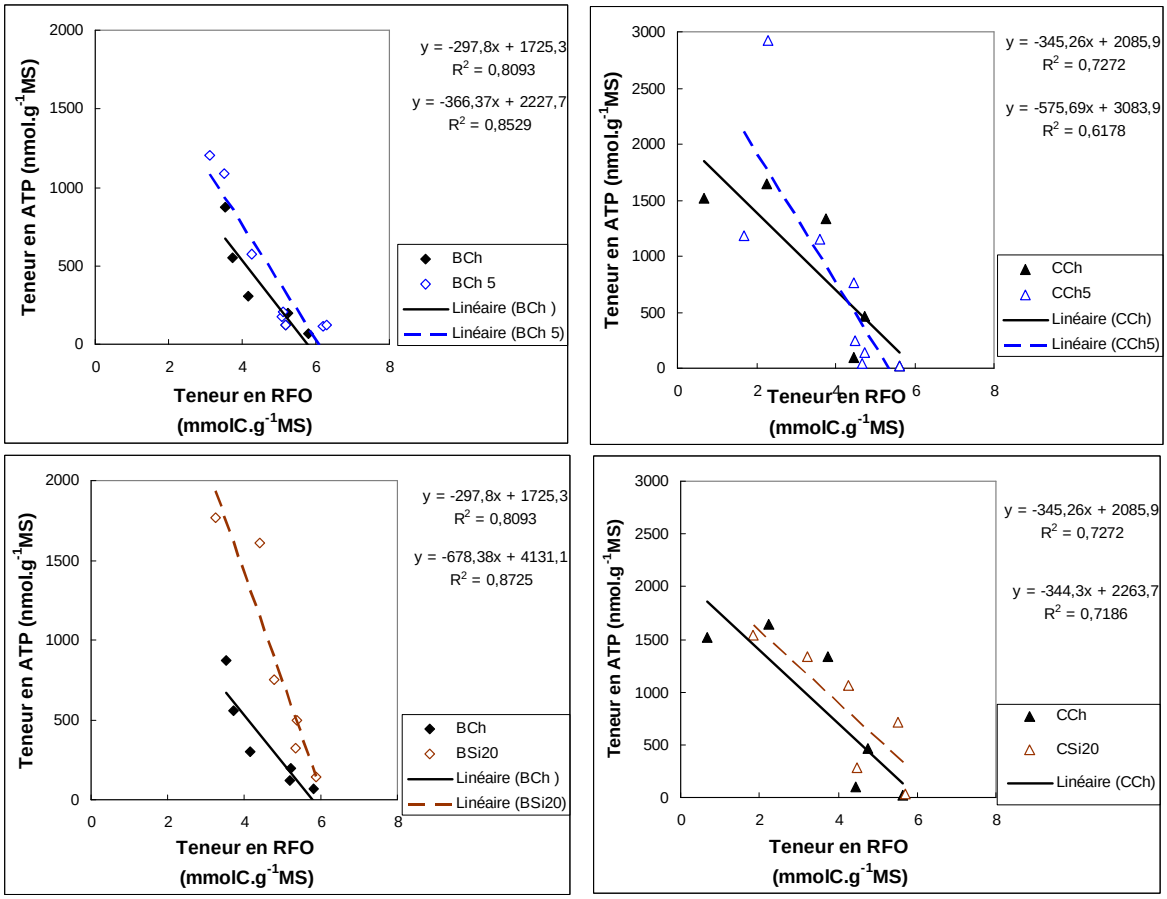


Figure 85 : Corrélations entre la teneur en ATP et la teneur en RFO en fonction des génotypes, des conditions de températures de germination et des vitesses de dessiccation appliquées au moment de la formation de la graine.

4.7 Vitesse de germination et reprise du métabolisme

Un des objectifs principaux de cette étude est de comprendre la plus grande rapidité de germination de Champagne des basses températures à l'optimum peut-elle s'expliquer par une reprise du métabolisme plus rapide ? Quels sont les meilleurs indicateurs d'une germination rapide ?

Particulièrement au cours de la germination, la consommation d'oxygène par la graine est un processus primordial. La vitesse de germination (à 20°C) peut être reliée à la respiration des fragments à 20°C après 40 min d'imbibition (r^2 = 0,83), indiquant que plus la respiration des fragments sera forte et plus les graines de ce lot auront tendance à germer vite (Fig. 86). Cependant pour des respirations fortes, l'écart au niveau des vitesses de germination est élevé. La mesure sur un nombre de génotypes plus important permettrait d'affiner cette relation. La relation avec la respiration des graines entières après 6 h d'imbibition (r^2 = 0,72) n'apporte pas plus de précision (peu de points sont disponibles) tout en sachant que la méthode est plus lente.

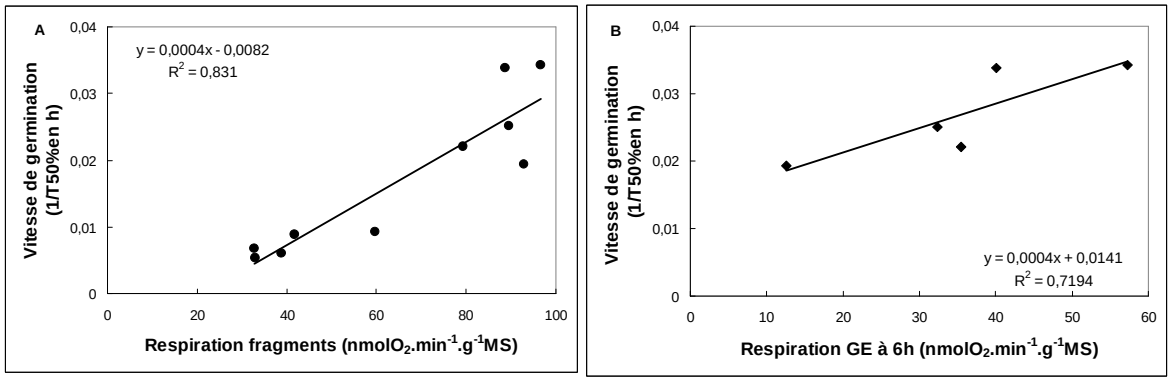


Figure 86: Vitesse de germination en fonction de la respiration (A) des fragments à 20°C et (B) des graines entières à 6 h d'imbibition.

La respiration mitochondriale permet une production efficace d'ATP. Cependant les modalités de sa reprise en début d'imbibition ne permettent pas de faire un lien avec la vitesse de germination. Malgré l'importance du stock d'AMP et du rôle de l'AK dans la reprise du métabolisme, les teneurs en adénylates totaux et en AMP dans la graine sèches ne sont pas des marqueurs de la vitesse de germination. En effet, aucune corrélation n'a été trouvée entre les deux. Bien qu'une dessiccation rapide entraine une augmentation des adénylates dans la graine sèche, la formation d'ATP après 12 h d'imbibition dans les axes embryonnaires est un meilleur indicateur de la germination (Fig. 87). La bonne reprise du métabolisme énergétique, qui permet des biosynthèses, et non les potentialités de la graine sèche, reflète mieux la vitesse de germination. Cette relation ne peut être confirmée par l'étude de la formation d'ATP par la graine entière des 16 génotypes étudiés car les mesures effectuées à 18 h sont trop tardives.

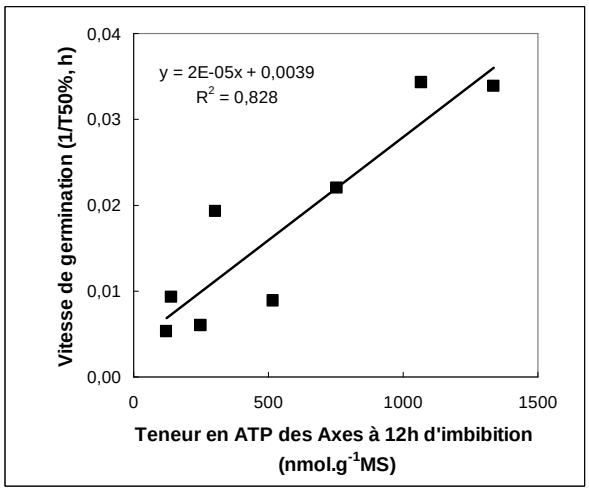


Figure 87 : Relation entre teneur en ATP à 12h d'imbibition.

Un des rôles le plus souvent cité pour les RFO dans la bibliographie, est qu'ils constituent une source d'énergie rapidement mobilisable au cours de la germination. Nous avons montré que le compartiment de la graine le plus impliqué dans la mobilisation des sucres solubles au cours de la germination est l'axe embryonnaire. Aussi, des relations ont été recherchées entre la vitesse de germination et des teneurs ou la mobilisation des sucres au niveau de l'axe embryonnaire. La vitesse de germination est liée à la teneur en

verbascose dans l'axe de la graine sèche (r^2 = 0,81), au temps de perte des 50% de RFO (r^2 = 0,77) et à la mobilisation des sucres solubles totaux autre que l'accumulation de saccharose (r^2 = 0,82) mais pas à l'accumulation en saccharose dans l'axe (r^2 = 0.02) (Fig. 88). Le saccharose stocké dans l'axe ne joue pas un rôle dans la germination au sens strict mais pourra être utilisé pour la croissance de la plantule.

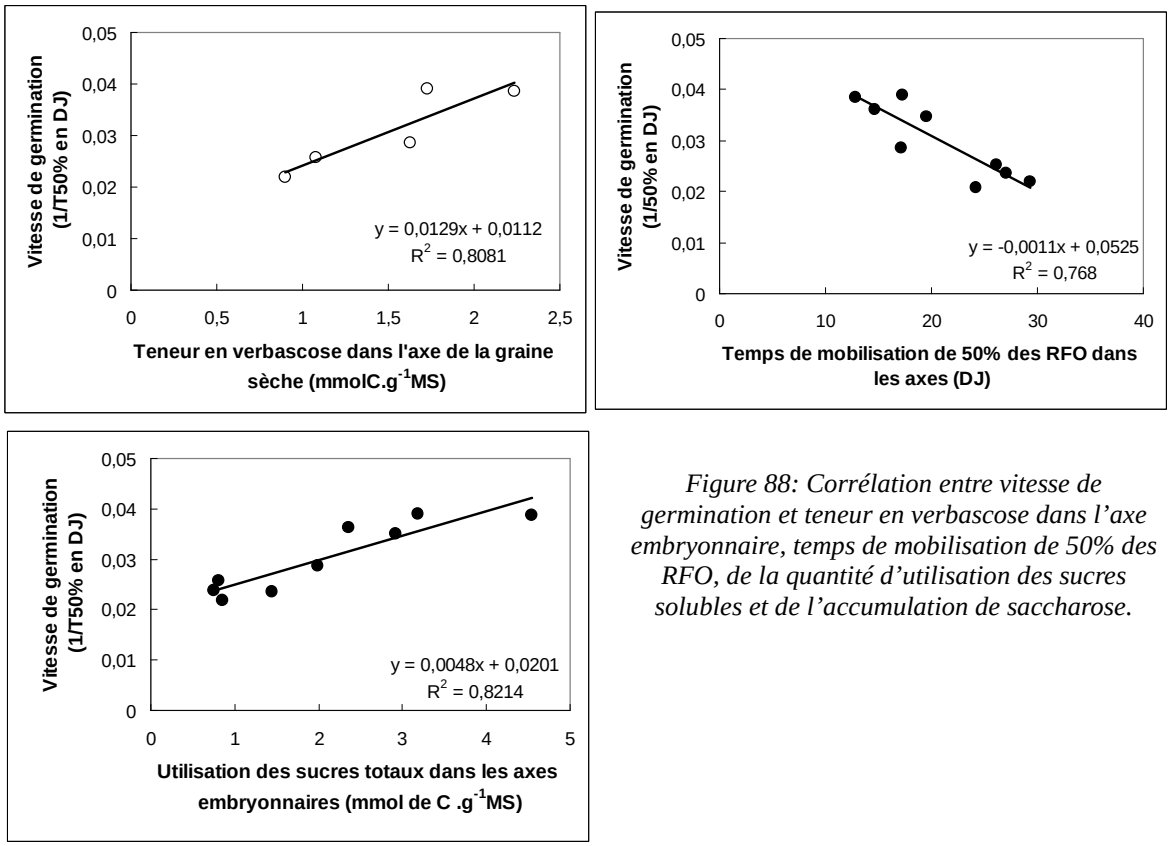


Figure 88: Corrélation entre vitesse de germination et teneur en verbascose dans l'axe embryonnaire, temps de mobilisation de 50% des RFO, de la quantité d'utilisation des sucres solubles et de l'accumulation de saccharose.

4.8 Discussion

Dès l'imbibition et la réhydratation des cellules, l'activité respiratoire, caractérisée par la consommation en oxygène, reprend très rapidement. Cette activité respiratoire est attribuée à l'activité des mitochondries (Benamar et al. 2003). Les valeurs mesurées sur les trois génotypes étudiés sont comprises entre 20 et 50 nmol $O_2.g^{-1}MS.min^{-1}$ pour les graines entières, et 600 $nmol.min^{-1}.g^{-1}MS$ pour les axes, valeurs en accord avec celles trouvées dans la bibliographie sur le pois (Raymond et al. 1985, Walters et al. 2001). Au cours de la germination, dans les axes et les fragments de graines, la capacité de la voie COX est très majoritaire (78-91% pour B et T ; 62-68% pour C) indiquant une forte implication de la graine et en particulier des axes dans la production d'ATP mais aussi une forte utilisation de cet ATP pour les nouvelles synthèses. La vitesse de croissance de la plante est fortement dépendante de la vitesse de respiration et de l'efficacité du couplage à la phosphorylation donc de l'activité de la voie COX (Hansen et al. 2002, Florez-Sarasa et al. 2007). Cependant, l'activité de l'AOX est souvent plus faible dans les tissus non photosynthétiques par rapport aux tissus chlorophylliens (Moore et al. 2002). Dans la

feuille, elle est proche de 50% chez le pois (Azcon-Bieto et al. 1983) et 40% chez Arabidopsis (Florez-Sarasa et al. 2007). Les lots qui germent rapidement ont une respiration totale élevée au niveau des fragments ou des graines entières. Cependant, nos résultats montrent que Champagne ne présente pas une capacité respiratoire plus élevée par la voie COX des fragments et des axes, par rapport aux deux autres génotypes. Par contre, la capacité de la voie AOX est plus importante chez Champagne expliquant la respiration totale plus importante.

La vitesse de germination plus rapide de Champagne serait-elle liée à la capacité plus élevée de la voie AOX de ce génotype? Le fait que l'enzyme oxydase alternative ne soit pas liée à la force protonique permet une adaptation flexible et rapide de l'efficacité respiratoire de la mitochondrie garantissant la stabilité de la charge énergétique et donc de la vitesse de croissance sous une certaine gamme de variation de l'environnement (Moore et al. 2002, Fung et al. 2004, Fiorani et al. 2005, Vanlerberghe et al. 2009). Lors de la reprise du métabolisme, outre une demande élevée en ATP, une demande métabolique forte en squelettes carbonés existe pour de nouvelles synthèses comme celle des acides aminés ou acides nucléiques. Lorsque la voie COX est saturée ou limitée par la disponibilité en adénylates, le fonctionnement de l'AOX permet la continuité des flux de carbone du cycle TCA (Moore et al. 2002, Clifton et al. 2006) évitant l'interruption des synthèses par manque de production de squelettes carbonés. De plus, l'utilisation des squelettes carbonés pour les biosynthèses consomme de l'ATP, ce qui permet le maintien de la respiration de la COX à un niveau élevé (Clifton et al. 2006). Un autre point important est que la chaine de transfert des électrons produit des ROS. La quantité de ROS formée peut être diminuée par le fonctionnement de la voie AOX (Purvis 1997, Moore et al. 2002, Robson et Vanlerberghe 2002, Fiorani et al. 2005, Wang et al. 2011) puisque l'AOX utilise les électrons et l'oxygène pour la formation d'eau. L'AOX aurait donc un effet tampon sur les fluctuations de la respiration pouvant perturber ou détruire la coordination métabolique et conduire à un stress oxydatif (Rasmusson et al. 2009). Ces auteurs soulignent l'importance de la présence d'une surcapacité de l'AOX pour la réalisation de ces changements rapides. Champagne, en ayant une plus grande capacité de respiration par la voie AOX, pourrait mieux réguler le transfert des électrons et aurait, au final, une production plus importante d'ATP et de squelettes carbonés.

