



**HAL**  
open science

# Etude de l'autophagie au cours du développement et de la germination de la graine d'*Arabidopsis thaliana*

Julien Di Berardino

## ► To cite this version:

Julien Di Berardino. Etude de l'autophagie au cours du développement et de la germination de la graine d'*Arabidopsis thaliana*. Amélioration des plantes. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS376 . tel-04042342

**HAL Id: tel-04042342**

**<https://theses.hal.science/tel-04042342>**

Submitted on 23 Mar 2023

**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.

NNT : 2016SACLS376



THESE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY  
PREPAREE A  
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N° 567  
Sciences du Végétal : du Gène à l'Ecosystème

Spécialité : Biologie

Par

**M. Julien Di Berardino**

Etude de l'autophagie au cours du développement et de la germination  
de la graine d'*Arabidopsis thaliana*

**Thèse présentée et soutenue à Versailles, le 15 décembre 2016 :**

**Composition du Jury :**

Mme Audrey Esclatine  
Mme Gwyneth Ingram  
M. Stéphane Mari  
Mme Julia Buitink  
Mme Michèle Reisdorf-Cren  
Mme Anne Marmagne

Professeur, Université Paris-Sud  
Directrice de Recherche, CNRS  
Chargé de Recherche, INRA  
Directrice de Recherche, INRA  
Maître de conférences, UVSQ  
Ingénieur de Recherche, INRA

Présidente  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directrice de thèse  
Co-directrice de thèse

## REMERCIEMENTS

A l'issue de ce travail de thèse, c'est avec sincérité que je tiens à remercier mes deux encadrantes, Michèle Reisdorf-Cren et Anne Marmagne, qui ont su me conseiller, me soutenir et m'aider de façon très complémentaire au cours de ces trois années. Vous m'avez aussi accordé une certaine autonomie, tout en étant présentes aux moments où j'en avais besoin. Pour ces raisons, je vous remercie !

Je remercie les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mon travail : Gwyneth Ingram et Stéphane Mari, les deux rapporteurs, ainsi que les deux examinatrices, Julia Buitink et Audrey Esclatine.

Je remercie encore Gwyneth Ingram pour avoir été membre de mon comité de thèse, au même titre que Christophe Bailly et Renaud Legouis.

Je remercie les membres du projet AutoAdapt, en particulier les collègues de Caen : Jean-Christophe Avice, Jacques Trouverie, Philippe Etienne et Aurélia Lornac.

Je remercie tous les membres de l'IJPB que j'ai sollicités (parfois trop ?) au cours de mon travail de thèse : Gwendal Cueff, Marlène Bailly et Loïc Rajjou pour l'aspect protéomique sur la plateforme de biochimie ; Martine Miquel pour son expertise dans l'analyse des acides gras ; Carine Deruyffelaere, Isabelle Bouchez et Sabine d'Andréa pour leur savoir faire dans les western blots ; Adeline Berger, Aurélie Hurel et Olivier Grandjean pour leur maîtrise de la cytologie et de l'imagerie ; Isabelle Debeaujon, Elodie Akary, Enrico Magnani, Jean-Christophe Palauqui, Cyril Gaertner et Sébastien Baud, pour leur aide dans le peaufinage de certaines manipes.

Je remercie évidemment tous les membres de l'équipe Saturne (la meilleure du bâtiment 3 et probablement de l'IJPB, en toute objectivité) : Céline Masclaux, « la Grande Chef », qui aime aller droit à l'essentiel et dont l'esprit critique m'a beaucoup aidé, Fabienne Soulay pour son aide et ses fous rires partagés, Fabien Chardon « le Statisticien » pour ses conseils et son humour plein de sous-entendus, Qinwu Chen pour sa gentillesse, et puis tous les autres qui sont désormais partis vers d'autres horizons : Magali Bedu, Loreto Naya, Liliana Avila-Ospina, Giorgiana Chietera, Katherine Merkulova, Michael Moison, Akira Suzuki, Kohki Yoshimoto, Germán Robert et Marien Havé.

Je remercie les membres du bâtiment 3 avec lesquels c'était toujours un plaisir de partager des moments autour d'un barbecue. J'espère pouvoir goûter prochainement le miel de la ruche « Bât 3 Bees », qui a été si bien décorée par Anne et est entretenue par nos apiculteurs Sylvie Dinant, Thomas Girin et Patrick Berquin.

Je remercie les autres doctorants (ou ex-doctorants) de l'IJPB, en particulier Camille Chardin, Mahsa Farjad et Camille Verly.

Je remercie Sébastien Baud et Nicolas Bouché pour leur soutien, mais surtout pour le partage de potins (oui, je vous balance).

Je remercie Michael Moison et Camille Soulard pour tous ces moments partagés : les séances de piscine, de cinéma, les sorties dans Paris... et les déménagements (pitié les mecs arrêtez de déménager !). Je remercie Marie Jeanne Sellier qui est l'une des personnes les plus adorables que j'ai pu rencontrer. Je remercie également Marien Havé pour tous ces bons moments et pour avoir su booster ma motivation avec sa bonne humeur communicative.

Je remercie tout particulièrement Thomas Bourgeois, qui au fil de ces trois années est devenu un de mes amis les plus proches. Nous partageons la même passion pour les plantes et avons tous les deux cultivé (clandestinement) des fruitiers exotiques dans une serre de l'INRA. (Je te laisse la charge des quelques dizaines de manguiers, papayes, goyaves, caféiers, cacaoyers, ananas, kiwis, corossoliers, mameys, agrumes, etc. Je sais que tu en prendras soin !).

Enfin, je remercie Nicolas Cadoret pour son soutien au quotidien, ainsi que mes parents (oserais-je dire « pour leur amour et leur soutien financier ?! ») et mes frères.

## Liste des figures

- [Figure 1](#). **p4**. Représentation schématique du cœur de la machinerie moléculaire de la macroautophagie
- [Figure 2](#). **p5**. Schématisation de l'interactome du complexe ATG1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*
- [Figure 3](#). **p6**. Schémas des complexes PI3K
- [Figure 4](#). **p7**. Schéma du recyclage de la protéine ATG9
- [Figure 5](#). **p9**. Schéma des systèmes de conjugaison ATG8 et ATG12
- [Figure 6](#). **p9**. Localisation schématique des protéines « Ubiquitin-like » de l'autophagie conjuguées à la membrane de l'autophagosome
- [Figure 7](#). **p10**. Schémas des types de liaisons et de régulations du recrutement des cargos dans l'autophagie sélective
- [Figure 8](#). **p11**. Schéma du CVT pathway chez la levure
- [Figure 9](#). **p13**. Schéma de la mitophagie
- [Figure 10](#). **p18**. Image en microscopie électronique à transmission (TEM) d'un autophagosome (AVi) dans une cellule hépatique de souris
- [Figure 11](#). **p19**. Images en microscopie photonique de cellules de racines non traitées et traitées à la concanamycines A
- [Figure 12](#). **p21**. Western blot présentant les formes conjuguée et libre d'ATG8
- [Figure 13](#). **p24**. Schémas présentant l'implication de l'autophagie dans le maintien ou la mort des cellules tumorales
- [Figure 14](#). **p28**. Voie schématique présentant la relation entre l'autophagie et la métacaspase mclI-PA dans la régulation de la mort cellulaire vacuolaire ou nécrotique
- [Figure 15](#). **p31**. Schéma du mécanisme de réduction des nitrates et d'assimilation de l'ammonium par le cycle GS/GOGAT
- [Figure 16](#). **p32**. Représentation schématique des phases d'expansion, de maturité et de sénescence des feuilles
- [Figure 17](#). **p34**. Schéma du RCB (Rubisco Containing body) pathway.
- [Figure 18](#). **p35**. Schéma de l'expérience de mise en évidence du défaut de remobilisation de l'azote chez les mutants d'autophagie
- [Figure 19](#). **p36**. Photographies de plantes mutantes *atg* présentant des phénotypes de sénescence précoce en condition d'azote pléthorique et limitant
- [Figure 20](#). **p38**. Schémas de la structure d'une silique d'*Arabidopsis*

- Figure 21. **p38.** Photographies de siliques d'Arabidopsis en développement depuis la fécondation de l'ovule jusqu'à la graine mature
- Figure 22. **p39.** Schémas de la mégasporogenèse et de la mégagaméthogenèse chez Arabidopsis
- Figure 23. **p40.** Schéma du gynécée d'Arabidopsis
- Figure 24. **p41.** Schémas des différentes étapes du développement de l'embryon d'Arabidopsis depuis la fécondation de l'oosphère jusqu'à l'embryon mature encore vert
- Figure 25. **p42.** Schémas des étapes de développement de l'endosperme dans la graine d'Arabidopsis
- Figure 26. **p43.** Images en microscopie photonique présentant le phénotype du mutant *zou* dans la graine d'Arabidopsis
- Figure 27. **p45.** Images en microscopie photonique du suivi du développement des téguments de la graine depuis l'ovule jusqu'au stade embryon mature
- Figure 28. **p47.** Schéma du transport du saccharose par voie apoplasmique à partir d'une cellule du parenchyme phloémien vers une cellule compagne du phloème
- Figure 29. **p48.** Modèle présentant les différentes étapes de transports apoplasmiques par les transporteurs SWEET au cours du développement de la graine d'Arabidopsis
- Figure 30. **p49.** Représentation schématique des proportions des principales molécules de réserve accumulées dans la graine d'Arabidopsis au cours de son développement, puis mobilisées pendant la germination
- Figure 31. **p51.** Schéma simplifié de la synthèse des triacylglycérols (TAG) dans les graines vertes d'*Arabidopsis thaliana*
- Figure 32. **p54.** Schéma explicatif de la formation des vésicules de réserves (PSV et oléosomes) dans les cellules de l'embryon au cours de la maturation de la graine d'Arabidopsis
- Figure 33. **p59.** Représentation de la cinétique de la teneur en eau au cours de l'imbibition de la graine et des événements métaboliques et physiologiques importants intervenant au cours de la germination
- Figure 34. **p59.** Photographies des étapes de germination de la graine d'*Arabidopsis thaliana*
- Figure 35. **p64.** Schéma de la stratégie employée pour identifier les rôles de l'autophagie au cours du développement et de la germination de la graine d'Arabidopsis
- Figure 36. **p71.** Schéma de la stratégie de clonage par la technologie Gateway
- Figure 37. **p72.** Schéma de la stratégie de clonage de la construction Prom<sub>ACTIN</sub>::GFP::ATG8f pour la transformation d'*Arabidopsis thaliana*.

- Figure 38. **p82.** Courbes d'évolution du nombre de graines viables au cours du développement chez le mutant *atg5* en condition de limitation nutritionnelle en azote et en condition d'azote non limitante
- Figure 39. **p83.** Photographies des zones apicales de siliques de plante sauvages et du mutant *atg5*
- Figure 40. **p85.** Observations de l'évolution du développement embryonnaire du sauvage et du mutant *atg5* par la méthode de Nomarski.
- Figure 41. **p86.** Observations de l'endosperme de la graine au stade torpille du sauvage et du mutant *atg5* par microscopie confocale après marquage au calcofluore
- Figure 42. **p88.** Graphiques présentant les courbes d'évolution de la masse sèche et du contenu en eau dans les graines Col et *atg5* au cours de leur développement
- Figure 43. **p89.** Diagramme de la surface plane des graines sèches Col et *atg5*
- Figure 44. **p91.** Photographies présentant l'évolution de la couleur des graines sauvages et mutantes *atg5* au cours de leur développement
- Figure 45. **p93.** Graphiques présentant le pourcentage de carbone total, d'azote total et le ratio C/N dans les graines Col et *atg5* au cours de leur développement
- Figure 46. **p95.** Graphiques présentant la cinétique d'accumulation des acides gras totaux au cours du développement de la graine Col et du mutant *atg5*
- Figure 47. **p97.** Graphiques des dosages des acides gras à chaînes courtes, à chaînes longues et minoritaires, contenus dans une graine au cours du développement chez des plantes sauvages (Col) et mutantes (*atg5*)
- Figure 48. **p99.** Photographies des mucilages solubles et insolubles de graines d'*Arabidopsis* sauvages (Col) et mutantes (*atg5*)
- Figure 49. **p99.** Graphiques présentant la surface de diffusion du mucilage soluble et l'épaisseur du mucilage insoluble quantifiées sur des graines sauvages Col et mutantes *atg5*
- Figure 50. **p101.** Graphiques présentant le dosage des protéines totales contenues par graine au cours de leur développement et à maturité chez des plantes sauvages (Col) et mutantes (*atg5*)
- Figure 51. **p102.** Western blots anti-12S et anti-2S réalisés sur extraits de protéines totales de graines sauvages Col et mutantes *atg5* de 8 à 20 JAF
- Figure 52. **p103.** Western blots anti-12S et anti-2S réalisés sur extraits de protéines totales de graines sèches de plante sauvage Col, de mutant *atg5*, et de mutants cru- et napin
- Figure 53. **p107.** Electrophorèse SDS-PAGE réalisée sur protéines totales de graines Col et *atg5* puis coloration au bleu de coomassie

- Figure 54. **p106.** Gel SDS-PAGE à deux dimensions réalisé avec un mélange d'extraits protéiques de graines matures Col et *atg5* cultivées sur 2 et 10 mM de nitrate.
- Figure 55. **p107.** Analyse en Composante Principale (ACP) des variations d'intensité de 169 spots sur 993 identifiés sur gels à deux dimensions ayant une p-value inférieure à 5%.
- Figure 56. **p108.** Diagramme de Venn présentant une ANOVA à deux facteurs (génotype et nutrition) réalisée sur la variation d'intensité des spots identifiés sur gels à deux dimensions (p-value < 0,05).
- Figure 57. **p110.** Graphiques présentant la quantification du ratio C/N par génotype en fonction de la nutrition
- Figure 58. **p115.** Graphique de l'expression moyenne de 34 gènes d'autophagie (*ATG*) dont les valeurs individuelles ont été normalisées par la valeur maximale d'expression au cours du développement de la graine, de 4 à 28 jours après fécondation de la fleur (JAF)
- Figure 59. **p116.** Graphiques présentant la cinétique d'expression moyenne de 34 gènes d'autophagie répartis en 5 groupes selon leur profil d'expression
- Figure 60. **p118.** Image de coupe longitudinale d'une valve de silique exprimant la construction Prom<sub>ATG8f</sub>::ATG8f::GUS incluse en résine
- Figure 61. **p119.** Observation en microscopie confocale des tissus vasculaires d'une silique exprimant la construction Prom<sub>ATG8f</sub>::GFP
- Figure 62. **p199.** Images de coupes d'un replum (placenta) et d'un funicule exprimant la construction Prom<sub>ATG8f</sub>::ATG8f::GUS après inclusion en résine
- Figure 63. **p121.** Suivi de la localisation d'expression par coloration GUS de 4 gènes *ATG8* au cours du développement embryonnaire d'*Arabidopsis*, du stade embryon globulaire au stade embryon mature vert
- Figure 64. **p122.** Images de la localisation d'expression par coloration GUS du gène *ATG8f* au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis* aux stades embryon globulaire, jeune embryon mature et embryon mature vert
- Figure 65. **p124.** Observations au microscope confocal d'une graine sauvage Col et de graines exprimant la construction Prom<sub>UBQ10</sub>::GFP::ATG8a au stade torpille
- Figure 66. **p126.** Observations au microscope confocal d'embryons de graines exprimant la construction Prom<sub>ACTIN</sub>::GFP::ATG8f dans un fond génétique sauvage Col et mutant *atg5* au cours du développement de la graine
- Figure 67. **p127.** Agrandissement des observations au microscope confocal de cellules d'embryons exprimant la construction Prom<sub>ACTIN</sub>::GFP::ATG8f dans un fond génétique sauvage Col et mutant *atg5* à 4 et 12 JAF



- Figure 68. **p129.** Graphique des dosages des acides gras totaux contenus dans une graine au cours de la germination et du début du développement de la plantule chez des plantes sauvages (Col) et mutantes (*atg5*)
- Figure 69. **p130.** Graphique des dosages des protéines totales contenues par graine au cours de la germination et du début du développement de la plantule chez des plantes sauvages (Col) et mutantes (*atg5*)
- Figure 70. **p132.** Graphique présentant l'expression moyenne de 34 gènes d'autophagie (ATG) dont les valeurs individuelles ont été normalisées par la valeur maximale d'expression au cours de la germination, de 30 minutes à 24 heures après début de l'imbibition de la graine
- Figure 71. **p133.** Graphiques présentant la cinétique présentant l'expression moyenne de 34 gènes d'autophagie répartis en 3 groupes selon leur profil d'expression
- Figure 72. **p135.** Observations au microscope confocal de cellules d'embryon de graines sauvages Col et mutantes *atg5*, 6 heures après imbibition, exprimant la construction GFP::ATG8f
- Figure 73. **p136.** Observations au microscope confocal de cellules d'embryon 24h après imbibition de la graine sauvage Col exprimant la construction Prom<sub>ACTIN</sub>::GFP::ATG8f
- Figure 74. **p137.** Observation au microscope confocal de plastides de cellules de l'épiderme de l'hypocotyle réalisée au cours des travaux de Michaeli et al. (2014) sur des plantules d'*Arabidopsis*, 7 jours après germination, soumises à un stress à l'obscurité (stress carboné), exprimant la construction Prom<sub>35S</sub>::ATI1::GFP
- Figure 75. **p140.** Graphique présentant la cinétique du taux de germination après un traitement de détérioration contrôlée
- Figure 76. **p142.** Schéma du transport et de la circulation des nutriments des tissus de la plante mère jusqu'à la graine
- Figure 77. **p144.** Modèle proposé expliquant le rôle de l'autophagie dans la maturation des protéines de réserve
- Figure 78. **p148.** Modèle proposé expliquant le rôle de l'autophagie dans la mobilisation des protéines de réserve

## Liste des tableaux

- Tableau 1. **p69.** Paramètres des chambres de culture
- Tableau 2. **p69.** Composition des solutions nutritives
- Tableau 3. **p78.** Bains successifs pour la déshydratation des siliques dans l'éthanol
- Tableau 4. **p79.** Bains successifs de résine pour l'inclusion des siliques
- Tableau 5. **p79.** Bains successifs de cire pour l'inclusion des siliques
- Tableau 6. **p80.** Bains successifs d'élimination de la cire sur lames

- Tableau 7. p109. Comparaison de l'identification de spots protéiques sur gels 2D par « shotgun proteomics » et par l'utilisation une base de données ([www.seed-proteome.com](http://www.seed-proteome.com))

## Liste des annexes

- Annexe 1. p173. Liste des gènes *ATG* d'*Arabidopsis thaliana* étudiés répartis par complexes
- Annexe 2. p174. Liste des amorces utilisées pour les analyses en qPCR (voir II.2.2.2.4)
- Annexe 3. p175. Graphique présentant l'expression de 34 gènes d'autophagie mesurée par qPCR sur des ADNc issus de siliques de 4 à 28 JAF
- Annexe 4. p176. Graphiques présentant l'expression normalisée par la valeur maximale d'expression individuelle de 34 gènes *ATG* au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis*
- Annexe 5. p177. Graphiques présentant les dosages d'acides gras totaux, à courtes chaînes (C18:1, C18:2, C18:3), à longues chaînes (C20:1, C22:1, C24:1) et minoritaires (C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0) au cours de la germination et du début du développement de la plantule jusqu'à 72h après imbibition de graines de génotypes Col, atg5.1, atg5.2 et atg2
- Annexe 6. p178. Graphique présentant l'expression de 34 gènes d'autophagie mesurée par qPCR sur des ADNc issus de siliques de 0,5 à 24 HAI
- Annexe 7. p179. Graphiques présentant l'expression normalisée par la valeur maximale d'expression individuelle de 34 gènes *ATG* au cours de la germination de la graine d'*Arabidopsis*

<b>I. INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
I.1 AUTOPHAGIE.....	1
<i>I.1.1 Autophagie : bases morphologiques et moléculaires</i> .....	1
I.1.1.1 Observations morphologiques de l'autophagie.....	1
I.1.1.2 Machinerie moléculaire de l'autophagie .....	3
I.1.1.3 Sélectivité de l'autophagie .....	10
<i>I.1.2 Méthodes d'étude du flux autophagique</i> .....	18
I.1.2.1 Microscopie électronique à transmission .....	18
I.1.2.2 Microscopie photonique.....	19
I.1.2.3 Méthodes biochimiques.....	20
<i>I.1.3 Rôles de l'autophagie</i> .....	21
I.1.3.1 Rôles de l'autophagie chez les animaux.....	22
I.1.3.2 Rôles de l'autophagie chez les végétaux .....	25
<i>I.1.4 Sénescence, remobilisation de l'azote et autophagie</i> .....	29
I.1.4.1 Absorption et assimilation primaire de l'azote .....	29
I.1.4.2 Remobilisation et senescence foliaire .....	31
I.1.4.3 Autophagie et remobilisation de l'azote .....	33
I.1.4.4 Autophagie et senescence foliaire.....	35
<i>I.1.5 Autophagie dans la graine</i> .....	36
I.2 DEVELOPPEMENT DE LA GRAINE D'ARABIDOPSIS THALIANA.....	37
<i>I.2.1 Développement du fruit : la silique</i> .....	37
<i>I.2.2 Développement de la graine</i> .....	39
I.2.2.1 Développement de l'ovule.....	39
I.2.2.2 Double fécondation de l'ovule .....	39
I.2.2.3 Développement embryonnaire.....	40
I.2.2.4 Développement et dégradation de l'endosperme .....	41
I.2.2.5 Développement des téguments de la graine.....	43
I.2.2.6 Apports nutritifs carbonés et azotés de la plante mère à la graine .....	46
<i>I.2.3 Maturation et constitution des réserves de l'embryon</i> .....	49
I.2.3.1 Lipides de réserve : du saccharose aux triacylglycérols.....	50
I.2.3.2 Protéines de réserve.....	52
I.3 DESSICCATION ET DORMANCE DE LA GRAINE D'ARABIDOPSIS .....	55
I.4 GERMINATION DE LA GRAINE D'ARABIDOPSIS.....	57
<i>I.4.1 Graine sèche</i> .....	57
<i>I.4.2 Imbibition et germination de la graine</i> .....	58
<i>I.4.3 Mobilisation des molécules de réserve</i> .....	59
I.4.3.1 Mobilisation des protéines de réserve et formation de la vacuole lytique.....	59
I.4.3.2 Lipides de réserve .....	60
I.5 OBJECTIFS DE THESE.....	62

<b>II. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>65</b>
II.1 MATERIELS .....	65
II.1.1 <i>Matériel végétal</i> .....	65
II.1.1.1 Ecotype sauvage <i>Columbia-0</i> (Col) .....	65
II.1.1.2 Mutants d'autophagie <i>atg5.1</i> , <i>atg5.2</i> et <i>atg2</i> .....	65
II.1.1.3 Mutants <i>cru-</i> et <i>napin</i> .....	65
II.1.1.4 Fusions transcriptionnelles et traductionnelles ATG8::GFP .....	66
II.1.2 <i>Souches bactériennes</i> .....	66
II.1.3 <i>Vecteurs</i> .....	66
II.2 METHODES .....	68
II.2.1 <i>Culture des plantes</i> .....	68
II.2.1.1 Cultures en serre .....	68
II.2.1.2 Culture en conditions contrôlées .....	68
II.2.1.3 Marquage des boutons floraux .....	69
II.2.1.4 Transformation des plantes par <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	70
II.2.2 <i>Techniques de biologie moléculaire</i> .....	70
II.2.2.1 Stratégies de clonage .....	70
II.2.2.2 PCR quantitative .....	72
II.2.3 <i>Analyses biométriques</i> .....	74
II.2.3.1 Mesure de la taille des graines .....	74
II.2.3.2 Mesure de la masse et du contenu en eau des graines .....	74
II.2.3.3 Mesure de l'aire de diffusion des mucilages solubles et insolubles .....	74
II.2.4 <i>Analyses biochimiques</i> .....	75
II.2.4.1 Quantification du carbone et de l'azote total .....	75
II.2.4.2 Dosage des acides gras .....	75
II.2.4.3 Dosage des protéines totales .....	75
II.2.4.4 Séparation des protéines .....	75
II.2.5 <i>Analyses cytologiques</i> .....	77
II.2.5.1 Fixation .....	77
II.2.5.2 Décoloration des graines .....	77
II.2.5.3 Coloration GUS .....	77
II.2.5.4 Coloration des parois cellulaires au calcofluor .....	78
II.2.5.5 Coupes du matériel végétal .....	78
II.2.5.6 Immunolocalisation .....	79
II.2.6 <i>Microscopie</i> .....	80
<b>III. RESULTATS .....</b>	<b>81</b>
III.1 AUTOPHAGIE ET REMPLISSAGE DE LA GRAINE .....	81
III.1.1 <i>Autophagie et arrêt de croissance de l'embryon</i> .....	81
III.1.1.1 Nombre de graines par silique et taux d'avortement .....	81
III.1.1.2 Suivi du développement de l'embryon .....	83

III.1.1.3	Dégradation de l'endosperme.....	86
III.1.1.4	Conclusion intermédiaire – Autophagie et taux d'avortement.....	87
III.1.2	<i>Autophagie et phénotypes morphologiques des graines viables.....</i>	<i>87</i>
III.1.2.1	Masse des graines au cours du développement.....	87
III.1.2.2	Surface des graines sèches.....	89
III.1.2.3	Couleur des graines au cours du développement.....	90
III.1.3	<i>Autophagie et constitution des réserves de la graine.....</i>	<i>91</i>
III.1.3.1	Quantification du carbone et de l'azote total.....	91
III.1.3.2	Dosage des acides gras.....	94
III.1.3.3	Diffusion du mucilage de la graine mature.....	97
III.1.3.4	Dosage des protéines de réserve.....	100
III.1.3.5	Conclusion - Autophagie et remplissage de la graine.....	109
III.2	LOCALISATION D'EXPRESSION GENIQUE ET ACTIVITE AUTOPHAGIQUE.....	113
III.2.1	<i>Expression des gènes ATG au cours du développement de la graine.....</i>	<i>113</i>
III.2.2	<i>Localisation tissulaire de l'expression des gènes ATG8.....</i>	<i>117</i>
III.2.2.1	Dans la silique.....	117
III.2.2.2	Dans le funicule.....	118
III.2.2.3	Dans la graine au cours du développement.....	120
III.2.3	<i>Activité autophagique dans la graine en développement.....</i>	<i>122</i>
III.3	AUTOPHAGIE ET GERMINATION DE LA GRAINE.....	128
III.3.1	<i>Mobilisation des réserves.....</i>	<i>128</i>
III.3.1.1	Mobilisation des acides gras.....	128
III.3.1.2	Mobilisation des protéines de réserve.....	129
III.3.2	<i>Expression des gènes ATG au cours de la germination de la graine.....</i>	<i>130</i>
III.3.3	<i>Observation de la localisation de la protéine ATG8 au cours de la germination de la graine</i>	<i>133</i>
III.3.4	<i>Conclusion – Autophagie et germination de la graine.....</i>	<i>137</i>
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSIONS ET DISCUSSIONS.....</b>	<b>138</b>
IV.1	AUTOPHAGIE, MATURATION ET VIEILLISSEMENT DE LA GRAINE.....	139
IV.2	AUTOPHAGIE ET NUTRITION DE LA GRAINE.....	141
IV.3	AUTOPHAGIE ET CONSTITUTION DES RESERVES DE LA GRAINE.....	143
IV.4	AUTOPHAGIE ET MOBILISATION DES RESERVES DE LA GRAINE.....	147
<b>V.</b>	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>151</b>
<b>VI.</b>	<b>ANNEXES.....</b>	<b>173</b>

## I. INTRODUCTION

### I.1 Autophagie

#### I.1.1 Autophagie : bases morphologiques et moléculaires

##### I.1.1.1 Observations morphologiques de l'autophagie

###### I.1.1.1.1 Découverte de l'autophagie

Il existe chez tous les organismes vivants des systèmes de régulation de la synthèse et de la dégradation des macromolécules dont dépend l'homéostasie cellulaire. La cellule eucaryote dispose de deux mécanismes principaux pour la dégradation de ses composants qui diffèrent dans leur fonction et dans la nature de leur substrat : la voie ubiquitine-protéasome, responsable de la dégradation des protéines à durée de vie courte, et la voie de l'autophagie, responsable de la dégradation des protéines à durée de vie longue (Ciechanover, 1994, pour revue).

L'autophagie est un mécanisme de dégradation fortement conservé au cours de l'évolution des Eucaryotes et par lequel la cellule est capable de recycler son matériel cytoplasmique. L'autophagie a été l'une des premières voies de dégradation mise en évidence suite à la description de vacuoles lytiques appelées lysosomes en 1955 par Christian de Duve et ses collaborateurs (de Duve et al., 1955 ; de Duve and Wattiaux, 1966). Le terme autophagie, dérivé du grec *auto* : soi-même et *phagein* : manger ; donc « se manger soi-même » a été utilisé pour la première fois en 1963 par de Duve (de Duve and Wattiaux, 1966 ; Klionsky, 2008, pour revue). L'autophagie fonctionne en effet à un niveau basal pour éliminer certaines structures cellulaires telles que les organites endommagés et des agrégats de protéines par séquestration d'une portion cytoplasmique. Cette séquestration est réalisée par l'intermédiaire d'une structure dénommée autophagosome, qui effectue un déchargement de son contenu dans la vacuole lytique chez les champignons et végétaux, et dans le lysosome chez les animaux. Les autophagosomes sont des vésicules à double membrane qui ont été observées pour la première fois en 1967 sur des cellules hépatiques de rat par microscopie électronique (Deter et al., 1967).

Ce mécanisme de dégradation a longtemps été considéré comme non sélectif jusqu'à la compréhension de la machinerie moléculaire de l'autophagie. Ce n'est en effet qu'à la fin des années 1990 que des études moléculaires menées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont permis de caractériser les premiers gènes impliqués dans l'autophagie, appelés gènes *ATG* (pour *Autophagy related gene* ou AuTophagie) (Baba et al., 1994 ; Matsuura et al., 1997 ; Takeshige et al., 1992 ;

Thumm et al., 1994). Chez la levure, une cinquantaine de gènes *ATG* différents ont été décrits (Farré and Subramani, 2016, pour revue).

Pour la plupart d'entre eux, des homologues ont été identifiés et décrits chez les mammifères (Meijer and Codogno, 2004, pour revue) puis chez les végétaux (Kim et al., 2012, pour revue). La nomenclature des gènes *ATG* de mammifères n'est pas stricte car leur parenté avec un gène *ATG* de levure a été établie *a posteriori*.

### *1.1.1.1.2 Différents types d'autophagie*

Jusqu'à présent, quatre types d'autophagie ont été décrits : la micro-autophagie, l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes, l'autophagie ciblant les ARN et la forme la plus décrite : la macro-autophagie.

La micro-autophagie désigne un processus impliquant l'invagination de la membrane de la vacuole pour séquestrer de petits constituants cytoplasmiques et les dégrader par les hydrolases vacuolaires (de Duve and Wattiaux, 1966). Bien que l'activité de la micro-autophagie soit considérée comme relativement importante, peu d'études existent à ce jour concernant le processus de sélection du matériel cellulaire à dégrader. Chez les plantes, des structures ressemblantes appelées pro-vacuoles ont été observées dans les méristèmes racinaires de maïs et d'*Euphorbia* (Marty, 1978 ; Matile and Moor, 1968). Plus récemment, il a été montré que les anthocyanes cytoplasmiques présentes dans les cotylédons d'*Arabidopsis thaliana* et dans les pétales violets de *Lisianthus* s'agrègent en contact de la surface du tonoplaste avant d'y être englobées par un processus ressemblant à la micro-autophagie (Chanoca et al., 2015).

L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes (CMA), quant à elle, est un processus de dégradation sélective de protéines cytosoliques présentant des séquences consensus KFERQ ou «KFERQlike ». Au cours de ce processus, ces protéines sont reconnues par la protéine chaperonne Hsc70 (Heat Shock Cognate protein) qui assure leur dépliement et leur transport à la protéine vacuolaire LAMP-2A (Lysosomal Associated Membrane protein Type 2A)(Chiang et al., 1989 ; Kaushik and Cuervo, 2012, pour revue). A ce jour, la CMA n'a jamais été décrite dans des cellules végétales.

L'autophagie ciblant spécifiquement les ARN, appelée RNautophagie, est indépendante de la protéine Hsc70, contrairement à la CMA. Cependant, une étude menée sur des cellules cérébrales de souris a montré que des ARN sont réceptionnés au niveau de la vacuole par la protéine LAMP-2C avant d'être dégradés. La séquence de LAMP-2C et son affinité pour les ARN sont très conservées au cours de l'évolution des Eucaryotes, du nématode à l'humain (Fujiwara et al., 2013). A ce jour chez les végétaux, seule la dégradation des ARN ribosomiaux a été décrite (voir 1.1.1.3.4) (Floyd et al., 2015).

#### *1.1.1.1.3 Macro-autophagie*

La macro-autophagie est la forme prépondérante et la mieux décrite parmi les différentes formes d'autophagie. Lorsque l'on parle d'autophagie, on fait communément référence à la macro-autophagie.

Le processus de la macro-autophagie se déroule en plusieurs étapes (Fig. 1). La première étape s'initie dans le cytoplasme par la formation d'une double membrane appelée phagophore. Cette membrane s'allonge ensuite par recrutement de lipides pour séquestrer une partie du contenu cytoplasmique et former une vésicule délimitée par une double membrane nommée autophagosome. L'autophagosome migre alors vers la vacuole lytique et sa membrane externe fusionne avec celle de la vacuole pour y libérer le corps autophagique. La dernière étape de ce processus consiste en la dégradation du contenu de l'autophagosome par les enzymes vacuolaires. Les constituants cellulaires ainsi dégradés seront ensuite réutilisés par la cellule.

#### *1.1.1.1.4 Origine de la membrane du phagophore*

Depuis la découverte des autophagosomes, l'origine de leur membrane reste encore aujourd'hui méconnue. Des études consistant à l'analyse biochimique de vésicules autophagiques purifiées ainsi que des observations par microscopie électronique ont été réalisées, mais le manque de marqueurs spécifiques avec des fonctions claires laisse les résultats difficiles à interpréter quant à l'origine de la membrane (Fengsrud et al., 1995 ; Strømhaug et al., 1998). En effet, les autophagosomes séquestrent des portions cytoplasmiques pouvant contenir des organites très différents, et donc des protéines variées, et la membrane de l'autophagosome elle-même est pauvre en protéines pouvant servir de marqueurs (Weidberg et al., 2011, pour revue). La protéine ATG8 est cependant considérée comme un bon marqueur de la membrane des autophagosomes (Klionsky et al., 2012, pour revue).

Néanmoins, ces études soutiennent l'hypothèse selon laquelle les autophagosomes seraient formés *de novo* avec assemblage et élongation des structures membranaires (Fengsrud et al., 1995 ; Strømhaug et al., 1998). Cela impliquerait un site spécifique pour la synthèse du phagophore. D'autres études suggèrent au contraire que les autophagosomes seraient formés à partir d'organites préexistants, comme le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi ou les endosomes (Reggiori, 2006).

#### *1.1.1.2 Machinerie moléculaire de l'autophagie*

L'étude de la machinerie moléculaire de l'autophagie a débuté avec l'identification des gènes *ATG* (Fig. 1). La levure *Saccharomyces cerevisiae* a été le premier organisme modèle pour l'étude de l'autophagie, et jusqu'à présent, une quarantaine de gènes liés à la macro-autophagie ont été



identifiés. La plupart de ces gènes ont des orthologues connus chez d'autres espèces eucaryotes. Pour plus de simplicité, la nomenclature de la levure est communément utilisée pour la description des différents complexes et systèmes protéiques intervenant dans la formation de l'autophagosome. Ainsi, les complexes de régulation ATG1 et PI3K interviennent dans l'initiation de la formation du phagophore tandis que le complexe ATG9 et les systèmes de conjugaison ATG8 et ATG12 permettent l'élongation de la membrane. La liste des gènes *ATG d'Arabidopsis thaliana* étudiés lors de ce travail de thèse est consignée en annexe 1.

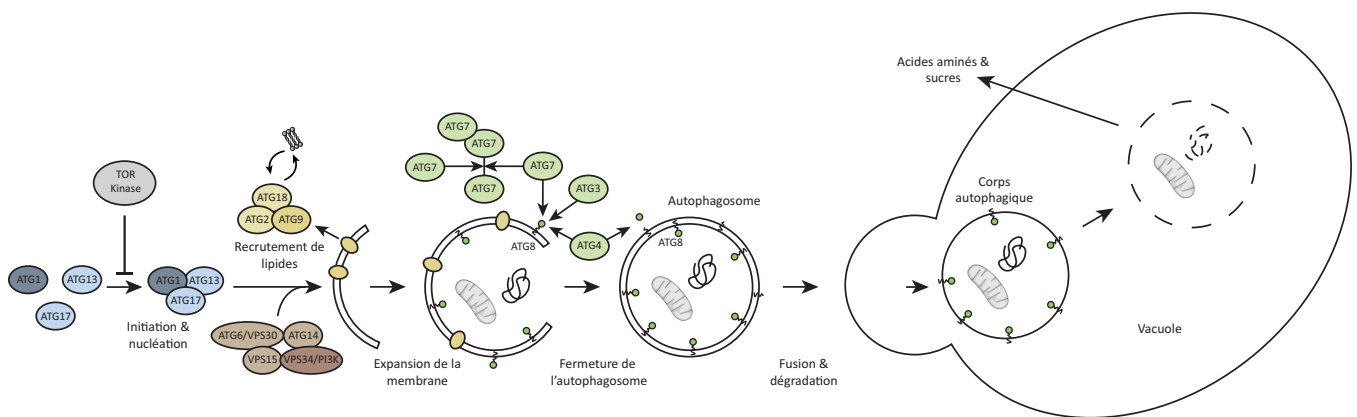


Figure 1. Représentation schématique du cœur de la machinerie moléculaire de la macro-autophagie. En conditions normales de croissance, l'activité autophagique est négativement régulée par TOR (Target Of Rapamycin) kinase pour être maintenue à un état basal. Les complexes ATG1 et PI3K sont responsables de l'initiation de l'autophagie. Le complexe ATG9 permet l'assemblage de la double membrane du phagophore, qui s'étend grâce aux systèmes de conjugaison pour former l'autophagosome. L'autophagosome fusionne avec la vacuole (ou le lysosome chez les animaux) dans laquelle le corps autophagique et son contenu seront dégradés par des enzymes vacuolaires (Avila-Ospina et al., 2014 ; Denton et al., 2015, pour revues).

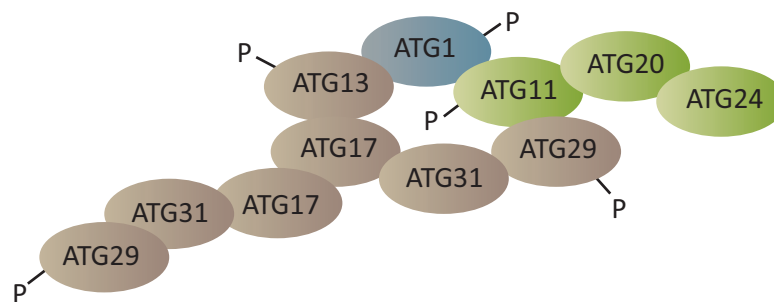
#### 1.1.1.2.1 Complexe de régulation ATG1

ATG1 est une protéine kinase capable de s'autophosphoryler et probablement de phosphoryler d'autres cibles. Cependant, les substrats d'ATG1 en rapport avec le processus autophagique restent encore inconnus. ATG1 forme un complexe avec les protéines ATG13, ATG17, ATG29 et ATG31 (Fig. 2) (Reggiori and Klionsky, 2013, pour revue). La protéine ATG13 est déphosphorylée ou hyperphosphorylée selon les conditions nutritionnelles de la cellule. En effet, en cas de carence nutritionnelle, le complexe TOR (Target of Rapamycin) facilite la déphosphorylation de la protéine ATG13, lui conférant une grande affinité pour les protéines ATG1 et ATG17 avec lesquelles elle s'assemble. La formation de ce complexe permet l'augmentation de l'activité kinase d'ATG1, qui est ainsi essentielle pour recruter les autres protéines permettant l'initiation de la formation du phagophore. Il est aussi à noter que les protéines ATG11, ATG20 et ATG24 peuvent

former un sous-complexe ayant une forte affinité pour le complexe ATG1 et permettant également une activité kinase maximale d'ATG1.

Récemment, un nouveau rôle pour le complexe ATG1 a été identifié lors des dernières étapes du processus autophagique, lui attribuant avec ATG11 la fonction de réguler la fusion spécifique de l'autophagosome avec la vacuole. ATG17 et ATG11 interagissent en effet de façon indépendante avec la protéine vacuolaire VAM7 de type SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor). Il a été montré qu'une mutation dans le site d'interaction d'ATG17 avec VAM7 conduisait à un défaut de fusion de l'autophagosome avec la vacuole. Le complexe ATG1 joue ainsi un rôle important dans l'initiation de l'autophagie, mais aussi dans ses dernières étapes (Liu et al., 2016).

Chez *Arabidopsis*, 3 gènes *ATG1*, 2 gènes *ATG13* et 1 gène ayant à la fois une homologie de séquence pour *ATG11* et *ATG17* ont été identifiés. Aucune étude sur des mutants pour ces gènes n'a été publiée jusqu'à présent.



*Figure 2. Schématisation de l'interactome du complexe ATG1 de la levure Saccharomyces cerevisiae. En cas de carence nutritionnelle, ATG13 est déphosphorylée et initie la formation du complexe ATG1 avec la complexation d'ATG17, ATG29 et ATG31. ATG11 a également une forte affinité pour ATG1 et ATG29, et peut former un sous-complexe avec ATG20 et ATG24. Il est à noter que ces interactions ne se produisent probablement pas de manière simultanée (Reggiori and Klionsky, 2013, pour revue).*

#### 1.1.1.2.2 Complexe PI3K

Chez la levure, il y a au moins deux complexes protéiques qui dirigent la synthèse de phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns3P), lipide participant à la formation de l'autophagosome au niveau de la structure pré-autophagosomale (PAS) (Reggiori and Klionsky, 2013, pour revue). Ces deux complexes incluent un régulateur de kinase VPS15, ainsi que VPS34 qui est l'unique phosphatidylinositol-3-kinase de la levure, et VPS30 également appelé ATG6 (Fig. 3). Le complexe I inclue la protéine ATG14 et est impliqué dans l'autophagie, tandis que le complexe II contient VPS38 et est impliqué dans le trafic endosomal, l'endocytose et ce que l'on appelle la voie du « Vacuolar Protein Sorting » qui permet le transport sélectif de protéines du Golgi à la vacuole *via* les endosomes. Dans le complexe I, VPS30 (ATG6) interagit directement avec ATG14 (Kametaka et al.,

1998) et son rôle est inconnu. Peu de protéines ATG se lient à la PtdIns3P, suggérant que l'une des fonctions de ce phosphoinositide est le recrutement de protéines ayant elles-mêmes une fonction dans la formation du phagophore et de l'autophagosome. Cependant, il n'est pas à exclure que la PtdIns3P puisse réguler l'activité d'une ou plusieurs protéines ATG (Reggiori and Klionsky, 2013, pour revue).

Des homologues des protéines VPS15, VPS30 (ATG6) et VPS34 ont été identifiés chez les plantes par homologie de séquence. Il est à noter qu'une plante homozygote pour la mutation du gène *ATG6* n'est pas viable, puisqu'elle est affectée dans le processus de fécondation de l'ovule par le pollen. Le mutant *atg6* est ainsi défini comme mâle stérile (Qin et al., 2007).

#### Complexe I

#### Complexe II

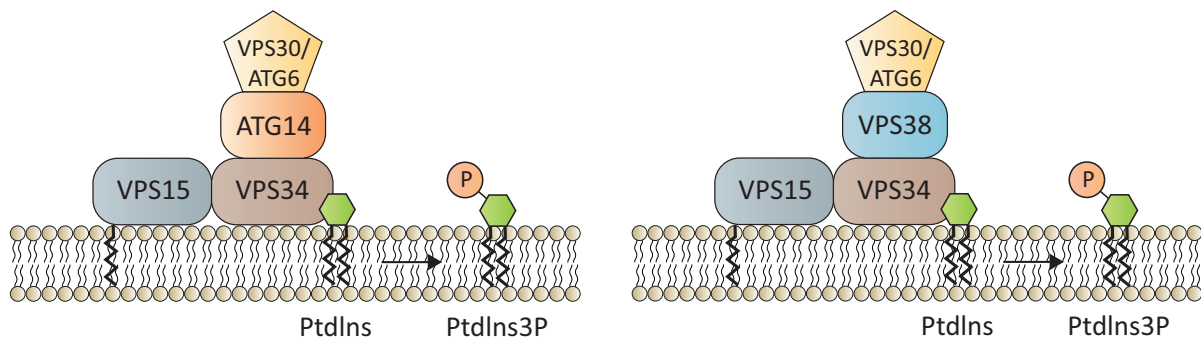


Figure 3. Schémas des complexes PI3K. Les complexes phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) I et II sont composés des sous-unités communes VPS34, VPS30 (ATG6) et VPS15, et de sous-unités qui leur sont propres : ATG14 et VPS38 respectivement (Nakatogawa et al., 2009, pour revue).

#### 1.1.1.2.3 Complexe ATG9

ATG9 est l'unique protéine transmembranaire nécessaire à l'autophagie. ATG9, principalement située sur la surface externe du phagophore en formation, est recyclée de la membrane autophagosomale juste avant ou après fusion de l'autophagosome avec la vacuole. Les données actuelles indiquent que rapidement après synthèse, ATG9 se retrouve dans le réticulum endoplasmique, et de là atteint l'appareil de Golgi où elle se retrouve dans de petites vésicules (Reggiori and Klionsky, 2013, pour revue). Une étude appuie l'hypothèse selon laquelle ces vésicules deviendraient indépendantes et que l'une ou plusieurs d'entre elles se déplaceraient à proximité de la vacuole pour devenir des structures pré-autophagosomales (PAS) lors de l'induction de l'autophagie (Wang et al., 2012). ATG18 et ATG2 sont des protéines périphériques de la membrane qui interagissent entre elles et s'associent avec ATG9 au niveau du PAS (Fig. 4). Chez des mutants pour les protéines ATG18 et ATG2, on observe une absence de la protéine ATG9 dans le PAS (Reggiori et al., 2004). Le rôle précis des protéines ATG2 et ATG18 reste inconnu quant à leur fonction dans la formation de l'autophagosome ainsi que pour le mécanisme par lequel ATG9 est recyclée de la

membrane de l'autophagosome. Le recrutement d'ATG2 et ATG18 au niveau du PAS dépend de la présence de PtdIns3P généré par le complexe PI3K (Reggiori and Klionsky, 2013, pour revue).

Des études sur des plantes d'*Arabidopsis* ne produisant pas les protéines ATG2, ATG9 ou ATG18a ont montré leur incapacité à former des autophagosomes (Hanaoka et al., 2002 ; Inoue et al., 2006 ; Xiong et al., 2005).

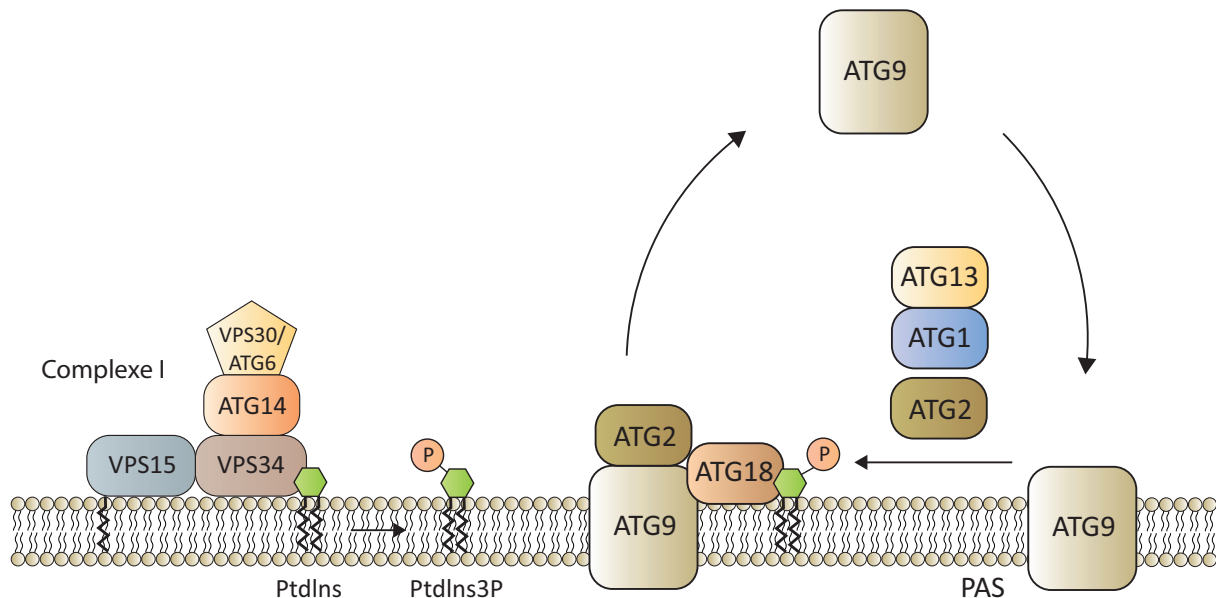


Figure 4. Schéma du recyclage de la protéine ATG9. ATG9 est localisée au niveau du PAS. Le complexe PI3K (complexe I) génère de la PtdIns3P qui s'associe à ATG18, la localisant au niveau du PAS. Le complexe ATG1 induit l'interaction d'ATG2 et ATG18 avec ATG9. Enfin, ce dernier complexe une fois formé permet de décrocher ATG9 du PAS (Yorimitsu and Klionsky, 2005, pour revue).

#### 1.1.1.2.4 Systèmes de conjugaison

Il existe deux complexes de conjugaison dits « Ubiquitin-like » qui participent à l'autophagie, impliquant ATG8 et ATG12 (Reggiori and Klionsky, 2013, pour revue).

Une étude par cristallographie a montré que la protéine ATG8 a une structure similaire à celle de l'Ubiquitine (Sugawara et al., 2004). L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle de protéines chez les Eucaryotes au cours de laquelle une ou plusieurs protéines d'Ubiquitine s'attachent à une protéine cible, laquelle est alors marquée pour être dégradée dans les protéasomes de la cellule. La fixation d'Ubiquitine(s) sur la protéine nécessite l'intervention successive de trois enzymes appelées E1, E2 et E3 ligases. La protéine « Ubiquitin-like » ATG8 est synthétisée avec une queue C-terminale arginine qui est clivée par la protéase à cystéines ATG4 et est ensuite activée par une réaction ATP-dépendante *via* ATG7, un homologue d'une E1-ligase, puis transférée à ATG3, analogue d'une E2-ligase (Fig. 5a). ATG3 forme une liaison covalente entre la glycine désormais en C-terminale d'ATG8 et la phosphatidyléthanolamine (PE), un lipide

membranaire (Ichimura et al., 2000). ATG8 est initialement située des deux côtés de la membrane du phagophore, mais ATG4 peut cliver la liaison amide libérant ATG8 de la PE sur la face externe de l'autophagosome en formation, permettant ainsi sa circularisation (Reggiori and Klionsky, 2013, pour revue).

L'analyse par cristallographie de la structure d'ATG12b chez *Arabidopsis thaliana* suggère que son homologue ATG12 chez la levure contiendrait également un domaine semblable à celui de l'Ubiquitine et participerait à un système de conjugaison parallèle (Suzuki et al., 2005). Cette protéine est aussi activée par ATG7 et est transférée à l'enzyme de conjugaison ATG10, qui catalyse la formation d'une liaison covalente entre la glycine C-terminale d'ATG12 et le résidu lysine d'ATG5, protéine qui possède aussi deux domaines semblables à ceux de l'ubiquitine (Fig. 5b) (Mizushima et al., 1998). Il est à noter que les mutations qui interfèrent avec ATG5 inhibent la macro-autophagie (Suzuki et al., 2005). ATG5, ou préférentiellement les protéines conjuguées ATG12-ATG5, se lie ensuite de façon non covalente à ATG16, créant un complexe ATG12-ATG5-ATG16 (Fujioka et al., 2010). La fonction de ce complexe serait équivalente à une E3-ligase pour la conjugaison d'ATG8 à la PE (Otomo et al., 2013). La fonction du complexe ATG12-ATG5-ATG16 reste peu claire aujourd'hui mais agirait probablement comme une plateforme permettant de mettre à proximité la protéine ATG8 liée à ATG3 et le site de liaison de la PE (Otomo et al., 2013). Néanmoins chez *Arabidopsis thaliana*, une étude récente suggère que le phagophore se formerait au contact de la membrane du réticulum endoplasmique et que le complexe ATG12-ATG5-ATG16 pourrait être impliqué dans l'attachement de ces deux membranes avant relargage de l'autophagosome. Cette même étude propose également un rôle pour ce complexe avec ATG5 dans l'étape de scellage de l'autophagosome en une vésicule fermée (Le Bars et al., 2014).

La liaison des protéines intervenant dans le système de conjugaison ATG8 sur la membrane, c'est-à-dire ATG7 et ATG3, dépend du système de conjugaison ATG12. Ces deux systèmes de conjugaison permettent l'élongation de la membrane de l'autophagosome (Reggiori and Klionsky, 2013, pour revue).

Au cours de l'induction de l'autophagie, ATG8 est la protéine dont la synthèse augmente le plus parmi toutes les protéines ATG et sa quantité est directement corrélée à la taille de l'autophagosome (Xie et al., 2008). ATG8, présente sur la face concave de l'autophagosome, joue également un rôle primordial dans la reconnaissance des protéines à dégrader, appelées cargos, au cours des différents types d'autophagie sélective (Fig. 6) (Reggiori and Klionsky, 2013, pour revue).

Chez *Arabidopsis thaliana*, au moins un homologue pour chaque gène impliqué dans le système de conjugaison a été identifié.

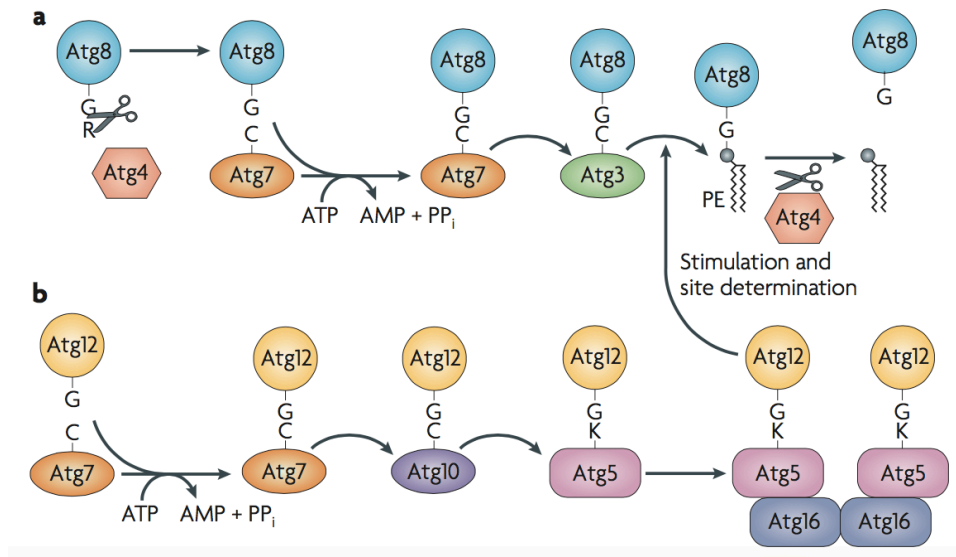


Figure 5. Schéma des systèmes de conjugaison ATG8 et ATG12. a) Le système de conjugaison d'ATG8. En premier lieu, ATG4 clive le résidu arginine (R) d'ATG8 en position C-terminale pour exposer un résidu glycine (G). ATG8 est ensuite activée par ATG7, transférée à ATG3 et finalement conjuguée à la phosphatidyléthanolamine (PE). ATG4 clive également la liaison entre ATG8 et la PE pour libérer la protéine de la membrane. b) Le système de conjugaison ATG12. ATG12 est activée par ATG7 puis transférée à l'enzyme de conjugaison ATG10. ATG10 catalyse ensuite la formation d'une liaison covalente entre le résidu glycine (G) d'ATG12 et le résidu lysine (K) d'ATG5 de la même manière qu'ATG8 est liée à ATG3. Les protéines ATG12-ATG5 conjuguées interagissent avec ATG16 et forment un oligomère. Le complexe ATG12-ATG5-ATG16 exerce une fonction similaire à une E3-ligase pour la réaction de conjugaison d'ATG8. La réaction de transfert d'ATG8 depuis ATG3 jusqu'à la PE est stimulée par ce complexe (Nakatogawa et al., 2009, pour revue).

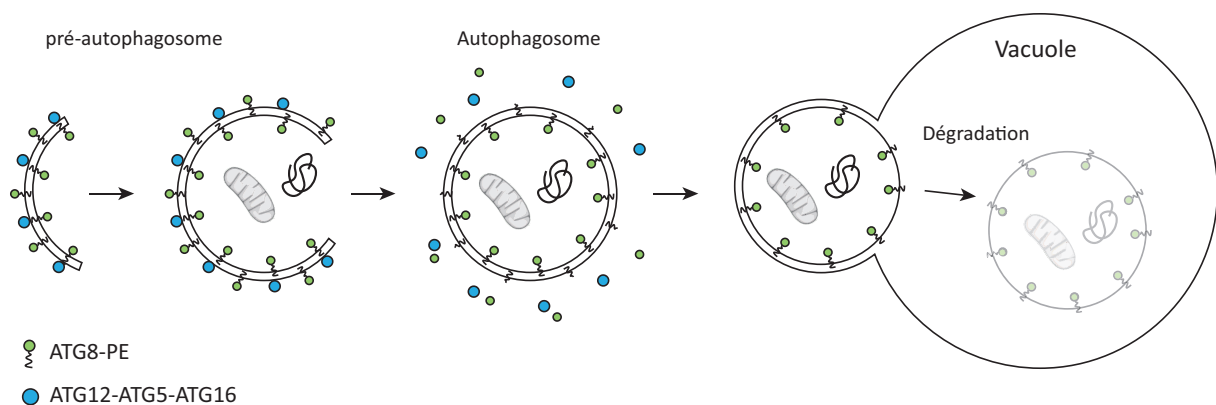


Figure 6. Localisation schématique des protéines « Ubiquitin-like » de l'autophagie conjuguées à la membrane de l'autophagosome. ATG8-PE est présente sur les deux faces de la membrane du phagophore, puis seules restent celles de la surface interne de l'autophagosome formé, qui seront dégradées avec le corps autophagique une fois dans la vacuole. Le complexe ATG12-ATG5-ATG16, préférentiellement situé sur la membrane externe du phagophore, sera dissocié de la membrane avant fermeture de l'autophagosome. Inspiré de Nakatogawa et al., 2009 (pour revue).

## I.1.1.3 Sélectivité de l'autophagie

L'autophagie a pendant longtemps été considérée comme un mécanisme de dégradation non-sélectif des constituants cellulaires, notamment lors d'une carence nutritive. Cependant, de nombreuses données récentes de la littérature démontrent l'existence de plusieurs formes d'autophagie sélective pour des protéines ou des organites spécifiques, utilisant les mécanismes de la macro-autophagie (Schreiber and Peter, 2014 ; Yang and Klionsky, 2009, pour revues). Cette autophagie sélective requiert la présence des protéines adaptatrices impliquées dans la reconnaissance des substrats spécifiques et leur recrutement vers l'autophagosome (Fig. 7). Ces substrats peuvent être spécifiques d'organites ou de protéines cibles.

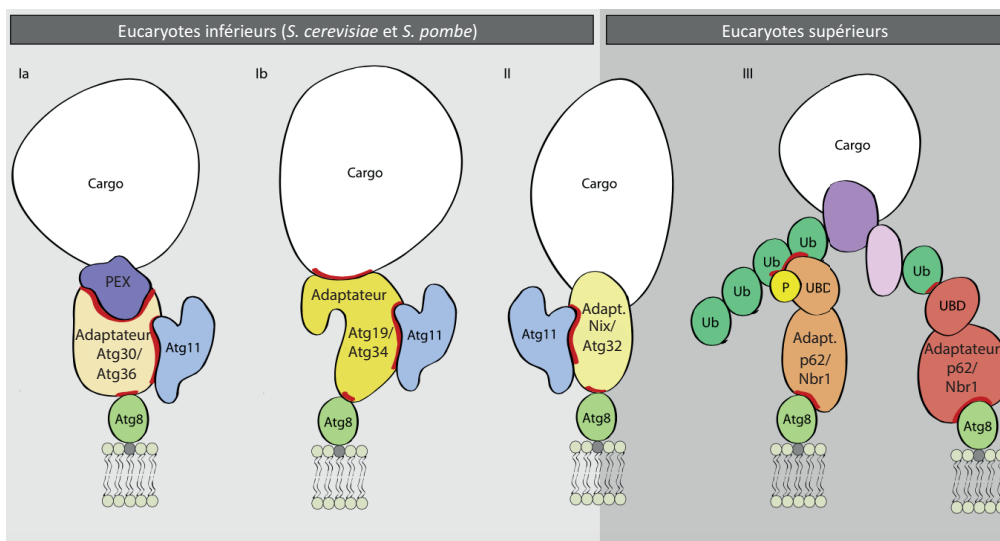


Figure 7. Schémas des types de liaisons et de régulations du recrutement des cargos dans l'autophagie sélective. La classification des adaptateurs pour les cargos dépend de leur mode de liaison avec leur substrat. Les adaptateurs de classe Ia et Ib n'ont été décrits que chez la levure, alors que les adaptateurs de classe III, dépendants de l'Ubiquitine, n'ont été jusqu'à présent caractérisés que chez les Eucaryotes supérieurs. Les adaptateurs de cargos Ia, spécifiques du peroxysome et caractérisés par ATG30 et ATG36, reconnaissent spécifiquement les membranes des peroxysomes ou bien des protéines associées à leur membrane comme PEX. Les adaptateurs de cargos Ib, spécifiques de la voie autophagique appelée CVT (Cytoplasm to Vacuole Targeting pathway) et impliquant ATG19 et ATG34, se lient directement à des protéines cytosoliques plutôt qu'à des organites. Les adaptateurs de classe Ia et Ib se lient tous les deux à la protéine ATG11. Les adaptateurs de classe II, comprenant NIX et ATG32 sont particuliers puisqu'ils font partie intégrante de la cible elle-même. En effet, ces adaptateurs sont des protéines transmembranaires de certains organites comme la mitochondrie. Par conséquent, l'interface entre l'adaptateur et ATG8 constitue le seul régulateur de cette sélection, suggérant une régulation fine. Cependant, la levure est capable de réguler l'interface entre le cargo et ATG11 lui conférant ainsi un deuxième mécanisme potentiel de régulation. Les adaptateurs de classe III reconnaissent les cargos marqués par l'Ubiquitine. Ainsi, la plupart des adaptateurs chez les Eucaryotes supérieurs possèdent des

domaines de liaison dédiés à l'Ubiquitine. Les interfaces potentielles de régulation sont indiquées en rouge (Schreiber and Peter, 2014, pour revue).