La respiration des graines entières est le résultat de l'expression de la vitesse d'imbibition et de la capacité à consommer l'oxygène ; elle reflète mieux les processus se déroulant dans les graines au champ. Cependant, l'utilisation des fragments de graine est un bon outil pour étudier la respiration et apporte des informations différentes par rapport à la respiration des mitochondries isolées car les cellules sont entières et la respiration intègre bien les apports de carbohydrates. De nombreuses études ont utilisé la fragmentation de différents organes pour l'étude de la respiration : des cubes de betterave de 1-2 mm (Klotz et al. 2008), des disques foliaires d'orge, de blé, de pois (Kumar et al. 2007), des fragments de feuilles et des apex de racines (Hu et al. 2006), des segments de feuilles de 1mm d'épaisseur (Azcon-Bieto et al. 1983). Ces derniers ont montré que la respiration de segments de feuilles était similaire à celle mesurée dans les feuilles intactes et ces auteurs ont considéré que les effets blessures sur la respiration des tranches étaient négligeables. Toutefois, si l'accélération et l'homogénéisation de l'imbibition ne font pas de doute, il serait intéressant de vérifier qu'au cours de la reprise de l'activité des fragments, le déroulement des autres processus soit identique à celui de la graine entière.

La consommation de l'oxygène par la voie COX est couplée à l'activité phosphorylante permettant la production d'ATP grâce à l'ATPase. La production d'ATP est bien corrélée à la consommation en oxygène, que ce soit pour les fragments ou la graine entière, plus la consommation en oxygène est forte et plus la production en ATP est élevée. Cependant, aucune différence significative de production d'ATP en faveur de Champagne n'est observée dans la graine entière. Par contre, l'estimation de la quantité d'ATP formés au cours de la germination, montre une production plus importante pour Champagne. La teneur au moment de la mesure ne représente que 0,5% de l'ATP total formé. La vitesse du turnover de l'ATP est très rapide, la demi-vie de l'ATP dans les cellules végétale est de quelques secondes ; les concentrations cellulaires restent faibles alors que de grandes quantités d'ATP sont formées (Pradet et Raymond 1983, Hansen et al. 2002). Au niveau des axes embryonnaires, la teneur en ATP est très supérieure chez Champagne par rapport à Baccara en particulier à 12 h d'imbibition. Ces deux éléments vont dans le sens d'une meilleure capacité de production d'ATP chez Champagne par rapport à Baccara. La vitesse de germination est bien corrélée à la production d'ATP des axes après 12 h d'imbibition et non à une teneur en adénylate ou en AMP au début de la germination. Dans les axes embryonnaires, l'augmentation de l'ATP est plus précoce et plus importante chez Champagne par rapport à Baccara. Cette augmentation des teneurs en ATP débute aussi très tôt chez l'embryon de blé après 6 h d'imbibition (Grass et Burris 1995). Parallèlement, la charge énergétique en adénylate (AEC) est croissante entre 2 et 14 h d'imbibition et atteint une valeur de 0,75-0,8 pour les graines entières. Cette valeur identique à celle trouvée pour le pois cv. Kalife par Al-Ani, est moins élevée que pour d'autres graines plus proches de 0,90 comme le soja, la laitue, le tournesol, le maïs (Al-Ani et al. 1985).

Le fonctionnement de la chaine respiratoire et donc la production d'ATP peut être modulée pas l'apport en substrat provenant du cycle TCA, lui-même alimenté par la glycolyse. Une forte mobilisation des RFO dans la graine de pois pourrait permettre une meilleure alimentation de la voie COX et contribuer à une plus forte production d'énergie. Plus la teneur en RFO est faible et plus la teneur en ATP est forte pour Baccara et Champagne, cependant pour Champagne la corrélation est moins bonne. Au cours de la germination, les sucres solubles jouent un rôle prépondérant car l'amidon est dégradé plus tardivement (Dirk et al. 1999). La teneur en RFO varie en fonction des espèces. Les graines de pois présentent des teneurs importantes en RFO de l'ordre de 5,3-6,4% dans les cotylédons des trois génotypes étudiés, ces valeurs sont proches de celles obtenues sur graines entières de pois (cv Esla 5,2%: Vidal-Valverde et al. 2002 ; cv Little Marvel 6,3%: Kuo et al. 1988). De nombreuses études ont montré une diminution graduelle des RFO au cours de la germination et une disparition après 6-8 jours (Vidal-Valverde et al. 2002) ; ils constituent une source d'énergie importante rapidement mobilisable (Downie et Bewley al. 2000, Blöchl et al. 2007, Zalewski et al. 2010). Bien que le rôle des RFO soit beaucoup discuté en particulier chez le soja (Dierking et Bilyeu 2009), ils sont indispensables dans les 42 premières heures de la germination pour le pois (Blöchl et al. 2007). Cependant, une forte teneur en RFO dans la graine sèche, n'est pas un bon indicateur d'une germination rapide. Dans notre étude, la quantité de sucres solubles totaux ou de RFO dans la graine sèche n'explique pas la vitesse de germination plus rapide de Champagne.

La relation verbascose - vitesse de germination, trouvée dans notre étude, est intéressante pour certaines légumineuses qui possèdent du verbascose dans leur graine comme le pois, le haricot mungo, *vigna sinensis* ou la fève (Kuo et al. 1988) mais son utilisation sera vite limitée pour d'autres légumineuses (soja, haricot, arachide) ou d'autres

plantes comme le tournesol, les poacées et les chénopodiacées qui ne possèdent pas de verbascose (Kuo et al. 1988). De plus, comme chez Térèse et Baccara, le verbascose n'est pas toujours la forme prédominante des RFO chez le pois. La prédominance de certains RFO dépend de la variété: le verbascose est majoritaire chez Esla (Vidal-Valverde et al. 2002), la lignée RRRbRb (Lahuta et al. 2007), le pois ridé Progress (Monerri et al. 1986) alors que le stachyose est prédominant chez le pois potager cv Little Marvel (Kuo et al. 1988), le pois lisse cv Alaska (Monerri et al. 1986, Koster et al. 1988) mais aussi de la taille des graines (Tableau 1, Ekvall et al. 2006). Cependant aucune information n'est disponible sur la vitesse de germination car dans beaucoup d'articles, la teneur en RFO est mesurée en relation avec la qualité nutritionnelle des graines ou pour étudier l'acquisition de la tolérance à la dessiccation. Le verbascose n'est peut-être pas l'élément important mais il serait plutôt le reflet d'un déroulement correct de la dernière phase de développement. La teneur en raffinose trouvée dans les cotylédons des trois génotypes étudiés est faible (< à 1,3%) et elle est proche de celle trouvée dans la bibliographie (0,1-2%) (Monerri et al. 1986, Kuo et al. 1988, Corbineau et al. 2000, Vidal-Valverde et al. 2002, Ekvall et al. 2006, Lahuta et al. 2007). Pour la teneur en stachyose, les valeurs sont supérieures et comprises pour les trois génotypes étudiés entre 1,5 et 3%, valeurs supérieures à celle trouvée par Corbineau (2000) chez Baccara mais comparables à celle d'autres auteurs (Monerri et al. 1986, Kuo et al. 1988, Vidal-Valverde et al. 2002, Ekvall et al. 2006).

Nos résultats sur la forte mobilisation des RFO dans les axes et la faible évolution des sucres solubles dans les cotylédons indiquent une activité métabolique importante dans les axes dès les premières heures d'imbibition. Ils suggèrent aussi un rôle primordial de l'axe dans la mobilisation des sucres solubles au cours des premières phases de germination, alors que les cotylédons auraient un rôle plus tardif. Cette activité accrue des axes et la faible mobilisation des RFO dans les cotylédons ont été observées chez le pois (Lahuta et al. 2007) mais aussi chez le Soja (Kuo et al. 1988) alors que chez le haricot mungo (Kuo et al. 1988), le rôle des cotylédons est plus précoce avec une diminution de plus de 50% du verbascose et du stachyose dans les 24 premières heures de germination (Kuo et al. 1988). Le comportement de Champagne avec la dégradation pratiquement complète des RFO dans les axes au cours des 24 premières heures de germination ressemble au comportement du cultivar Alaska étudié par l'équipe de Koster (Koster et Leopold 1988). Par contre chez les pois de printemps, Baccara et Térèse, la mobilisation des RFO après 24 h d'imbibition n'est pas complète en particulier pour le stachyose. La variabilité de la vitesse de mobilisation des RFO se retrouve chez différents génotypes de pois (1 jour pour le cv. Alaska, Koster et Leopold 1988; 6 jours pour le cv. Esla Vidal-Valverde et al. 2002) et chez différentes légumineuses (4 jours pour le haricot et la lentille, Vidal-Valverde et al. 2002, 1 jour pour le soja (Koster et Leopold 1988) ou plus d'un jour pour le soja (Guimaraes et al. 2001; Modi et al. 2002). Cependant, ce temps est à relativiser par rapport au temps nécessaire à la sortie de la radicule. En effet, nous avons trouvé une corrélation entre la vitesse de germination et le temps nécessaire à la mobilisation de 50% de la teneur en RFO contenus dans la graine sèche.

Au cours de la germination la teneur en saccharose augmente dans les axes des trois génotypes étudiés, mais l'ampleur de l'accumulation de saccharose ne reflète pas l'importance de la dégradation des RFO en particulier chez Champagne. Cette dégradation des RFO ne se fait pas au profit de l'accumulation d'hexoses tel que le glucose ou le fructose qui restent présents en très faible quantité (< à 3 $mg.g^{-1}MS$) après 24 h d'imbibition. Ces valeurs obtenues dans notre étude sont en accord avec celles publiées sur

les graines entières de pois (Vidal-Valverde et al. 2002) ou sur les axes embryonnaires de pois (Monerri et al. 1986, Ekvall et al. 2006) sur les axes de haricot mungo (Kuo et al. 1988) ; ou sur les axes de soja (Kuo et al. 1988, Modi et al. 2002) mais inférieures à celles publiées sur les axes de pois et soja (d'environ 60 $mg.g^{-1}$MS après 24 h d'imbibition; Koster et Leopold 1988). Cependant, aucune indication sur le moment de la sortie de la radicule n'est donnée, mais le déroulement de la germination se fait à 25°C contre 20°C dans notre étude et celle de Monerri et al. (1986). Buckerdge et Dietrich (1996) suggèrent que la non accumulation de sucres réducteurs s'expliquerait par leur mobilisation rapide dans la croissance de l'embryon. Nos résultats montrent que l'accumulation de saccharose n'est pas un bon indicateur de la vitesse de germination du pois mais que la différence entre la mobilisation des sucres solubles totaux et l'accumulation de saccharose donne une meilleure indication de la vitesse de germination. La dégradation des RFO est plus rapide que l'utilisation du saccharose. L'accumulation du saccharose semblerait être un moyen de stocker de manière transitoire et simple des sucres pour le métabolisme de l'axe. Cette augmentation temporaire du saccharose a été soulignée par Bialecka et Kepczynski (2007). Après 18 h d'imbibition, une diminution de la teneur en saccharose est observée chez Baccara et Champagne récoltés au champ. Cette baisse de saccharose s'amorce aussi à 18 h chez le pois et le soja (Koster et Leopold 1988). Le rôle plus précoce des hexoses dans la germination du pois par rapport au saccharose a été montré : en présence de l'inhibiteur de la galactosidase responsable de la dégradation des RFO, l'apport exogène de galactose permet de lever l'inhibition de germination alors que l'ajout de saccharose ne compense que très partiellement cette inhibition (Blöchl et al. 2007). De même, la présence de saccharose endogène ne permet pas de palier l'inhibition de la galactosidase (Blöchl et al. 2007). Cependant, l'apport de galactose en l'absence de l'inhibiteur de la galactosidase ne stimule pas la vitesse de germination mais entraîne une augmentation de la teneur en saccharose (Blöchl et al. 2007). Outre la constitution d'une réserve de sucre, ce stockage sous forme de saccharose permettrait aussi de maintenir des teneurs en monosaccharides endogènes faibles au cours de la germination. En effet, ces monosaccharides pourraient avoir une action directe sur la germination ou une action sur les voies de signalisation (Dekkers et al. 2004). Ces auteurs ont montré que la germination d'*Arabidopsis thaliana* est fortement retardée par un apport exogène de glucose. Un autre élément allant dans le sens de l'hypothèse du stockage sous forme de saccharose pendant la germination est que l'accumulation de ces monosaccharides se fait qu'après la sortie de la radicule (Modi et al. 2002, Vidal-Valverde et al. 2002).

Le rôle des RFO dans la germination est controversé. La réduction de l'activité des enzymes de dégradation des RFO, certaines galactosidases, par l'emploi d'un inhibiteur (1-deoxygalactonojirimycine = FGJ) (pois Blöchl et al. 2007) ou par l'action d'un méthyl ester de l'acide jasmonique (lupin, Zalewski et al. 2010) retarde la germination. Chez le soja, Dierking conclut que les RFO ne sont pas la source énergétique essentielle au cours de la germination (Dierking et Bilyeu 2009). Cependant, l'utilisation du FGJ ne fait que retarder la germination de pois, au-delà de 66 h la germination a lieu, grâce à la mobilisation des autres réserves (Blöchl et al. 2007). Le rôle des RFO porterait plus sur la capacité à libérer des sucres capables d'être utilisés dans le métabolisme mais d'autres sucres pourraient jouer ce rôle. Cette similarité des rôles entre différents α-galactosides a été suggérée chez différentes espèces au cours de la maturation et du stockage des graines (Vicia, Lahuta et al. 2005, Sarrasin ; Horbowicz et al. 1998) et chez le soja d'autres galactosides, des cyclitol α-galactosides, sont présents (Obendorf et al. 2008). Au cours de la germination du soja, d'autres composés comme les cyclitols et en particulier le pinitol augmentent (Modi et al. 2002) alors que chez le pois le galactopinitol n'a pas été détecté

dans les graines (Frias et al. 2003), et les cyclitols, D-chiro-inositol et D-pinitol sont absents chez le pois (Lahuta et Dzik 2011).