#### 1.1.1.3.1 CVT pathway

Le CVT pathway, pour « Cytosol to Vacuole Targeting pathway » est une forme sélective d'autophagie jusqu'à aujourd'hui uniquement identifiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 8). La protéine prApe1, principal cargo du CVT pathway, est synthétisée dans le cytoplasme sous la forme d'un précurseur inactif de l'aminopeptidase 1. Les monomères de prApe1 s'assemblent dans le cytoplasme pour former des dodécamères qui s'agrègent entre eux pour former de plus grosses particules. Le récepteur de cargo ATG19 se lie spécifiquement au pro-peptide prApe1 et peut également se lier à la protéine AMS1, l'incluant ainsi dans le dénommé « complexe CVT ». Par la suite, ATG19 permet le recrutement du complexe CVT jusqu'à la structure pré-autophagosomale par une interaction avec ATG11. Enfin, l'interaction d'ATG19 avec ATG8 de la membrane permet la séquestration du complexe CVT par une vésicule CVT (Zaffagnini and Martens, 2016, pour revue). Cette vésicule sera alors délivrée dans la vacuole où le pro-peptide de prApe1 inactif sera dégradé et transformé en aminopeptidase active (Lynch-Day and Klionsky, 2010, pour revue).

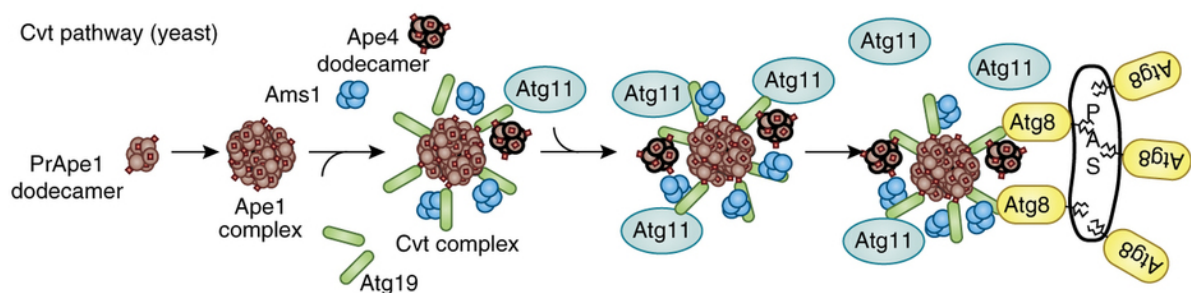


Figure 8. Schéma du CVT pathway chez la levure. Le pro-peptide de précurseur aminopeptidase 1 (prApe1) est le ligand qui lie le récepteur ATG19. Ce dernier interagit avec ATG11 et contient également un motif AIM pour se lier à ATG8, connectant ainsi le cargo avec le phagophore (Klionsky and Schulman, 2014, pour revue).

#### 1.1.1.3.2 Pexophagie

Les peroxysomes sont des organites à membrane simple qui assurent des fonctions essentielles dans la cellule, comme la  $\beta$ -oxydation des acides gras et la détoxification des composés réactifs de l'oxygène. La nature oxydative du métabolisme du peroxysome le prédispose à se détériorer plus facilement que d'autres organites, soulignant le besoin d'un mécanisme de recyclage lorsque ces organites sont endommagés. Une compréhension détaillée de la pexophagie a été obtenue par l'étude de différentes levures, comme *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* et *Hansenula polymorpha*, en raison de la très rapide induction de la pexophagie en réponse à des modifications des sources carbonées (Oku and Sakai, 2015, pour revue). Ainsi, deux voies de



dégradation du peroxysome ont été identifiées chez ces levures. La première possède un mécanisme similaire à la macro-autophagie où le peroxysome est complètement séquestré par une structure à double membrane, appelée macro-pexophagosome, qui fusionnera avec la vacuole. La deuxième voie de dégradation du peroxysome, appelée micro-pexophagie, implique une invagination de la membrane de la vacuole pour piéger l'organite (Oku and Sakai, 2015, pour revue). Chez la levure, ATG30 et ATG36 ont été identifiées comme étant les protéines adaptatrices ciblant les protéines PEX (Fig. 7) de la membrane du peroxysome (Farré et al., 2008 ; Motley et al., 2012).

Chez les plantes, la pexophagie n'a été décrite que très récemment (Shibata et al., 2013 ; Young and Bartel, 2015, pour revue), mais aucun homologue des récepteurs ATG30 ou ATG36 n'a jusqu'à présent été identifié. Néanmoins, une protéine homologue à NBR1 impliquée dans l'autophagie sélective chez les mammifères a été retrouvée chez différentes espèces végétales dont *Arabidopsis*. NBR1 semble être un bon candidat pour être une protéine adaptatrice intervenant dans la pexophagie chez les plantes (Svenning et al., 2011 ; Zientara-Rytter et al., 2011).

Par ailleurs, il a été montré que la pexophagie jouerait un rôle primordial lors des modifications métaboliques intervenant pendant la germination de la graine d'*Arabidopsis*. En effet, au cours de la germination, les lipides stockés de la graine sont convertis en carbohydrates par la  $\beta$ -oxydation des acides gras et le cycle du glyoxylate. Les peroxysomes au début de la germination possèdent ainsi deux enzymes pour le cycle du glyoxylate : l'isocitrate lyase et la malate synthase, les enzymes impliquées dans la  $\beta$ -oxydation. Le cycle du glyoxylate permet à l'acétyl-CoA généré par la  $\beta$ -oxydation des acides gras d'être utilisé pour la synthèse de sucres *via* la néoglucogenèse. Puis, comme la plantule croît et commence sa photosynthèse, le cycle du glyoxylate devient obsolète et les peroxysomes contenant l'isocitrate lyase et la malate synthase sont dégradés par pexophagie. Ainsi, au cours du développement, on assiste à un renouvellement des peroxysomes, depuis ceux conçus pour le cycle du glyoxylate vers des peroxysomes contenant des enzymes essentielles à la photorespiration (Young and Bartel, 2015, pour revue).

La pexophagie jouerait également un rôle important dans le contrôle qualité des peroxysomes chez les plantes en supprimant ceux qui sont endommagés. En effet, du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , composé réactif de l'oxygène, est produit notamment lors de la  $\beta$ -oxydation et de la photorespiration. Cet  $H_2O_2$  est détoxifié par des catalases qui le convertissent en eau et en oxygène, mais inflige néanmoins des dommages à la matrice du peroxysome par oxydation (Young and Bartel, 2015, pour revue).

### 1.1.1.3.3 Mitophagie

Les mitochondries sont des organites à double membrane jouant un rôle majeur dans différentes réactions métaboliques de la cellule, dont la respiration. Cet organite permet notamment de fournir de l'énergie et de synthétiser des métabolites essentiels, et génère aussi des composés réactifs de l'oxygène. L'homéostasie des mitochondries doit donc être continuellement maintenue malgré le challenge que représente la dégradation de cette structure complexe, étendue et réticulée. De plus, la fusion, la fission, la biogenèse ou la dégradation des mitochondries en font un organite extrêmement dynamique. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, un complexe protéique composé de FIS1, DNM1, MDV1 et CAF4 contrôle la fission de la mitochondrie, tandis que sa fusion est régulée par le complexe formé de FZO1, UGO1 et MGM1 (Youle and Narendra, 2011, pour revue). La dégradation des mitochondries est réalisée par une forme sélective de la macro-autophagie appelée mitophagie. Chez la levure, ATG32 est une protéine mitochondriale qui sert de récepteur spécifique qui se lie à ATG11 (Fig. 9). ATG11 est nécessaire pour recruter les mitochondries vers ATG8-PE dans la membrane du phagophore. ATG32 possède également un motif WXXL qui lui permet de se lier à ATG8 pour ancrer la mitochondrie au phagophore (Youle and Narendra, 2011, pour revue). Par ailleurs, il a été montré chez les mammifères que la fission des mitochondries de grande taille faciliterait la mitophagie (Tanaka et al., 2010). En effet, en plus de jouer le rôle de connecteur entre la mitochondrie et la membrane du phagophore, ATG11 permettrait de recruter les composants nécessaires à la fission des mitochondries en se liant à DNM1 (Mao et al., 2013).

Bien que l'existence de la mitophagie ait été démontrée chez les plantes, aucun homologue de la protéine ATG32 n'a été identifié jusqu'à présent (Li et al., 2014). Néanmoins, chez *Arabidopsis*, la protéine adaptatrice NBR1 pourrait reconnaître les mitochondries spécifiquement ubiquitinées pour être dégradées.

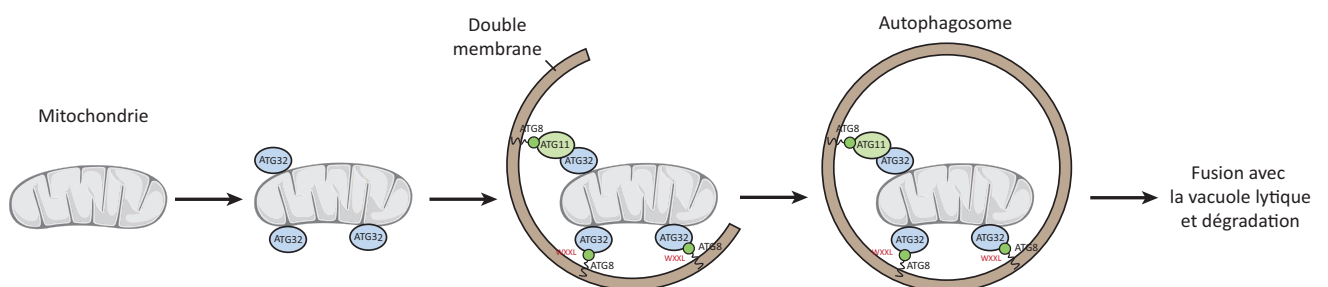


Figure 9. Schéma de la mitophagie. La mitophagie nécessite un marquage spécifique des mitochondries pour leur recrutement vers le phagophore. Chez la levure, la protéine mitochondriale ATG32 peut se lier à ATG8 via son motif WXXL. La façon dont la cellule cible spécifiquement les mitochondries à dégrader reste inconnue,

mais ATG11, qui se lie à ATG32 et à ATG8 pourrait jouer ce rôle de régulateur (Youle and Narendra, 2011, pour revue).

### *1.1.1.3.4 Ribophagie*

Les ribosomes sont d'énormes complexes ribonucléoprotéiques, présents en très grand nombre dans la cellule, permettant la traduction des ARNm en protéines. Ils sont composés d'ARNr et de protéines ribosomiques et peuvent être associés à une membrane (au niveau du réticulum endoplasmique granuleux) ou être libres dans le cytoplasme.

Depuis la découverte de l'autophagie, des ribosomes ont été mis en évidence à l'intérieur des autophagosomes par microscopie électronique (Eskelinen et al., 2011). Il a pendant longtemps été admis que ces ribosomes se retrouvaient séquestrés dans les vésicules autophagiques de façon aléatoire et non sélective. Cependant, il a depuis été démontré chez *Saccharomyces cerevisiae* que dans des conditions de carences nutritionnelles, les ribosomes étaient sélectivement dégradés par autophagie. En effet, le transport des ribosomes à la vacuole s'effectuerait grâce aux protéines ATG1 et ATG7 (Kraft et al., 2008). Par ailleurs, un crible génétique effectué chez la levure dans le but d'isoler des souches mutantes ayant un défaut de recyclage des ribosomes, a révélé que l'Ubiquitine protéase Ubp3 et ses cofacteurs Bre5 étaient requis pour la ribophagie, montrant qu'il ne s'agit pas d'un mécanisme de dégradation aléatoire (Cebollero et al., 2012, pour revue).

Chez les plantes, l'endonucléase Rns2, un membre de la famille protéique des RNase T2, est requise pour la dégradation des ribosomes (Hillwig et al., 2011). Les cellules mutantes dépourvues d'activité Rns2 présentent une forte induction de l'autophagie caractérisée par la présence d'un grand nombre d'autophagosomes. Ces autophagosomes contiennent des ARN et des ribosomes. L'autophagie serait ainsi induite pour compenser le défaut de recyclage des ribosomes chez le mutant *rns2* (Cebollero et al., 2012, pour revue ; Floyd et al., 2015).

### *1.1.1.3.5 Réticulophagie*

Le réticulum endoplasmique est un réseau de tubules membranaires interconnectés et dispersés dans tout le cytoplasme de la cellule. Sa membrane, qui représente à elle seule plus de la moitié du système membranaire cellulaire, est en contact avec l'enveloppe nucléaire. Le réticulum endoplasmique peut être granuleux, c'est-à-dire associé à des ribosomes qui constituent les « granules », ou lisse. Le réticulum endoplasmique granuleux est le lieu de synthèse (au niveau des ribosomes) d'une part des protéines sécrétées à l'extérieur de la cellule et, d'autre part, des protéines et des lipides constituant les membranes des autres organites. Il participe aussi au bon repliement des protéines qui viennent d'être synthétisées. Le réticulum endoplasmique lisse quant à lui, participe au métabolisme cellulaire, en synthétisant des lipides et en stockant le calcium.

Il a été montré que les cellules de levures et de mammifères soumises à des stress spécifiques pour le réticulum endoplasmique (RE) présentaient un niveau élevé d'ATG8 lipidées avec la PE (Cebollero et al., 2012, pour revue). Des études de microscopie ont également montré qu'un stress du RE induisait la formation d'autophagosomes contenant des portions de RE (Kouroku et al., 2006 ; Yorimitsu et al., 2006). La quantité de RE séquestrée dans les vésicules dépend cependant de la nature et de l'intensité du stimulus déclenchant la dénommée réticulophagie. Par exemple, quand une levure est traitée avec du dithiothreitol (DTT) inhibant la formation de ponts disulfures et empêchant ainsi le bon repliement des protéines, les autophagosomes sont majoritairement remplis de portions de RE empilées. Au contraire, quand le stress du RE est initié par une carence en glucose, ce qui entraîne un défaut dans la N-glycosylation qui est importante pour le repliement des glycoprotéines, chaque autophagosome contient alors un unique fragment de RE (Kouroku et al., 2006). L'existence d'autophagosomes contenant du RE est appuyée par l'observation en microscopie confocale de la protéine ATG8 se juxtaposant avec SEC61, protéine marqueur du RE (Bernales et al., 2006). Par ailleurs, une étude récente a montré que les protéines identifiées comme ATG39 et ATG40 enchâssées dans la membrane du RE possédaient des motifs AIM d'interaction avec ATG8 (Nakatogawa and Mochida, 2015).

Jusqu'à présent, aucune étude n'a permis de démontrer l'existence de la réticulophagie chez les plantes.

### *1.1.1.3.6 Nucléophagie*

Le noyau cellulaire est un organelle qui contient le génome et dans lequel celui-ci est transcrit. Le maintien de la structure et de l'organisation du noyau est essentiel pour la viabilité des cellules. Un mécanisme minimisant les dommages du noyau, appelé nucléophagie, permet de dégrader spécifiquement des composants non fonctionnels ou endommagés. Des événements de micro-nucléophagie et de macro-nucléophagie ont été observés chez *Saccharomyces cerevisiae* (Mijaljica and Devenish, 2013, pour revue).

Il a par ailleurs été montré que la protéine ATG39 présente dans la membrane du RE était également retrouvée dans la membrane du noyau (Nakatogawa and Mochida, 2015). Les cellules dépourvues de protéines ATG39 (mutants *atg39*) possèdent un noyau à la morphologie anormale et meurent de façon prématurée lors d'une carence en azote. Toutefois, les mutants *atg39* sont toujours capables de réaliser la macro-autophagie (Nakatogawa and Mochida, 2015). L'hypothèse serait donc que la dégradation du noyau est indépendante de l'autophagie et pourrait libérer des molécules spécifiques nécessaires au maintien de la viabilité de la cellule en cas de carence en azote (Nakatogawa and Mochida, 2015).

#### 1.1.1.3.7 Chlorophagie

Les chloroplastes sont des organites présents dans le cytoplasme des cellules photosynthétiques. Les chloroplastes jouent un rôle important dans le cycle du carbone, par la transformation du carbone atmosphérique en carbone organique. Il est aussi le siège de l'assimilation primaire de l'ammonium avec le cycle enzymatique GS-GOGAT (Glutamine Synthétase-Glutamine OxoGlutamate AminoTransférase). Il est à noter que plus de 80% de l'azote contenu dans les feuilles provient des chloroplastes, notamment de la Rubisco (Ishida et al., 2008).

La dégradation des chloroplastes endommagés sert à maintenir l'homéostasie cellulaire, mais joue aussi un rôle important dans le recyclage de nutriments lors de stress ou lors de la sénescence foliaire. Deux voies de dégradation des chloroplastes ont été caractérisées : celle faisant intervenir les « Senescence Associated Vacuoles » (SAV) et l'autophagie. Les SAV sont des petits compartiments vacuolaires protéolytiques qui s'accumulent dans les feuilles sénescentes. Ces SAV contiennent des protéines du stroma des chloroplastes, notamment de la Rubisco et de la glutamine synthétase (GS2), mais aucune protéine associée aux thylakoïdes (Martínez et al., 2008). L'origine des SAV et la manière dont ils séquestrent les protéines du stroma du chloroplaste restent inconnues (Xie et al., 2015, pour revue).

Davantage d'informations sont disponibles quant à la dégradation des chloroplastes dépendante de l'autophagie. Au cours de ce processus dénommé chlorophagie, des vésicules appelées RCB (pour Rubisco Containing Bodies) contenant des protéines du stroma, sont délivrées à la vacuole pour dégradation (Ishida et al., 2008). Bien que SAV et RCB sont induits dans les feuilles sénescentes et contiennent de la Rubisco mais pas de protéines associées aux thylakoïdes, ces deux mécanismes semblent dépendre de structures différentes puisque les SAV ne résultent pas de l'autophagie (Martínez et al., 2008). De plus, il semblerait que les SAV n'atteignent pas la vacuole mais auraient leur propre activité protéolytique.

Par ailleurs, l'autophagie est également impliquée dans la remobilisation de l'amidon depuis les plastes jusqu'à la vacuole au cours de la nuit. Cette remobilisation est effectuée *via* des vésicules appelées « Small Starch Granules Like structures » (SSGL), impliquant un procédé qui n'est pas nécessairement associé à un stress (Xie et al., 2015, pour revue). Le premier exemple d'une protéine spécifiquement impliquée dans la livraison des composés chloroplastiques jusqu'à la vacuole a été mis en évidence avec la découverte d'un nouveau type d'autophagie chez *Arabidopsis*. Cette protéine appelée ATG8-Interacting 1 (ATI1), interagit avec la protéine ATG8f et avec les protéines plastidiales, permettant leur dégradation dans la vacuole *via* de nouvelles vésicules appelées corps PS-ATI (Michaeli et al., 2014). Les corps PS-ATI et les RCB diffèrent en taille et sont par conséquent probablement des entités différentes. De plus, chez le mutant *ati1*, la dégradation de la Rubisco n'est

pas affectée contrairement à celle de la protéine chloroplastique Peroxiredoxin dont la stabilité augmente. En effet, ATI1 interagit avec la Peroxiredoxin A. Il est ainsi suggéré que ATI1 agirait comme un adaptateur spécifique de cargo ciblant les protéines chloroplastiques pour une dégradation dans la vacuole (Michaeli et al., 2014). Deux autres protéines impliquées dans la chlorophagie sont CHMP1A et CHMP1B, les sous-unités de ESCRT-III. CHMP1A et B sont nécessaires pour la maturation du phagophore des vésicules contenant des composés chloroplastiques (Xie et al., 2015, pour revue).

#### *1.1.1.3.8 Xénophagie*

La xénophagie est une autre forme sélective d'autophagie à ce jour uniquement identifiée chez les animaux. La xénophagie est le mécanisme intervenant en première ligne dans la défense de la cellule contre les infections virales, bactériennes et dues à des parasites. Sans xénophagie, la cellule est rapidement exposée à différentes maladies infectieuses. Les agents pathogènes ont néanmoins développé différents mécanismes pour contrer la xénophagie, par exemple avec des protéines inhibitrices d'autophagie, ou encore des stratégies pour s'échapper des autophagosomes et des vacuoles lytiques (lysosomes chez les animaux) (Galluzzi et al., 2011, pour revue). La façon dont les agents pathogènes sont spécifiquement reconnus et ciblés pour qu'ils soient dégradés par xénophagie est restée longtemps méconnue jusqu'à la découverte de molécules du système immunitaire qui interagissent physiquement avec les protéines de la machinerie autophagique, dirigeant la formation d'autophagosomes sur des sites spécifiques de la paroi bactérienne, ou ciblant les protéines pariétales bactériennes ubiquitinées (Galluzzi et al., 2011, pour revue).

#### *1.1.1.3.9 Agréphagie*

Chez la levure, les animaux ou les plantes, il a été montré que l'autophagie pouvait cibler spécifiquement des agrégats protéiques (Zhou et al., 2013). Chez Arabidopsis, un homologue des protéines NBR1 et P62 des mammifères a été identifié et nommé NBR1. Cette protéine adaptatrice de cargos est impliquée dans différentes formes sélectives d'autophagie (Fig. 7) (Zhou et al., 2013). Des mutants *nrb1* présentent certains des phénotypes des mutants *atg5* et *atg7*. En effet NBR1, comme ATG5 et ATG7, semble important chez les plantes pour la résistance aux stress oxydatifs, salins, à la chaleur et à la sécheresse. Le rôle de NBR1 dans la tolérance à ces stress abiotiques est dépendant de son interaction avec ATG8. Mais contrairement à ATG5 et ATG7, NBR1 n'est pas impliquée dans la sénescence induite par l'âge ou l'obscurité, ni dans la résistance aux agents pathogènes nécrotrophes (Zhou et al., 2013). L'intolérance à la chaleur des mutants *atg5*, *atg7* et *nrb1* est associée avec une accumulation de protéines insolubles qui sont fortement ubiquitinées. NBR1, qui contient un domaine de liaison à l'Ubiquitine, s'accumule également lors d'une augmentation du nombre d'agrégats protéiques chez les mutants *atg5* et *atg7*. Ces résultats

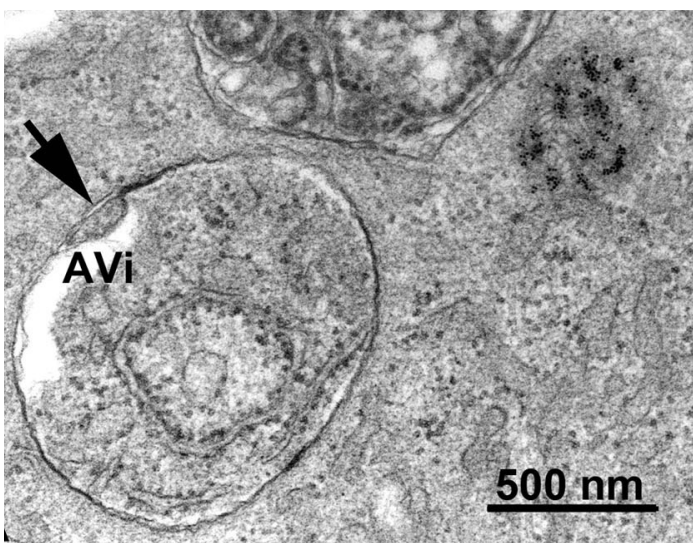
suggèrent que l'autophagie dépendante de NBR1 cible les agrégats protéiques ubiquitinés, qui sont probablement dérivés de protéines dénaturées ou endommagées, générées dans des conditions de stress de la cellule (Zhou et al., 2013).

### I.1.2 Méthodes d'étude du flux autophagique

Il n'existe à ce jour aucune technique permettant de doser directement l'activité autophagique. Néanmoins, le dénombrement des autophagosomes, le suivi de leur formation et de leur mouvement, permettent de donner une idée assez claire du flux autophagique. Pour ce faire, de nombreuses méthodes sont utilisées afin d'observer ces autophagosomes en microscopie, mais aussi de quantifier indirectement l'activité autophagique par des tests biochimiques.

#### I.1.2.1 Microscopie électronique à transmission

L'autophagie a été pour la première fois observée dans les années 1950 par microscopie électronique à transmission (TEM) (Fig. 10) (Eskelinen et al., 2011, pour revue). L'observation des autophagosomes, structures à double membrane, et de leur contenu est caractéristique de l'autophagie. La TEM peut être utilisée à la fois pour suivre l'autophagie sélective et non sélective. Dans le cas de l'autophagie sélective, le cargo doit correspondre au substrat séquestré, et l'autophagosome ne contient alors pas de cytoplasme ordinaire. Au contraire, au cours de l'autophagie non sélective, le contenu de l'autophagosome est morphologiquement identique au cytoplasme, contenant les mêmes densités de ribosomes et des organites séquestrés intacts. Ainsi, l'utilisation de la TEM est une méthode efficace et fiable, à la fois pour l'analyse quantitative et qualitative des modifications des structures autophagiques formant successivement le phagophore, l'autophagosome et le corps autophagique (Klionsky et al., 2012, pour revue).



*Figure 10. Image en microscopie électronique à transmission (TEM) d'un autophagosome (AVi) dans une cellule hépatique de souris. L'autophagosome peut être identifié par son contenu (cytoplasme morphologiquement intact incluant ribosomes et réticulum endoplasmique), et sa membrane dont les deux couches sont partiellement visibles (flèche) (Eskelinen et al., 2011, pour revue).*

### I.1.2.2 Microscopie photonique

#### I.1.2.2.1 Microscopie en fond clair

Les autophagosomes peuvent être observés par microscopie photonique en fond clair et particulièrement dans des tissus transparents, tels que les racines des végétaux. L'observation des autophagosomes peut être aidée par l'utilisation d'un objectif à contraste interférentiel différentiel (DIC ou selon Nomarski) et par l'utilisation de drogues permettant de bloquer la dégradation des corps autophagiques dans la vacuole lytique (Klionsky et al., 2012, pour revue). Les drogues les plus communément utilisées à cette fin sont la concanamycine A et le E-64-d. La concanamycine A inhibe les ATPases vacuolaires, provoquant une augmentation du pH de la vacuole et inhibant ainsi l'activité des protéases (Fig. 11). Le E-64-d quant à lui, est un inhibiteur de protéases à cystéine. Ces deux inhibiteurs permettent ainsi de bloquer dans la vacuole lytique la dégradation des corps autophagiques, qui s'accumulent et deviennent ainsi plus facilement observables en microscopie photonique (Yoshimoto et al., 2004).

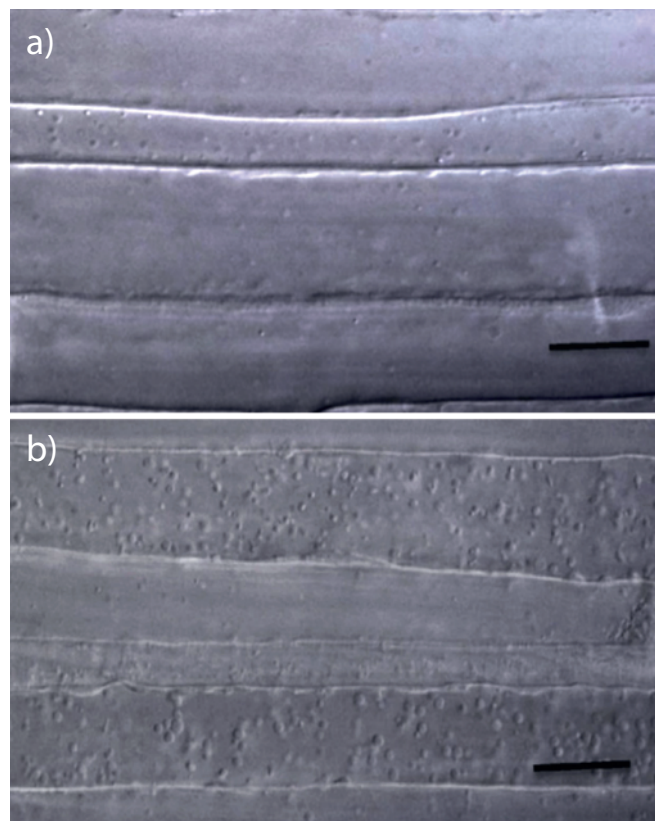


Figure 11. Images en microscopie photonique de cellules de racines non traitées (a) et traitées à la concanamycine A (b). Lorsque les racines sont traitées à la concanamycine A, on observe une augmentation de la densité de corps autophagiques qui s'accumulent dans la vacuole (Guiboileau and Masclaux-Daubresse, 2012). Barre d'échelle : 20  $\mu\text{m}$ .



### I.1.2.2.2 Microscopie confocale : fusion GFP::ATG8

La protéine ATG8 qui est enchâssée dans la membrane de l'autophagosome jusqu'à sa dégradation constitue l'un des seuls marqueurs efficaces pour suivre l'autophagie (Fig. 6). ATG8 fusionnée avec une protéine fluorescente telle que la GFP (Green Fluorescent Protein) en position N terminale est souvent utilisée en microscopie pour observer les autophagosomes *via* la fluorescence directe ou l'immunofluorescence indirecte. La détection de GFP::ATG8 est utilisée pour des études *in vivo* chez de nombreux organismes transgéniques tels que *Caenorhabditis elegans*, *Dictyostelium discoideum*, des ascomycètes filamenteux, *Ciona intestinalis*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Leishmania major* et la souris (Klionsky et al., 2012, pour revue). Il est aussi possible d'utiliser des anticorps anti-ATG8 pour réaliser de l'immunocytochimie ou de l'immunohistochimie. Ces procédures ont l'avantage de permettre la détection de protéines endogènes en s'affranchissant des transfections et/ou de la génération d'organismes transgéniques, mais aussi d'éviter les artefacts potentiels qui résulteraient de la surexpression d'ATG8 (par exemple, des hauts niveaux de surexpression de GFP::ATG8 peuvent induire leur observation dans le noyau). Enfin, des colorants permettent de marquer spécifiquement les compartiments acides de la cellule, dont les autophagosomes. Le défaut de cette dernière technique réside dans le fait que les structures marquées ne sont pas spécifiques à l'autophagie.

Des logiciels d'imagerie permettent ensuite de faire des mesures quantitatives rapides du nombre d'autophagosomes marqués par la GFP::ATG8, caractérisés par des points fluorescents.

### I.1.2.3 Méthodes biochimiques

#### I.1.2.3.1 Conjugaison ATG8-PE

Au cours du processus autophagique, la protéine ATG8 est conjuguée à la phosphatidyléthanolamine (PE). Cette conjugaison est initiée par le clivage du résidu arginine en position C-terminale du précurseur d'ATG8, *via* ATG4, afin d'exposer un résidu glycine. Cette glycine est ensuite conjuguée à la PE par l'action d'ATG7 et ATG3, des protéines analogues à des enzymes intervenant dans le processus d'ubiquitination (Nair et al., 2012). Chez la levure, en conditions pléthoriques de nutriments, la protéine ATG8 est principalement retrouvée sous sa forme non conjuguée, tandis qu'en conditions de carence en azote, sa quantité augmente et la protéine ATG8 est majoritairement présente sous sa forme conjuguée. C'est la forme conjuguée de la protéine ATG8 qui est recrutée pour la formation de l'autophagosome (Kirisako et al., 1999). Il est ainsi possible de suivre l'activité autophagique en comparant par western blot (Fig. 12) les quantités de protéine ATG8 conjuguées et libres.

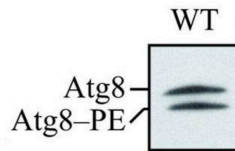


Figure 12. Western blot présentant les formes conjuguée et libre d'ATG8.

La conjugaison de la protéine ATG8 de la levure est étudiée sur des cellules cultivées dans un milieu riche en nutriments, puis transférées 1h dans un milieu carencé. Les cellules sont alors collectées avant d'en extraire les protéines totales.

L'extrait protéique est analysé par SDS-PAGE suivi par un marquage immunologique avec un anticorps anti-ATG8. La différence de taille entre la protéine ATG8 libre et la protéine ATG8 couplée à la PE est facilement observable (Nair et al., 2012).

#### 1.1.2.3.2 Dégradation des protéines à durée de vie longue

L'autophagie est impliquée dans la dégradation des protéines à durée de vie longue. Le suivi de leur dégradation s'avère être une méthode efficace permettant de suivre l'activité autophagique dans les cellules. La technique la plus couramment employée consiste à utiliser des acides aminés marqués radioactivement (comme la valine ou la leucine) pour marquer les protéines nouvellement synthétisées. Ensuite, les acides aminés des protéines à durée de vie courte sont dégradés et les acides aminés libérés lors de la dégradation des protéines à durée de vie longue peuvent ainsi être quantifiés (Seglen et al., 1980). Le point faible de cette technique réside dans le fait que l'autophagie n'est pas l'unique mécanisme intervenant dans la dégradation des protéines à longue durée de vie. L'utilisation d'un inhibiteur d'autophagie tel que le 3-MéthylAdénine (3-MA) peut être utilisé pour distinguer les protéines qui sont spécifiquement dégradées par le processus autophagique. Par ailleurs, une chromatographie peut aussi être utilisée pour doser les acides aminés issus de la dégradation des protéines (Venerando et al., 1994).

#### 1.1.3 Rôles de l'autophagie

Lorsque l'on connaît les mécanismes de l'autophagie, il peut d'abord sembler étonnant qu'un processus d'« autodigestion » puisse être bénéfique à la cellule. A l'origine cependant, l'autophagie est certainement apparue par adaptation d'organismes unicellulaires dans le but de permettre leur survie lors de carences nutritionnelles : s'il n'y a pas de nutriments disponibles, la cellule est obligée de dégrader une partie de ses propres réserves pour rester en vie jusqu'à ce que la situation s'améliore. Chez les organismes unicellulaires comme les levures, la réponse à la carence nutritionnelle est l'une des premières fonctions de l'autophagie, mais ses rôles se sont très largement différenciés à mesure que les organismes se sont complexifiés, notamment chez les mammifères et les plantes (Huang and Klionsky, 2002, pour revue).

Les différents types d'autophagie diffèrent ainsi dans leurs mécanismes et fonctions. La micro et la macro-autophagie ont la capacité de dégrader des structures de grandes tailles *via* des mécanismes sélectifs ou non-sélectifs, alors que l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes

(CMA) et la RNautophagie ne dégradent que certaines protéines de façon sélective. La capacité à dégrader des constituants cellulaires à grande échelle représente alors une fonction primordiale de l'autophagie pour la survie de la cellule, mais peut aussi engendrer des risques. En effet, une dégradation dérégulée du cytoplasme peut être létale à la cellule. Par ailleurs, un niveau basal d'autophagie est important pour maintenir une homéostasie cellulaire normale. Il est donc important que l'autophagie soit finement régulée pour être toujours maintenue à un niveau basal et induite quand la cellule en a besoin.

### I.1.3.1 Rôles de l'autophagie chez les animaux

#### I.1.3.1.1 *Survie et mort cellulaire*

L'implication de l'autophagie dans la survie de la cellule et de l'organisme a été démontrée dans différents contextes, qu'il s'agisse d'un manque de nutriments ou de facteurs de croissance, d'un stress du réticulum endoplasmique, du développement de l'organisme, d'une infection microbienne ou de maladies caractérisées par l'accumulation d'agrégats protéiques (Mizushima et al., 2008, pour revue). Ainsi, en réponse à la plupart des formes de stress, l'autophagie joue un rôle cytoprotecteur puisqu'il a été démontré que l'absence de ce processus chez des mutants *atg* accélérât la mort cellulaire plutôt que de la ralentir (Maiuri et al., 2007). Cependant, dans certains cas où l'autophagie est surexprimée de façon incontrôlée (par exemple, la surexpression de la protéine Beclin 1 (ATG6) dans les cellules de mammifères, ou d'ATG1 chez la drosophile), elle peut entraîner la mort cellulaire, probablement en activant l'apoptose ou par l'incapacité de la cellule à survivre à une dégradation non spécifique de larges portions cytoplasmiques (Mizushima et al., 2008, pour revue).

La mort cellulaire programmée due à l'autophagie a initialement été décrite dans des tissus en cours de développement. Il n'a cependant pas été démontré que l'inhibition de gènes *ATG* empêchait cette mort cellulaire programmée, bien que l'inverse puisse être vrai. En effet, des nématodes n'exprimant plus *bec-1*, l'orthologue d'*ATG6/beclin 1* chez *Caenorhabditis elegans*, et des souris n'exprimant plus *beclin 1* ou *atg5*, présentent un nombre accru de cellules apoptotiques dans les tissus embryonnaires (Mizushima et al., 2008, pour revue). Cela suggère que la machinerie de l'autophagie ne serait pas nécessaire à la mort cellulaire programmée au cours du développement. Il serait néanmoins prématuré de conclure qu'un défaut d'autophagie engendrerait une augmentation de la génération de cellules apoptotiques pendant le développement, puisque l'autophagie joue aussi un rôle dans la suppression des corps apoptotiques (Qu et al., 2007).

#### *1.1.3.1.2 Neurodégérescence*

L'autophagie fonctionne dans les cellules eucaryotes à un état basal, mais ce niveau d'activité autophagique diffère selon les tissus. Chez les mammifères par exemple, cette activité basale est particulièrement importante dans le foie ou dans d'autres tissus où les cellules, comme les neurones ou les fibres musculaires, ne se divisent plus après différenciation (Mizushima et al., 2008). Ainsi, au contraire des mutations *atg5* et *beclin 1 (atg6)* provoquant la mort des souris lors de l'embryogenèse ou de la période néonatale, des mutations spécifiques de ces gènes dans les tissus cérébraux permettent la survie des souris, mais qui deviennent rapidement psychomoteur déficientes et présentent des réflexes anormaux. Par ailleurs, il a été observé que des corps protéiques ubiquitinés s'accumulaient dans leurs neurones et que le nombre d'autophagosomes détectés était très bas, même en condition de carences nutritionnelles. Ces études ont permis de montrer l'importance d'un recyclage constitutif des composés cytosoliques dans les tissus cérébraux, et que l'autophagie préviendrait probablement la neurodégénérescence par élimination de corps d'inclusion ou d'agrégats de protéines, et ce de manière ciblée (Bjørkøy et al., 2005).

#### *1.1.3.1.3 Immunité*

La dégradation d'agents pathogènes et de parasites intracellulaires, qui peuvent alors s'apparenter à des organites, représente un véritable défi que la cellule relève par l'autophagie. La machinerie de l'autophagie qui est utilisée pour « capturer » de manière sélective certains organites, est également utilisée pour l'allocation spécifique des microorganismes vers les vacuoles lytiques (lysosomes) par le processus dénommé xénophagie (voir 1.1.1.3.8) (Levine, 2005, pour revue). Par ailleurs, de plus en plus d'études tendent à prouver l'existence d'un rôle de l'autophagie dans le relargage dans le cytoplasme d'antigènes microbiens nécessaires aux systèmes immunitaires innés et acquis *via* des complexes protéiques, ainsi que dans le maintien de l'homéostasie des lymphocytes (Puleston and Simon, 2014, pour revue).

Les mécanismes de la xénophagie dans la cellule sont bien moins étudiés que ceux de la macro-autophagie classique, et malgré l'utilisation de protéines identiques pour ces deux processus, il n'est pas encore établi de façon claire que la double membrane emprisonnant les microorganismes ait une biosynthèse similaire à celle des autophagosomes de l'autophagie classique. Par ailleurs, bien que la xénophagie semble être une forme sélective d'autophagie, peu d'informations sont connues sur la façon dont les microorganismes sont perçus par la machinerie autophagique, mais les protéines adaptatrices P62 et NBR1 semblent jouer un rôle dans la reconnaissance de plusieurs microorganismes (Mansilla Pareja and Colombo, 2013, pour revue).

#### 1.1.3.1.4 Cancer

Chez les mammifères, certains cancers sont liés à un dysfonctionnement de l'autophagie. Le gène *beclin 1* (*ATG6*) est délété sur un allèle dans 40 à 75% des cas de cancers du sein, des ovaires et de la prostate chez l'Homme. L'autophagie semble ainsi jouer un rôle dans l'inhibition de la formation des tumeurs, puisque chez des souris présentant une perturbation d'expression de *beclin 1*, on observe une diminution de l'activité autophagique ainsi qu'un développement spontané de tumeurs comme des lymphomes, des cancers du poumons, du foie et des mamelles (Mizushima et al., 2008, pour revue). Chez les modèles animaux, d'autres gènes *ATG* exercent un effet suppresseur des tumeurs, suggérant que les protéines de l'autophagie partagent la même fonction d'inhibition des cancers en intervenant à différentes étapes du processus.

L'autophagie permettrait alors d'empêcher l'initiation de cancers en évitant l'accumulation de protéines et d'organites endommagés, ainsi que d'autres signaux oncogènes. Cependant, il a été démontré qu'au contraire, certains cancers dépendent de ce processus pour la survie des cellules tumorales (Fig. 13). En effet, les cellules cancéreuses peuvent utiliser la fonction de recyclage de l'autophagie pour maintenir un bon fonctionnement des mitochondries, puisque l'homéostasie énergétique de ces cellules est nécessaire pour assurer leur croissance et leur prolifération rapide. Ainsi, l'inhibition de l'autophagie pourrait être bénéfique dans certains traitements de cancer (White et al., 2015, pour revue).

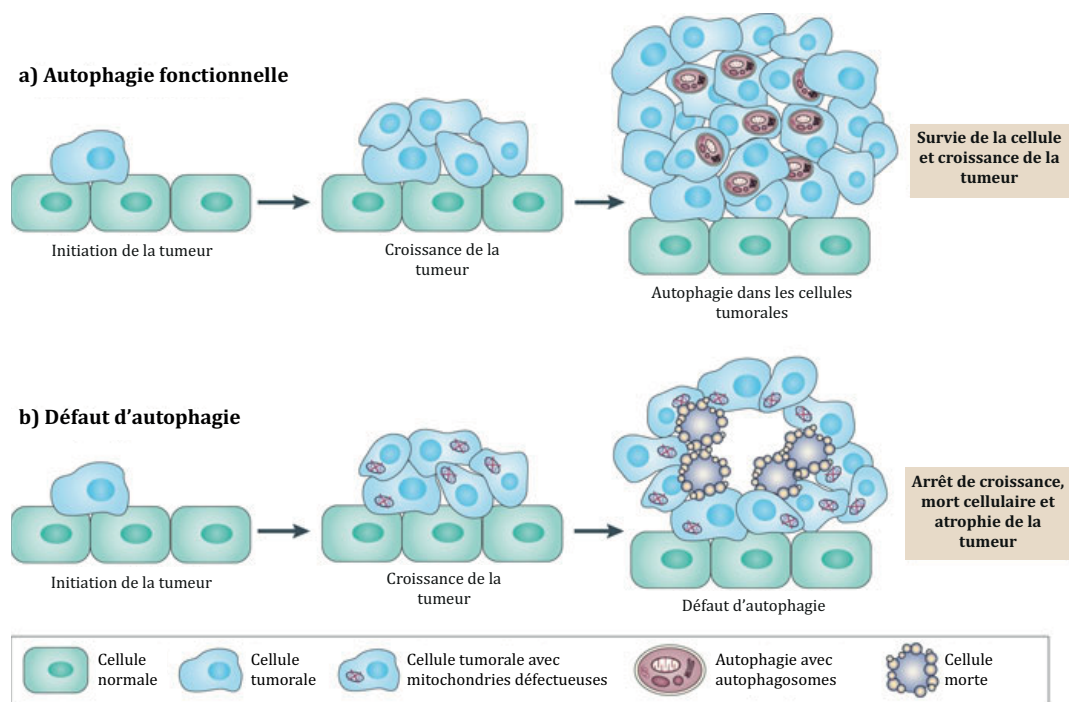


Figure 13. Schémas présentant l'implication de l'autophagie dans le maintien ou la mort des cellules tumorales. a) Dans certains cas de cancers, l'autophagie est induite dans les cellules tumorales, permettant

ainsi de conserver l'homéostasie cellulaire en détoxifiant le grand nombre de protéines oxydées générées par la multiplication cellulaire rapide. b) Un défaut d'autophagie dans les cellules tumorales de ce type de cancer provoque une accumulation de mitochondries défectueuses induisant la mort cellulaire et une atrophie de la tumeur (White et al., 2015, pour revue).

#### 1.1.3.1.5 Vieillesse et longévité

L'accumulation de protéines et d'organites endommagés est une caractéristique commune à toutes les cellules qui vieillissent, même en l'absence de mutations. Comme mentionné précédemment, ce phénomène est particulièrement néfaste aux cellules différenciées qui ne se divisent plus comme les neurones et les fibres musculaires (en particulier les cardiomyocytes), dont les caractéristiques fonctionnelles diminuent avec l'âge de façon plus rapide que pour d'autres types de cellules (Del Roso et al., 2003). Ainsi, au regard des phénotypes dramatiques observés chez des souris dont l'autophagie est affectée, il est facile d'extrapoler sur le fait qu'une diminution progressive de l'activité autophagique avec l'âge puisse jouer un rôle majeur dans la détérioration fonctionnelle des organismes sénescents (Mizushima et al., 2008, pour revue). Il a par ailleurs été montré qu'une restriction nutritionnelle de la cellule, la seule intervention connue permettant de ralentir son vieillissement, semble induire l'autophagie diminuant le niveau d'un de ses inhibiteurs, l'insuline. De plus en plus d'études sont ainsi en cours afin de trouver des moyens de prévenir ou de restaurer le défaut d'autophagie dû à l'âge en reproduisant les effets bénéfiques de la carence nutritionnelle par l'utilisation de molécules anti-lipolytiques (qui miment l'état de carence) (Bergamini, 2005, pour revue).

#### 1.1.3.2 Rôles de l'autophagie chez les végétaux

Les plantes d'*Arabidopsis* mutantes pour les gènes *ATG2*, *ATG4*, *ATG5*, *ATG7*, *ATG9* ou *ATG10* présentent toutes un défaut d'autophagie en restant néanmoins capables de réaliser l'embryogenèse, la germination, le développement des cotylédons, l'élongation des tiges et des racines, la floraison et la production de graines dans des conditions normales de nutrition (Yoshimoto et al., 2010). Seules les plantes mutantes pour *ATG6* ont un défaut de germination des grains de pollen et sont donc mâle stériles (Fujiki et al., 2007). En cas de carences nutritionnelles ou de stress biotiques ou abiotiques, tous ces mutants d'autophagie présentent des phénotypes particuliers plus marqués tels qu'une sénescence précoce et un faible rendement en graines (Hanaoka et al., 2002), révélant l'importance de l'autophagie dans ces conditions.

##### 1.1.3.2.1 Gestion des carences nutritionnelles

Au début du développement des plantules, la plupart des plantes supérieures doivent faire face à des carences nutritionnelles en molécules carbonées avant leur transition vers un état d'autotrophie (voir 1.1.1.3.2). Ensuite, d'autres carences, principalement les carences en azote,

peuvent survenir en cas de non disponibilité de nutriments dans le sol. Afin de pallier ces carences nutritionnelles et permettre la survie de la cellule et donc de l'organisme, l'autophagie va permettre de dégrader certains organites et de cataboliser lipides et protéines afin de fournir les nutriments essentiels au bon fonctionnement de la cellule, et ce de façon temporaire jusqu'à un nouvel apport de nutriments (Rose et al., 2006).

La protéine kinase TOR a été identifiée chez la levure, puis chez les animaux et les plantes, comme étant un élément essentiel à la régulation de l'autophagie en jouant notamment un rôle majeur dans la perception des signaux nutritionnels de la cellule (Yang and Klionsky, 2009, pour revue). En présence de nutriments, TOR est activée et induit la croissance cellulaire et inhibe l'autophagie. En situation de carence nutritionnelle, l'activité kinase de TOR est partiellement inhibée, réduisant la croissance cellulaire au profit de l'induction de l'autophagie pour permettre le recyclage de nutriments. La protéine kinase TOR interagit de façon directe avec les protéines ATG13 et ATG1 du complexe d'initiation de l'autophagie (Wullschleger et al., 2006). Chez *Arabidopsis*, un unique gène TOR a été identifié (Bassham et al., 2005, pour revue)

### *1.1.3.2.2 Résistance aux stress de l'environnement*

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des produits toxiques du métabolisme aérobie qui sont formés naturellement, et tout particulièrement lors de stress de la cellule. En comparaison avec le dioxygène  $O_2$ , les ROS sont hautement réactifs et toxiques. L'accumulation de ROS conduit à un stress oxydatif qui peut endommager tous les constituants cellulaires tels que les protéines, les lipides et l'ADN (Han et al., 2011, pour revue). Les ROS peuvent être éliminés grâce à des antioxydants et enzymes antioxydatives. Parmi ces enzymes par exemple, la superoxyde dismutase convertit  $O_2^-$  en  $H_2O_2$  qui sera ensuite détoxifié par des catalases et peroxydases en  $H_2O$  et  $O_2$ . Le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  est un ROS relativement stable qui est considéré comme un inducteur de l'autophagie (Scherz-Shouval et al., 2007). L'autophagie joue en effet un rôle primordial dans la protection des cellules contre le stress oxydatif en dégradant les protéines oxydées (Shin et al., 2009).

Une forte salinité du sol ainsi qu'une sécheresse constituent les stress environnementaux les plus courants qui affectent la croissance et le développement des plantes. Tandis que le sel provoque un « stress ionique », la sécheresse, elle, induit un stress de type osmotique. Ces deux formes de stress peuvent engendrer l'accumulation de ROS et de protéines oxydées en créant des dommages oxydatifs aux cellules végétales. Il a été observé que ces deux stress induisaient l'autophagie (Bassham et al., 2005 ; Sláviková et al., 2008).

#### 1.1.3.2.3 *Immunité*

La réponse hypersensible (HR) est le mécanisme spécifique de réactions de défense des plantes à l'attaque par un agent pathogène reconnu *via* une interaction gène pour gène (gène d'avirulence du pathogène/gène de résistance de la plante hôte). Destinée à prévenir la propagation d'une infection locale, la réponse hypersensible se caractérise par la mort programmée et rapide de cellules voisines du point d'infection. Son rôle est de limiter la croissance et la propagation des agents pathogènes dans le reste de la plante. Ce mécanisme rappelle le système immunitaire inné chez les animaux et précède généralement une réponse systémique (généralisée à la plante entière) plus lente à se mettre en place, qui conduit finalement à la résistance systémique acquise (SAR). L'acide salicylique (SA) et les ROS, messagers produits au niveau du site d'infection, seront véhiculés vers les autres tissus sains et induiront ainsi la SAR (Pieterse et al., 2009).

Chez des mutants d'autophagie, il a été montré que lors d'une infection par un agent pathogène, la HR se met en place et provoque la mort des cellules au point d'infection, mais cette mort cellulaire s'étend rapidement aux tissus sains voisins sans aucune circonscription (Liu et al., 2005 ; Yoshimoto et al., 2009). L'autophagie pourrait alors intervenir dans l'inhibition de la propagation de la zone de mort cellulaire en dégradant certains signaux tels que les ROS, le SA ou certaines protéines signal (Hayward and Dinesh-Kumar, 2011 ; Zvereva et al., 2016).

#### 1.1.3.2.4 *Mort cellulaire programmée et formation des tissus vasculaires*

La mort cellulaire programmée (PCD) est caractérisée par la mort planifiée de certaines cellules au cours du développement de nombreux tissus végétaux. La PCD se caractérise soit par une expansion de la vacuole lytique qui englobe alors tous les constituants cytoplasmiques pour les dégrader, soit par une disparition du tonoplaste libérant ainsi les enzymes hydrolytiques. La PCD se distingue d'un autre type de mort cellulaire appelé nécrose, qui se caractérise par une mort cellulaire causée par des facteurs externes, tels que des traumatismes ou des infections (comme la HR par exemple). Dans le cas de la nécrose, la cellule meurt sans remobilisation des constituants cytoplasmiques.

Parmi les nombreuses implications de la PCD dans le développement des tissus végétaux, il a été montré que la mort cellulaire programmée intervient dans la mise en place du système vasculaire des plantes (Fukuda, 1997). Ce système vasculaire est composé du xylème et du phloème et joue un rôle majeur dans le transport d'eau, de nutriments et de signaux moléculaires. Le développement des tissus vasculaires implique la différenciation de cellules du procambium vers des cellules spécialisées comme celles des trachéides pour le xylème, et des tubes criblés avec leurs cellules compagnes pour le phloème, ainsi que des cellules de parenchyme non conducteur et de fibres (Carlsbecker and Helariutta, 2005). La différenciation des trachéides au cours du développement est



ainsi caractérisée par la formation d'une paroi secondaire et une mort cellulaire programmée (Fukuda, 1997). Au cours de la PCD, la vacuole se dégrade et des enzymes hydrolytiques telles que des protéases, des nucléases et des lipases sont libérées, puis activées pour dégrader le matériel cytosolique (Turner et al., 2007, pour revue).

Dans le cas spécifique de la formation des tissus vasculaires, il a été montré que l'autophagie joue un rôle dans la mise en place de la PCD (Kwon et al., 2010). En effet, chez *Arabidopsis*, la protéine RabG3b, membre de la famille protéique des GTPases RabG, a une séquence très proche de la protéine Rab7 animale et Ypt7 de levure. Rab7 et Ypt7 sont notamment impliquées dans l'autophagie au niveau de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes et les endosomes. Il a ainsi été suggéré qu'une fois sur-induite par RabG3b, l'autophagie dégrade les constituants cellulaires jusqu'à provoquer un effondrement de la vacuole, entraînant la PCD. Il a par ailleurs été montré que le mutant d'autophagie *atg5* est affecté dans la formation des trachéides chez *Arabidopsis* puisque la disparition des vacuoles est retardée (Kwon et al., 2010).

D'autre part, les travaux de Minina et al. (2013) ont montré qu'une protéase à cystéine, appelée métacaspase de type II (mclI-PA), agit en amont de l'autophagie pour initier la PCD des cellules du suspenseur de l'embryon de l'épicéa. En effet, le suspenseur sert de conduit nutritif pour l'embryon au même titre que les autres tissus vasculaires de la plante. Chez l'épicéa, les plantes RNAi-ATG5, RNAi-ATG6 ou RNAi-mclI-PA voient les cellules de leur suspenseur basculer vers le processus de nécrose plutôt que vers celui de la PCD (Fig. 14). Chez ces plantes RNAi, l'embryon cesse de se développer.

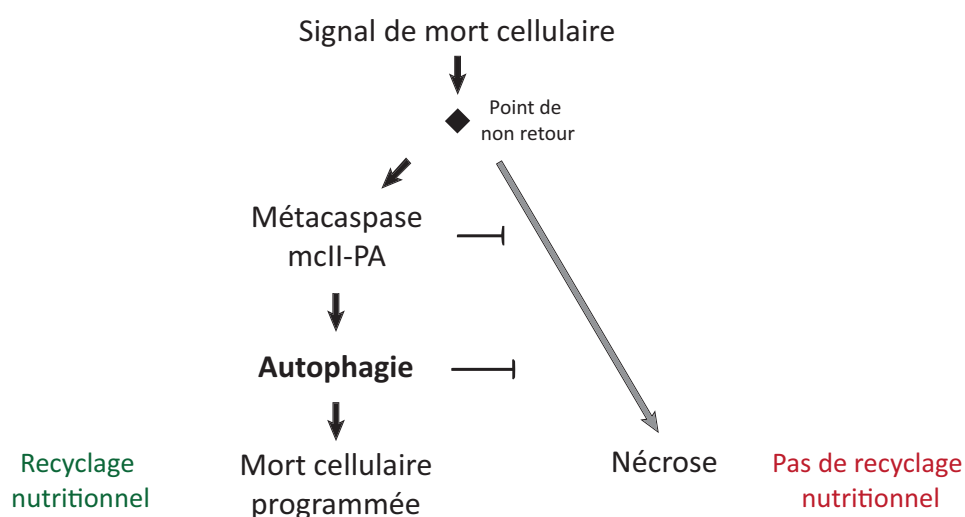


Figure 14. Voie schématique présentant la relation entre l'autophagie et la métacaspase mclI-PA dans la régulation de la mort cellulaire vacuolaire ou nécrotique (Minina et al., 2013).

### 1.1.3.2.5 *Sénescence et remobilisation des nutriments*

La mise en place des organes reproducteurs et le développement des graines sont des étapes importantes du développement des plantes qui requièrent un apport conséquent d'éléments nutritifs. Pendant la phase végétative, la plante prélève dans le sol les nutriments dont elle a besoin. Au cours de la phase reproductive, l'absorption racinaire diminue et les feuilles entrent en sénescence et constituent alors des organes sources en nutriments qui sont remobilisés vers les graines. Il a été montré que l'autophagie joue un rôle important dans le recyclage nutritionnel au niveau des feuilles pour une remobilisation vers les graines (Guiboileau et al., 2013, 2012 ; Lee et al., 2013 ; Li et al., 2015). L'autophagie est ainsi impliquée dans la remobilisation de l'azote mais également des micronutriments tels que les éléments métalliques zinc, fer, cuivre, magnésium (Pottier et al., 2014, pour revue).

### 1.1.4 **Sénescence, remobilisation de l'azote et autophagie**

L'azote est un élément nutritif indispensable à la croissance de la plante, il est déterminant pour obtenir un bon rendement et une teneur en protéines élevée du grain. Avec le carbone, l'azote joue un rôle fondamental dans la constitution de la matière végétale. Il permet de synthétiser de nombreuses molécules comme la chlorophylle, les enzymes, les protéines de réserve et les acides nucléiques de la plante. L'azote est, pour la plupart des plantes, prélevé dans le sol sous forme minérale (très majoritairement sous forme de nitrate  $\text{NO}_3^-$  et accessoirement sous forme d'ammonium  $\text{NH}_4^+$ ). Cet azote inorganique absorbé au niveau des racines est assimilé, puis remobilisé pour le remplissage des graines.

#### 1.1.4.1 Absorption et assimilation primaire de l'azote

Après l'absorption des ions nitrates  $\text{NO}_3^-$  par la plante, l'enzyme nitrate réductase (NR) réduit les nitrates en nitrites  $\text{NO}_2^-$ . Ces nitrites toxiques sont immédiatement transférés dans des plastes (chloroplastes dans les parties aériennes ou plastes non photosynthétiques dans les racines) où ils sont réduits par la nitrite réductase (NiR) en ammonium  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 15). Cet ammonium formé, ainsi que l'ammonium issu de la photorespiration, seront assimilés pour la synthèse de composés organiques (Xu et al., 2012, pour revue).

La Glutamine Synthétase (GS) catalyse la condensation ATP-dépendante de l'ammonium au glutamate pour former de la glutamine. Il existe deux isoformes majeures de GS dans les plantes : la GS2 localisée dans les chloroplastes et servant à l'assimilation primaire de l'azote, et la GS1 localisée dans le cytosol impliquée dans l'assimilation secondaire, c'est-à-dire de l'ammonium remobilisé (Edwards et al., 1990). La Glutamine Oxoglutarate Aminotransférase (GOGAT) catalyse la réaction permettant le transfert d'un groupement amine de la glutamine vers une molécule de 2-oxoglutarate,

conduisant ensuite à la formation de deux molécules de glutamate. Une de ces molécules de glutamate peut alors être utilisée *via* la GS pour l'assimilation continue de l'ammonium toxique pour la cellule. L'autre molécule de glutamate servira avec la glutamine de donneur de groupement amine pour des réactions de transamination pour la synthèse de nombreux acides aminés. C'est l'étape primaire d'assimilation de l'ammonium pour la formation d'acides aminés. La GS requiert de l'ATP comme source d'énergie alors que la GOGAT nécessite du NADPH (dans les feuilles) ou de la ferrédoxine (dans les racines) ayant des pouvoirs réducteurs nécessaires aux biosynthèses (Masclaux-Daubresse et al., 2006).