Une vitesse de dessiccation rapide entraîne des potentialités différentes au niveau de la graine. Une des conséquences de cette vitesse de dessiccation rapide est l'augmentation de la respiration des axes de Champagne, des fragments et des graines entières des trois génotypes étudiés. L'intensité de la respiration pourrait être un indicateur de la qualité physiologique des graines. Des fragments de graines vieillies de pois présentent une vitesse de consommation de l'oxygène plus rapide que le témoin ou que des graines primées (Morohashi et Bewley 1980, Benamar et al. 2003). Nos résultats apportent plus d'éléments en faveur d'une demande énergétique plus importante, entrainant une augmentation de la consommation d'oxygène, que d'un dysfonctionnement des mitochondries. Les teneurs en ATP au début de l'imbibition des graines ayant subi une vitesse de dessiccation rapide sont plus importantes par rapport aux graines ayant séchées au champ. L'augmentation de la respiration est bien corrélée à une teneur en ATP plus élevée. De plus, le contrôle respiratoire montre que les mitochondries fonctionnent correctement et que l'intégrité des membranes n'est pas affectée après 22 h d'imbibition, moment d'isolement des mitochondries. Cette information à 22 h ne reflète pas forcément l'état et le fonctionnement des mitochondries en début d'imbibition. Un isolement plus précoce donnerait plus d'informations, mais les méthodes d'extraction actuelles ne permettent pas d'isoler correctement les mitochondries à partir de matériel peu hydraté (D. Macherel, communication personnelle). Cependant, la respiration des fragments des génotypes étudiés, en présence de FCCP, montre bien que le gradient de protons est limitant pour la circulation des électrons dans la chaine respiratoire ce qui indique une absence de fuites d'électrons et une capacité maximale non atteinte. Cette demande énergétique accrue s'expliquerait par la mise en place de mécanismes de réparation. La dessiccation rapide entraine des dégâts membranaires se traduisant par une perte de l'intégrité membranaire des lots étudiés. Les composants cellulaires comme les organites ou l'ADN de la graine subissent des stress considérables au cours du séchage puis de la réhydratation (Nonogaki et al. 2010), au cours du stockage (Rajjou et Debeaujon 2008). Au cours de l'imbibition, la synthèse d'enzymes et de composés contribue en priorité aux réparations des dégâts engendrés (Nonogaki et al. 2010). De nombreuses études sur le priming laissent supposer que l'activité respiratoire est un élément indispensable dans le processus de réparation (McDonald 2000).

Nos résultats suggèrent que des conditions comme des vitesses de dessiccation élevées entrainent un stress modéré et la mise en place de mécanismes de réparation permet d'obtenir des facultés germinatives élevées malgré les dégâts observés. Cependant si la vitesse de dessiccation est très rapide (Si), la stimulation de la respiration peut être moins importante par rapport à une vitesse de dessiccation plus modérée des lots Na. Lors de l'application de conditions très stressantes comme la détérioration contrôlée, les dégâts engendrés sont très importants, les mécanismes de réparation ne se mettent pas en place et la stimulation de la respiration n'est pas visible, au contraire la respiration est plus faible par rapport au témoin. De même, la faculté germinative de ces lots chute. Chez le soja, après détérioration des graines, de faibles consommations d'oxygène ont été observées et attribuées à une perte de l'intégrité de la voie COX (Amable et Obendorf 1986, Ferguson et al. 1990). Les résultats obtenus par Benamar et al. (2003) montrent une respiration relativement faible pour les graines primées où les réparations ont déjà eu lieu et une respiration des graines vieillies, supérieure au témoin. Ces graines vieillies semblent se comporter comme les lots de graines ayant subi une vitesse de dessiccation rapide et non

comme les lots ayant subi une détérioration contrôlée. La différence entre les deux traitements, vieillissement et détérioration contrôlée, est que le vieillissement accéléré se fait avec une humidité relative de 75% alors que dans la détérioration contrôlée la teneur en eau des graines est maintenue à 16%. La présence d'une forte hygrométrie au cours du vieillissement pourrait permettre aux graines vieillies d'amorcer certains mécanismes de réparation se manifestant par une forte respiration mais insuffisants pour obtenir un pourcentage de germination élevé.

Une vitesse de dessiccation rapide modifie la composition initiale des graines en augmentant les teneurs en adénylates totaux. Cependant comme la teneur initiale n'est pas corrélée à la vitesse de germination, l'impact de ce changement est faible. Les résultats sur l'évolution des ATP confirment que les vitesses de dessiccation n'induisent pas une plus faible teneur en ATP. La seconde modification est l'abaissement des teneurs en verbascose dans les axes et les cotylédons de Champagne en limitant sa synthèse. Cependant ce séchage rapide ne modifie pas assez cette teneur initiale en verbascose ou en RFO totaux pour observer une modification significative de la vitesse de germination. De même, malgré des retards dans la mobilisation des RFO ou de l'utilisation du saccharose de l'axe de Champagne observés par rapport à un séchage au champ, cette utilisation reste plus élevée que celles des pois de printemps ayant eu une dessiccation au champ.

La meilleure tolérance au froid de Champagne au stade jeune plante pourrait se retrouver dans les tout premiers stades de développement, au moment de la germination. La respiration est affectée par les basses températures et diminue fortement entre 5-15°C. Cependant Champagne à une respiration totale plus importante que celle des pois de printemps. Contrairement à ce qui était attendu, cette augmentation de la consommation en oxygène ne provient pas d'un meilleur fonctionnement de la voie phosphorylante, la voie COX mais d'une augmentation de la capacité de l'AOX. Avec sa plus grande capacité de respiration par la voie AOX, Champagne serait avantagé pour germer aux basses températures. Des travaux sur des plantes transformées mettent en évidence que l'altération de l'AOX n'a pas de conséquences dramatiques lorsque les conditions de cultures sont optimales car la respiration par la voie AOX est basse (Lei et al. 2010) mais affecte fortement la plante en conditions de stress (Fiorani et al. 2005, Amirsadeghi et al. 2007, Van Aken et al. 2009, Vanlerberghe et al. 2009). Une augmentation de la capacité de la voie AOX pour différentes espèces a été observée en conditions difficiles comme en altitude, avec une stimulation de 70% chez le pois (Kumar et al. 2007) ou en conditions de basses températures (Gonzalez-Meler et al. 1999, Mizuno et al. 2008, Lei et al. 2010). Dans la bibliographie plusieurs études ont montré une augmentation de la voie AOX (Vanlerberghe et McIntosh 1992, Gonzalez-Meler et al. 1999, Fiorani et al. 2005, Hu et al. 2006, Mizuno et al. 2008, Lei et al. 2010), en partie due à une augmentation de la teneur en protéine AOX après acclimatation au froid, cependant cette augmentation de la protéine n'a pas été observée chez le soja (Gonzalez-Meler et al. 1999). Dans notre étude, l'application du froid sur les fragments de graines est comparativement très court, ce temps correspond soit au temps de stabilisation de la consommation d'oxygène à 5°C dans la cellule de mesure ou soit à une imbibition à 5°C pendant 40 min et rend improbable le processus de nouvelle synthèse d'AOX. Les diagrammes d'Arrhénius obtenus confirment la plus grande capacité de respiration de Champagne aux basses températures avec une rupture de pente à 15°C, indiquant une différence dans l'activité métabolique. Cette rupture de pente se situe à 12,5°C pour les axes embryonnaires de soja après 48 h d'imbibition (Duke et al. 1977) et à 25°C pour les feuilles de haricot mungo (Gonzalez-Meler et al. 1999). La rupture de pente que nous avons observée est beaucoup moins brutale que celle

relevée chez le soja qui est une plante tropicale donc très sensible aux basses températures. Lorsque l'imbibition se fait aux basses températures, nos résultats montrent une réduction de la respiration totale à 25°C et 5°C. Ces basses températures au cours de l'imbibition retarderaient le déroulement de la synthèse et/ou activité de protéines impliquées dans la réparation des structures ou dans la mobilisation des sucres. L'application d'une vitesse de dessiccation rapide entraine un abaissement de la capacité de la voie AOX dans les axes des trois génotypes donc les graines sont moins bien armées pour faire face à des conditions d'imbibition stressantes comme à basse température. Une imbibition des fragments aux basses températures entraine une diminution de la capacité de respiration se déroulant à des températures favorables (25°C). Les graines détériorées pendant le stockage deviennent plus sensibles aux stress pendant la germination et peuvent perdre leur capacité à germer (Rajjou et Debeaujon 2008). Les basses températures retardent l'augmentation des teneurs en ATP et la mobilisation des sucres, en agissant sur le ralentissement des activités enzymatiques. En effet, si l'expression du temps d'imbibition se fait en temps thermique, les teneurs en ATP ne sont pas plus basses à 5°C et la charge énergétique en adénylates ainsi que la mobilisation des sucres évolue de la même manière. La production d'ATP aux basses températures a été peu étudiée. Cette forte teneur en ATP peut refléter une sensibilité plus forte au froid pour l'utilisation d'ATP par rapport à la production. Cependant, une longue durée de conservation de litchi au froid (30 jours) entraine une baisse des teneurs en ATP et ADP et une augmentation des AMP dans les fruits (Liu et al. 2011). Ceci va plutôt dans le sens d'une utilisation plus forte d'ATP par rapport à sa production. La limitation de l'activité métabolique par abaissement de la température n'induit pas de changement de la valeur AEC qui reste élevée, amenant Pradet et Raymond (1983) à conclure à une réduction équilibrée des voies de synthèse et d'utilisation de l'ATP.

Les graines comme d'autres organismes anhydrobiotes ont la capacité de se déshydrater et de se réhydrater après un temps de conservation plus ou moins long. La régulation du métabolisme énergétique au cours de la dessiccation réhydratation est mal connue. Dans les graines sèches, la charge énergétique est basse, elle est de l'ordre de 0,12 - 0,35 chez le pois pouvant varier en fonction du génotype et de la teneur en eau. Ces faibles valeurs se retrouvent chez d'autres espèces 0,1 pour les axes de blé (Grass et Burris 1995), 0,14 - 0,24 pour le tournesol (Corbineau et al. 2002, Kibinza et al. 2006,). Cette faible charge énergétique est en lien avec des teneurs basses en ATP, en ADP et des teneurs élevées en AMP. La graine ne stocke pas d'énergie sous forme d'ATP mais accumule de l'AMP. Ce constat de l'accumulation de l'AMP est général, nous l'avons trouvé chez tous les génotypes de pois et chez les différentes espèces testées et même chez les cystes anhydrobiotes d'une micro-crevette, *Artemia*. Les exemples trouvés dans la bibliographie confirment cette richesse en AMP dans les graines ou organismes déshydratés, blé (Grass et Burris 1995), tournesol (Kibinza et al. 2006) crevette marine (Glasheen et Hand 1988). Cette accumulation d'AMP dans la graine en cours de la déshydratation, résulterait de l'arrêt de la production d'ATP par la phosphorylation oxydative, de la continuité de l'activité du métabolisme même s'il est réduit et de l'activité de l'AK. *In vivo*, de l'AK a été localisée à la surface externe de la membrane interne des mitochondries du pois (Zancani et al. 2001). En regardant l'évolution des teneurs en adénylates dans différentes publications, cette évolution particulière des adénylates s'observe avec des conditions autres que conduisant à la déshydratation des graines mais toujours avec des conditions stressantes, limitant la production d'ATP. Cette évolution particulière des adénylates se retrouve lors d'un transfert des extrémités de racines de maïs excisées, de l'air vers des

conditions d'anoxie (Saglio et al. 1980) ou lors de la conservation de fruit de litchi pendant une longue période au froid (Liu et al. 2011) ou après 72 h d'incubation de graines de tournesols à 45°C (Corbineau et al. 2002). Le déplacement de l'équilibre de l'AK par différentes conditions, a été déjà souligné par Zancani et al. (2001) avec au cours des biosynthèses ou de transport, les niveaux d'ADP augmentent, par contre, avec des conditions d'anoxie l'utilisation de l'ADP est forte. Cependant, ces chercheurs pensaient que cet équilibre pouvait être influencé par l'activité de l'apyrase, enzyme localisé sur la surface de la membrane externe des mitochondries et permettant l'hydrolyse de l'ATP en AMP. Nos résultats montrent que cette enzyme n'est pas nécessaire pour provoquer le déplacement de l'équilibre de l'AK en faveur de la production d'AMP lorsqu'une certaine activité métabolique se maintient.

Au moment de la réhydratation, cet AMP accumulé en présence de traces d'ATP va permettre d'amorcer par l'AK la production d'ADP, substrat utilisé par l'ATPase de la chaine respiratoire permettant la phosphorylation oxydative, lorsque l'hydratation sera suffisante. La stimulation de la consommation de l'oxygène par les mitochondries de pois de Baccara après l'ajout d'AMP, le déplacement de l'équilibre de l'AK vers la production d'ADP dans un système mimétique, et la simulation théorique de la reconstitution du pool d'adénylates sont des éléments en faveur de ce modèle de régulation du métabolisme énergétique en lien avec l'anhydrobiose. Cette augmentation de la teneur en ATP est aussi observée lors du retour à des conditions plus favorables de température 25°C pour le litchi (Liu et al. 2011) ou pour les graines de tournesol (Corbineau et al. 2002). Lors des mesures d'adénylates des axes embryonnaires de pois, nous avons trouvé des valeurs plus élevés en ADP par rapport au teneur en AMP qui serait dues à des teneurs en eau plus élevées. En effet, à des teneurs en eau très basses (4%MF), les teneurs en AMP des axes de tournesols sont les plus élevées; ensuite avec l'élévation de la teneur en eau (12%MF) les teneurs en ADP tendent à dépasser les teneurs en AMP (Kibinza et al. 2006).

5. Discussion générale

L’objectif de ce travail était d'identifier et d'explorer les mécanismes des évènements précoces permettant une vitesse de germination rapide des pois protéagineux en conditions optimales ou en conditions sub-optimales telles que l'exposition au froid. Les basses températures peuvent se rencontrer au moment des semis qui sont susceptibles d’être de plus en plus précoces afin d’éviter les stress thermiques et hydriques de fin de cycle. Les semis peuvent ainsi intervenir plus tôt pour les pois de printemps, et à l'automne pour les pois d'hiver. Les conditions régnant lors de la formation des graines influent sur leur qualité physiologique. En particulier, une dessiccation rapide de la graine à la fin de son développement pourrait modifier ses potentialités et compromettre le bon déroulement de la germination ou l’aptitude à la conservation.

Le premier élément associé à une germination rapide est en lien avec la vitesse d’imbibition des graines (Fig. 89). Dès la réhydratation des cellules, l’activité mitochondriale permet une activité respiratoire élevée. Les graines entières de Champagne présentent une respiration plus importante que les graines des pois de printemps. Cependant, cette différence, entre les génotypes, n’est plus visible avec les axes ou les fragments qui ont une même teneur en eau. La respiration plus forte, observée sur les graines entières, est à relier aux vitesses d’imbibition plus rapide de Champagne. Pour une même teneur en eau, les capacités de respiration de Baccara, Térèse et Champagne sont proches : de 100-120 $nmol.min^{-1}.g^{-1}MS$ pour les fragments de graines et d’environ 600 $nmol.min^{-1}.g^{-1}MS$ pour les axes. Les graines ayant subi une vitesse de dessiccation élevée, présentent une imbibition plus rapide au début de la germination qui entraine une augmentation de la respiration. Cependant une vitesse de dessiccation rapide peut induire des ruptures de membranes mais le pois est une espèce qui résiste bien aux dégâts d’imbibition par rapport à d’autres légumineuses comme le haricot et le soja (Duke et Kakefuda 1981). Par contre d’autres traitements, comme les basses températures, retardent l’imbibition mais la respiration est plus élevée chez les fragments de Champagne que ceux des pois de printemps. Cet effet imbibition se retrouve au niveau des axes, lorsque elle se déroule à 20°C, au sein de la graine, les axes de Champagne s’imbibent plus vite au début de l’imbibition (6-12 h) par rapport aux pois de printemps, se traduisant par une plus forte teneur en ATP.