La synthèse des acides aminés s'effectue *via* des transaminations à partir de glutamate et de la glutamine :

- L'alanine aminotransférase convertit le pyruvate et le glutamate en alanine et en 2-oxoglutarate ;
- L'aspartate aminotransférase catalyse la formation d'aspartate à partir de glutamate et d'oxaloacétate ;
- L'asparagine synthétase catalyse la production d'asparagine à partir d'aspartate et de glutamine ou d'ammonium (Lam et al., 1996).

Le glutamate (Glu) et l'aspartate (Asp), ainsi que les acides aminés riches en azote tels que l'asparagine (Asn), et la glutamine (Gln) synthétisés dans les feuilles sont ensuite transportés vers les organes puits *via* le phloème. Après floraison, ces acides aminés seront presque exclusivement redirigés vers les grains (Lam et al., 1996).

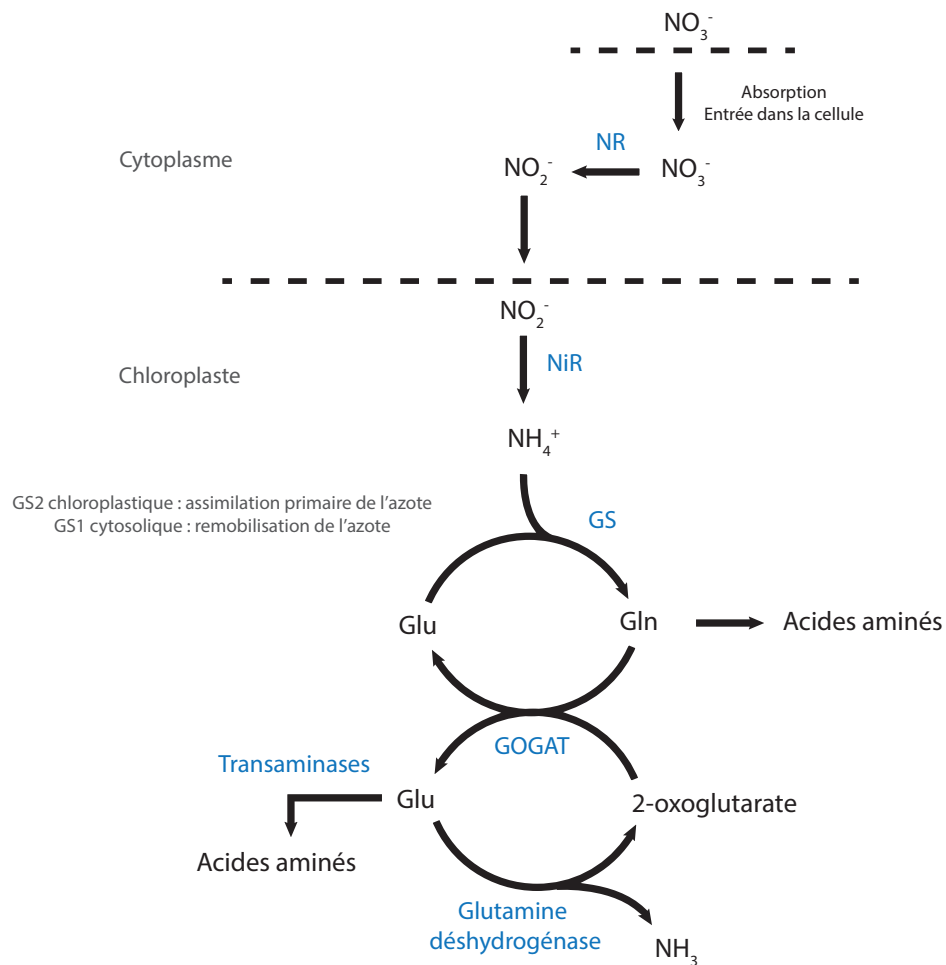


Figure 15. Schéma du mécanisme de réduction des nitrates et d'assimilation de l'ammonium par le cycle GS/GOGAT. La réduction des nitrates peut avoir lieu dans les racines et les organes aériens. L'assimilation de l'ammonium est catalysée par la glutamine synthétase (GS) dans les chloroplastes ou le cytosol en fonction des tissus et de l'origine de l'ammonium, qu'il soit issu de l'absorption primaire (racinaire ou via la photorespiration) ou secondaire (remobilisation).  $\text{NO}_3^-$  : ion nitrate,  $\text{NO}_2^-$  : ion nitrite,  $\text{NH}_4^+$  : ion ammonium,  $\text{NH}_3$  : ammoniac, NR : Nitrate réductase, NiR : Nitrite réductase, GS : Glutamine synthétase, GOGAT : Glutamine oxoglutarate aminotransférase, Glu : Glutamate, Gln : Glutamine (Yuan et al., 2009).

#### I.1.4.2 Remobilisation et senescence foliaire

Lors du développement des organes végétatifs, les toutes jeunes feuilles émergentes n'ont pas encore d'activité photosynthétique et sont définies comme des organes « puits » nécessitant l'apport d'azote. Cet azote est essentiel à la synthèse de protéines chloroplastiques (dont la Rubisco) pour assurer la photosynthèse. Les feuilles arrivent ensuite à maturité et développent une activité photosynthétique intense et constituent des organes « sources » en nutriments pour la mise en place de nouveaux organes puits (Masclaux et al., 2000). Enfin, les feuilles entament le processus de senescence.

La sénescence foliaire est caractérisée par un jaunissement des feuilles. Ce jaunissement est le résultat de changements métaboliques principalement associés à la dégradation des chloroplastes. Par ailleurs, la sénescence foliaire ne se caractérise pas uniquement par de simples événements de dégradations, mais s'accompagne de modifications ordonnées des cellules au niveau de leur structure, de leur métabolisme et de leur rôle d'organe puits qui évolue vers celui d'organe source en nutriments (Thomas, 2013). La sénescence foliaire est ainsi un processus indispensable pour la gestion des ressources nutritionnelles, leur recyclage et leur remobilisation (Avila-Ospina et al., 2014 ; Guiboileau et al., 2010, pour revues). En effet, l'azote des cellules du mésophylle foliaire (représentant selon l'espèce jusqu'à 75% de l'azote total de la plante) peut être recyclé et remobilisé vers d'autres organes puits (Avila-Ospina et al., 2014, pour revue). D'un point de vue métabolique, lors de la sénescence foliaire, l'assimilation primaire du carbone et de l'azote serait remplacée par le recyclage de macromolécules telles que les protéines, les ARN et les lipides membranaires. Il est ainsi considéré que la fonction principale de la sénescence foliaire est de recycler en des nutriments exportables le matériel cellulaire accumulé pendant le développement et la maturation des feuilles. Ces nutriments sont remobilisés pour approvisionner les nouveaux organes en développement comme les graines au cours de la phase reproductive (Avila-Ospina et al., 2014, pour revue). L'importance de ce phénomène est soulignée par la durée de la sénescence foliaire qui s'étend sur une période aussi longue que celle de la maturation des feuilles (Fig. 16).

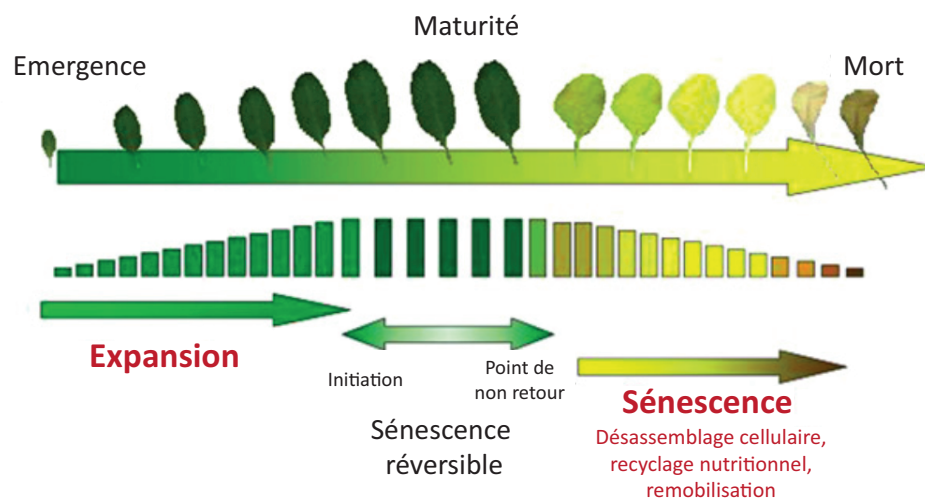


Figure 16. Représentation schématique des phases d'expansion, de maturité et de sénescence des feuilles. Par définition, la maturité de la feuille commence lorsque l'expansion foliaire est terminée et se termine elle-même avec le début de la sénescence. Au cours de la phase de maturité, la feuille est confrontée à de nombreux événements réversibles de sénescence. La sénescence foliaire dite « sans retour » (« no-return ») est caractérisée par une succession de processus de dégradation qui conduiront à la mort cellulaire (Guiboileau et al., 2010, pour revue).

#### I.1.4.3 Autophagie et remobilisation de l'azote

Lors de la sénescence foliaire, les protéines chloroplastiques sont transférées vers des vésicules dénommées Rubisco Containing Bodies (RCB) puis transférées à la vacuole afin d'être dégradées par des protéases puis remobilisées vers les organes puits (voir I.1.1.3.7). Il a récemment été montré que ces RCB ne sont pas observés dans les feuilles sénescentes de mutants *atg*, laissant penser qu'il s'agit d'une dégradation sélective faisant intervenir le processus autophagique (Fig. 17) (Ishida et al., 2008 ; Wada et al., 2009).

Par ailleurs, bien que différents travaux suggèrent que l'autophagie soit impliquée dans le recyclage nutritionnel chez les plantes, aucune donnée physiologique n'était venue appuyer cette hypothèse avant les travaux de Guiboileau et al. (2012, 2013). Ces travaux portent sur l'étude du métabolisme du carbone et de l'azote, et de la remobilisation de l'azote chez des mutants d'autophagie (*atg*). En effet, en utilisant de l'azote marqué  $^{15}\text{N}$  en apport nutritif pendant une durée déterminée au cours de la phase végétative de plantes d'*Arabidopsis*, il est possible de suivre la proportion d'azote stocké dans les feuilles qui est remobilisée vers d'autres organes nouvellement formés, comme les graines (Fig. 18a). Cette technique a été utilisée afin de comparer la remobilisation de l'azote entre des plantes sauvages et mutantes *atg*. Il a ainsi été montré que l'efficacité de remobilisation de l'azote est largement réduite chez ces mutants *atg* en comparaison avec les plantes sauvages (Fig. 18b). Il est à noter que le défaut de remobilisation de l'azote chez les mutants *atg* a été observé indépendamment de la disponibilité en nitrate du sol. Il a ainsi été évalué que l'autophagie est impliquée dans 40% du flux de remobilisation de l'azote  $^{15}\text{N}$  depuis les rosettes jusqu'aux graines, chez des plantes cultivées dans des conditions d'azote limitant. Un défaut d'activité autophagique ne bloque donc pas la totalité du flux de remobilisation de l'azote. D'autres voies de remobilisation restent alors actives chez les mutants *atg*. Ces données montrent également que l'autophagie ne prend pas en charge tous les substrats recyclés pour être remobilisés, et que la dégradation *via* l'autophagie est probablement sélective pour certaines sources azotées.

L'étude des composés azotés dans les feuilles des mutants *atg* au cours de la sénescence montre que ces mutants accumulent toutes sortes de molécules azotées (acides aminés, protéines et ammonium), à l'exception du nitrate. L'absence d'accumulation de nitrate, ainsi qu'un ratio C/N mesuré qui est plus élevé chez les mutants *atg*, indiquent que les mutants d'autophagie ne sont pas affectés dans l'absorption du nitrate ni dans la voie de réduction du nitrate.

A l'inverse, de plus fortes concentrations en acides aminés, protéines solubles et ammonium mesurées dans les feuilles de mutants *atg* montrent que le recyclage et l'exportation de l'azote organique sont affectés. Dans le but de déterminer si une activité protéolytique affectée peut

expliquer une suraccumulation de protéines chez les mutants *atg*, des activités de protéases ont été mesurées (Guiboileau et al., 2013). De manière étonnante, il a été trouvé que l'activité de la carboxypeptidase, de l'aminopeptidase et de l'endopeptidase est accrue chez les mutants *atg* par rapport au sauvage alors qu'il y a une accumulation de protéines solubles. Cependant, toutes les protéines ne s'accumulent pas de la même façon, suggérant que l'autophagie touche spécifiquement certaines protéines (Guiboileau et al., 2013).

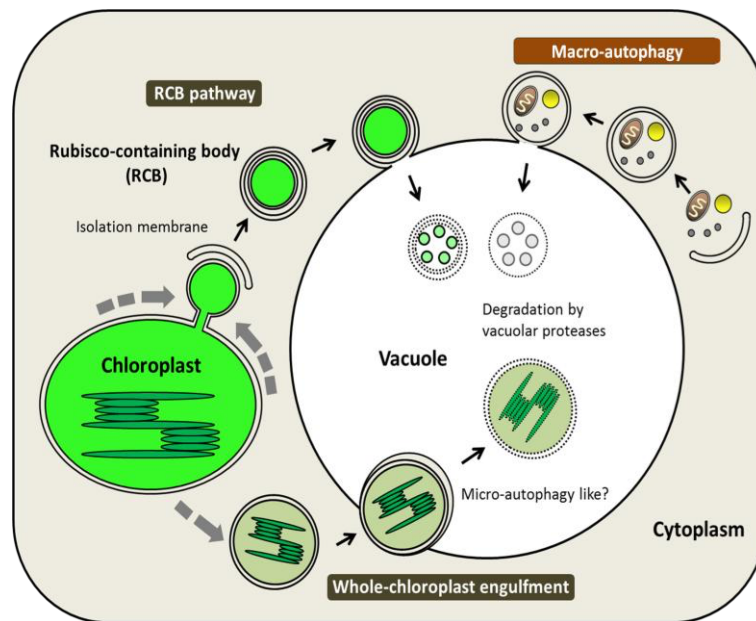


Figure 17. Schéma du RCB (Rubisco containing body) pathway. Modèle proposé par Ishida et al. (2008) de la dégradation de la Rubisco et/ou d'autres protéines du stroma par un mécanisme de macro-autophagie sélectif dépendant de gènes ATG via les RCB. En condition de carence nutritionnelle induisant l'autophagie, des stromules bourgeonnent à partir d'un chloroplaste et sont séquestrés dans une double membrane. Les RCB formés seraient ainsi des autophagosomes contenant une portion de stroma du chloroplaste, puis seraient transportés vers la vacuole pour être dégradés.

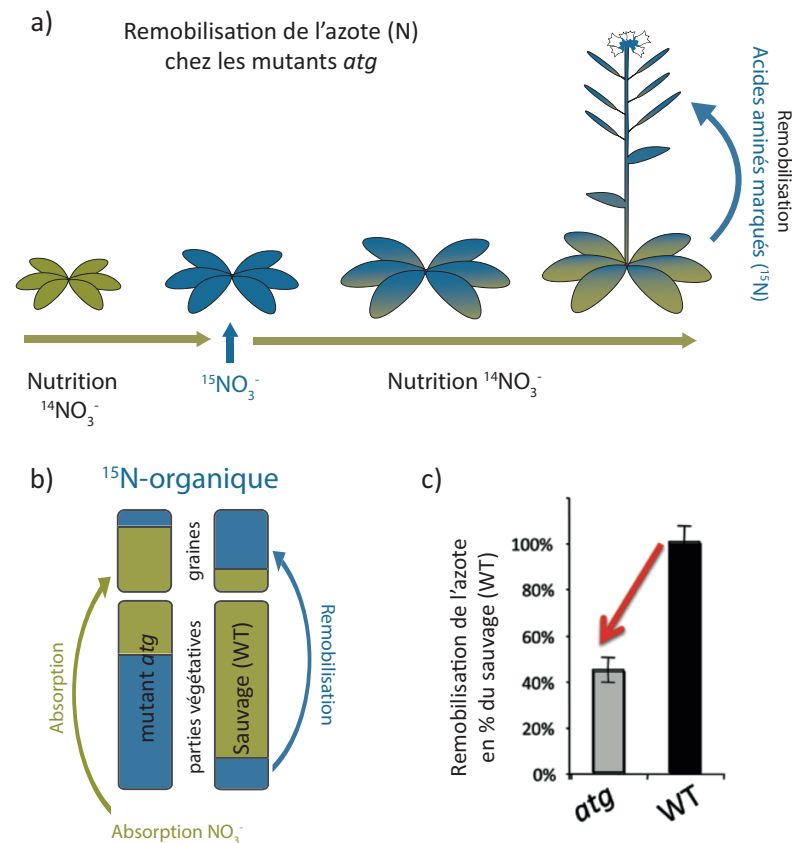


Figure 18. Schéma de l'expérience de mise en évidence du défaut de remobilisation de l'azote chez les mutants d'autophagie. En utilisant un traçage au  $^{15}\text{N}$  selon la méthode décrite par Lemaître et al., (2008), l'efficacité de remobilisation de l'azote N (la partition de  $^{15}\text{N}$  dans les graines normalisée par l'indice de récolte) a été estimée dans les mutants *atg* et comparée à celle du sauvage (WT) (Guiboileau et al., 2012).

#### I.1.4.4 Autophagie et sénescence foliaire

Chez *Arabidopsis*, les mutants *atg* ayant un défaut d'autophagie présentent tous un phénotype de sénescence foliaire précoce (Fig. 19). Cette sénescence précoce est due à une suraccumulation d'acide salicylique (SA) chez les mutants d'autophagie. En effet, en utilisant des lignées dépourvues de SA comme le mutant *sid2* ou le surexpresser du gène *NahG*, on observe une disparition du phénotype de sénescence précoce chez les mutants *atg* (Yoshimoto et al., 2009). Par ailleurs, l'efficacité de remobilisation de l'azote a été suivie chez un double mutant *atg5-sid2* et un transformant *NahG-atg5*. Des défauts de remobilisation et de rendements similaires ont été observés chez ces plantes qui ne présentent pourtant pas de différence de sénescence avec les plantes sauvages (Guiboileau et al., 2012). La sénescence précoce des mutants d'autophagie et leur défaut de remobilisation de l'azote sont donc des phénotypes indépendants.



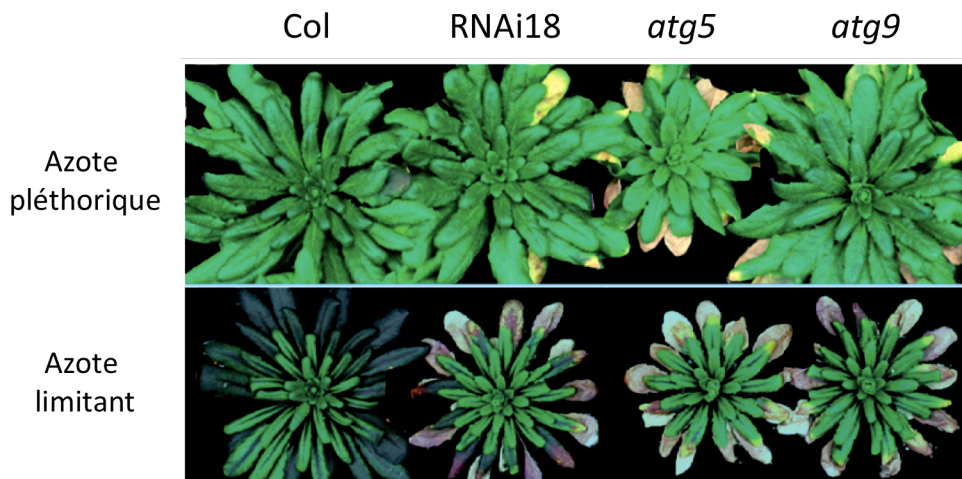


Figure 19. Photographies de plantes mutantes *atg* présentant des phénotypes de sénescence précoce en condition d'azote pléthorique et limitant. Les lignées sauvage (*Col*), *atg5*, *atg9* et *RNAi18* ont été cultivées en condition de jours courts (8h de lumière et 16h d'obscurité) pendant 56 jours avant d'être transférées en condition de jours longs (16h de lumière et 8h d'obscurité) jusqu'à la récolte. Les photographies ont été réalisées 70 jours après semis (Guiboileau et al., 2012).

### 1.1.5 Autophagie dans la graine

L'autophagie joue un rôle dans l'efficacité de remobilisation de l'azote organique des feuilles vers les graines et contrôle les contenus en carbone et azote des graines (Guiboileau et al., 2013, 2012). D'autre part, l'étude de l'expression de différents gènes d'autophagie lors du développement et de la germination de la graine (*via* l'analyse de microarrays) montre une forte induction de ces gènes au cours du remplissage de la graine et dans la graine sèche (eFP-Browser : <http://bar.utoronto.ca/efp>). L'autophagie est ainsi induite dans les feuilles sénescentes et semble également induite dans les graines. Cependant jusqu'à ce jour, aucune étude n'a porté sur le rôle physiologique de l'autophagie au sein de la graine.

## **I.2 Développement de la graine d'*Arabidopsis thaliana***

Une fois la fécondation effectuée, l'ovule, contenu dans l'ovaire qui devient le fruit, se transforme en graine. La formation de la graine comprend une phase de développement de l'embryon, puis une phase d'accumulation des réserves qui seront nécessaires à la jeune plantule avant d'atteindre l'état d'autotrophie. Le gynécée qui est composé de deux carpelles soudés évolue en silique, fruit sec déhiscent contenant deux loges carpellaires séparées par un septum.

### **I.2.1 Développement du fruit : la silique**

Les fleurs sont caractérisées par deux types d'organes : les organes stériles comprenant les sépales et les pétales qui forment le périanthe, et les organes fertiles avec les étamines et les carpelles. L'organe reproducteur femelle, le carpelle, comprend trois parties : le stigmate sur lequel se dépose le grain de pollen, le style, et l'ovaire qui renferme le ou les ovules. L'ensemble des carpelles forme le gynécée.

Chez *Arabidopsis*, le gynécée se compose de deux carpelles soudés, formant ainsi un gynécée syncarpique. Un réceptacle floral appelé gynophore connecte le gynécée à la base de la fleur (Fig. 20). Au dessus du gynophore se trouvent ainsi les ovaires des carpelles qui contiennent en tout une cinquantaine d'ovules. Les deux ovaires sont séparés en deux chambres par une membrane appelée septum. Les tissus protégeant ces deux ovaires constituent ce que l'on appelle des valves, et la partie externe du septum est nommée replum. A l'apex de l'ovaire se situent le style et le stigmate. Le stigmate est constitué d'une unique couche de cellules épidermiques spécialisées formant les papilles stigmatiques et est en charge de réceptionner et d'induire la germination du grain de pollen. En dessous du stigmate, le style apparaît comme un court cylindre au milieu duquel le tractus de transmission, un tissu riche en polysaccharides, dirige la croissance du tube pollinique. Le tractus de transmission se poursuit dans la partie centrale du septum, guidant les tubes polliniques jusqu'aux ovules (Balanzà et al., 2014). Après fécondation, les ovules se développent en graines et le gynécée d'*Arabidopsis* se transforme en un fruit allongé à deux loges carpellaires, appelé silique.

Au cours de la maturation des graines, les tissus photosynthétiques constituant les valves entrent en sénescence et jaunissent (Fig. 20). A maturité, la silique s'ouvre pour libérer les graines selon quatre zones de déhiscence définies par des sillons longitudinaux formés de petites cellules de chaque côté du replum (Fig. 21). La lignification de cellules spécifiques dans ces zones contribuent au processus de déhiscence (Balanzà et al., 2014).

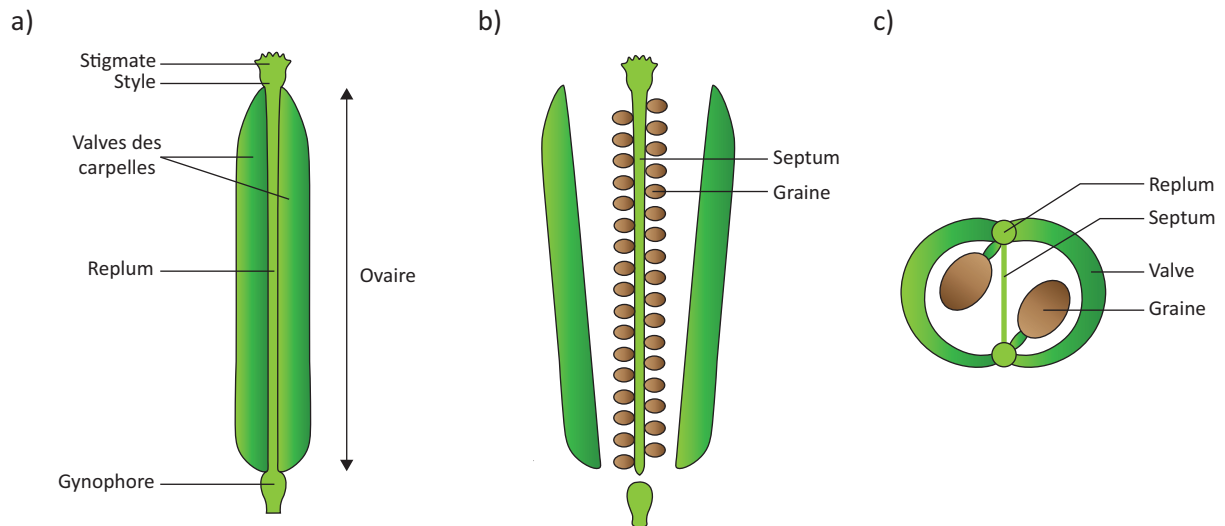


Figure 20. Schémas de la structure d'une silique d'*Arabidopsis*. a) Une silique intacte avant déhiscence. La déhiscence s'effectue à la jonction des valves et du replum. b) Les valves se séparent après déhiscence, révélant les graines attachées au septum. c) Coupe transversale d'une silique (Dardick and Callahan, 2014, pour revue).

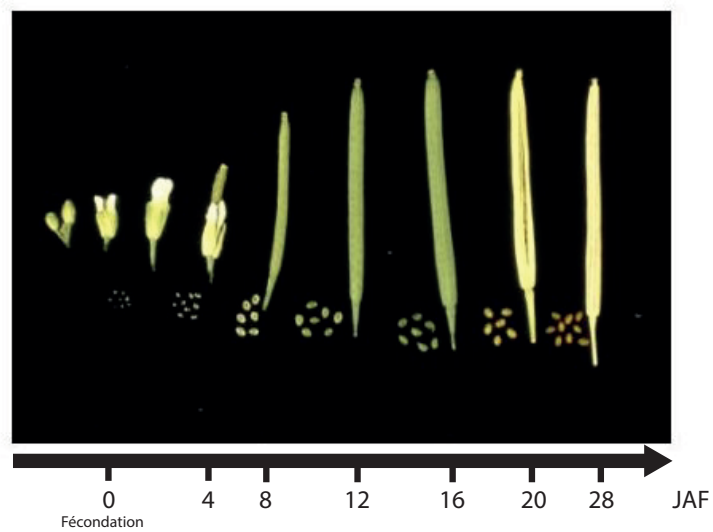


Figure 21. Photographies de siliques d'*Arabidopsis* en développement depuis la fécondation de l'ovule jusqu'à la graine mature. JAF : jours après fécondation. Figure modifiée d'après Kou et al. (2012).

## 1.2.2 Développement de la graine

### 1.2.2.1 Développement de l'ovule

Chez *Arabidopsis*, un ovule (mégasporange) est composé d'un nucelle, de deux téguments qui enveloppent le nucelle et d'un funicule qui est un fin pédoncule qui rattache l'ovule à un tissu de l'ovaire appelé placenta. Chacun de ces tissus est diploïde et possède le même matériel génétique que la plante mère.

A l'intérieur du nucelle, une cellule sporogène appelée « mégaspore mère » subit une méiose pour former une tétrade, dont trois cellules dégèrent (Fig. 22). La mégaspore fonctionnelle restant subit à son tour trois mitoses pour former un syncytium, c'est à dire une cellule coenocytique comprenant plusieurs noyaux. Les huit noyaux haploïdes de cette cellule se répartissent en groupe de quatre à chacun des deux pôles de ce qui deviendra le sac embryonnaire (gamétophyte). Un des noyaux de chaque groupe migre ensuite vers le centre de la cellule, formant les noyaux polaires, c'est-à-dire provenant des pôles. La cytotélière se poursuit alors, mettant en place des parois et terminant ainsi la formation du sac embryonnaire qui est composé de sept cellules : deux synergides qui encadrent l'oosphère (gamète femelle) au pôle micropylaire, trois antipodes au pôle opposé qui dégèrent rapidement et une grande cellule centrale qui contient deux noyaux polaires qui fusionnent (Fig. 22) (Pagnussat et al., 2005).

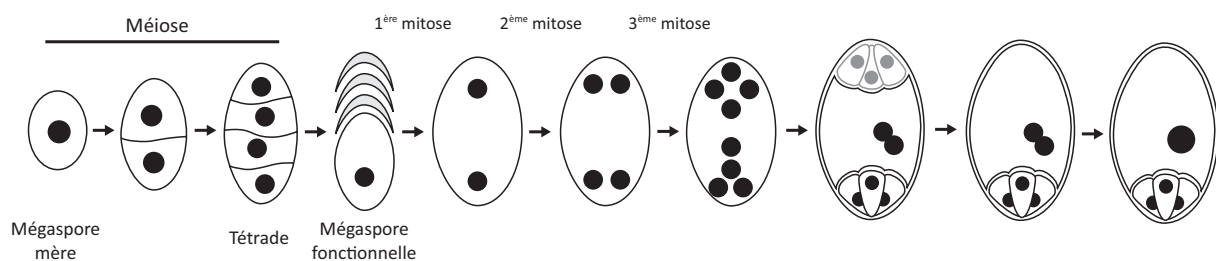


Figure 22. Schémas de la mégasporogénèse et de la mégagamétogénèse chez *Arabidopsis*. Une mégaspore mère ( $2n$ ) subit une méiose pour former une tétrade ( $n$ ) dont trois cellules dégèrent. La cellule restante subit trois mitoses formant un syncytium. Le sac embryonnaire mature possède deux synergides, une oosphère et une cellule centrale formée par la fusion des deux noyaux polaires (Chevalier et al., 2011, pour revue).

### 1.2.2.2 Double fécondation de l'ovule

Le sac embryonnaire se situe à l'intérieur de l'ovule, lui-même dans l'ovaire du carpelle. Le sac embryonnaire est donc inaccessible pour les gamètes mâles. Ainsi, les angiospermes ont développé une technique particulière, la siphonogamie, pour transmettre les gamètes mâles (spermatis) à l'ovule : les grains de pollen (gamétophytes mâles) s'hydratent sur les cellules papillaires du stigmate, germent, et forment un tube pollinique dans lequel deux gamètes mâles sont transportés jusqu'à

l'ovule. Le tube pollinique croît à l'intérieur du style, est attiré jusqu'à l'ovule et guidé dans le micropyle (Fig. 23). Le tube pollinique entre dans le sac embryonnaire en se développant dans l'une des deux synergides. La réception du tube pollinique par l'une des synergides entraîne un arrêt de croissance du tube, la rupture de son extrémité et le relargage des spermatis. Une spermatis fusionne alors avec l'oosphère, formant le zygote, ou embryon ( $2n$ ). L'autre gamète mâle féconde la cellule centrale pour induire la formation de l'endosperme, ou albumen ( $3n$ ) : c'est la double fécondation.