La deuxième étape est la réactivation de la phosphorylation oxydative au niveau de la chaine respiratoire (Fig. 89). Attuci et al. (1991) indiquent que le principal mécanisme de régénération de l’ATP dans les graines, après imbibition, est la phosphorylation oxydative. L’AK semble jouer un rôle important en convertissant l'AMP stocké dans les graines en ADP pour réamorcer la production d’ATP par l’ATPase de la voie COX. La quantité d’AMP ou celle des adénylates totaux de la graine sèche ne sont cependant pas reliées à la vitesse de germination. L’activité de l’AK est indispensable à la reprise de la respiration mais ne paraît pas être un point de régulation fort pour moduler la vitesse de germination. Nos résultats montrent que la voie COX est majoritaire et puisqu’elle est phosphorylante, elle contribue effectivement à l'approvisionnement énergétique des graines. En effet, plus la consommation en oxygène est élevée et plus la teneur en ATP est forte. En intégrant les valeurs de vitesse de consommation d'oxygène mesurées à différents temps, il est possible d'estimer la quantité totale d’oxygène utilisé pour une période donnée. Pour les graines entières cela nous a permis de calculer la quantité totale d’ATP formée pour un temps déterminé au cours de l’imbibition. Champagne se distingue des génotypes de printemps par sa forte production et utilisation d'ATP, surtout après 12 h d’imbibition. En effet, Pradet et Raymond (1983) soulignent qu’avec une faible et constante quantité d’ATP, la cellule est

capable de satisfaire sa demande énergétique. La teneur en ATP n'est peut-être pas le meilleur critère pour estimer la vitesse de germination mais une corrélation entre la teneur en ATP des axes à 12 h d'imbibition et la vitesse de germination a été obtenue. Cependant, Meyer et al. (2009) soulignent qu'une production efficace d'ATP par la respiration est cruciale pour une germination rapide. Par ailleurs, un suivi fin de la production d'ATP des graines de Baccara a été réalisé au cours de la germination. Une forte augmentation de la teneur en ATP a lieu entre 6 h et 14 h d'imbibition. Cette relation ATP-vitesse de germination pourrait être affinée en utilisant la vitesse de production d'ATP, donnée par la pente entre 6 et 14 h correspondant au début du plateau. Il serait intéressant de vérifier pour les 13 autres génotypes si la vitesse de germination rapide est liée au temps de latence, à la vitesse de production d'ATP et au temps pour atteindre le plateau.

La troisième étape de régulation de la vitesse de germination serait la régulation de la phosphorylation oxydative par la demande en ATP (Fig. 89). En effet, la voie COX est régulée par le gradient de protons qui est relié au rapport ATP/ADP (Noctor et al. 2007). Le système de contrôle le plus fort de la respiration se situe au sein même de la chaine de transport des électrons au niveau de la mitochondrie (Igamberdiev et Kleczkowski 2006). Avec l'imbibition, le métabolisme devient actif et la demande en énergie est forte. L'utilisation de l'ATP dans les graines entières est plus élevée chez Champagne par rapport aux pois de printemps Baccara et Térèse. De même, des vitesses de dessiccation élevées entrainent une augmentation de la respiration des fragments pour une même teneur en eau, donc cette respiration est indépendante de la vitesse d'imbibition. Cependant, cela ne se traduit pas par une accélération de la germination car cette augmentation de la respiration serait provoquée par une forte utilisation d'ATP pour les réparations des différentes structures comme les systèmes membranaires touchés par les vitesses de dessiccation rapides et mis en évidence dans les mesures de conductivité. Cette augmentation de la respiration ne semble pas être le reflet d'un mauvais fonctionnement des mitochondries et elle se traduit par une teneur en ATP plus forte au début de l'imbibition. En cas de stress important comme induit par la détérioration contrôlée, cette augmentation de la respiration n'est pas visible et les réparations ne se feraient pas, conduisant à une diminution du nombre de plantules normales. Cette altération de la germination est observée au cours de la détérioration contrôlée du tournesol et elle est d'autant plus forte que la teneur en eau de la graine est élevée (Kibinza et al. 2006). De plus, la comparaison des graines de Térèse ayant subi une dessiccation rapide en conditions contrôlées par rapport à celles récoltées au champ montre une utilisation pratiquement similaire de l'ATP et une perte d'environ 40% de plantules normales. Ces résultats suggèrent que les systèmes de réparation sont moins efficaces pour le lot de graines de Térèse ayant subi des vitesses de dessiccation rapides. Par ailleurs, en intégrant les lots des différents génotypes, des lots ayant subi des vitesses de dessiccation différentes et des germinations aux basses températures une corrélation a été trouvée entre la consommation en oxygène des fragments et la vitesse de germination des lots. Cependant, cette corrélation peut être favorisée par l'impact fort des basses températures sur la respiration mais aussi par l'impact sur d'autres réactions enzymatiques. L'autre relation trouvée entre respiration et vitesse de germination concerne les graines entières, mais elle intègre les vitesses d'imbibition qui affectent aussi la respiration. La respiration et la production d'ATP reflètent plus une activité cellulaire mais ne sont pas des indicateurs fins d'une vitesse de germination. Ceci est en accord avec les conclusions de différents auteurs sur le tournesol montrant que l'AEC et les niveaux d'ATP n'étaient pas de bons indicateurs de la capacité à germer (Corbineau et al. 2002, Kibinza et al. 2006).

Un autre élément de régulation de la vitesse de germination est la disponibilité en sucres solubles pour alimenter la respiration et fournir des squelettes carbonés pour les biosynthèses en lien avec la germination (Fig. 89). Dans notre étude, il est difficile de distinguer la part des sucres solubles utilisée par la chaine respiratoire de celle utilisée pour les biosynthèses sur toute la durée de la germination. Pour Klotz et al. (2008), le statut énergétique de la cellule régulerait la respiration par le contrôle du flux de carbone au niveau de la glycolyse et de la vitesse d'entrée du carbone dans le cycle TCA. Au niveau de la respiration, l'autre différence entre les trois génotypes étudiés est une capacité respiratoire de la voie AOX toujours plus importante pour Champagne. La respiration aux basses températures et les diagrammes d'Arrhénius montrent que Champagne est capable de maintenir une respiration totale plus élevée aux basses températures par rapport aux pois de printemps. Cette augmentation de la respiration est en lien avec une augmentation de la capacité de la voie AOX. Cette voie AOX pourrait jouer un rôle important dans la stabilité du système avec le maintien d'une production élevée d'ATP au niveau de la voie COX et le maintien des synthèses grâce à la disponibilité des squelettes carbonées (Moore et al. 2002, Fung et al. 2004, Fiorani et al. 2005, Vanlerberghe et al. 2009). De plus, l'augmentation de l'activité AOX est corrélée avec l'augmentation des niveaux de pyruvate intracellulaire (Dinakar et al. 2010). La mobilisation des sucres solubles se fait principalement dans les axes embryonnaires pour la germination. De façon plus globale, l'utilisation des sucres est très nettement supérieure chez Champagne par rapport aux génotypes de printemps. La vitesse de germination des graines est corrélée à l'utilisation des sucres solubles totaux des axes embryonnaires. Les sucres solubles sont indispensables pour une bonne germination, pour le pois ce sont des RFO. Pour le soja, les RFO ne sont pas indispensables à la germination (Dierking et Bilyeu 2009) cependant, d'autres sucres solubles pourraient être utilisés comme des α-galactosides, autre que les RFO chez le soja (Obendorf et al. 2008) ou le planteose, autre galactosyl-saccharose, chez la tomate et l'impatiens (Gurusinghe et Bradford 2001). Lorsque la demande énergétique est forte, le fait d'avoir la forme prédominante des RFO sous forme de verbascose pourrait être un avantage car la dégradation du verbascose conduirait à la libération de trois galactoses pour un saccharose. Le galactose pouvant être épimérisé en glucose et être utilisé dans le métabolisme (Buckeridge et Dietrich 1996), limitant l'intervention de l'invertase pour l'hydrolyse du saccharose. En effet, l'accumulation de saccharose n'est pas un bon indicateur de la vitesse de germination et reflèterait plus la régulation des monosaccharides. La mobilisation du saccharose se fait plus tardivement au niveau de la germination, un peu avant la sortie de la radicule. Une vitesse de dessiccation induit des modifications dans la graine sèche mais ne modifie pas les teneurs en RFO totaux, ces modifications ne permettent pas de mettre en évidence des différences de germination.

Un autre élément à prendre en compte est l'aptitude à la conservation (Fig. 89). Des modifications de la graine après une vitesse de dessiccation rapide n'ont que peu d'impacts lorsque les graines sont mises à germer rapidement, mais peuvent avoir de graves conséquences après un stockage. Cette perte de capacité à germer après stockage a été mise en évidence avec les graines vertes de soja (Pizzolante de Padua et al. 2007). Après un certain temps, la graine semble ne plus avoir la capacité d'augmenter sa respiration pour fournir l'énergie nécessaire pour les réparations. Après trois jours de détérioration contrôlée à 40°C, aucune stimulation de la respiration n'a été observée. La détérioration contrôlée engendrerait un stress trop fort et les graines se trouveraient dans la phase d'épuisement proposée par Kranner et al. (2010). Les teneurs en adénylates sont plus fortes après l'application d'une vitesse de dessiccation rapide ou après une pré-germination et séchage priming mais ne semblent pas être des éléments permettant d'expliquer une durée de vie

plus courte. Par contre l'augmentation des pools d'adénylates lors du traitement de pré-germination et séchage pourrait contribuer à la diminution du temps de latence et à l'augmentation de la vitesse de germination des graines qui caractérise de tels traitements de "priming" au niveau industriel.

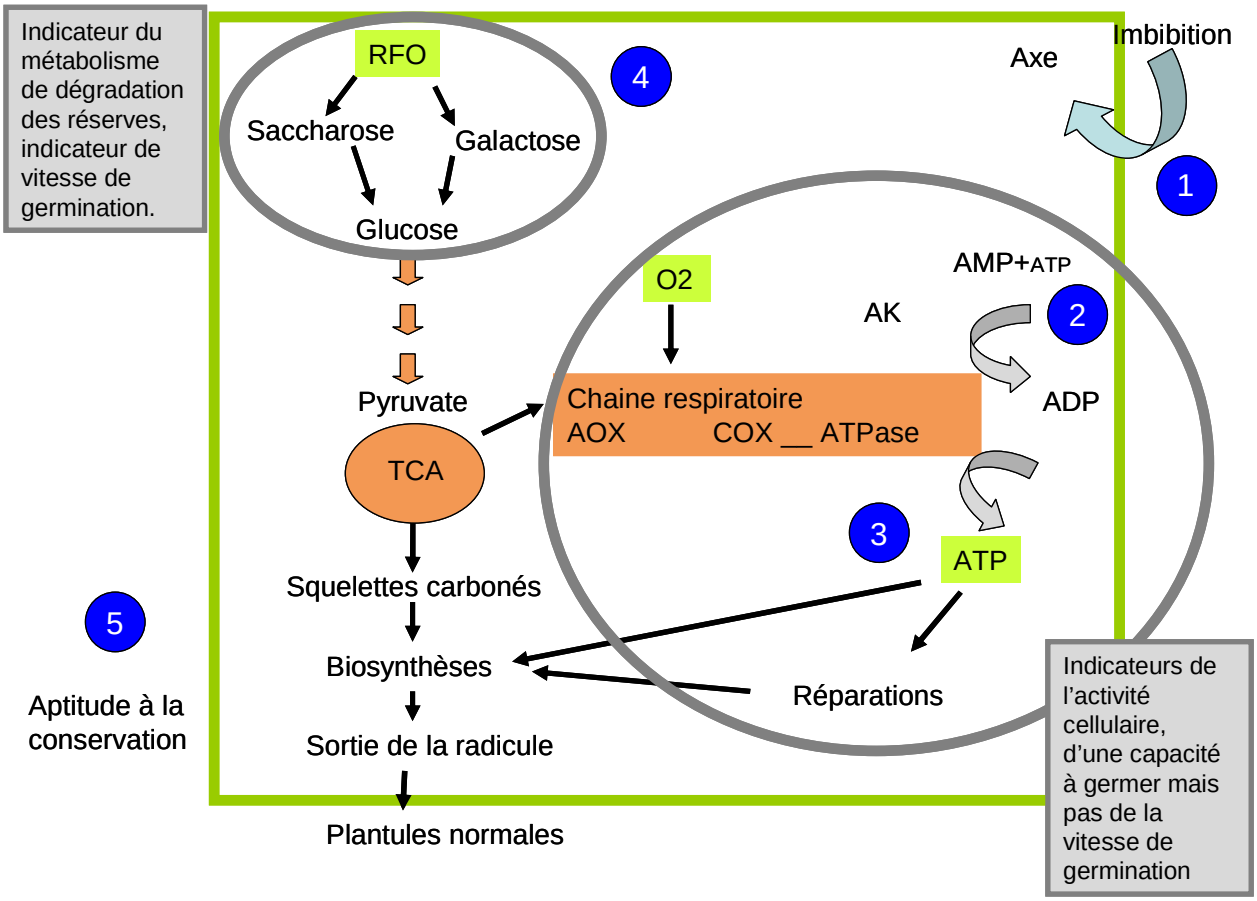


Figure 89 : Schéma global indiquant les points de régulation en lien avec la vitesse de germination.

Le froid n'empêche pas la production d'ATP mais ralentit la mobilisation du stachyose dans les axes embryonnaire de Champagne. Les vitesses de dessiccation rapides entrainent des répartitions différentes au sein des RFO et diminuent l'utilisation des sucres. Toutefois, les deux types de traitement affectent peu la germination exprimée en temps thermique (DJ). Cependant, le cumul d'une vitesse de dessiccation rapide lors de la formation des graines et la germination aux basses températures augmentent les risques d'une germination plus difficile surtout si des graines doivent être stockées. Nous avons montré qu'environ 10% des graines des pois de printemps n'étaient plus capable de germer lors du cumul de ces deux traitements.

Conclusion et perspectives

Notre étude a permis d'une part de comparer le comportement de différents génotypes de pois protéagineux en fonction de la réponse de la germination à différentes températures. D'autre part, nous avons dégagé des étapes importantes au tout début de la germination, en particulier sur la reprise du métabolisme énergétique et nous avons mesuré l'impact des vitesses de dessiccation sur les potentialités de la graine et l'impact des basses températures sur la germination.

Champagne présente une germination plus rapide que Baccara et Térèse, à l'optimum ou aux basses températures. Cependant cette rapidité ne se retrouve pas au cours de la phase d'élongation conduisant à la levée (Raveneau et al. 2011). Est-ce une adaptation de Champagne pour mieux résister au froid? En effet, les pois protéagineux sont plus tolérants au froid, au stade végétatif, lorsque les plantes ne sont pas très développées et qu'elles sont au stade rosette (Lejeune-Hénaut et al. 2005, Dumont et al. 2011). A l'optimum, cette rapidité de germination se retrouve pour la population de génotypes de pois d'hiver testées. Aux basses températures, cette séparation des deux populations n'est pas significative, cependant, les graines des différents génotypes testés n'ont pas été produites dans les mêmes conditions. Une production de graines dans une même région, avec une récolte manuelle, sur un étage particulier de la plante, devrait être envisagée pour limiter les facteurs de variation comme pour les trois génotypes étudiés.

La vitesse de germination plus rapide de Champagne s'explique par une imbibition plus rapide et par une plus forte utilisation des ATP et des sucres solubles. L'axe embryonnaire est très fortement impliqué dans la germination. Cette forte activité se retrouve au niveau de la respiration, de la production d'ATP et de la mobilisation des sucres solubles. La vitesse de germination est corrélée à l'utilisation des sucres solubles de l'axe embryonnaire et à la formation d'ATP après 12 h d'imbibition. Ces deux facteurs semblent être des indicateurs de la reprise du métabolisme, et l'utilisation des sucres semble mieux refléter la reprise des biosynthèses et donc la vitesse de germination. Il serait intéressant de confirmer ces relations en intégrant les valeurs d'autres génotypes de pois. De même, la cinétique fine de production d'ATP pour Baccara montre une forte augmentation de la teneur en ATP entre 6 et 14 h d'imbibition, quand est-il pour Champagne? Retrouve-t-on les mêmes cinétiques chez les génotypes qui ont une vitesse de germination rapide? Contrairement aux axes, la mobilisation des sucres solubles est faible dans les cotylédons, alors que la respiration augmente après l'application d'une vitesse de dessiccation rapide en fin de développement de la graine. Au cours de la germination, la mise en place des réparations se ferait dans les cotylédons, expliquant l'accroissement de la respiration après un stress, mais la forte mobilisation des sucres solubles n'a lieu qu'après la sortie de la radicule. Quel est le rôle des RFO stockés dans les cotylédons par rapport à celui de l'amidon, dans la croissance de la plantule? La réalisation de l'étude sur un temps plus long, permettra d'appréhender le transfert des carbohydrates des cotylédons vers la plantule et leur impact sur la croissance.