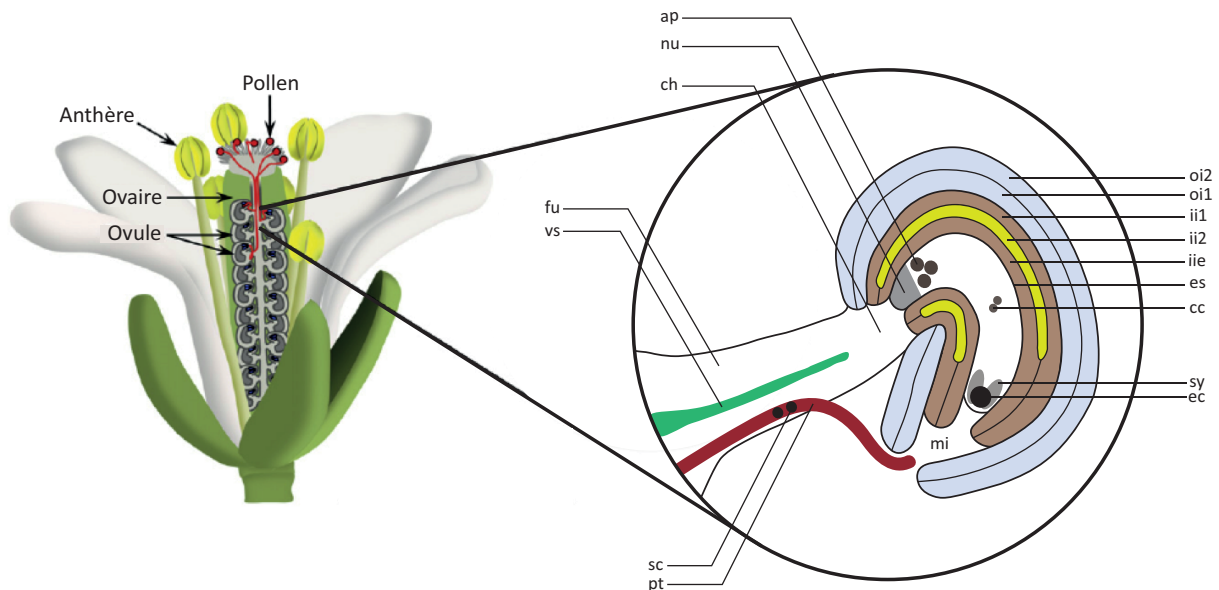


Figure 23. Schéma du gynécée d'*Arabidopsis*. Le gynécée d'*Arabidopsis* comprend deux ovaires contenant environ cinquante ovules. Un agrandissement de l'un des ovules est présenté. L'ovule comporte un tégument externe (oi) composé de deux couches cellulaires (1, 2) et d'un tégument interne composé de trois couches cellulaires (1, 2 et l'endothélium (e)). Après germination, les tubes polliniques rentrent en compétition pour atteindre l'un des ovules dans l'ovaire. Chaque tube pollinique transporte deux spermatis (sc) vers l'oosphère (ec) et les noyaux polaires centraux (cc) pour effectuer la double fécondation dans le sac embryonnaire (es). Le sac embryonnaire contient également des cellules antipodales (ap) et des synergides (sy). ch : chalaze, fu : funicule, mi : micropyle, nu : nucelle, pt : tube pollinique, vs : tissu vasculaire. Figure modifiée de Dresselhaus and Sprunck (2012).

### 1.2.2.3 Développement embryonnaire

Après la fécondation, l'oosphère fécondée forme un zygote qui s'allonge selon un axe apico-basal avant d'entamer ses premières divisions. La première division est asymétrique et produit une petite cellule apicale ainsi qu'une cellule basale plus grande (Fig. 24). La cellule apicale est à l'origine de la totalité des cellules de l'embryon. La cellule basale, quant à elle, subit des divisions pour générer un alignement de sept à neuf cellules qui formeront le suspenseur de l'embryon (Fig. 24). Après la première division asymétrique, des divisions rapides partitionnent la cellule apicale afin de

former les différents tissus de l'embryon tels que l'épiderme et les cellules à l'origine des tissus vasculaires. Une fois que les cellules du jeune embryon ont acquis une spécificité, elles se divisent en deux domaines : celui supérieur, en position apicale, qui contribue à la formation des tissus aériens et de l'hypocotyle, et le domaine inférieur en position basale qui formera les tissus racinaires. Chacune de ces deux régions, apicale ou racinaire, met en place ses méristèmes.

Au cours de l'embryogenèse, les différents stades de développement d'*Arabidopsis* sont désignés selon la forme de l'embryon. Ainsi, lorsque les cotylédons commencent à se développer, l'embryon globulaire prend la forme d'un cœur environ six à huit jours après la fécondation de l'ovule (Fig. 24). Dix jours après fécondation, lorsque l'hypocotyle commence à s'allonger, l'embryon est défini comme ayant une forme de torpille. Enfin, à douze jours de développement, l'embryon a la forme d'un « U retourné » et est défini comme mature. C'est la fin de l'embryogenèse et le début de la maturation de la graine (Baud et al., 2002).

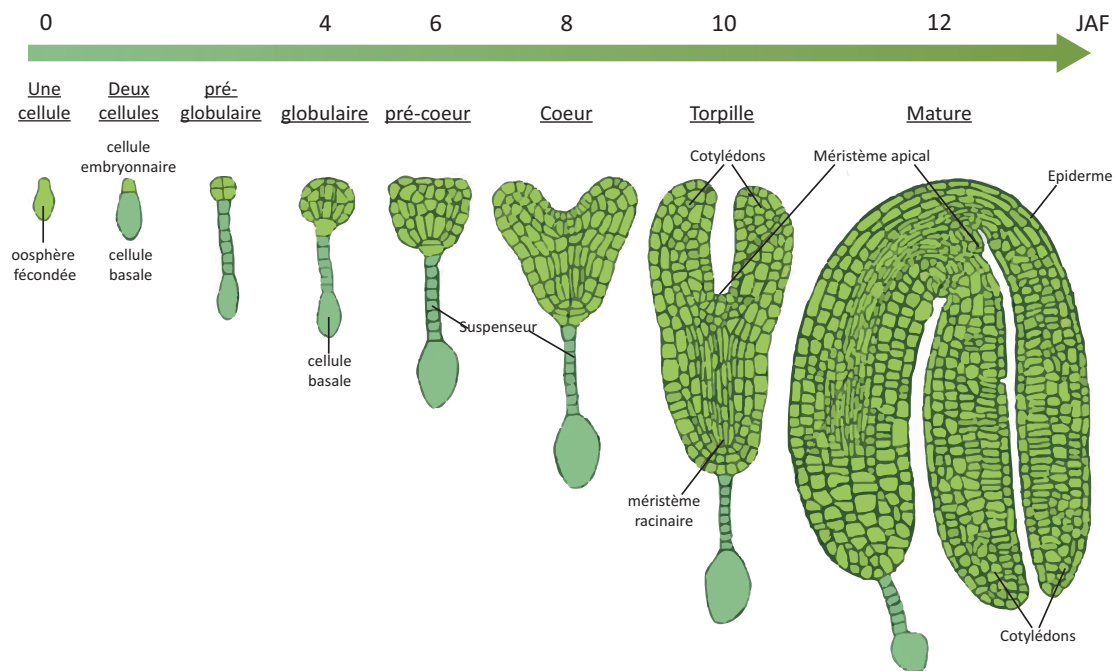


Figure 24. Schémas des différentes étapes du développement de l'embryon d'*Arabidopsis* depuis la fécondation de l'oosphère jusqu'à l'embryon mature encore vert. JAF : jours après fécondation de l'ovule. Inspiré de Baud et al. (2002).

#### 1.2.2.4 Développement et dégradation de l'endosperme

Après la double fécondation de l'ovule, la cellule centrale (3n) forme un syncytium dans lequel plusieurs régions distinctes apparaissent à mesure que la graine se développe (Fig. 25). On observe ainsi trois régions : la région entourant l'embryon, appelée endosperme micropylaire (EM) ; l'endosperme périphérique (EP) dans la cavité centrale ; et l'endosperme de la chalaze (EC) (Sørensen et al., 2002). Au fur et à mesure de l'expansion du sac embryonnaire après la fécondation,

la vacuole centrale s'élargie et le cytoplasme de l'endosperme syncytial est repoussé en position périphérique. Au stade globulaire de l'embryon, le cytoplasme de l'EM entoure l'embryon en développement et l'EP syncytial n'est encore réduit qu'à une fine couche en périphérie du sac embryonnaire. Chez *Arabidopsis*, la cellularisation de l'endosperme se produit *via* la formation d'un système de microtubules irradiant à partir du noyau central et d'une alvéolisation (Brown et al., 1999). Le processus de cellularisation commence par vagues dans l'EM lorsque l'embryon initie ses cotylédons, puis progresse dans l'EP, puis dans l'EC. Au cours du développement de la graine, l'embryon va petit à petit « consommer » l'endosperme qui va disparaître, à l'exception d'une unique couche cellulaire persistante : la couche à aleurone. Cette couche à aleurone accumule des molécules de réserve pour alimenter l'embryon jusqu'à la fin de la maturation de la graine. La couche à aleurone reste vivante jusqu'à la germination (Bethke et al., 2007).

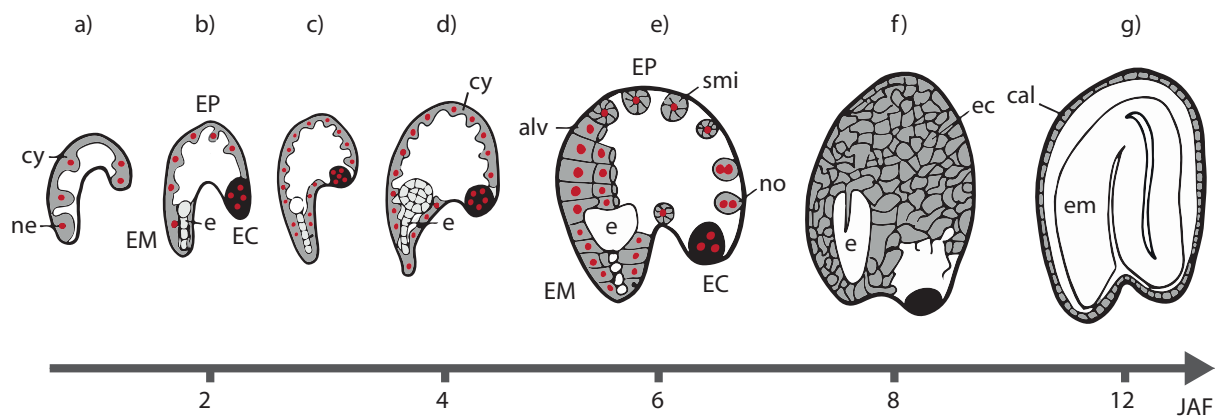


Figure 25. Schémas des étapes de développement de l'endosperme dans la graine d'*Arabidopsis*. a) L'endosperme coenocytique d'*Arabidopsis* a des noyaux qui migrent du micropyle vers la chalaze, couvrant ainsi la totalité du périmètre du coenocyte. b), c) Au cours du développement, l'endosperme développe trois régions distinctes : l'endosperme micropylaire (EM), l'endosperme périphérique (EP) et l'endosperme chalazal (EC). d) A la fin du stade globulaire, l'embryon (e) est complètement entouré de cytoplasme (cy). e) L'endosperme au stade cœur présente un EM cellularisé, un gradient de stades du processus d'alvéolisation de l'EP, ainsi que des nodules d'endosperme (no) et l'endosperme chalazal. f) Endosperme complètement cellularisé (ec). g) L'endosperme est dégradé pendant la maturation de la graine, ne laissant que la couche cellulaire « aleurone-like » en périphérie de l'embryon mature (em). *alv* : alvéole ; *cal* : cellules aleurone-like ; *ne* : noyau de l'endosperme triploïde ; *smi* : système de microtubules irradiants. JAF : jours après fécondation. Figure modifiée d'après Olsen (2004).

La croissance de l'embryon s'effectue en parallèle de la dégradation de l'endosperme. Il a été montré que la dégradation de l'endosperme est régulée par un facteur de transcription dénommé ZHOUP1 (ZOU), qui est très conservé au cours de l'évolution de nombreuses espèces végétales (Yang et al., 2008). Le facteur de transcription ZOU est exclusivement exprimé dans les cellules de

l'endosperme qui entourent l'embryon en développement. Les mutants *zou* présentent un endosperme persistant qui ne se dégrade pas, adhérant à l'embryon, et qui empêche ce dernier de croître par manque d'espace (Fig. 26) (Xing et al., 2013 ; Yang et al., 2008). Ces mutants présentent également un défaut de formation de la cuticule de l'embryon. Les travaux de Xing et al. (2013) ont montré que le facteur de transcription ZOU et la protéine ABNORMAL LEAF-SHAPE1 (ALE1) sont impliqués dans une même voie de signalisation entre l'embryon et l'endosperme. Cette voie de signalisation permet en effet la formation d'une cuticule normale au niveau de l'embryon, ainsi que la dégradation de l'endosperme. Cette voie de signalisation implique les récepteurs kinases GASSHO1 et GASSHO2.

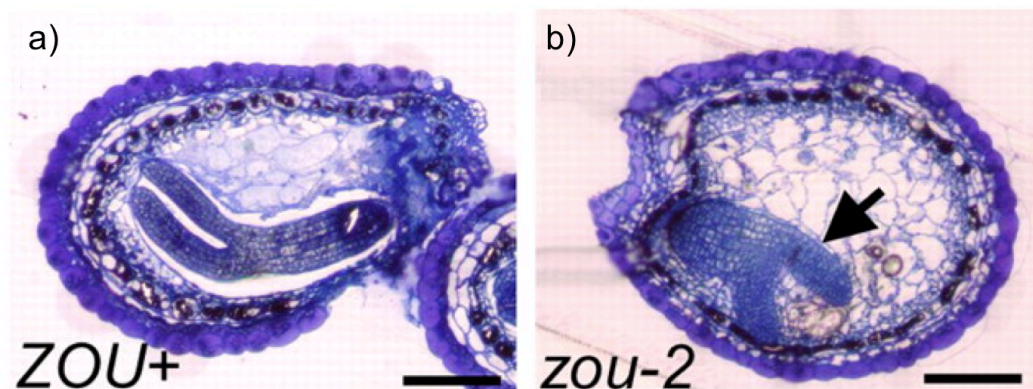


Figure 26. Images en microscopie photonique présentant le phénotype du mutant *zou* dans la graine d'*Arabidopsis*. Images obtenues en microscopie à lumière blanche sur des sections de 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de graines incluses en résine. a) Graine sauvage au stade torpille. On observe que l'endosperme entoure l'embryon sans y être accolé. b) Graine du mutant *zou* au stade torpille. L'endosperme adhère à l'embryon, l'empêchant de se développer et lui conférant une forme arrondie. La flèche indique l'adhérence de l'endosperme cellularisé à l'embryon. Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$  (Yang et al., 2008).

#### 1.2.2.5 Développement des téguments de la graine

Suite à la double fécondation de l'ovule, trois tissus de la graine vont se développer de façon concomitante :

- L'embryon (2n) qui résulte de la fécondation de l'oosphère ;
- L'albumen (3n) entourant l'embryon qui est issu de la fécondation de la cellule centrale ;
- Les tissus diploïdes maternels caractérisés par les téguments internes et externes.

Les téguments interne et externe de la graine sont composés de cinq assises cellulaires. En effet, le tégument interne se compose des assises ii1, ii2 (pour « inner integument » 1 et 2) et de l'endothélium qui est la couche cellulaire la plus interne des téguments. Le tégument externe, quant à lui, se compose des assises oi1 et oi2 (pour « outer integument » 1 et 2) (Fig. 27). Ces assises cellulaires sont facilement observables au tout début du développement de l'embryon. Lorsque la



morphogénèse arrive à son terme et que la graine commence sa maturation, les assises ii1 et ii2 du tégument interne sont comprimées et finissent par disparaître. L'endothélium est formé de cellules alignées, de taille identique, dans lesquelles il y a une synthèse importante de proanthocyanidine (PA). La PA est un composé de la famille des flavonoïdes également connue sous le nom de tannins condensés. Ces tannins s'accumulent dans la vacuole centrale pendant les six premiers jours qui suivent la fécondation de l'ovule. Au cours de la maturation de la graine, ces flavonoïdes sont oxydés et confèrent une couleur brune aux téguments (Dixon et al., 2005). Les cellules des deux assises du tégument externe accumulent des amyloplastides contenant de l'amidon au cours du développement de la graine, avant la phase de maturation (Fig. 27). Les cellules de l'assise oi1, la palissade, effectuent un épaississement de la paroi de la face la plus interne à la graine (Fig. 27). Les cellules de l'épiderme, c'est à dire de l'assise oi2, synthétisent et sécrètent une grande quantité de mucilage dans l'apoplasme.

Le mucilage est un composé pectique riche en rhamnose qui est libéré au contact de l'eau au moment de l'imbibition de la graine. Au fur et à mesure que le mucilage se forme, la vacuole se contracte, ne laissant qu'une étroite colonne de cytoplasme au centre de la cellule. Le cytoplasme se retrouve ainsi entouré d'un espace apoplasmique en forme d'anneau rempli de mucilage. Après la synthèse du mucilage, une paroi secondaire se forme pour remplir complètement l'espace qu'occupait la colonne cytoplasmique, formant une columelle (Fig. 27). Au cours des dernières étapes du développement de la graine, les cellules de toutes les couches cellulaires meurent. La structure des cellules épidermiques est préservée par le mucilage et les columelles. Les autres assises tégumentaires sont écrasées les unes contre les autres à la fin de la maturation de la graine (Fig. 27). Les PA sont vraisemblablement libérées des cellules endothéliales et imprègnent les assises du tégument interne pendant cette période.

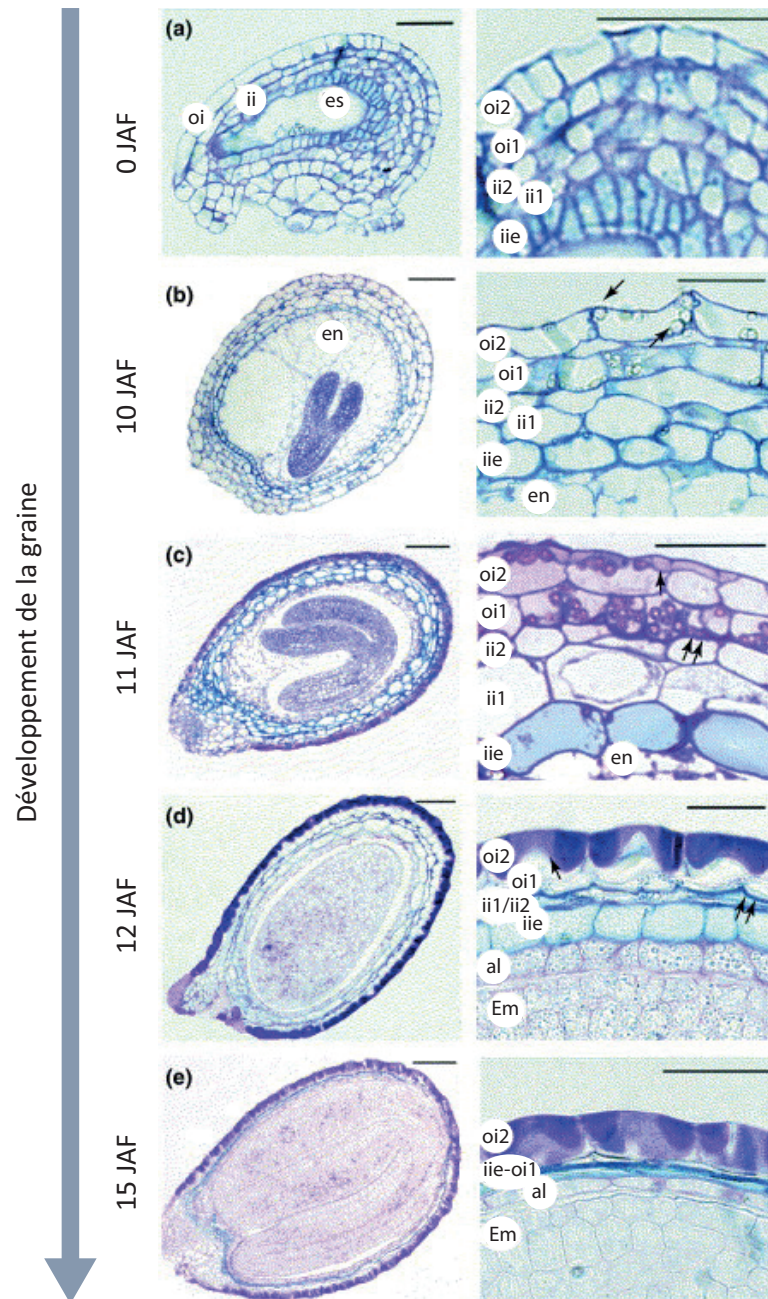


Figure 27. Images en microscopie photonique du suivi du développement des téguments de la graine depuis l'ovule jusqu'au stade embryon mature. a) Stade ovule : les deux couches cellulaires du tégument externe (oi1, oi2) et les trois couches cellulaires du tégument interne (iie, ii1, ii2). b, c) Cellules des différentes couches cellulaires différenciées incluant l'endothélium (iie), la palissade (oi2) et l'épiderme (oi1). d, e) Lorsque la graine arrive à maturité, les cellules des différentes assises meurent et sont écrasées les unes contre les autres, à l'exception de l'épiderme. Les flèches simples indiquent en b) les amyloplastés, en c) le mucilage dans l'apoplasme et en d) la paroi secondaire se formant dans l'épiderme. Les flèches doubles indiquent en c) et d) la paroi secondaire de la palissade. al : endosperme à aleurone, Em : embryon, En : endosperme, Es : sac embryonnaire, ii : tégument interne, oi : tégument externe. Barres d'échelle : 80  $\mu\text{m}$  (b-d, gauche) ; 40  $\mu\text{m}$  (a, gauche, a-d, droite). Figure modifiée d'après Haughn and Chaudhury (2005).

### 1.2.2.6 Apports nutritifs carbonés et azotés de la plante mère à la graine

Les graines sont des organes puits qui dépendent des nutriments importés depuis la plante mère pour mener à bien leur croissance et leur développement. L'apport de nutriments influence le nombre et la taille des graines que peut produire une plante, et constitue ainsi un facteur agronomique clé pour l'obtention de rendements élevés (Fenner, 2004). Qu'il s'agisse de molécules carbonées, soufrées, d'acides aminés, de sels minéraux ou de micronutriments, les éléments nutritifs sont véhiculés jusqu'à la graine par le système vasculaire de la plante mère. En effet, les minéraux sont essentiellement transportés dans la sève brute par le xylème, tandis que le saccharose et certains acides aminés (Asn, Asp, Gln et Glu) sont majoritairement transportés dans la sève élaborée du phloème. Cependant, la graine n'est pas un organe vascularisé : les nutriments sont déchargés du phloème du funicule directement dans le tégument de la graine *via* des plasmodesmes. Des transporteurs spécifiques assurent ensuite le passage de ces nutriments du tégument vers l'endosperme ou vers l'embryon (Zhang et al., 2007, pour revue).

#### 1.2.2.6.1 Transport de saccharose du phloème à l'embryon

Bien que les graines contiennent des chloroplastes, le développement de l'embryon dépend de l'apport de photoassimilats provenant de la plante mère, particulièrement des feuilles qui constituent le premier organe photosynthétique. Le saccharose est la principale forme de sucre qui est transporté sur de longues distances depuis les tissus photosynthétiques jusqu'aux organes en développement ou de réserve (dont les graines) par le phloème. Les tubes criblés du phloème sont constitués de cellules longilignes sans noyau qui ne possèdent plus que quelques organites. Ces cellules sont associées à des cellules compagnes dont elles sont dépendantes et qui assurent leur survie. Le passage du saccharose des cellules du parenchyme photosynthétique jusqu'aux tubes criblés en passant par le parenchyme phloémien et les cellules compagnes, se fait par transfert de cellule à cellule par voies symplasmique (intracellulaire) et apoplasmique (intercellulaire). En effet, tandis que des plasmodesmes relient les tubes criblés à leurs cellules compagnes (symplasme), le transfert de saccharose entre le parenchyme phloémien et ces cellules compagnes est réalisé par voie apoplasmique. Ainsi, les transporteurs de saccharose AtSUC ont été identifiés chez *Arabidopsis* comme des cotransporteurs saccharose-protons permettant le transfert du saccharose de l'apoplasme vers le cytoplasme des cellules compagnes du phloème (Fig. 28) (Lalonde et al., 2004). Plus récemment, un nouveau type de transporteurs de sucres, les transporteurs SWEET, ont été identifiés comme étant impliqués dans la sécrétion du saccharose à partir des cellules du mésophylle, principalement les cellules du parenchyme phloémien, vers l'apoplasme (Chen et al., 2012).

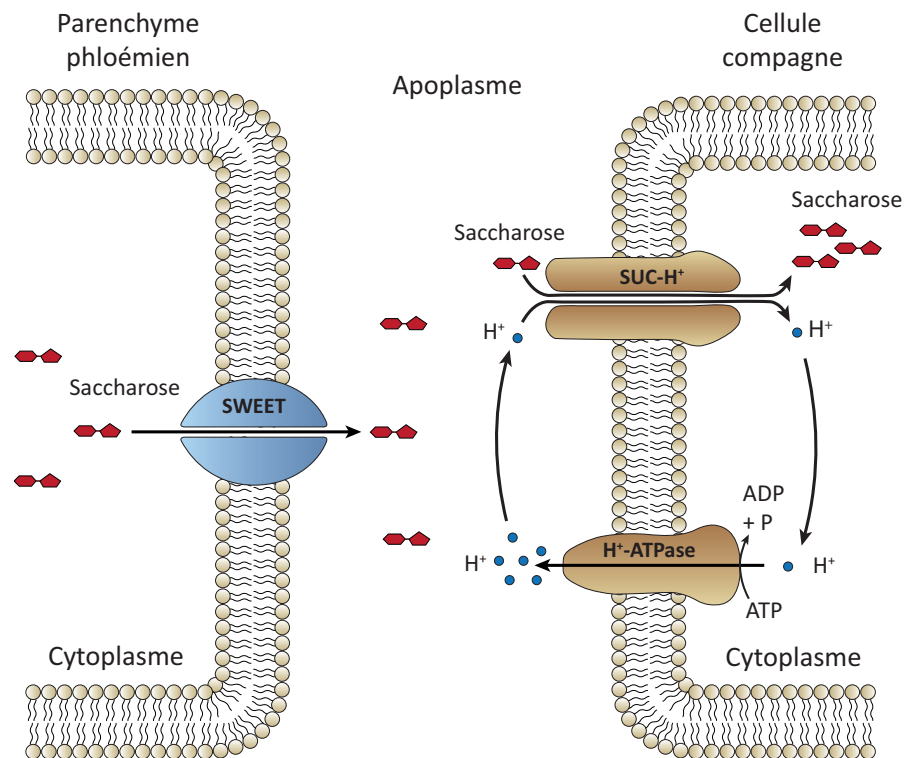


Figure 28. Schéma du transport du saccharose par voie apoplasmique à partir d'une cellule du parenchyme phloémien vers une cellule compagne du phloème. L'export du saccharose vers l'apoplasme est réalisé par des transporteurs SWEET. L'import du saccharose de l'apoplasme vers les cellules compagnes s'effectue ensuite grâce à un symporteur saccharose-proton SUC : des pompes à protons utilisent de l'ATP pour un transport actif de protons vers l'apoplasme. Ainsi, pour rétablir l'équilibre du pH, il y a un efflux de protons dans le sens inverse entraînant ainsi un mouvement de saccharose vers le cytoplasme via le transporteur SUC. Figure modifiée de Yadav et al. (2015).

Chez *Arabidopsis thaliana*, les sucres sont délivrés aux tissus maternels de la graine via le phloème funiculaire, qui est symplasmiquement connecté au tégument externe (Stadler et al., 2005). Les sucres transitent ensuite du tégument externe vers le tégument interne, et potentiellement vers le suspenseur en étant sécrétés dans l'apoplasme par des transporteurs SWEET. En effet, les travaux de Chen et al. (2015) ont montré que les gènes des transporteurs SWEET11, 12 et 15 sont exprimés chacun spécifiquement dans les tissus de la graine d'*Arabidopsis* au cours de son développement (Fig. 29). Il a également été montré que le triple mutant *sweet11 ;12 ;15* est affecté par un retard dans le développement de l'embryon, ainsi qu'une diminution de la masse des graines et de leur contenu en lipides, et présente des graines à l'aspect ridé. Le tégument externe des graines de ces triples mutants accumule en outre davantage d'amidon que le sauvage tandis que les embryons ont un contenu en amidon plus faible. Les travaux menés sur ces mutants ont permis de conclure que les transporteurs SWEET sont responsables de l'efflux de sucre du tégument interne vers l'endosperme de la graine. Les travaux de Baud et al. (2005) ont également montré que sur les huit gènes *AtSUC*

identifiés chez *Arabidopsis*, seul le gène *AtSUC5* s'exprime dans la graine, et plus spécifiquement dans l'endosperme, de 4 à 9 jours après fécondation de l'ovule. L'expression différentielle dans les téguments de la graine et dans l'endosperme suggère que le cheminement du sucre du phloème funiculaire jusqu'à l'embryon est un processus composé de plusieurs étapes de transferts apoplasmiques rendues possibles par ces transporteurs SWEET11, 12 et 15 (Chen et al., 2015) et *AtSUC5* (Baud et al., 2005).

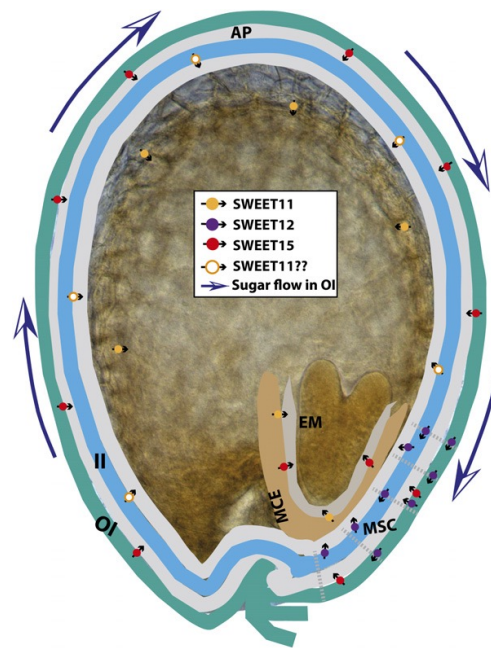


Figure 29. Modèle présentant les différentes étapes de transports apoplasmiques par les transporteurs SWEET au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis*. Le saccharose arrive par les plasmodesmes dans le tégument externe via le phloème funiculaire. SWEET15 qui est exprimé dans le tégument externe (OI), exporte le saccharose dans l'apoplasme (AP). SWEET11 est possiblement impliqué dans le relargage du saccharose depuis le tégument interne (II). SWEET12 semble jouer un rôle dans la sécrétion du saccharose des cellules de l'extrémité micropylaire (MSC) et SWEET11 et 15 dans sa sécrétion de l'endosperme micropylaire (MCE) pour approvisionner l'embryon (EM) (Chen et al., 2015).

#### 1.2.2.6.2 Transport des acides aminés

Les acides aminés résultent de l'assimilation primaire de l'azote qui intervient majoritairement dans les feuilles (voir I.1.4.1). Lors de la phase reproductive, les acides aminés tels que la glutamine, le glutamate, l'acide aspartique et l'asparagine sont transportés jusqu'aux graines par le biais des tissus vasculaires. Bien que majoritairement transportés dans la sève élaborée du phloème, les acides aminés peuvent également être transportés dans le xylème. Ainsi, de la même façon que pour les sucres, les acides aminés sont déchargés dans les cellules du tégument externe de la graine par transport symplasmique. Le transfert des acides aminés entre les différentes couches du tégument externe se fait ensuite par voie apoplasmique et nécessite l'intervention de transporteurs (Stadler et

al., 2005). La plupart des transporteurs caractérisés sont des protéines de la membrane plasmique qui permettent l'importation de l'azote organique par un cotransport avec des protons, comme les transporteurs SUC pour le saccharose (Rentsch et al., 2007). Plus récemment, les travaux de Müller et al. (2015) ont permis d'identifier quatre transporteurs dénommés UmamiT qui sont impliqués dans l'exportation des acides aminés du cytoplasme des cellules des téguments externes et internes vers l'apoplasme. Ces transporteurs ont été caractérisés dans la graine d'*Arabidopsis thaliana*. Les mutants pour ces transporteurs accumulent de grandes quantités d'acides aminés dans la silique et produisent des graines plus petites (Müller et al., 2015). Le rôle que les UmamiT jouent dans le transport des acides aminés est fonctionnellement équivalent à celui des transporteurs SWEET dans l'exportation de sucre dans la graine en développement.

### 1.2.3 Maturation et constitution des réserves de l'embryon

Au cours de la maturation de la graine d'*Arabidopsis*, les sucres et acides aminés transportés jusqu'à l'embryon servent à la synthèse de molécules de réserve. Ces molécules constituent principalement des lipides stockés sous la forme de triacylglycérols (TAG) et des protéines de réserves (SSP, pour « Seed Storage Proteins »). En effet, contrairement à d'autres espèces végétales comme le blé, le riz ou le maïs, définies comme amylacées, la graine d'*Arabidopsis* ne produit qu'une forme transitoire d'amidon au cours de son développement (Fig. 30). Ainsi, *Arabidopsis* est défini comme un oléo-protéagineux dont les réserves sont mobilisées pour fournir l'énergie nécessaire lors de la germination et de la croissance de la jeune plantule jusqu'à l'acquisition de l'autotrophie.

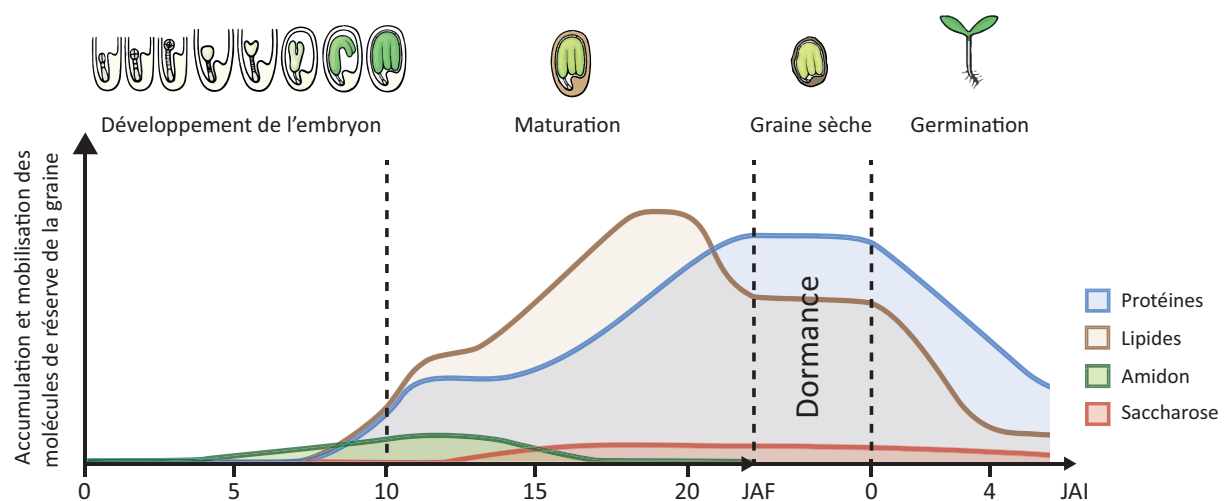


Figure 30. Représentation schématique des proportions des principales molécules de réserve accumulées dans la graine d'*Arabidopsis* au cours de son développement, puis mobilisées pendant la germination. JAF : jours après fécondation, JAI : jours après imbibition. Figure Inspirée de Baud et al. (2002).

### 1.2.3.1 Lipides de réserve : du saccharose aux triacylglycérols

#### 1.2.3.1.1 Synthèse des triacylglycérols

Lors de la maturation de la graine, du saccharose est transporté jusqu'à l'embryon. Une fois dans le cytosol des cellules embryonnaires, la saccharose synthase (SUS) clive le saccharose pour générer des résidus UDP-glucose et du fructose. Les résidus UDP-glucose sont susceptibles de réagir avec du phosphate pour produire du glucose-1-phosphate (glucose-P) et de l'uridine triphosphate. Cette voie métabolique permet ensuite de produire des hexoses-P impliqués dans le processus de synthèse des réserves carbonées de la graine (Sturm and Tang, 1999).

Au début de la phase de maturation, le glucose-6-P ainsi généré sert de précurseur pour la synthèse d'amidon transitoirement accumulé dans les plastes de l'embryon. Cet amidon ne constitue pas une forme de réserve puisqu'il est amené à disparaître complètement avant la fin de la maturation (Fig. 30) (Baud et al., 2002). Son rôle dans la graine d'*Arabidopsis* reste encore à ce jour méconnu. D'autre part, ces hexoses-P servent à la production de pyruvate *via* la glycolyse dans le cytosol ou dans les plastes. Le pyruvate est converti en acétyl-CoA par un complexe pyruvate déshydrogénase (PDH). L'acétyl-CoA carboxylase (ACCase) plastidiale catalyse ensuite de façon ATP dépendante avec du bicarbonate la formation de malonyl-CoA. Le malonyl-CoA sert de matériau de base pour les réactions successives de condensation, permettant à chaque fois l'ajout de deux atomes de carbone à la chaîne carbonée en cours de synthèse. L'ensemble des enzymes ensuite impliquées dans la biosynthèse des acides gras forme un complexe appelé FAS, pour « Fatty Acid Synthase ». Les réactions répétées de condensation permettent l'obtention d'acyls à 16 ou 18 atomes de carbone. Ces réactions impliquent des étapes de réduction et nécessitent ainsi des molécules de NADPH générées par les photosystèmes dans les plastes des graines encore vertes (Fig. 31). Une fois synthétisés, les acides gras sont convertis en acyl-CoA par des LACS (Long-chain Acyl-CoA Synthétases) dans les membranes des plastes puis sont exportés vers le RE. Des désaturases permettent ensuite d'introduire des insaturations, c'est à dire des doubles liaisons entre atomes de carbone, transformant notamment le C18:0-CoA en C18:1-CoA. Les acides gras C16:0-CoA, C18:0-CoA et C18:1-CoA constituent les précurseurs pour la synthèse des lipides membranaires et de réserve (Chapman et al., 2012, pour revue ; Miquel and Browse, 1998).

Au cours de la maturation de la graine d'*Arabidopsis*, la synthèse des triacylglycérols (TAG) repose sur des mécanismes d'échanges d'acyles faisant circuler des acides gras entre des pools de lipides membranaires et des pools de lipides de réserve. La synthèse de ces TAG dans le réticulum endoplasmique se fait par estérification des acides gras avec du glycérol-3-P. Des acides gras sont en premier lieu estérifiés en position 1 et 2 du glycérol-3-P pour former l'acide phosphatidique (AP). L'AP est ensuite utilisé pour la synthèse de diacylglycérol (DAG) puis de phosphatidylcholine (PC). Les

enzymes nécessaires à ces réactions se situent dans le réticulum endoplasmique. Au final, ces TAG sont stockés dans une structure entourée d'une couche lipidique simple, appelée oléosome. Les TAG stockés dans les oléosomes sont majoritairement formés à partir des acides gras à longue chaîne C20:1, C22:1 et C24:1. Les lipides membranaires sont quant à eux constitués d'acides gras à chaîne courte comprenant moins de vingt atomes de carbone (Baud et al., 2008 ; Miquel and Browse, 1998).

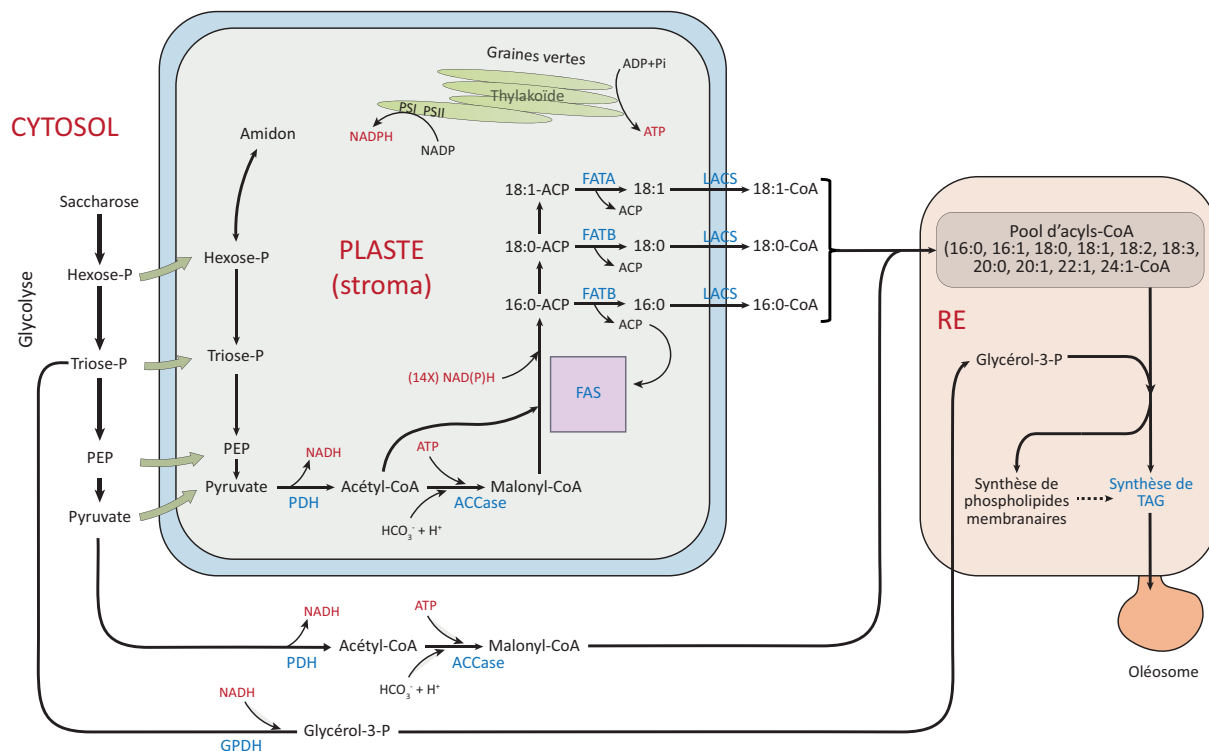


Figure 31. Schéma simplifié de la synthèse des triacylglycérols (TAG) dans les graines vertes d'Arabidopsis thaliana. Le saccharose hydrolysé subit la glycolyse dans le cytosol ou dans un plaste pour former du pyruvate qui permet la synthèse d'acétyl-Coenzyme A (Acétyl-CoA) grâce à la pyruvate déshydrogénase (PDH) et de malonyl-CoA via l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase). Ces derniers servent de matériaux de base pour la synthèse d'acides gras par l'action d'un complexe enzymatique FAS (Fatty Acid Synthase) comprenant l'ACP (Acyl Carrier Protein). Les acides gras sont ensuite exportés du plaste et dirigés vers le RE (Réticulum Endoplasmique). De façon concomitante, du glycérol-3-P est synthétisé dans le cytoplasme par action de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH) sur des trioses-P, puis est transporté dans le RE où se déroule la synthèse de TAG et de lipides membranaires. Les TAG sont enfin chargés dans des oléosomes. Figure Inspirée de Baud et al. (2008) et Chapman et al. (2012).

#### 1.2.3.1.2 Mise en place des corps lipidiques

Les TAG sont accumulés dans des structures appelées corps lipidiques, ou oléosomes. Les corps lipidiques formés dans les graines sont des organites simples comprenant une matrice constituée de TAG entourée d'une monocouche phospholipidique (micelle). La chaîne aliphatique des phospholipides est orientée vers le lumen des oléosomes et la tête polaire est orientée vers le



cytosol (Yatsu and Jacks, 1972). Les corps lipidiques sont formés à partir du RE et le mécanisme précis de leur biogenèse est matière à débats (Fig. 32). Cependant, l'hypothèse la plus répandue propose une accumulation des TAG dans la bicouche lipidique de la membrane du RE, d'où les TAG bourgeonnent et sont séquestrés dans un oléosome (Murphy and Vance, 1999). Des protéines spécifiques sont enchâssées dans la monocouche lipidique entourant l'oléosome et représentent 1 à 4% de la masse des corps lipidiques. Le protéome des corps lipidiques est constitué de cinq oléosines distinctes (S1/OLEO5, S2/OLEO4, S3/OLEO1, S4/OLEO2, S5/OLEO3), une caléosine CLO1, une stéroléosine HSD1, une aquaporine putative TIP3.2 et un précurseur de glycoprotéine membranaire (At1g54860) (d'Andréa et al., 2007 ; Jolivet et al., 2004). Les protéines les plus abondantes sont les oléosines, et une grande partie de la surface des corps lipidiques peut être recouverte par ces protéines (Tzen and Huang, 1992). L'accumulation des oléosines au cours de la maturation détermine la taille des corps lipidiques (Siloto et al., 2006). A la fin de la maturation, quand la graine commence sa dessiccation, les oléosomes subissent une compression dans le cytoplasme. Ils se retrouvent ainsi accolés les uns aux autres en périphérie des cellules embryonnaires. Pourtant, les corps lipidiques ne fusionnent pas, et ce grâce aux oléosines qui forment une barrière stérique les maintenant à l'état de petites vésicules individuelles. Ainsi, les oléosomes fournissent une importante surface qui optimise l'accès des lipases au cours de la mobilisation des réserves pendant la germination (Baud et al., 2008).

#### 1.2.3.2 Protéines de réserve

En plus des lipides, les graines d'*Arabidopsis* accumulent des protéines de réserve (SSP). Ces SSP sont majoritairement représentées par les globulines 12S (aussi appelées cruciférines) (Li et al., 2007) et par les albumines de type napine, souvent dénommées albumines 2S (Krebbers et al., 1988). Les globulines 12S sont généralement organisées en complexes hexamériques composés de six sous-unités  $\alpha$  et de six sous-unités  $\beta$  liées par des ponts disulfures. Les polypeptides  $\alpha$  et  $\beta$  sont maturés à partir des mêmes précurseurs. Chez *Arabidopsis*, quatre gènes codant des précurseurs des protéines 12S ont été identifiés, incluant *CRU1*, *CRU2*, *CRU3* et *CUPIN* (Gruis et al., 2004 ; Nguyen et al., 2015). Les albumines 2S s'accumulent sous forme d'hétérodimères composés de deux sous-unités (aussi appelées longues et petites chaînes) générées par le clivage d'un même précurseur. Ces sous-unités sont liées entre elles par des ponts disulfures (Guerche et al., 1990). Les protéines 2S sont codées par les cinq gènes *At2S1*, *At2S2*, *At2S3*, *At2S4* et *At2S5*. D'autres formes mineures de SSP codées par un gène vacilin-like et par deux gènes globulin-like peuvent être stockées dans la graine d'*Arabidopsis* (Baud et al., 2008).

##### 1.2.3.2.1 Synthèse des protéines de réserve

Les SSP contenues dans les vésicules de réserves appelées PSV (pour « Protein Storage Vacuoles ») sont tout d'abord synthétisées dans le RE rugueux sous forme de proformes de

précurseurs, puis maturées dans le Golgi sous forme de précurseurs. Une fois dans les PSV, les précurseurs des protéines 12S sont convertis en leur forme mature par action protéolytique à des sites spécifiques. En effet, l'asparaginyl endopeptidase agit sur une liaison peptidique Asn-Gly très conservée des précurseurs des globulines. L'action de cette enzyme permet la formation de protéines matures  $\alpha$  et  $\beta$  liées par des ponts disulfures et formant des trimères. Ces trimères sont ensuite assemblés en hexamères pour former les complexes 12S (Barton et al., 1982). Quant aux albumines 2S, la maturation de leurs précurseurs semble plus complexe. Elle requiert en effet la suppression de trois de leurs régions pour former les deux polypeptides matures liés par des ponts disulfure (Krebbes et al., 1988). Les changements de conformation des protéines de réserve permettent leur accumulation et leur conservation à long terme dans les PSV. Il est supposé que les PSV renferment des enzymes protéolytiques qui participeront à la mobilisation des SSP au cours de la germination (Gruis et al., 2004).

Des travaux ayant pour but d'isoler des endopeptidases impliquées dans la maturation des globulines 12S ont permis d'identifier un groupe d'enzymes Asn spécifiques de la famille des protéases à cystéine dénommées VPE (pour « Vacuolar Processing Enzymes ») (Hara-Nishimura et al., 1991). Chez *Arabidopsis thaliana*, les quatre gènes  $\alpha$ VPE,  $\beta$ VPE,  $\gamma$ VPE, et  $\delta$ VPE sont impliqués dans la maturation des SSP, et le gène  $\beta$ VPE est spécifiquement exprimé dans les graines (Gruis et al., 2004 ; Nakaune et al., 2005). Il a également été montré que chez le quadruple mutant  $\alpha vpe-\beta vpe-\gamma vpe-\delta vpe$ , les précurseurs des SSP sont clivés au niveau d'autres sites que les résidus Asn ciblés par les VPE, générant ainsi de nombreuses formes alternatives de ces protéines de réserve. Cela démontre ainsi qu'en l'absence des VPE, une activité protéolytique moins spécifique permet malgré tout la mise en place des réserves protéiques de la graine (Gruis et al., 2004).

Il est par ailleurs à noter que les travaux de Nakaune et al. (2005) ont mis en évidence qu'en plus de son implication dans la maturation des SSP, la protéine  $\delta$ VPE présente une activité de type Caspase, permettant d'initier la mort cellulaire des téguments internes de la graine au cours de la maturation.

#### 1.2.3.2.2 Vacuoles de réserve protéiques (PSV)

Des proformes de précurseurs de protéines de réserve sont localisées dans des vésicules issues du RE et apportées au Golgi pour maturation (Fig. 32). Des vésicules contenant les précurseurs des protéines de réserve bourgeonnent à partir de l'appareil de Golgi. Ces vésicules fusionnent ensuite avec des structures semblables à des endosomes pour former les MVB (Multi-Vesicular Bodies), qui eux-mêmes fusionnent avec les PSV (Protein Storage Vacuoles) (Otegui et al., 2006). C'est dans les PSV que les précurseurs des protéines de réserve vont être clivés par des protéases à cystéine

appelées VPE, pour « Vacuolar Processing Enzymes », et produire les formes matures des protéines 2S et 12S (Hara-Nishimura et al., 1995).

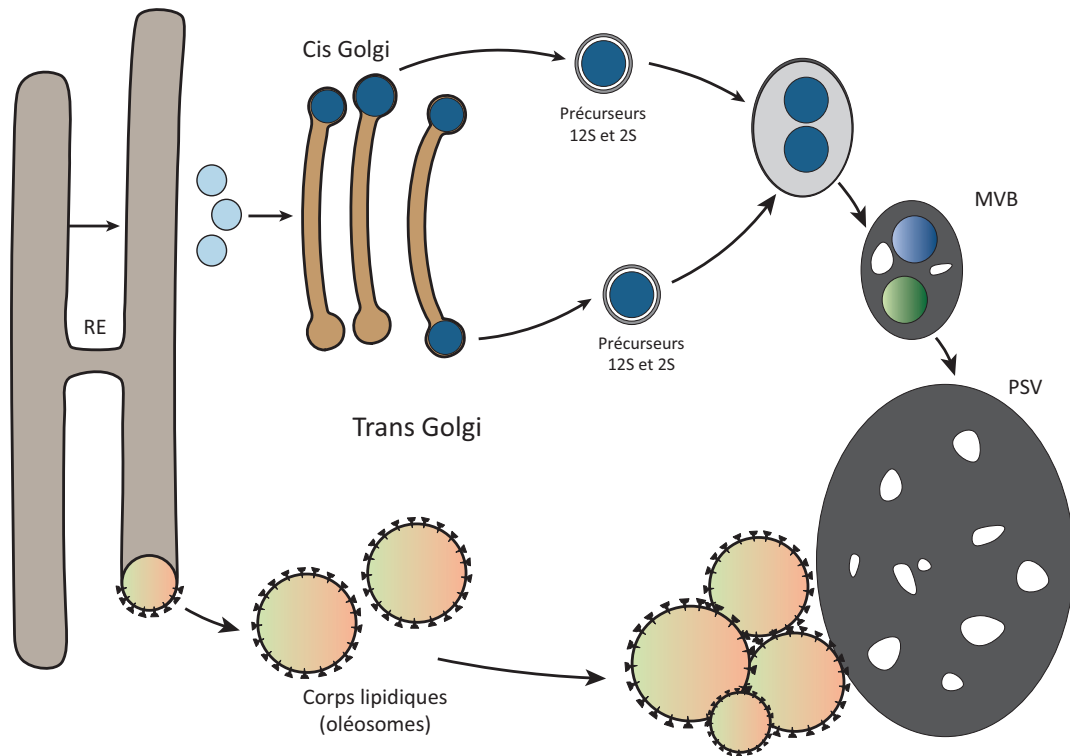


Figure 32. Schéma explicatif de la formation des vésicules de réserves (PSV et oléosomes) dans les cellules de l'embryon au cours de la maturation de la graine d'Arabidopsis. MVB : corps multivésiculaire, PSV : vacuole de réserve protéique, RE : réticulum endoplasmique (Baud et al., 2008).

### I.3 Dessiccation et dormance de la graine d'Arabidopsis

Le développement de la graine peut être divisé en deux grandes phases : l'embryogenèse et la maturation. Au cours de l'embryogenèse, les différents tissus qui seront retrouvés dans la graine mature se mettent en place. Ensuite, lors de la maturation, les molécules de réserve s'accumulent pour fournir l'énergie indispensable à la germination avant que la plantule n'atteigne l'état d'autotrophie. Enfin, au cours des dernières étapes de la maturation, l'embryon acquiert une tolérance à la dessiccation et entame une déshydratation programmée, menant à la dormance et à un état quiescent de l'embryon. Il est par ailleurs à noter que la couche à aleurone, couche cellulaire persistante de l'endosperme, subit également le processus de dessiccation.

La plupart des graines matures présentent un contenu en eau de 5 et 10% de leur masse totale. Certaines graines peuvent pousser cette déshydratation jusqu'à une teneur de 1 à 5% en eau sans perte de viabilité. Pendant la déshydratation, le cytoplasme des cellules embryonnaires se condense et les composants intracellulaires se retrouvent accolés les uns aux autres. Des interactions inappropriées peuvent alors avoir lieu et entraîner des agrégations et des dénaturations de protéines, ainsi que des fusions de membranes des différents organites (Hoekstra et al., 2001, pour revue). L'acquisition de la tolérance à la dessiccation, ou la capacité des cellules à survivre à de très faibles teneurs en eau et aux contraintes imputées par la déshydratation, a été corrélée avec l'accumulation de nombreux composés protecteurs dont certaines protéines et certains sucres (Black et al., 1999 ; Buitink et al., 2000).

Lorsque l'embryon prépare sa dessiccation, on assiste à une modification de la nature des sucres accumulés, allant de sucres simples à des sucres plus complexes. Le saccharose, le raffinose et le stachyose sont présents à de très faibles concentrations au cours du développement de l'embryon, et s'accumulent davantage au moment de la dessiccation (Manfre et al., 2009). La capacité des sucres à former des fluides visqueux, et particulièrement les sucres non réducteurs retrouvés dans la graine mature, permettent la « vitrification » des cellules embryonnaires. Des études portées sur la caractérisation des propriétés de cette matrice vitreuse ont mis en évidence que les sucres ne peuvent constituer les seules molécules impliquées dans ce processus de vitrification. En effet, de nombreuses protéines sont également abondantes dans le cytoplasme et jouent un rôle dans l'état vitreux du cytoplasme (Buitink and Leprince, 2008, pour revue).

Deux types de protéines semblent jouer un rôle majeur dans la stabilité des cellules de l'embryon mature : les HSP (Heat Shock Proteins) et les LEA (Late Embryogenesis Abundant proteins). Les HSP qui s'accumulent tardivement au cours du développement de la graine peuvent minimiser les agrégations dues à la condensation du cytoplasme en augmentant la stabilité de l'état vitreux. Les

protéines LEA sont des protéines thermostables qui s'accumulent tardivement dans l'embryon. L'accumulation de LEA est corrélée avec l'acquisition de la tolérance à la dessiccation, et certaines LEA s'accumulent ainsi également dans le pollen (Hoekstra et al., 2001, pour revue). L'expression des gènes codant les LEA est induite par un stress lié à l'acide abscissique (ABA), et peut être activée par un apport endogène ou exogène d'ABA. Par ailleurs, bien que les LEA représentent jusqu'à 4% des protéines totales de la cellule, les transcrits et les protéines correspondants sont rapidement dégradés au cours de l'imbibition de la graine. Il est alors possible que les LEA jouent à la fois un rôle protecteur lors de la dessiccation, ainsi qu'un rôle de protéines de réserve au cours de la germination (Hundertmark and Hinch, 2008).

## **1.4 Germination de la graine d'Arabidopsis**

### **1.4.1 Graine sèche**

Selon l'espèce végétale, les graines matures dormantes et sèches peuvent être conservées de plusieurs mois à plusieurs années avant d'être semées pour produire de nouvelles plantules. L'état « sec » de la graine fait en réalité référence à un état « très peu hydraté » puisqu'elle contient encore 1 à 10% d'eau (voir 1.3). Les graines sèches ne sont donc pas métaboliquement inertes. Ainsi, le statut physiologique de la graine sèche évolue au cours du temps, permettant une levée de dormance progressive (Holdsworth et al., 2008, pour revue). Le temps nécessaire à cette levée de dormance dépend notamment de la température et de l'humidité de la graine (Bazin et al., 2011). Des études d'imagerie spectroscopiques en résonance magnétique nucléaire (RMN) chez le tabac suggèrent la présence localisée dans la graine de poches de plus forte hydratation, dans lesquelles l'eau pourrait être librement utilisée pour des réactions biochimiques (Leubner-Metzger, 2005). Ces poches pourraient révéler des différences d'activités métaboliques entre différents tissus de l'embryon, notamment chez Arabidopsis (Müller et al., 2009).

Des données montrent également que des oxydations de protéines par des espèces réactives de l'oxygène (ROS) se déroulent dans la graine sèche, et également que l'activité des enzymes antioxydantes y est très limitée puisqu'elle est dépendante d'un milieu aqueux (Kranner et al., 2010). Ce sont ainsi de petites molécules antioxydantes comme le glutathion, le tocophérol et l'acide ascorbique qui protègent la graine des dommages oxydatifs (Weitbrecht et al., 2011, pour revue). Plusieurs études ont proposé un rôle du stress oxydatif dans les premiers stades de la levée de dormance. A plus long terme, le processus oxydatif provoquerait des dommages entraînant une détérioration des cellules et une perte de viabilité des graines (Bailly, 2004 ; Müller et al., 2009 ; Oracz et al., 2009).

Les graines sèches contiennent des ARNm dits « à longue durée de vie » qui ont été stockés au cours de la maturation et qui résistent à la dessiccation (Rajjou et al., 2004). Plus de 10 000 ARNm différents ont été identifiés *via* des analyses transcriptomiques chez Arabidopsis (Kimura and Nambara, 2010 ; Nakabayashi et al., 2005 ; Okamoto et al., 2010). En accord avec le rôle majeur que joue l'acide abscissique (ABA) dans la maturation de la graine, les transcrits des gènes dont les promoteurs répondent à l'ABA sont sur-représentés parmi les transcrits stockés dans la graine sèche (Nakabayashi et al., 2005). Les transcriptomes publiés jusqu'à présent ont été réalisés sur des graines sèches entières (Kimura and Nambara, 2010), on ne connaît donc pas la répartition des transcrits entre l'embryon et la couche à aleurone, qui est l'assise cellulaire persistante de l'endosperme.

#### I.4.2 Imbibition et germination de la graine

La germination *stricto sensu* est caractérisée par une série d'événements qui se termine lorsque la radicule émerge du tégument. Dès lors, la plantule entame sa phase de développement.

La germination commence lorsque la graine rentre en contact avec de l'eau. L'imbibition de la graine comprend trois grandes phases d'absorption d'eau (Fig. 33). Au cours de la première phase (phase I), le très faible potentiel hydrique de la graine sèche provoque un afflux d'eau rapide à l'intérieur de celle-ci, entraînant un gonflement rapide et une modification de la forme de la graine (Preston et al., 2009).

Lorsque la graine d'*Arabidopsis* rentre pour la première fois en contact avec de l'eau, elle libère par les columelles le mucilage préalablement synthétisé au cours du développement (voir I.2.2.5). Les fonctions du mucilage ne sont à l'heure actuelle toujours pas bien identifiées. Il pourrait vraisemblablement permettre une meilleure adhérence à certaines surfaces et aux animaux pour faciliter la dispersion des graines (Mummenhoff et al., 2004), ainsi qu'aider la germination en cas de stress salin ou osmotique. En effet, le mucilage est très hydrophile et peut permettre de retarder la déshydratation de la graine (Yang et al., 2010).