Le génotype d'hiver, Champagne se démarque par une utilisation plus forte de sucres et d'ATP. Les mesures sur les fragments de graines nous ont permis de nous affranchir des différences d'imbibition entre les génotypes et d'avoir plus rapidement des données.

Cependant, la vitesse de respiration ou des teneurs ATP sont des mesures ponctuelles, qui ne traduisent que faiblement ce qui se passe au niveau de la graine pendant la période d'imbibition. La mesure de la respiration de la graine entière permet d'avoir la quantité d'oxygène consommé sur un pas de temps choisi. Cette mesure devra être adaptée, pour pouvoir mesurer cette consommation sur toute la période avant la sortie de la radicule et non seulement sur une période de 12 h d'imbibition. L'estimation de la quantité d'ATP produite à partir de la consommation en oxygène devra être affinée pour être plus précise. Si cette estimation est bien reliée à la production d'ATP, cela représenterait une mesure moins coûteuse et plus informative sur l'activité de la graine, que des dosages d'ATP. La vérification de l'existence d'une relation avec la vitesse de germination permettrait d'avoir un indicateur de la vitesse de germination. De plus, une mesure des flux des ATP serait plus intéressante que des mesures ponctuelles et complèterait l'approche de la reprise du métabolisme énergétique. Par ailleurs, l'étude des mitochondries de Champagne révèlerait peut-être d'autres différences avec le pois de printemps Baccara, en particulier aux basses températures. Cependant, malgré toutes ces améliorations dans l'approche du fonctionnement de la chaine respiratoire, le point le plus crucial et le plus délicat est la distinction entre la part du métabolisme impliquée dans les réparations et la part impliquée dans les biosynthèses. C'est cette dernière qui semble liée à la vitesse de germination. L'utilisation d'inhibiteur de la galactosidase utilisé chez le lupin réduit l'hydrolyse des RFO et retarde la germination (Zalewski et al. 2010) pourrait peut-être donner quelques éléments de réponse.

Une autre grande différence entre Champagne et les pois de printemps Baccara et Térèse est une capacité de la voie AOX supérieure chez le génotype Champagne. Cette caractéristique est-elle liée à sa grande vitesse de germination à des températures optimales ou inférieures à cet optimum? L'étude de cette capacité AOX serait intéressante à réaliser sur les différents génotypes de pois. De même, l'étude de mutants, ou de plantes modifiées au niveau de ce système enzymatique permettrait de mieux comprendre son implication. Par ailleurs, la vérification de l'hypothèse d'une production plus faible de ROS chez Champagne serait à faire, en particulier aux basses températures.

Les vitesses de dessiccation n'entrainent pas une perte de capacité de germination, ni de grands bouleversements dans la composition ou la mobilisation des sucres solubles, mais induisent une perte de l'intégrité des membranes et une stimulation de la respiration au moment de la germination. L'explication la plus plausible, en fonction des différents résultats obtenus sur les mitochondries, ainsi que sur le couplage de la respiration et la forte production d'ATP, est la mise en place de mécanismes de réparation. Ceci est difficile à vérifier car ces mécanismes de réparation touchent beaucoup de structures ou de composés cellulaires. Cependant, la mise au point d'une méthode d'extraction des mitochondries dans un matériel peu hydraté permettrait d'apporter des réponses claires sur le degré d'intégrité des membranes et du fonctionnement mitochondrial entre les différents lots étudiés. Le génotype Térèse a été peu étudié au niveau métabolique. Cependant ce génotype est très affecté par les fortes vitesses de dessiccation, car lors du test de la faculté germinative le nombre de plantules normales diminue et il mériterait une étude plus approfondie. Outre le fait que ces vitesses de dessiccation modifient peu les potentialités initiales de la graine pour la germination, elles se manifestent cependant par la perte de l'aptitude à la conservation. Il faut cependant rappeler que des vitesses dessiccation aussi élevées ne se rencontrent pas sous les conditions climatiques en France. Des modifications plus prononcées pourraient être induites par des alternances de température ou des cycles d'hydratation - réhydratation. En effet, des alternances de températures fortes stimulent la

formation de RFO chez le lupin (Piotrowicz-Cieslak 2006) et plusieurs cycles d'hydratation - déshydratation de cotylédons de pois affectent le fonctionnement mitochondrial avec une baisse de la respiration et du contrôle respiratoire (Morohashi et Bewley 1980). De même, le pois est une espèce qui résiste bien aux vitesses de dessiccation élevées par rapport au haricot, la comparaison entre ces deux espèces serait intéressante. Par ailleurs, que se passe-t-il pendant le stockage? Quelles sont les quantités minimales d'AMP pour le redémarrage du métabolisme énergétique ? Les graines primées ne se conservent pas longtemps et pourtant dans notre étude elles montrent une teneur plus élevées en adénylates totaux et en AMP.

Les basses températures ne modifient pas beaucoup le déroulement des premières étapes de la germination. Certes, ces basses températures ralentissent la germination mais cela semble plus en lien avec la sensibilité des systèmes enzymatiques à la température, car lorsque le temps est exprimé en temps thermique, les différences s'estompent. Cependant, Champagne présente un maintien de la respiration aux basses températures que l'on ne rencontre pas chez Baccara ou moins important chez Térèse. Ce maintien de la respiration chez Champagne est lié à la capacité de respiration de la voie AOX. Les vitesses de dessiccation rapide suppriment ce maintien de la respiration aux basses températures pour Champagne et Térèse. Dans cette étude, nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur les basses températures mais le comportement de Champagne aux températures au-delà de l'optimum est tout à fait intéressant avec cette chute brutale de la vitesse de germination et ce comportement mériterait une étude plus approfondie.

Outre l'importance de ces résultats pour la compréhension des mécanismes de déroulement de la germination et leur transposition aux conditions au champ, ils apportent une approche complémentaire aux travaux réalisés sur d'autres thématiques non abordées dans cette étude comme la recherche de QTL, la protéomique et l'étude des régulateurs de croissance. En effet, à l'INRA de Mons, une population de lignées recombinantes a été obtenue à partir des génotypes Térèse et Champagne; la recherche de QTL de résistance au froid est en cours (Dumont et al. 2011).

Bibliographie

Adesogan A.T., Salawu M.B., Deaville E.R., 2002. The effect on voluntary feed intake, in vivo digestibility and nitrogen balance in sheep of feeding grass silage or pea-wheat intercrops differing in pea to wheat ratio and maturity. Animal Feed Science and Technology 96: 161-173.

Al-Ani A., Bruzau F., Raymond P., Saint-Ges V., Leblanc J-M., Pradet A., 1985. Germination, respiration and adenylate energy charge of seeds at various oxygen partial pressures. Plant Physiology 79: 885-890.

Amable R.A., Obendorf R.L., 1986. Soybean seed respiration during simulated preharvest deterioration. Journal of Experimental Botany 37: 1364-1375.

Amirsadeghi S., Robson C.A., Vanlerberghe G.C., 2007. The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress. Physiologia Plantarum 129: 253-266.

Andrews M., McKenzie B.A., Joyce A., Andrews M.E., 2001. The potential of lentil (*Lens culinaris*) as a grain legume crop in UK: an assessment based on a crop growth model. Annals of Applied Biology 139: 293-300.

Angelovici R., Galili G., Fernie A.R., Fait A., 2010. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. Trends in Plant Science 15: 211-218.

Angus J.F., Cunningham R.B., Moncur M.W., Mackenzie D.H., 1981. Phasic development in field crops I. Thermal response in the seedling phase. Field Crops Research 3: 365-378.

Annicchiarico P., Iannucci A., 2008. Adaptation strategy, germplasm type and adaptative traits for field pea improvement in Italy based on variety responses across climatically contrasting environments. Field Crops Research 108: 133-142.

Atkin O.K., Macherel D., 2008. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. Annals of Botany 1-19.

Attuci S. Carde JP., Raymond P., Saint-Gès V., Spiteri A., Pradet A., 1991. Oxidative phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds. Plant physiology 95: 390-398.

Azcon-Bieto J., Lambers H., Day D.A., 1983. Effect of photosynthesis and carbohydrate status on respiratory rates and the involvement of alternative pathway in leaf respiration. Plant physiology 72: 598-603.

Bachmann M., Matile P., Keller F., 1994. Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. Cold acclimation, translocation, and sink to source transition: discovery of chain elongation enzyme. Plant physiology 105: 1335-1345.

Bachmann M., Keller F., 1995. Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. Inter-and intracellular compartmentation. Plant physiology 109: 991-998.

Bailly C., Audigier C., Ladonne F., Wagner M-H., Coste F., Corbineau F., Cöme D., 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: 701-708.

Benamar A., Tallon C. Macherel D., 2003. Membrane integrity and oxidative properties of mitochondria isolated from imbibing pea seeds after priming or accelerated ageing. Seed Science Research 13: 35-45.

Bertrand A., Castonguay Y., 2003. Plant adaptations to overwintering stresses and implication s of climate change. Canadian Journal of Botany 81:1145-1152.

Bewley J., Black M., 1994. Seeds: Physiology of development and germination. 2e edition, Plenum Press, New-York, Londres. 445p.

Bialecka B., Kepczynski J., 2007. Changes in concentrations of soluble carbohydrates during germination of *Amaranthus caudatus* L. seeds in relation to ethylene, gibberellin A_3 and methyl jasmonate. Plant Growth Regulation 51: 21-31.

Black M., Corbineau F., Gee H., Côme D., 1999. Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. Plant Physiology 120: 463-471.

Blackman S.A., Obendorf R.L., Leopold C.A., 1992. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. Plant Physiology 100: 225-230.

Blöchl A., Peterbauer T., Richter A., 2007. Inhibition of raffinose oligosaccharide breakdown delays germination of pea seeds. Journal of Plant Physiology 164: 1093-1096.

Blöchl A., Peterbauer T., Hofmann J., Richter A., 2008. Enzymatic breakdown of raffinose oligosacharides in pea seeds. Planta 228: 99-110.

Bonhomme R., 2000. Bases and limits to using 'degree.day' units. European Journal of Agronomy 13: 1-10.

Borisjuk L., Rolletschek H., Walenta S., Panitz R., Wobus U., Weber H., 2003. Energy status and its control on embryogenesis of legumes: ATP distribution within Vicia faba embryos is developmentally regulated and correlated with photosynthetic capacity. The Plant Journal 36: 318-329.

Bourion V., Lejeune-hénaut I., Munier-Jolain N., Salon C., 2003. Cold acclimation of winter and spring peas: carbon partitioning as affected by light intensity. European Journal of Agronomy 19: 535-548.

Bramlage W.J., Leopold A.C., Parrish D.J., 1978. Chilling stress to soybeans during imbibition. Plant physiology 61: 525-529.

Brunel S., Teulat-Merah B., Wagner M-H., Huguet T., Prosperi J-M., Dürr C., 2009. Using a model-based framework for analysing genetic diversity during germination and heterotrophic growth of *Medicago truncatula*. Annals of Botany 103: 1103-1117.

Buckeridge M.S., Dietrich S.M.C., 1996. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). Plant Science 117: 33-43.

Buitink J., Hemminga M.A., Hoekstra F.,A., 2000. Is there a role for oligosaccharides in seed longevity? An assessment of intracellular glass stability. Plant Physiology 122: 1217-1224.

Burbano C., Muzquiz M., Ayet G., Cuadrado C., Pedrosa M.M., 1999. Evaluation of antinutritional factors of selected varieties of *Phaseolus vulgaris*. Journal of the Science of Food and Agriculture 79: 1468-1472.

Busch K., Ninnemann H., 1997. The controlling influence of ADP, ATP and magnesium on the activities of adenylate kinase, ATP synthase, ADP/ATP translocator and the mitochondrial respiration in plants. Plant Science 128: 85-95.

Calegario, F.F., Cosso R.G., Fagian M.M., Almeida F.V., Jardim W. F., Jerek P., Arruda P., Vercesi A.E., 2003. Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 35: 211-220.

Castillo E.M., De Lumen B.O., Reyes P.S., De Lumen H.Z., 1990. Raffinose synthase and galactinol synthase in developing seeds and leaves of legumes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 38: 351-355.

Cavaillès E., 2009. La relance des légumineuses dans le cadre d'un plan protéine: quels bénéfices environnementaux. Etudes et document 15 :1-44. Collection « Etudes et document » du Service de l'Economie, de l'Evaluation et de l'Intégration du Développement Durable (SEEIDD) du Commissariat Général au Développement Durable (CGDD).

Cheng L-B., Li S-Y., He G-Y., 2009. Isolation and expression profile analysis of genes relevant to chilling stress during seed imbibition in soybean [*Glycine max* (L.) Meeer.] Agricultural Sciences in China 8: 521-528.

Chiu K.Y., Chuang S.J., Sung J.M., 2006. Both anti-oxidation and lipid-carbohydrate conversion enhancements are involved in priming-improved emergence of *Echinacea purpurea* seeds that differ in size. Scientia Horticulturae 108: 220-226.

Clerkx E.J.M., Blankestijn-De Vries H., Ruys G.J., Groot S.P.C., Koornneef M., 2003. Characterization of *green seed*, an enhancer of *abi3-1* in Arabidopsis that affe cts seed longevity. Plant physiology 132: 1077-1084.

Clerkx E.J.M., Blankestijn-De Vries H., Ruys G.J., Groot S.P.C., Koornneef M., 2004. Genetic differences in seed longevity of various *Arabidopsis* mutants. Physiologia Plantarum 121: 448-461.

Clifton R., Millar H.A., Whelan J., 2006. Alternative oxidases in Arabidopsis: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. Biochimica et Biophysica Acta 1757: 730-741.

Corbineau F., Picard MA., Fougereux J-A, Ladonne F., Côme D., 2000. Effects of dehydration conditions on desiccation tolerance of developing pea seeds as related to oligosaccharide content and cell membrane properties. Seed Science Research 10: 329-339.

Corbineau F., Gay-Mathieu C., Vinel D., Côme D., 2002. Decrease in sunflower (*Helianthus annuus*) seed viability caused by high temperature as related to energy metabolism, membrane damage and lipid composition. Physiologia Plantarum 116: 489-496.

Corre-Hellou G., Dibet A., Hauggaard-Nielsen H., Crozat Y., Gooding M., Ambus P., Dahlmann C., Von Fragstein P., Pristeri A., Monti M., Jensen E.S., 2011. The competitive ability of pea-barley intercrops against weeds and the interactions with crop productivity and soil N availability. Field Crops Research 122: 264-272.

Coste F., Raveneau M-P., Crozat Y., 2005. Spectrophotometrical pod colour measurement: a non-destructive method for monitoring seed drying? Journal of Agricultural Science 143: 183-192.

Cousin R., 1997. Peas (*Pisum sativum* L.) Field Crops Research 53:111-130.

Couty F., Debord J., Fredon D., 1990. Probabilités et statistiques pour biologistes. Edition Armand Colin Paris. 207p. 166-176.

Covell S., Ellis R.H., Roberts E.H. Summerfield R.J., 1986. The influence of temperature on seed germination rate in grain legumes. I. A comparison of chickpea, lentil, soybean and cowpea at constant temperatures. Journal of Experimental Botany 37: 705-715.

Cunningham S.M., Nadeau P., Castonguay Y., Laberge S., Volence J.J., 2003. Raffinose and stachyose accumulation, galactinol synthase expression, and winter injury of contrasting Alfalfa germplasms. Crop Science 43: 562-570.

Dahal P., Bradford K.J., 1994. Hydrothermal time analysis of tomato seed germination at suboptimal temperature and reduced water potential. Seed Science Research 4: 71-80.

Debeaujon I., Léon-Kloosterziel K.M., Koornneef M., 2000. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. Plant Physiology 122: 403-413.

Dekkers B.J.W., Schuurmans J.A.M.J., Smeekens S.C.M., 2004. Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. Planta 218: 579-588.

De Santis A., Landi P., Genchi G., 1999. Changes of mitochondrial properties in maize seedlings associated with selection for germination at low temperature. Fatty acid composition, cytochrome *c* oxidase, and adenine nucleotide translocase activities. Plant Physiology 119: 743-754.

Dierking, E.C., Bilyeu K.D., 2009. Raffinose and stachyose metabolism are not required for efficient soybean seed germination. Journal of Plant Physiology 166: 1329-1335.

Dinakar C., Raghavendra A.S., Padmasree K., 2010. Importance of AOX pathway in optimizing photosynthesis under high light stress: role of pyruvate and malate in activating AOX. Physiologia Plantarum 139: 13-26.

Dirk L.M.A., Van der Krol A.R., Vreugdenhil D., Hilhorst H.W.M., Bewley D.J., 1999. Galactomannan, soluble sugar and starch mobilization following germination of *Trigonella foenum-graecum* seeds. Plant Physiology and Biochemistry 37 :41-50.

Doré C., Varoquaux F., 2006. Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées. Cemagef, Cirad, Ifremer, INRA. Paris. 840 p.

Downie B., Bewley J.D., 2000. Soluble sugar content of white spruce (Picea glauca) seeds during and after germination. Physiologia Plantarum 110: 1-12.

Duke S.H., Schrader L.E., Miller M.G., 1977. Low temperature effects on soybean (*Glycine max* [L.] Merr. Cv. Wells) mitochondrial respiration and several dehydrogenases during imbibition and germination. Plant physiology 60: 716-722.

Duke S.H., Kakefuda G., 1981. Role of the testa in preventing cellular rupture during imbibition of legume seeds. Plant physiology 67: 449-456.

Duke S.H., Kakefuda G., Harvey T.M., 1983. Differential leakage of intracellular substances from imbibing soybean seeds. Plant Physiology 72: 919-924.

Dumont E., Fontaine V., Vuylsteker C., Sellier H., Bodèle S., Voedts N., Devaux R., Frise M., Avia K., Hilbert J-L., Bahrman N., Hanocq E., Lejeune-Hénaut I., Delbreil B., 2009. Association of sugar content QTL and PQL with physiological traits relevant to frost damage resistance in pea under field and controlled conditions. Theoretical and Applied Genetics 118: 1561-1571.

Dumont E., Bahrman N., Goulas E., Valot B., Sellier H., Hilbert J-L., Vuylsteker C., Lejeune-Hénaut I., Delbreil B., 2011. A proteomic approach to decipher chilling response from cold acclimation in pea (*Pisum sativum* L.) Plant Science 180: 86-98.

Ekvall J., Stegmark R., Nyman M., 2006. Content of low molecular weight carbohydrates in vining peas (Pisum sativum) related to harvest time, size and brine grade. Food Chemistry 94: 513-519.

El-Adawy T.A., 2002. Nutritional composition and antinutritional factors of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) undergoing different cooking methods and germination. Plant Foods for Human Nutrition 57: 83-97.

Ellis R.H., Covell S., Roberts E.H., Summerfield R.J., 1986. The influence of temperature on seed germination rate in grain legumes. II. Intraspecific variation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) at constant temperatures. Journal of Experimental Botany 37: 1503-1515.

Ellis R.H., Barrett S., 1994. Alternating temperatures and rate of seed germination in lentil. Annals of Botany 74: 519-524.

Fader G.M., Koller R.H., 1984. Relationships between respiration rate and adenylate and carbohydrate pools of the soybean fruit. Plant physiology 75: 694-699.

Felter D.G., Lyon D.J., Nielsen D.C., 2006. Evaluating crops for a flexible summer fallow cropping system. Agronomy Journal 98: 1510-1516.

Ferguson J.M., TeKrony D.M., Egli D.B., 1990. Changes during early soybean seed and axes deterioration: I. Seed quality and mitochondrial respiration. Crop Science 30: 175-179.

Fernie A.R., Carrari F., Sweetlove L.J., 2004. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. Current Opinion in Plant Biology 7: 254-261.

Finch-Savage W.E., Rowse H.R., Dent K.C., 2005. Development of combined imbibition and hydrothermal threshold models to simulate maize (*Zea mays*) and chickpea (*Cicer arietinum*) seed germination in variable environments. New Phytologist 165: 825-838.

Fiorani F., Umbach A.L., Siedow J.N., 2005. The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of Arabidopsis *AOX1a* transgenic plants. Plant Physiology 139: 1795-1805.

Florez-Sarasa I.D., Bouma T.J., Medrano H., Azcon-Bieto J., Ribas-Carbo M., 2007. Contribution of the cytochrome and alternative pathways to growth respiration and maintenance respiration in *Arabidopsis thaliana*. Physiologia Plantarum 129: 143-151.

Frias J., Doblado R., Vidal-Valverde C., 2003. Kinetics of soluble carbohydrates by action of endo/exo α-galactosidase enzyme in lentils and peas. European Food Research and Technology 216 : 199-203.

Fung R.W.M., Wang C.Y., Smith D.L., 2004. MeSA and MeJA increase steady-state transcript levels of alternative oxidase and resistance against chilling injury in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). Plant Science 166: 711-719.

Gallais A., Bannerot H., 1992. Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de sélection, INRA édition, Paris. 768p.

Gardarin A., Dürr C., Colbach N., 2011. Prediction of germination rates of weed species: Relationships between germination speed parameters and species traits. Ecological Modelling 222: 626-636.

Garnczarska, M., Zalewski T., Kempka M., 2007. Water uptake and distribution in germinating lupine seeds studied by magnetic resonance imaging and NMR spectrocopy. Physiologia Plantarum 130: 23-32.

Gilmour S.J., Sebolt A.M., Salazar M.P., Everard J.D., Thomashow M.F., 2000. Overexpression of the Arabidopsis *CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. Plant Physiology 124: 1854-1865.

Glasheen J.S., Hand S.C., 1988. Anhydrobiosis in embryos of the brine shrimp *Artemia*: characterization of metabolic arrest during reductions in cell-associated water. Journal of Experimental Biology 135: 363-380.

Golovina E.A., Tikhonov A.N., Hoekstra F.A., 1997. An electron paramagnetic resonance spin-probe study of membrane-permeability changes with seed aging. Plant Physiology 114: 383-389.

Gomes S.M.O., Sinnecker P., Tanaka R.T., Lanfer-Marquez U.M., 2003. Effect of harvesting and drying conditions on chlorophyll levels of soybean (*Glycine max* L. Merr). Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 1634-1639.

Gonzalez-Meler M.A., Ribas-Carbo M., Giles L., Siedow J.N., 1999. The effect of growth and measurement temperature on the activity of the alternative respiratory pathway. Plant Physiology 120: 765-772.

Gowen A., Abu-Ghannam N., Frias J., Oliveira J., 2007a. Modelling the water absorption process in chickpeas (*Cicer arietinum L.*) – The effect of blanching pre-treatment on water intake and texture kinetics. Journal of Food Engineering 78: 810-819.

Gowen A., Abu-Ghannam N., Frias J., Oliveira J., 2007b. Influence of pre-blanching on the water absorption kinetics of soybeans. Journal of Food Engineering 78: 965-971.

Grabelnych O.I., Kolesnichenko A.V., Pobezhimova T.P., Tourchaninova V.V., Korzun A.M., Koroleva N.A., Zykova V.V., Voinikov V.K., 2003. The role of different plant seedling shoots mitochondrial uncoupling systems in thermogenesis during low-temperature stress. Journal of Thermal Biology 28: 571-580.

Grant N.M., Miller R.E., Watling J.R., Robinson S.A., 2008. Synchronicity of thermogenic activity, alternative pathway respiratory flux, AOX protein content, and carbohydrates in receptacle tissues of sacred lotus during floral development. Journal of Experimental Botany 1-10.

Grass L., Burris J.S., 1995. Effect of heat stress during seed development and maturation on wheat (*Triticum durum*) seed quality II. Mitochondrial respiration and nucleotide pools during early germination. Canadian Journal of Plant Science 75: 831-839.

Grelet, J., Benamar, A., Teyssier, E., Avelange-Macherel, M.H., Grunwald, D. and Macherel D., 2005. Identification in pea seed mitochondria of a Late-Embryogenesis Abundant protein able to protect enzymes from drying. Plant Physiology 137: 157-167.

Guilioni L. Jeuffroy M-H., 2005. Fortes températures et fonctionnement d'un couvert de pois, dans Agrophysiologie du pois protéagineux Munier-Jolain N., Biarnès V., Lecoeur J., Jeuffroy M.H., INRA, ARVALIS-Institut du végétal, UNIP, ENSAM. INRA éditions Paris 164-173.

Guimaraes V.M., Tavares de Rezende S., Moreira M.A., Gonçalves de Barros E., Felix C.R., 2001. Characterization of α-galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. Phytochemistry 58: 67-73.

Gummerson R.J., 1986. The effect of constant temperatures and osmotic potentials on the germination of sugar beet. Journal of Experimental Botany 37: 729-741.

Gupta K.J., Zabalza A., Van Dogen J.T., 2009. Regulation of respiration when the oxygen availability changes. Physiologia Plantarum 137: 383-391.

Gurusinghe S., Bradford K.J., 2001. Galactosyl-sucrose oligosaccharides and potential longevity of primed seeds. Seed Science Research 11: 121-133.

Hansen L.D., Church J.N., Matheson S., McCarlie W. V., Thygerson T., Criddle R.S., Smith B. N., 2002. Kinetics of plant growth and metabolism. Thermochimica Acta 388: 415-425.

Hincha D.K., Zuther E., Heyer A.G., 2003. The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. Biochimica et Biophysica Acta 1612: 172-177.

Hobbs P.R., Obendorf R.L. 1972. Interaction of initial seed moisture and imbibitional temperature on germination and productivity of soybean. Crop science 12: 664-667.

Horbowicz M., Brenac P., Obendorf R.L. 1998. Fagopyritol B1, O-α-D-galactopyranosyl-(1->2)-D-chiro-inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with desiccation tolerance. Planta 205: 1-11.

Hou J., Romo J.T. 1998a. Seed weight and germination time affect growth of 2 shrubs. Journal of Range Management 51: 699-703.

Hou J., Romo J.T., 1998b. Cold-hardiness of silver sagebrush seedlings. Journal of Range Management 51: 704-708.

Hu W.H., Shi K., Song X.S., Xia X.J., Zhou Y.H., Yu J.Q., 2006. Different effects of chilling on respiration in leaves and roots of cucumber (*Cucumis sativus*). Plant physiology and biochemistry 44: 837-843.

Igamberdiev A.U., Kleczkowski L.A, 2006. Equilibration of adenylates in the mitochondrial intermembrane space maintains respiration and regulates cytosolic metabolism. Journal of Experimental Botany 57: 2133-2141.

ISTA 2003. ISTA Handbook on Seedling Evaluation. 3rd edition, International Seed Testing Association, Bassersdorf, Swizterland.

ISTA 2005. International Rules for Seed Testing. Edition 2005, International Seed Testing Association, Bassersdorf, Swizterland.

Ito Y., Saisho D., Nakazono M., Tsutsumi N., Hirai A., 1997. Transcript levels of tandem-arranged alternative oxidase genes in rice are increased by low temperature. Gene 203: 121-129.

Kadlec P., Rubecova A., Hinkova A., Kaasova J., Bubnik Z., Pour V., 2001. Processing of yellow pea by germination, microwave treatment and drying. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2: 133-137.

Kibinza S., Vinel D., Côme D., Bailly C., Corbineau F., 2006. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. Physiologia Plantarum 128: 496-506.

Khazaei J., Mohammadi N., 2009. Effect of temperature on hydration kinetics of sesame seeds (*Sesamum indicum* L.). Journal of Food Engineering 91:542-552.

Klotz K.L., Finger F.L., Anderson M.D., 2008. Respiration in postharvest sugarbeet roots is not limited by respiratory capacity or adenylates. Journal of Plant Physiology 165: 1500-1510.

Koster K.L., Leopold C.A., 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. Plant Physiology 88: 829-832.

Koizumi M., Kikuchi K., Isobe S., Ishida N., Naito S., Kano H., 2008. Role of seed coat in imbibing soybean seeds observed by micro-magnetic resonance imaging. Annals of Botany 102: 343-352.

Kranner I., Minibayeva F.V., Beckett R.P., Seal C.E., 2010. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. New Phytologist 188: 655-673

Krishnan P., Nagarajan S., Moharir A.V., 2004. Thermodynamic characterisation of seed deterioration during storage under accelerated ageing conditions. Biosystems Engineering 89: 425-433.

Kumar N., Vyas D., Kumar S., 2007. Plants at high altitude exhibit higher component of alternative respiration. Journal of Plant Physiology 164: 31-38.

Kumar V., Rani A., Goyal L., Dixit A.K., Manjaya J.G., Dev J., Swamy M., 2010. Sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) in soybean seeds as influenced by genotype and growing location. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58: 5081-5085.

Kuo T.M., VanMiddlesworth J.F., Wolf W.J., 1988. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. Journal of Agricultural Food Chemistry 36: 32-36.

Lahuta L.B., Gorecki R.J., Gojlo E., Horbowicz M., 2005. Differences in accumulation of soluble α-galactosides during seed maturation of several *Vicia* species. Acta Physiologiae Plantarum 27: 163-171.

Lahuta L.B., Gorecki R., Zalewski K., Hedley CL., 2007. Sorbitol accumulation during natural and accelerated ageing of pea (*Pisum sativum* L.) seeds. Acta Physiologiae Plantarum 29: 527-534.

Lahuta L.B., Dzik T., 2011. D-*chiro*-Inositol affects accumulation of raffinose family oligosaccharides in developing embryos of *Pisum sativum*. Journal of Plant Physiology 168: 352-358.

Lei T., Feng H., Sun X., Dai Q.L., Zhang F., Liang H.G., Lin H.H., 2010. The alternative pathway in cucumber seedlings under low temperature stress was enhanced by salicylic acid. Plant Growth Regulation 60: 35-42.

Lejeune-Hénaut I., Bourion V., Etevé G., Cunot E., Delhaye K., Desmyter C., 1999. Floral initiation in field-grown forage peas is delayed to a greater extent by short photoperiods, than in other types of European varieties. Euphytica 109: 201-211.

Lejeune-Hénaut I., Delbreil B., Devaux R., Guilioni L., 2005. Températures froides et fonctionnement d'un couvert de pois, dans Agrophysiologie du pois protéagineux. Munier-Jolain N., Biarnès V., Chaillet I., Lecoeur J., Jeuffroy M-H. INRA, ARVALIS-Institut du végétal, UNIP, ENSAM. INRA éditions Paris 184-194.

Leopold C.A., Musgrave, M.E., 1979. Respiratory changes with chilling injury of soybeans. Plant physiology 64: 702-705.

Liu J-J.J., Krenz D.C., Galvez A.F., De Lumen B.O., 1998. Galactinol synthase (GS): increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation. Plant Science 134: 11-20.

Liu H., Song L., You Y., Li Y., Duan X., Jiang Y., Joyce D.C., Ashraf M., Lu W., 2011. Cold storage duration affects litchi fruit quality, membrane permeability, enzyme activities and energy charge during shelf time at ambient temperature. Postharvest Biology and Technology 60: 24-30.

Macherel D., Benamar A., Avelange-Macherel M-H., Tolleter D., 2007. Function and stress tolerance of seed mitochondria. Physiologia Plantarum 129: 233-241.

Machado Neto N.B., Priolo M.R., Gatti A.B., Cardoso V.J.M. 2006. Temperature effects on seed germination in races of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Acta Scientiarum Agronomy 28: 155-164.

Martinez-Villaluenga C., Frias J., Vidal-Valverde C., 2005. Raffinose family oligosaccharides and sucrose contents in 13 Spanish lupin cultivars. Food chemistry 91: 645-649.

McDonald M.B., 2000. Seed priming dans Seed technology and its biological basis Black M., Bewley. Sheffield Academic Press 310-325.

McDonald A.E., Sieger S.M., Vanlerberghe G.C., 2002. Methods and approaches to study plant mitochondrial alternative oxidase. Physiologia Plantarum 116: 135-143.

Meyer E.H., Tomaz T., Carroll A.J., Estavillo G., Delannoy E., Tanz S.K., Small I.D., Pogson B.J., Millar H.A., 2009. Remodeled respiration in *ndufs4* with low phosphorylation efficiency suppresses Arabidopsis germination and growth and alters control of metabolism at night. Plant physiology 151: 603-619.

Millenaar F.F, Lambers H., 2003. The alternative oxidase: *in vivo* regulation and function. Plant Biology 5: 2-15.

Mizuno N., Sugie A., Kobayashi F., Takumi S., 2008. Mitochondrial alternative pathway is associated with development of freezing tolerance in common wheat. Journal of Plant Physiology 165: 462-467.

Modi A.T., McDonald M.B., Streeter J.G., 2002. Water status influences common events of soluble carbohydrate accumulation during soybean seed development and germination. Canadian Journal of Botany 80: 262-270.

Moller et Rasmusson dans Plant Physiology online 5^{e} édition, Taiz L. Zeiger E. http://5e.plantphys.net/article.php?ch=11&id=495&search=mitochondria

Monerri C., Garcia-Luis A., Guardiola J.L., 1986. Sugar and starch changes in pea cotyledons during germination. Physiologia Plantarum 67: 49-54.

Moore A.L., Albury M.S., Crichton P.G., Affourtit C., 2002. Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? Trends in Plant Science 7: 478-481.

Moreau-Valancogne P., Coste F., Vandewalle P., Wagner M-H., Ladonne F., Crozat Y. 2007. Modelling the effects of microclimate on bean seed desiccation rate and seed storage ability. Annals of Applied Biology 150 :41-51.

Moreau-Valancogne P., Coste F., Crozat Y., Dürr C., 2008. Asessing emergence of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed lots in France: Field observations and simulations. European Journal of Agronomy 28: 309-320.

Morohashi Y., Bewley J.D., 1980. Development of mitochondrial activities in pea cotyledons. Influence of desiccation during and following germination of the axis. Plant Physiology 66: 637-640.

Morohashi Y., Katoh H., Kaneko Y., Matsushima H., 1989. Control of α-amylase development in cotyledons during and following germination of mung bean seeds. Plant Physiology 91: 253-258.

Munier-Jolain N., Carrouée B., 2003. Considering pea in sustainable agriculture: agricultural and environmental arguments. Cahiers Agricultures 12:111-120.

Naudin C., Corre-Hellou G., Pineau S., Crozat Y., Jeuffroy M-H., 2010. The effect of various dynamics of N availability on winter pea-wheat intercrops: Crop growth, N partitioning and symbiotic N_2 fixation. Field Crops Research 119: 2-11.

Nemecek T., Von Richthofen J-S., Dubois G., Casta P., Charles R., Pahl H., 2008. Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations. European Journal of Agronomy 28: 380-393.

Nikolopoulou D., Grigorakis K., Stasini M., Alexis M.N., Iliadis K., 2007. Differences in chemical composition of field pea (*Pisum sativum*) cultivars: effects of cultivation area and year. Food chemistry 103: 847-852.

Nishizawa A., Yabuta Y., Shigeoka S., 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. Plant physiology 147: 1251-1263.

Noctor G., De Paepe R., Foyer C.H., 2007. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. Trends in Plant Science 12: 125-134.

Nonogaki, H., Bassel, G.W., Bewley D.J., 2010. Germination–Still a mystery. Plant Science 179: 574-581.

Nykiforuk, C.L., Johnson-Flanagan A.M., 1999. Storage reserve mobilization during low temperature germination and early seedling growth in *Bracsica napus.* Plant Physiology and Biochemistry 37: 939-947.

Obendorf R., Dickerman A.M., Pflum T.M., Kacalanos M.A., Smith M.E., 1998. Drying rate alters soluble carbohydrates, desiccation tolerance, and subsequent seedling growth of soybean (*Glycine max* L. Merrill) zygotic embryos during *in vitro* maturation. Plant Science 132: 1-12.

Obendorf, R.L., Sensenig E.M., Wu J., Ohashi M., O'Sullivan T.E., Kosina S.M., Schnebly S.R., 2008. Soluble carbohydrates in mature soybean seed after feeding D-*chiro*-inositol, *myo*-Inositol, or D-pinitol to stem-leaf-pod explants of low-raffinose, low-stachyose lines. Plant Science 175: 650-655.

Olivier F.C., Annandale J.G., 1998. Thermal time requirements for the development of green pea (*Pisum sativum* L.). Field Crops Research 56: 301-307.

Omnès G., 2011. Le pois veut redevenir une culture de masse. Réussir Grandes cultures 246 : 24-25.

Oresnik I.J., Layzell D.B., 1994. Composition and distribution of adenylates in soybean (*Glycine max* L.) nodule tissue. Plant Physiology 104: 217-225.

Palander, S., Laurinen P., Perttilä S., Valaja J., Partanen, K., 2006. Protein and amino acid digestibility and metabolizable energy value of pea (*Pisum sativum*), faba bean (*Vicia faba*) and lupin (*Lupinus angustifolius*) seeds for turkeys of different age. Animal Feed Science and Technology 127: 89-100.

Peterbauer T., Lahuta L.B., Blöchl A., Mucha J., Jones D.A., Hedley C.L., Gorecki R.J. , Richter A., 2001. Analysis of the raffinose family oligosaccharide pathway in pea seeds with contrasting carbohydrate composition. Plant Physiology 127: 1764-1772.

Piotrowicz-Cieslak A.I., 2006. Contents of soluble carbohydrates in yellow lupin seeds maturated at various temperatures. Acta Physiologiae Plantarum 28: 349-356.

Pizzolante de Padua G., De Barros França-Neto J., Moreira De Carvalho M.L., Costa O., Krzyzanowski F.C., Pereira Da Costa N., 2007. Tolerance level of green seed in soybean seed lots after storage. Revista Brasileira de Sementes 29: 128-138.

Pourcel L., Routaboul J-M., Cheynier V., Lepiniec L., Debeaujon I. 2007. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. Trends in Plant Science 12: 29-36.

Pradet A., Raymond P. 1983. Adenine nucleotide ratios and adenylate energy charge in energy metabolism. Ann. Rev. Plant physiology 34: 199-224.

Pukacka S., Wojkiewicz E., 2003. The effect of the temperature of drying on viability and some factors affecting storability of *Fagus sylvatica* seeds. Acta Physiologiae Plantarum 25: 163-169.

Purvis A.C., 1997. Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. Physiologia Plantarum 100: 165-170.

Rajjou L., Debeaujon I., 2008. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. Comptes Rendus Biologies 331: 796–805.

Rasmusson A.G., Fernie A.R., Van Dogen J.T., 2009. Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? Physiologia Plantarum 137: 371-382.

Raveneau M-P., Coste F., Moreau-Valancogne P., Lejeune-Hénaut I., Dürr C., 2011. Pea and bean germination and seedling responses to temperature and water potential. Seed Science Research 143:183-192.

Raymond P., Al-Ani A., Pradet A., 1985. ATP production by respiration and fermentation, and energy charge during aerobiosis and anaerobiosis in twelve fatty and starchy germinating seeds. Plant Physiology 79: 879-884.

Roberts J.K.M., Aubert S., Gout E., Bligny R., Douce R., 1997. Cooperation and competition between adenylate kinase, nucleoside diphosphokinase, electron transport, and ATP synthase in plant mitochondria studied by ^{31}P-nuclear magnetic resonance. Plant Physiology 113: 191-199.

Robson C.A., Vanlerberghe G.C., 2002. Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and -independent pathways of programmed cell death. Plant Physiology 129: 1908-1920.

Saglio P.H., Raymond P., Pradet A., 1980. Metabolic activity and energy charge of excised maize root tips under anoxia. Plant Physiology 66: 1053-1057.

Salawu M.B., Adesogan, A.T., Fraser M.D., Fychan R., Jones R., 2002. Assessment of the nutritive value of whole crop peas and intercropped pea-wheat bi-crop forages harvested at different maturity stages for ruminants. Animal Feed Science and Technology 96: 43-53.

Schneider A., 1998. Variability of maize seed imbibition rates as influenced by seed size distribution and coating application. Agronomie 18: 247-260.

Siddique K.H.M., Regan K.L., Tennant D., Thomson B.D., 2001. Water use and water use efficiency of cool season grain legumes in low rainfall Mediterranean-type environments. European Journal of Agronomy 15: 267-280.

Sinnecker P., Braga N., Macchione E.L.A., Lanfer-Marquez U.M., 2005. Mechanism of soybean (*Glycine max* L. Merril) degreening related to maturity stage and postharvest drying temperature. Postharvest Biology and Technology 38: 269-279.

Stupnikova I., Benamar A., Tolleter D., Grelet J., Borovskii G., Dorne A-J., Macherel D., 2006. Pea seed mitochondria are endowed with a remarkable tolerance to extreme physiological temperatures. Plant Physiology 140: 326-335.

Sun H., Li L., Wang X., Wu S., Wang X., 2011. Ascorbate-glutathione cycle of mitochondria in osmoprimed soybean cotyledons in reponse to imbibitional chilling injury. Journal of Plant Physiology 168: 226-232.

Tahir M., Vandenberg A., Chibbar R.N., 2011. Influence of environment on seed soluble carbohydrates in selected lentil cultivars. Journal of Food Composition and Analysis 24: 596-602.

Taji T., Ohsumi C., Luchi S., Seki M., Kasuga M., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., 2002. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. The plant Journal 29: 417-426.

Trudgill D.L., Honek A., Li D., Van Straalen N.M., 2005. Thermal time - concepts and utility. Annals of Applied Biology 146: 1-14.

Turgeon R., Medville R. 2004. Phloem loading. A reevaluation of the relationship between plasmodesmatal frequencies and loading strategies. Plant Physiology 136: 3795-3803.

Van Aken O., Giraud E., Clifton R., Welhan J., 2009. Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses. Physiologia Plantarum 137: 354-361.

Vander Pol M., Hristov A.N., Zaman S., Delano N., Schneider C., 2009. Effect of inclusion of peas in dairy cow diets on ruminal fermentation, digestibility, and nitrogen losses. Animal Feed Science and Technology 150: 95-105.

Vanlerberghe G.C., McIntosh L., 1992. Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. Plant Physiology 100: 115-119.

Vanlerberghe G.C., Cvetkovska M., Wang J., 2009. Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? Physiologia Plantarum 137: 392-406.

Vedel F., Lalanne E., Sabar M., Chrétrit P., De Paepe R., 1999. The mitochondrial respiratory chain and ATP synthase complexes: Composition, structure and mutational studies. Plant Physiology and Biochemistry 37: 629-643.

Veselova T.V., Veselovskii V.A., Usmanov P.D., Usmanova O.V., Kozar V.I., 2003. Hypoxia and imbibition injuries to aging seeds. Russian Journal of Plant Physiology 50: 835-842.

Vidal-Valverde C., Frias J., Sierra I., Blazquez I., Lambein F., Kuo Y-H., 2002. New functional legume foods by germination: effect on the nutritive value of beans, lentils and peas. European Food Research Technology 215: 472-477.

Vocanson A, Jeuffroy M-H., 2008. Agronomic performance of different pea cultivars under various sowing periods and contrasting soil structures. Agronomy Journal 100: 748-759.

Voinikov V.K., Kolesnichenko A.V., Pobezhimova T.P., Grabel'nykh O.I., 2006. Functioning of a CSP310 Stress protein is related to the shunting of electron transfer along the respiratory chain of winter wheat mitochondria. Russian Journal of plant physiology 53: 332-339.

Walters C., 1998. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. Seed Science Research 8: 223-244.

Walters C., Pammenter N.W., Berjak P., Crane J., 2001. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. Seed Science Research 11: 135-148.

Wang R., Bai Y., Tanino K., 2004. Effect of seed size and sub-zero imbibition-temperature on the thermal time model of winterfat (*Eurotia lanata* (Pursh) Moq.). Environmental and Experimental Botany 51: 183-197.

Wang J., Rajakulendran N., Amirsadeghi S., Valerberghe G. C., 2011. Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of Nicotiana tabacum to cold temperature. Physiologia Plantarum 142: 339-351.

White J.W., Montes-R C., 1993. The influence of temperature on seed germination in cultivars of common bean. Journal of Experimental Botany 44: 1795-1800.

Wojtyla L., Garnczarska M., Zalewski T., Bednarski W., Ratajczak L., Jurga S., 2006. A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds. Journal of Plant Physiology 163: 1207-1220.

Wolk W.D., Dillon P.F., Copeland L.F., Dilley D.R., 1989. Dynamics of imbibition in *Phaseolus vulgaris* L. in relation to initial seed moisture content. Plant Physiology 89: 805-810.

Yin X., Kropff M., McLaren G., Visperas R.M., 1995. A nonlinear model for crop development as a function of temperature. Agricultural and Forest Meteorology. 77: 1-16.

Young N.D., Mudge J. Ellis N.T.H., 2003. Legume genomes: more than peas in a pod. Current Opinion in Plant Biology 6: 199-204.

Zalewski K., Nitkiewicz B., Lahuta L.B., Glowacka K., Socha A., Amarowicz R., 2010. Effect of jasmonic acid-methyl ester on the composition of carbohydrates and germination of yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) seeds. Journal of Plant Physiology 167 : 967-973.

Zancani M., Casolo V., Vianello A., Macri F., 2001. Involvement of apyrase in the regulation of adenylate pool by adenylate kinase in plant mitochondria. Plant Science 161: 927-933.

Zhuo J., Wang W., Lu Y., Sen W., Wang X., 2009. Osmopriming-regulated changes of plasma membrane composition and function were inhibited by phenylarsine oxide in soybean seeds. Journal of integrative Plant Biology 51: 858-867.

Zuther E., Büchel K., Hundertmark M., Stitt M., Hincha D.K., Heyer A.G., 2004. The role of raffinose in cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters 576: 169-173.

Table des illustrations

Figure 1: Evolution des surfaces cultivées et des rendements du pois. 12

Figure 2: Déroulement dans le temps des évènements physiques et métabolique pendant la germination (phases I et II) et le début de la croissance de plantule (Phase III).. 18

Figure 3: Fonction Beta pour modéliser la vitesse de développement en fonction de la température 19

Figure 4 : Eléments influençant la longévité de la graine. 21

Figure 5 : Transport des électrons dans la chaine respiratoire. 23

Figure 6 : Lien entre chaine respiratoire, cycle TCA et Glycolyse. 24

Figure 7 : Lien entre l'ATPase et l'AK. 25

Figure 8 : Structure du raffinose, stachyose et verbascose 26

Figure 9 Voie de biosynthèse du galactinol, du raffinose, du stachyose chez les plantes. .. 26

Figure 10 : Evolution des oligosaccharides au cours de la formation de la graine de deux génotypes de pois. 27

Figure 11 : Concept de stress appliqué à la graine. 30

Figure 12 : Principaux processus caractérisant la dessiccation de la graine 31

Figure 13 : Solide des couleurs 36

Figure 14 : Détermination de l'angle de teinte 36

Figure 15 : Boite de germination avec Champagne 38

Figure 16 : Graine de Baccara considérée comme germée 38

Figure 17 : Vitesse de germination des trois génotypes produits en Anjou en 2006 en fonction de la température. 40

Figure 18: Vitesse de germination des trois génotypes produits en Anjou en 2006 ou en 2007 en fonction de la température. 40

Figure 19: Vitesse de germination des trois génotypes produits en Anjou ou à Mons en 2006 en fonction de la température. 41

Figure 20 : Vitesse de germination à 5 et 20°C des deux populations de génotypes de printemps et de génotypes d'hiver 42

Figure 21 : Les graines des différents génotypes après 25 h d'imbibition dans les flaçons utilisés pour la mesure de la respiration. 43

Figure 22 : Evolution de la couleur (teinte = h) des graines entières avec tégument en fonction de la vitesse de dessiccation. 43

Figure 23: Cinétique de germination de Térèse à 5 et 20°C. 44

Figure 24: Vitesse de germination exprimée en temps thermique en fonction des génotypes et des modalités de dessiccation. 44

Figure 25 : Evolution de la teneur en eau (TE) en % matière fraîche des graines entières en fonction du temps d'imbibition exprimé en heures..... 44

Figure 26 : Evolution de la teneur en eau dans les axes embryonnaires et les cotylédons du génotype Térèse. 45

Figure 27: Evolution de la teneur en eau des axes des trois génotypes. 45

Figure 28: Evolution de la teneur en eau des axes du génotype Térèse en fonction des conditions de dessiccation. 46

Figure 29: Evolution de la teneur en eau des graines du génotype Térèse..... 46

Figure 30: Faculté germinative (FG) et faculté germinative après détérioration contrôlée (FGDC11) exprimée en % de plantules normales pour les trois génotypes.. 47

Figure 31: Evolution de la conductivité après 23 h en fonction de la vitesse de dessiccation pour les trois génotypes. 47

Figure 32 : A gauche vue externe de l'oxygraphe, à droite le schéma de fonctionnement de l'électrode à oxygène.. 55

Figure 33 : Graines des différents génotypes après 24 h d'imbibition dans les flacons utilisés pour la mesure de la respiration. 56

Figure 34 : Différents états mitochondriaux. 57

Figure 35 : Dissection des graines de Baccara 58

Figure 36 : Chromatogramme du standard (A) et chromatogramme de l'extrait de pois Baccara champ après 18 h d'imbibition (B). 60

Figure 37 : Chromatogramme du standard des sucres (A) et chromatogramme d'un extrait d'axes de graines sèches de pois Baccara (B). 62

Figure 38 : Evolution de la teneur en eau (en % MF) des fragments en fonction du temps d'imbibition. 64

Figure 39: Evolution de la consommation en oxygène des fragments en fonction du temps d'imbibition. 65

Figure 40: Effet des vitesses de dessiccation sur l'intensité respiratoire 65

Figure 41: Evolution de l'intensité respiratoire des fragments en fonction du temps d'imbibition 66

Figure 42: Capacité respiratoire de la voie AOX 67

Figure 43: Diagramme d'Arrhénius 68

Figure 44: Influence de la température d'imbibition (5 ou 23°C) sur l'intensité respiratoire à 25°C des différents génotypes ayant subi différentes modalités de dessiccation. 69

Figure 45: Influence de la température d'imbibition (5 ou 23°C) sur l'intensité respiratoire à 5°C des différents génotypes ayant subi différentes modalités de dessiccation. 69

Figure 46: Influence des génotypes et des vitesses de dessiccation sur l'intensité respiratoire des axes embryonnaires. 70

Figure 47: Evolution de la respiration de la graine entière au cours de l'imbibition du génotype Baccara. 71

Figure 48: Influence de la vitesse de dessiccation sur l'intensité respiratoire des trois

génotypes. 71

Figure 49: Influence de la durée de détérioration contrôlée sur l'intensité respiratoire de différents génotypes ayant subi différentes modalités de dessiccation. 72

Figure 50: Effet du FCCP sur la consommation en oxygène des fragments en fonction des génotypes et des modalités de dessiccation 73

Figure 51: Le contrôle respiratoire des mitochondries du génotype Baccara évalué en utilisant trois substrats différents (Succinate, NADH, Malate/Glutamate) en fonction des trois modalités de dessiccation (Ch= Champ, Na, Si). 74

Figure 52 : Expression de la protéine LEAm chez la graine de pois Baccara. 74

Figure 53: Teneur en adénylates dans les graines en fonction du génotype et des modalités de dessiccation. 76

Figure 54: Teneur en AXP dans les axes embryonnaires en fonction des génotypes et des conditions de dessiccation. 76

Figure 55: Evolution des différents adénylates au cours de la germination du génotype Baccara. 77

Figure 56: Evolution de l'ATP de la graine entière au cours de l'imbibition. 77

Figure 57: Evolution de la teneur en ATP dans les axes embryonnaires de Baccara et de Champagne sous différentes modalités de dessiccation. 78

Figure 58: Evolution de la teneur en ATP dans les axes embryonnaires de Baccara et de Champagne sous différentes températures de germination (20 et 5°C). 78

Figure 59: Evolution de l'AEC de la graine entière au cours de la germination de Baccara. 79

Figure 60: Evolution de l'AEC des graines entières au cours de la germination en fonction des génotypes et des modalités de dessiccation 79

Figure 61: Evolution de l'AEC des axes embryonnaires au cours de la germination 80

Figure 62: Evolution de l'AEC des axes embryonnaires au cours de la germination aux basses températures. 80

Figure 63 : Spectre HPLC pour des graines sèches (GS) et pour des graines imbibées18 h de Baccara 81

Figure 64 : Teneur en adénylates de différents génotypes de pois. 81

Figure 65 : Evolution des adénylates au cours du séchage de graines pré-imbibées pendant 18 h.. 82

Figure 66 : Teneur en adénylates de différentes espèces végétale et d'un anhydrobiote, cystes déshydratés d'une crevette marine, *Artemia*. 82

Figure 67 : Evolution des adénylates au cours du temps à 20°C et 0°C. 83

Figure 68: Reconstitution du pool d'adénylates. 83

Figure 69 : Rôle de l'adénylate kinase (AK) et de la phosphorylation oxydative mitochondriale dans la régulation du métabolisme en lien avec l'anhydrobiose. 84

Figure 70 : Réponse des mitochondries isolées de pois Baccara 2009 aux apports d'AMP et rôle de l'adénylate kinase. 85

Figure 71 : Activité de l'AK mimant l'accumulation d'AMP pendant la déshydratation... 86

Figure 72 : Activité de l'AK mimant l'utilisation du stock d'AMP pour la production d'ADP lors de la réhydratation. 87

Figure 73: Composition initiale en sucres solubles des graines de différents génotypes de pois 88

Figure 74: Evolution des différents RFO dans les cotylédons au cours de la germination du pois à 20°C. 89

Figure 75: Evolution des différents RFO dans les axes au cours de la germination du pois à 20°C. 89

Figure 76: Effet des basses températures sur la mobilisation des différents oligosaccharides dans les axes embryonnaires de différents génotypes. 90

Figure 77: Evolution des RFO et saccharose dans les axes embryonnaires au cours de la germination du pois à 20°C. 91

Figure 78: Relation entre Teneur en RFO et teneur en Saccharose 92

Figure 79 : Evolution des RFO et du saccharose dans les axes au cours du temps exprimé en degré-jour. 93

Figure 80: Utilisation des sucres solubles par les différents génotypes sous différentes modalités de dessiccation et de germination. 94

Figure 81 : Relation entre teneur en ATP et consommation en $O_{2.}$ 96

Figure 82: Utilisation de l'ATP formé depuis le début de l'imbibition. 97

Figure 83: Relation entre respiration des graines entières et teneur en RFO. 98

Figure 84: Relation entre respiration des fragments et la vitesse de mobilisation des sucres solubles. 98

Figure 85 : Corrélations entre la teneur en ATP et la teneur en RFO en fonction des génotypes, des conditions de températures de germination et des vitesses de dessiccation appliquées au moment de la formation de la graine. 99

Figure 86: Vitesse de germination en fonction de la respiration (A) des fragments à 20°C et (B) des graines entières à 6 h d'imbibition. 100

Figure 87 : Relation entre teneur en ATP à 12h d'imbibition. 100

Figure 88: Corrélation entre vitesse de germination et teneur en verbascose dans l'axe embryonnaire, temps de mobilisation de 50% des RFO, de la quantité d'utilisation des sucres solubles et de l'accumulation de saccharose. 101

Figure 89 : Schéma global indiquant les points de régulation en lien avec la vitesse de germination. 114

Table des Tableaux

Tableau 1 : Répartition des sucres solubles chez les graines de pois de différents génotypes. 28

Tableau 2 : Caractéristiques des cultivars de pois. 35

Tableau 3 : Vitesse de dessiccation au cours de la phase de dessiccation 37

Tableau 4: Paramètres de germination pour différents génotypes et lots de graines de pois. 41

Tableau 5: Vitesse maximale et accélération maximale de la consommation en oxygène par les différents génotypes. Estimation du moment de démarrage de la phase de respiration rapide. 72

Tableau 6: Intégrité de la membrane externe de la mitochondrie..... 74

Tableau 7 : Estimation de la contribution du saccharose aux besoins des cellules de l'axe embryonnaire 94

Tableau 8 : Mise en évidence de la possibilité de synthèse de saccharose via le galactose.95

Sigles et abréviations

AOX : oxydase de la voie alternative
AEC : charge énergétique en adénylate
AK = ADK : adénylate kinase
Cipan : culture intermédiaire piège à nitrate
COX : cytochrome oxydase
CSP 310 : cold shock protein avec un poids moléculaire de 310KD.
DGJ : 1-deoxygalactonojirimycin
DJ : degré-jour
FCCP : p-trifluoromethoxy-carbonyl-cyanide-phenylhydrazone
FRG : fin du remplissage du grain
GE : graine entière
GS : graine sèche (stade récolte)
H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène
HPLC: chromatographie liquide à haute pression
HR : humidité relative
KCN : cyanure de potassium
LEAm : protéine mitochondriale late embryogenesis abondant
LEVA : laboratoire d'écophysiologie et agroécologie.
ND2 : déshydrogenase NAD(P)H de type II
PAC : politique agricole commune
PMG : poids de mille grains
PMS : laboratoire de physiologie moléculaire des semences
PUMP (Plant Uncoupling Mitochondrial Protein) : protéines découplantes dans les mitochondries végétales
QTL : quantitative trait locus
RC : contrôle respiratoire
RFO : oligosaccharides de la famille du raffinose
RMN : résonnance magnétique nucléaire
ROS : reactive oxygen species.
SHAM : acide salicyl-hydroxamique
TCA : cycle des acides tricarboxyliques
UCP (Uncoupling Protein) : protéine découplante
UQ : ubiquinone

EFFET DES VITESSES DE DESSICCATION DE LA GRAINE ET DES BASSES TEMPERATURES SUR LA GERMINATION DU POIS PROTEAGINEUX.

Résumé français :

Des semis précoces permettent d'allonger les cycles de culture du pois protéagineux et d'éviter les stress hydriques et thermiques tardifs, ce qui contribue à la maîtrise des variations de rendement. Les objectifs de ce travail sont 1) d'étudier le comportement de différents génotypes de pois au cours de la germination en réponse à la température ; 2) de déterminer l'impact des vitesses de dessiccation à température élevée sur les caractéristiques des graines, leur germination et leur conservation ; 3) d'explorer la reprise du métabolisme énergétique et la mobilisation des sucres solubles au cours de la germination et de déterminer l'impact d'une vitesse de dessiccation rapide après la phase de remplissage et des basses températures pendant la germination. Les pois de printemps Baccara et Térèse et le pois d'hiver Champagne présentent une température de base identique et très basse de -1,1°C. Le génotype Champagne a une vitesse de germination plus rapide que les deux autres génotypes, des basses températures jusqu'à l'optimum. Les vitesses de dessiccation élevées ont peu d'impact sur la germination mais affectent fortement l'aptitude à la conservation des graines, mesurée après détérioration contrôlée. Cela est associé à une augmentation de la conductivité traduisant des dégâts cellulaires, en particulier au niveau des membranes. La vitesse élevée de germination de Champagne s'explique en partie par une grande vitesse d'imbibition, permettant une respiration plus forte. Une corrélation entre la consommation en oxygène et la production d'ATP a été trouvée. Champagne présente également une capacité de la voie alternative, une utilisation d'ATP et de sucres solubles plus élevées que les génotypes de printemps, Baccara et Térèse. L'utilisation des sucres solubles des axes embryonnaires, après mobilisation des RFO, est bien corrélée avec la vitesse de germination. De fortes vitesses de dessiccation entrainent une augmentation de la respiration qui serait à relier à la mise en place de mécanismes de réparation. Les basses températures retardent le processus de germination et de reprise du métabolisme par leur action sur les systèmes enzymatiques, mais lorsque l'échelle de temps est exprimée en temps thermique, le retard disparaît. Cependant, la respiration du génotype Champagne est moins affectée par les basses températures. Les résultats obtenus ont permis de proposer un schéma global résumant les étapes clés permettant une vitesse de germination rapide et un modèlesur le rôle de l'adénylate kinase et de la phosphorylation oxydative mitochondriale dans la régulation du métabolisme en lien avec l'anhydrobiose.

Mots clés français = Températures cardinales, respiration, ATP, RFO, anhydrobiose, *Pisum sativum*.

EFFECT OF SEED DESICCATION RATE AND LOW TEMPERATURE ON PEA GERMINATION

Abstract:

Earlier sowings allow to extend pea crop cycle and to avoid later water and heat stresses, and thus contribute to control yield variability. The objectives of this work were 1) to study the performances of different pea genotypes during germination in temperature response; 2) to determine the impact of desiccation rate, at high temperature, on seed characteristics, germination and storage ability; 3) to investigate energy metabolism resumption and soluble sugar mobilisation during germination, and to determine the impact of high desiccation rate after seed filling, and low temperature during germination. Spring pea genotypes, Baccara and Térèse, and winter genotype, Champagne, had the same very low base temperature of -1.1°C. From cold until optimum temperature, Champagne genotype had a germination rate faster than the two other genotypes. High desiccation rates had little impactson germination but strongly affected seed storage ability, which was measured after a controlled deterioration. This was related to an increase of conductivity attributed to cellular damages, in particular at membrane level. The high germination rate of Champagne genotype was correlated to a high imbibition rate, allowing a faster respiration. A relationship was found between oxygen consumption and ATP production. Champagne genotype also showed a higher alternative pathway capacity, ATP and soluble sugar use than the spring pea genotypes, Baccara and Térèse. Soluble sugar use in embryonic axes, after RFO mobilisation, was well correlated with germination rate. High desiccation rate induced an increase of respiration which could be connected with the establishment of repair mechanisms. Low temperatures delayed germination process and metabolism resumption by their action on enzymatic systems but when time was expressed in thermal-time, the delay disappeared. Nevertheless, Champagne respiration was less affected by low temperature. The overall results lead to a global scheme that summarizes key mechanisms associated with a high germination rate, and to a model describing the role of adenylate kinase and mitochondrial oxidative phosphorylation in the regulation of metabolism with respect to anhydrobiosis.

Mots clés en anglais: Cardinal temperature, respiration, ATP, RFO, anhydrobiosis, *Pisum sativum.*