L'imbibition initiale de la graine est aussi très souvent accompagnée d'un relargage massif de solutés cellulaires, qui peut à la fois permettre d'accélérer la germination en diminuant les concentrations d'inhibiteurs, ou être un signe de détérioration des membranes et des compartiments cellulaires à cause d'une réhydratation trop rapide (Powell and Matthews, 1979). Ainsi, afin de pallier les dommages imposés par les phénomènes de déshydratation et de réhydratation, la graine active un certain nombre de mécanismes de réparation des protéines et des membranes au cours de l'imbibition (Ogé et al., 2008).

D'autre part, les dommages engendrés par les ROS et la déshydratation concernent également l'ADN génomique. Ainsi, l'accumulation de dommages chromosomiques et/ou l'incapacité de réparer ces dommages au cours de l'imbibition, constitue un important facteur contribuant à la perte de viabilité des graines au cours du temps. De fait, l'ADN peut être réparé par des ADN ligases dont l'expression est rapidement activée pendant l'imbibition de la graine d'*Arabidopsis* (Bray and West, 2005).

Une fois que le contenu en eau et les modifications de taille et de forme de la graine commencent à stagner, la graine entame la phase II d'imbibition. Au cours de cette phase, la teneur en eau de la graine n'évolue pas (Fig. 33). Chez *Arabidopsis*, c'est pendant cette phase II d'imbibition qu'il y a rupture du tégument de la graine (Fig. 34). S'ensuit alors la phase III d'imbibition durant laquelle l'expansion de l'embryon par élongation des cellules provoque la rupture de l'endosperme

et l'émergence de la radicule, indiquant alors la fin de la germination *stricto sensu* (Fig. 33 et 34) (Weitbrecht et al., 2011, pour revue).

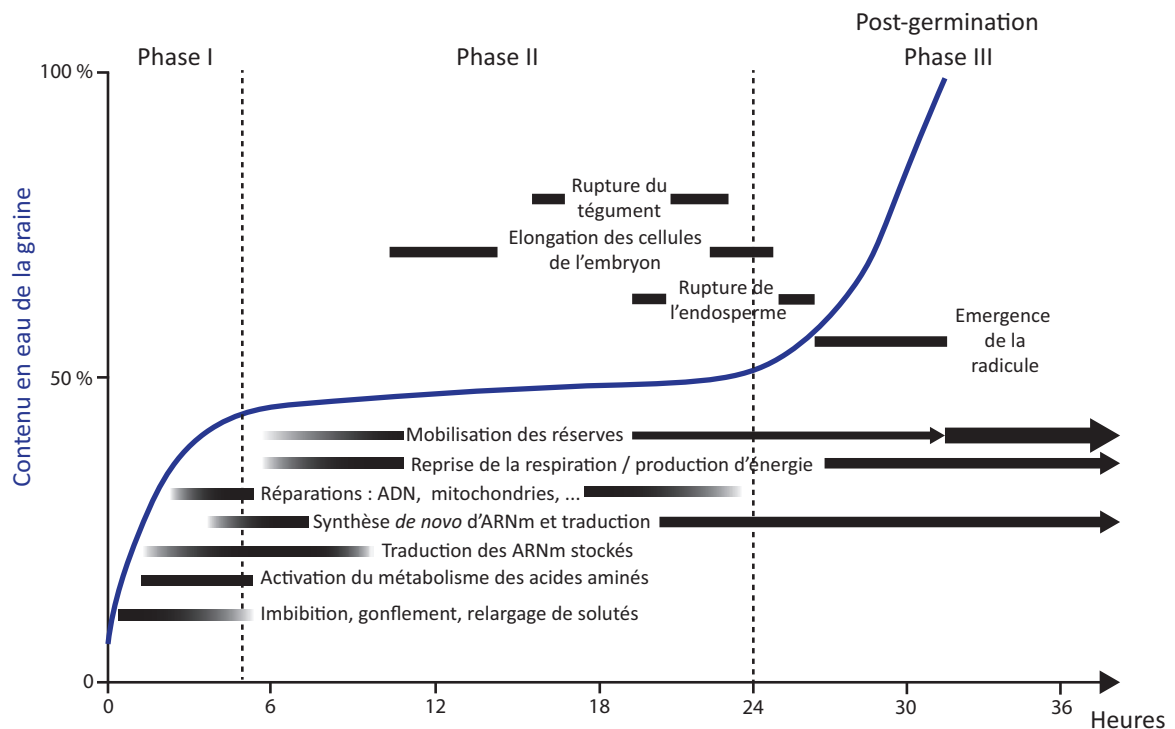


Figure 33. Représentation de la cinétique de la teneur en eau au cours de l'imbibition de la graine et des événements métaboliques et physiologiques importants intervenant au cours de la germination. Figure modifiée d'après Weitbrecht et al. (2011).

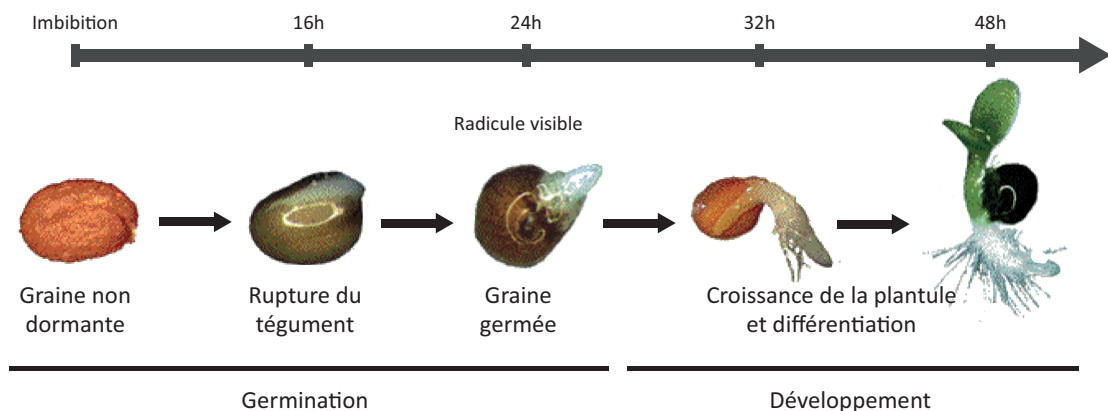


Figure 34. Photographies des étapes de germination de la graine d'*Arabidopsis thaliana*. Figure modifiée d'après Weitbrecht et al. (2011).

### I.4.3 Mobilisation des molécules de réserve

#### I.4.3.1 Mobilisation des protéines de réserve et formation de la vacuole lytique

##### I.4.3.1.1 Mise en place de la vacuole lytique

La mobilisation des protéines de réserve commence dès le début de l'imbibition de la graine,



mais la majeure partie des réserves est mobilisée après la germination, au début du développement de la plantule (Fig. 30). Chez *Arabidopsis*, les protéines de réserve sont principalement présentes dans les PSV à l'intérieur des cotylédons (voir I.2.3.2).

Il a été montré qu'au cours de la mobilisation des protéines de réserve dans la radicule, au delà de 50h d'imbibition, les PSV se transforment en vacuole lytique (VL) (Zheng and Staehelin, 2011). Il a en effet été observé que les PSV fusionnent entre elles pour former la VL. Un autre mécanisme plus complexe de formation de la VL a également été décrit. En effet, après mobilisation des protéines de réserve, les PSV peuvent éclater sous l'effet de la pression osmotique. Les membranes de ces PSV se différencient alors en deux domaines : un domaine qui formera une pré-vacuole lytique, et des domaines qui formeront des structures semblables à des autophagosomes, dits multilamellaires, qui englobent des portions cytoplasmiques. Ces autophagosomes multilamellaires fusionnent ensuite avec la pré-vacuole lytique pour former la VL mature (Zheng and Staehelin, 2011). D'autre part, il a été montré qu'au cours de la mobilisation des protéines de réserve, des protéines transmembranaires caractéristiques des PSV, les  $\alpha$ -TIP ( $\alpha$ -Tonoplast Intrinsic Proteins), sont remplacées par les protéines  $\gamma$ -TIP, qui sont elles caractéristiques de la VL mature (Zheng and Staehelin, 2011).

#### *1.4.3.1.2 Hydrolyse des protéines de réserve*

Après la germination, l'hydrolyse des protéines de réserves en acides aminés est réalisée par différentes protéases. Les endopeptidases clivent les liaisons peptidiques internes de façon à générer de plus petits oligopeptides qui seront ensuite dégradés par des exopeptidases (aminopeptidases et carboxypeptidases) pour produire des acides aminés. Ces réactions se déroulent en partie dans les PSV et le cytoplasme. Les acides aminés libres dans le cytoplasme sont ensuite convertis en glutamine et asparagine avant d'être transportés vers les organes en croissance.

Au cours de la digestion des protéines, les PSV fusionnent pour former de larges vacuoles lytiques dans lesquelles de nombreuses hydrolases sont sécrétées (Nonogaki, 2008, pour revue).

#### *1.4.3.2 Lipides de réserve*

Les triacylglycérols (TAG) constituent les huiles contenues dans les graines. Ces TAG sont mobilisés dès l'imbibition de la graine, puis majoritairement au cours de la phase post-germinative pour le développement de la plantule. Le catabolisme des TAG implique trois organites présents dans les cellules de l'embryon qui stockent les huiles :

- Les oléosomes dans lesquels commence l'hydrolyse des TAG en glycérol et en acides gras libres (AGL) ;
- Le glyoxysome où les acides gras libres sont oxydés et dans lequel le succinate est

synthétisé *via* le cycle du glyoxylate ;

- La mitochondrie, dans laquelle le succinate est converti en malate ou en oxaloacétate. Ces deux derniers sont ensuite transportés dans le cytosol où ils sont utilisés pour produire du saccharose.

Ainsi, l'hydrolyse initiale des TAG, appelée lipolyse, est effectuée par des lipases qui clivent les acides gras du squelette glycérol. Après phosphorylation, le glycérol est converti en hexoses dans le cytoplasme par néoglucogenèse. Les AGL transitent des oléosomes vers le glyoxysome, un organeite présent dans la plupart des graines stockant des lipides. Dans le glyoxysome, les AGL subissent des retraits séquentiels (hélice de Lynen) d'acétyl-coenzyme A (CoA) par  $\beta$ -oxydation. D'autres enzymes sont impliquées si les AGL sont insaturés ou contiennent un nombre impair d'atomes de carbones (Bewley, 1997, pour revue). L'acétyl-CoA généré est alors pris en charge par le cycle du glyoxylate. Les enzymes clés de ce cycle sont l'isocitrate lyase (IL) et la malate synthase (MS) qui produisent respectivement du succinate et du malate, qui sont transportés dans la mitochondrie et le cytosol. Les étapes finales de conversion des AGL et du glycérol se déroulent dans le cytosol *via* la néoglucogenèse, où les hexoses sont convertis en saccharose qui est transporté vers les organes en croissance. Dans certains tissus, l'acétyl-CoA généré *via* la  $\beta$ -oxydation des AGL peut être utilisé pour la synthèse d'acides aminés par des réactions partielles du cycle du glyoxylate et du cycle de Krebs. Après consommation des réserves lipidiques des cotylédons, le pool enzymatique du glyoxysome change, et ce dernier évolue en péroxysome, qui joue alors un rôle important dans la photorespiration (Bewley, 1997, pour revue).

## I.5 Objectifs de thèse

Après la découverte du processus autophagique et des gènes *ATG* impliqués dans sa machinerie moléculaire chez *S. cerevisiae*, de nombreux gènes d'autophagie ont été identifiés par homologie de séquence chez d'autres organismes eucaryotes, tels que les plantes.

Depuis quelques années, l'intérêt pour ce processus de dégradation est grandissant au sein de la communauté scientifique (Prix Nobel de médecine 2016, Yoshinori Ohsumi), et de nombreuses études font désormais état des rôles que joue l'autophagie au sein des organismes végétaux. Les rôles de l'autophagie sont très diversifiés et s'étendent de la réponse à une infection par un organisme pathogène jusqu'au recyclage nutritionnel (Guiboileau and Masclaux-Daubresse, 2012, pour revue).

Chez *Arabidopsis*, l'analyse de microarrays montre que les gènes d'autophagie sont particulièrement exprimés dans les feuilles sénescentes, ainsi que dans les graines au cours du développement embryonnaire ([bar.utoronto.ca/efp](http://bar.utoronto.ca/efp)).

Tandis que de nombreux travaux ont démontré les rôles que joue l'autophagie au cours de la sénescence et dans le recyclage nutritionnel au niveau des feuilles et des racines (Avila-Ospina et al., 2014, pour revue), jusqu'à ce jour aucune étude des rôles de l'autophagie dans la graine d'une plante dicotylédone telle qu'*Arabidopsis thaliana* n'a été réalisée. Outre la forte expression des gènes *ATG* dans les graines, l'intérêt d'une telle étude est motivé par l'observation des mutants d'autophagie qui remobilisent moins d'azote des feuilles vers les graines, et ce indépendamment de l'état de sénescence de la plante mère (Guiboileau et al., 2012). Il est en effet possible que cette perturbation de la remobilisation des molécules azotées soit à la fois due à un défaut d'autophagie dans les parties végétatives de la plante mère, ainsi qu'à un défaut d'autophagie dans les graines elles-mêmes.

Les objectifs de ce travail de thèse consistent ainsi à identifier les rôles que joue l'autophagie au sein de la graine en développement et au cours de sa germination. Il est question de déterminer dans quelle mesure l'autophagie affecte la morphologie de la graine, le développement embryonnaire, le remplissage de l'embryon en molécules de réserve, ainsi que d'identifier dans quel(s) tissu(s) sont exprimés les gènes d'autophagie, puis de tenter d'y observer des structures autophagiques par microscopie.

Afin d'étudier les rôles spécifiques de l'autophagie dans la graine, un mutant d'autophagie *atg5* incapable de former des autophagosomes a été caractérisé et comparé avec un génotype sauvage Col. Dans le but de déterminer si les phénotypes observés sont dépendants de l'état de nutrition de la plante mère ou du défaut d'autophagie dans la graine, les analyses comparatives

entre les deux génotypes ont été réalisées sur deux conditions de nutrition azotées : en azote limitant (2 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) et en azote pléthorique (10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

Ce travail de thèse s'articule en trois parties. Dans une première partie intitulée « Autophagie et remplissage de la graine », les graines du mutant *atg5* sont caractérisées d'un point de vue morphologique, et leur remplissage en molécules de réserves carbonées et azotées est étudié d'un point de vue quantitatif, qualitatif, et en rapport à la cinétique de développement de la graine (Fig. 35).

Dans une seconde partie intitulée « Localisation d'expression et activité autophagique », afin de déterminer à quel moment et dans quel(s) tissu(s) l'autophagie intervient au cours du développement de la graine, la localisation d'expression de certains gènes *ATG8*, la cinétique d'expression de tous les gènes *ATG* au cours du développement de la graine, et l'observation de structures autophagiques dans l'embryon ont été étudiées (Fig. 35).

Enfin, pour comprendre le rôle que joue l'autophagie au cours de la germination de la graine, une troisième partie expose les analyses effectuées de caractérisation du mutant *atg5* dans la dégradation des molécules de réserve, ainsi que l'étude de la cinétique d'expression des gènes *ATG* au cours de la germination *stricto sensu*, et la recherche d'une activité autophagique par des observations en microscopie dans la graine au cours de l'imbibition (Fig. 35).



Figure 35. Schéma de la stratégie employée pour identifier les rôles de l'autophagie au cours du développement et de la germination de la graine d'Arabidopsis. Sont présentées en marron les méthodologies utilisées dans la partie intitulée « Autophagie et remplissage de la graine », en bleu celles utilisées dans la partie « Localisation d'expression et activité autophagique », et en rose celles utilisées pour la partie « Autophagie et germination de la graine ».

## II. MATERIELS ET METHODES

### II.1 Matériels

#### II.1.1 Matériel végétal

##### II.1.1.1 Ecotype sauvage *Columbia-0* (Col)

L'écotype *Columbia-0* (Col) a été utilisé par les membres de l'*Arabidopsis Genome Initiative* pour le séquençage du génome d'*Arabidopsis* entre 1996 et 2000. Cet écotype est le plus utilisé pour la génération des collections de mutants disponibles à l'ABRC (*Arabidopsis Biological resource Center*) et au NASC (*The Nottingham Arabidopsis Stock Center*). Les plantes *Columbia-0*, définies comme Col dans ce travail de thèse, sont utilisées comme témoins.

##### II.1.1.2 Mutants d'autophagie *atg5.1*, *atg5.2* et *atg2*

Le mutant *atg5.1* (appelé plus simplement *atg5*) a été utilisé pour caractériser le rôle de l'autophagie dans le développement et la constitution des réserves de la graine d'*Arabidopsis*. Ce mutant *atg5* (SAIL\_129\_B07) a été conçu par insertion d'ADN-T dans le gène At5g17290 du fond génétique *Columbia d'Arabidopsis thaliana* et donné à l'ABRC par Syngenta. Le mutant *atg5.1* homozygote a été sélectionné sur antibiotique BASTA.

Les mutants *atg5.2* (SALK\_020601) et *atg2* (SALK\_076727) ont été créés au sein du *Salk Institute Genomic Analysis Laboratory* dans le fond génétique *Columbia* et donnés à l'ABRC et au NASC. Les mutants *atg5.1* et *atg2* homozygotes ont été initialement sélectionnés sur antibiotique kanamycine et ont depuis perdu leur résistance à cet antibiotique.

Les mutants *atg5.1* et *atg2* ont été phénotypés dans le cadre des travaux de (Yoshimoto et al., 2009).

##### II.1.1.3 Mutants *cru-* et *napin*

Le mutant nul *cru-* ne synthétisant pas de globulines 12S a été généré par croisements successifs des mutants simples *cru1* (SALK\_002668), *cru2* (SALK\_045987) et *cru3* (GK\_283D09) dans le cadre des travaux de Withana-Gamage et al. (2013). Les mutants *cru1* et *cru2* ont été créés au sein du *Salk Institute Genomic Analysis Laboratory* dans le fond génétique *Columbia* et sélectionnés sur kanamycine. Le mutant *cru-* a quant à lui été créé au cours du projet *GABI-Kat* initié en 1999 par le *Max Planck Institute* à Cologne (Allemagne) et donné au NASC. Le mutant *cru3* a été sélectionné sur l'antibiotique sulfadiazine.

Le mutant *RNAi-napin* (appelé *napin*) a été créé par clonage d'une cassette RNAi contenant les nucléotides 328 à 513 de la séquence du gène At4g27150 en orientations sens et antisens entre le promoteur 3X35S et le terminateur OS du plasmide pGSA1252, séparés par un fragment du gène GUS pour créer une structure ARNi en épingle à cheveux. Cette construction a été créée et clonée dans l'écotype *Columbia* d'*Arabidopsis* dans le cadre des travaux de Withana-Gamage et al. (2013).

### II.1.1.4 Fusions transcriptionnelles et traductionnelles ATG8::GFP

Des graines d'*Arabidopsis* homozygotes de l'écotype *Wassilewskija* (WS) transformées avec la construction Prom<sub>ATG8c</sub>::ATG8c::GUS, Prom<sub>ATG8e</sub>::ATG8e::GUS, Prom<sub>ATG8f</sub>::ATG8f::GUS ou Prom<sub>ATG8g</sub>::ATG8g::GUS ont été fournies par le Professeur Gad Galili (Weizmann Institute of Science, Israël). Ces constructions ont été utilisées dans le cadre des travaux de Sláviková et al. (2005).

### II.1.2 Souches bactériennes

Les bactéries *Escherichia coli* utilisées proviennent du kit « One shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* » (Invitrogen, C4040-06) et ont été utilisées pour la multiplication des vecteurs de clonage. Ces bactéries sont mises en culture à 37°C sur un milieu sélectif après transformation par choc thermique.

Les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* de souche GV3101::pMP90 ont été utilisées pour la transformation des plantes (Koncz et al., 1984). Cette souche dérive du fond sauvage C58. Elle possède une résistance à la rifampicine, ainsi qu'un plasmide Ti de virulence résistant à la gentamicine. Ces bactéries sont mises en culture à 28°C sur milieu sélectif après transformation par électroporation du plasmide binaire destiné à être transféré chez *Arabidopsis*.

### II.1.3 Vecteurs

Le vecteur pDONR207 (Invitrogen) est le vecteur donneur utilisé par la technologie Gateway. Il possède des séquences de recombinaison *attP1* et *attP2* permettant le clonage des produits de PCR amplifiés avec des amorces spécifiques de cette technique.

Le vecteur pEZS-CL de 5,7 kb a été créé au sein du Carnegie Science Center (Etats-Unis) et est utilisé pour créer des fusions traductionnelles en position N ou C-terminale de la GFP sous le contrôle du promoteur 35S. Les cassettes d'expression sont flanquées par des sites *Not1*. Le vecteur comprend un gène *GmB<sup>R</sup>* de résistance à la gentamicine.

Le vecteur pGWB4 de 17,1 kb a été créé dans le cadre des travaux de Nakagawa et al. (2007) et est utilisé pour créer des fusions traductionnelles en position C-terminale de la GFP. Ce plasmide ne

comporte aucune séquence promotrice d'expression. Il confère aux plantes une résistance à la kanamycine et à l'hygromycine.

Le vecteur pUBN-Dest de 10,8 kb a été créé dans le cadre des travaux de Grefen et al. (2010) et est utilisé pour créer des fusions traductionnelles en position C-terminale de la GFP. Ce vecteur permet une expression sous le contrôle du promoteur du gène *UBQ10* (At4g05320). Il confère aux plantes une résistance à l'herbicide BASTA.

Le plasmide pCambia d'environ 9 kb a été créé au sein de l'institut Cambia (Australie) dans le cadre du projet *Transbacter* et permet l'expression d'un gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur 35S. Il confère aux plantes la résistance à la kanamycine.



## II.2 Méthodes

### II.2.1 Culture des plantes

#### II.2.1.1 Cultures en serre

La sélection du matériel végétal après transformation est réalisée en serre avec une photopériode de 13h de lumière (intensité minimale de  $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). La température est comprise entre 17 et 25°C et l'hygrométrie n'est pas contrôlée. Le substrat utilisé est un terreau horticole arrosé régulièrement par une solution nutritive (Fertil).

#### II.2.1.2 Culture en conditions contrôlées

A l'exception du matériel végétal sélectionné après transformation, toutes les cultures ont été effectuées en chambres avec des conditions contrôlées.

Les graines sèches ont été stratifiées pendant 48h à 4°C et à l'obscurité afin de lever la dormance et homogénéiser la germination, puis semées en chambre de culture sur sable à raison d'une plante par pot. Les plantes sont cultivées en condition de jours courts (8h de jour/ 16h de nuit) pendant 55 jours pour favoriser le développement de la rosette, puis transférées en chambre avec des conditions de jours longs (16h de jour/ 8h de nuit) pour induire la floraison (Tableau 1). L'éclairage des chambres de culture est assuré par des lampes à mercure et la PPF (Photosynthetic Photon Flux Density) est de  $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$  (intensité 3, tableau 1). La température est régulée en fonction des périodes d'aube, de jour, de crépuscule et de nuit. L'hygrométrie des chambres est maintenue à 65%. Les arrosages sont effectués 3 fois par semaine par immersion partielle pendant 2h dans la solution nutritive définie selon l'expérience.

Deux nutritives azotées ont été utilisées, soit en condition d'azote pléthorique avec 10 mM de nitrate, soit en condition d'azote limitant avec 2 mM de nitrate (Tableau 2).

Jours courts				
	Aube	Jour	Crépuscule	Nuit
Durée	1h	6h	1h	16h
Température	19°C	21°C	20°C	18°C
Hygrométrie	65%	65%	65%	65%
Eclairage (Intensité)	3	3	3	0
Jours longs				
	Aube	Jour	Crépuscule	Nuit
Durée	2h	12h	2h	8h
Température	19°C	21°C	20°C	18°C
Hygrométrie	65%	65%	65%	65%
Eclairage (Intensité)	2	3	2	0

Tableau 1. Paramètres des chambres de culture.

	2 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	10 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Phosphate	0,25 mM	0,25 mM
Sulfate	0,25 mM	0,25 mM
Magnésium	0,25 mM	0,25 mM
Sodium	0,20 mM	0,20 mM
Potassium	2,75 mM	5,25 mM
Calcium	0,50 mM	2,50 mM
Ions chlorure	0,70 mM	0,25 mM
Fer-EDTA	10 mg.mL <sup>-1</sup>	10 mg.mL <sup>-1</sup>
Micro-éléments	1 mL.L <sup>-1</sup>	1 mL.L <sup>-1</sup>

Tableau 2. Composition des solutions nutritives. La solution mère des micro-éléments est composée de : 10 mM MnSO<sub>4</sub>, 24 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,9 mM CuSO<sub>4</sub>, 0,04 mM (NH<sub>4</sub>)Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.

### II.2.1.3 Marquage des boutons floraux

Les boutons floraux qui commencent à s'ouvrir (un point blanc apparaît à l'extrémité du bouton) sont marqués à l'aide d'un fil de coton sur le pédoncule floral. Ce stade de développement coïncide avec l'étape de pollinisation de la fleur et sert de référence pour la datation de la silique et des graines qu'elle contient. L'unité de développement utilisée est le Jour Après Fécondation (JAF)

### II.2.1.4 Transformation des plantes par *Agrobacterium tumefaciens*

Le plasmide binaire recombiné qui contient l'ADN-T est introduit dans la souche GV3101::pMP90 d'*Agrobacterium tumefaciens* par électroporation. Les bactéries recombinantes sont sélectionnées sur milieu LB supplémenté en rifampicine, gentamicine, ainsi qu'en un antibiotique de sélection spécifique du plasmide recombiné. Un clone isolé est mis en culture pour ensuite réaliser la transformation des plantes d'écotype *Columbia* par la technique du floral dipping (Clough and Bent, 1998) qui repose sur une méthode d'inoculation au Silwet. Le Silwet est un puissant agent mouillant qui facilite la pénétration des agrobactéries dans les interstices cellulaires par les lésions tissulaires qu'il engendre.

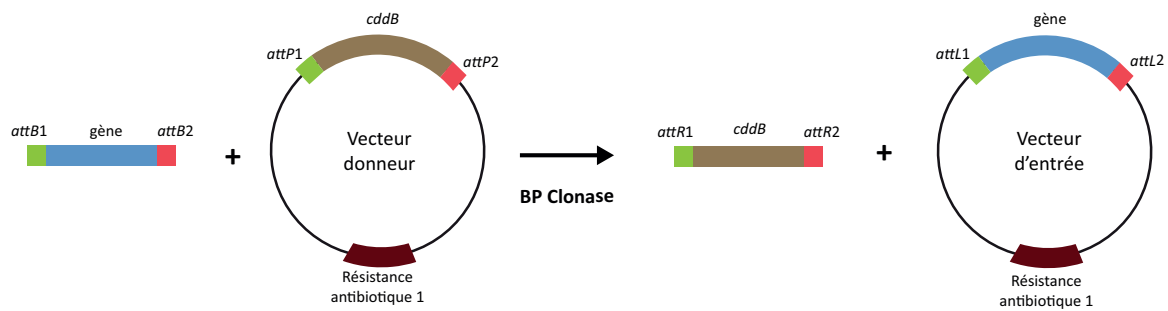
## II.2.2 Techniques de biologie moléculaire

### II.2.2.1 Stratégies de clonage

La construction Prom<sub>ATG8f</sub>::GFP a été créée par Anne Marmagne (INRA de Versailles, IJPB) en utilisant la technologie Gateway (Fig. 36). La séquence du promoteur du gène *ATG8f* (At4g16520) flanquée des sites de recombinaison *attL* a été amplifiée par PCR. Le vecteur d'entrée utilisé est le pDONR207 et le vecteur d'expression est le pGWB4.

La construction Prom<sub>UBQ10</sub>::GFP::ATG8a a été créée par Taline Elmayan (INRA de Versailles, IJPB) en utilisant également la technologie Gateway (Fig. 36). La séquence du gène *ATG8a* (At4g21980) flanquée des sites de recombinaison *attL* a été amplifiée par PCR. Le vecteur d'entrée utilisé est le pDONR207 et le vecteur d'expression est le pUBN-Dest.

## Construction du vecteur d'entrée Gateway



## Obtention du vecteur d'expression Gateway

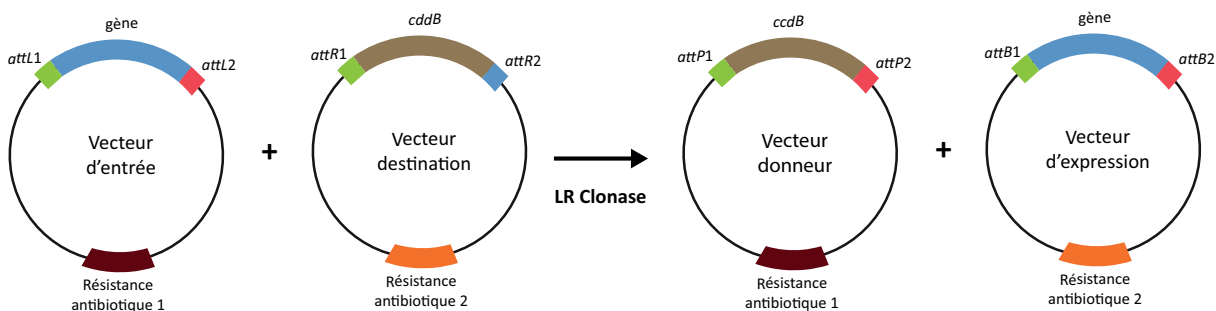


Figure 36. Schéma de la stratégie de clonage par la technologie Gateway (Invitrogen). Le gène d'intérêt est amplifié par PCR avec des extrémités attB1 et attB2 puis le fragment est inséré dans un vecteur donneur à la place de la cassette suicide ccdB par recombinaison avec une BP Clonase. Le gène d'intérêt est ainsi cloné dans le vecteur d'entrée. Le gène d'intérêt est ensuite transféré du vecteur d'entrée vers le vecteur destination par une nouvelle recombinaison en utilisant une LR Clonase.

La construction Prom<sub>ACTIN</sub>::GFP::ATG8f a été créée par Loreto Naya (INRA de Versailles, IJPB) en utilisant un vecteur pEVS-CL dont la région promotrice 35S a été remplacée par le promoteur du gène *ACTIN2* (At3g18780) (Fig. 37). Une digestion avec les enzymes de restriction *SacI* et *NcoI* a permis d'extraire le promoteur 35S du plasmide, et la séquence du promoteur *ACTIN* amplifiée avec des amorces ayant des extrémités compatibles avec les enzymes de restriction a été insérée à sa place. La construction Prom<sub>ACTIN</sub>::GFP::ATG8f a ensuite été extraite du vecteur pEVS-CL avec l'enzyme de restriction *NotI* qui génère des coupures franches. Cette construction a enfin été insérée dans le vecteur pCambia digéré avec *SmaI*.

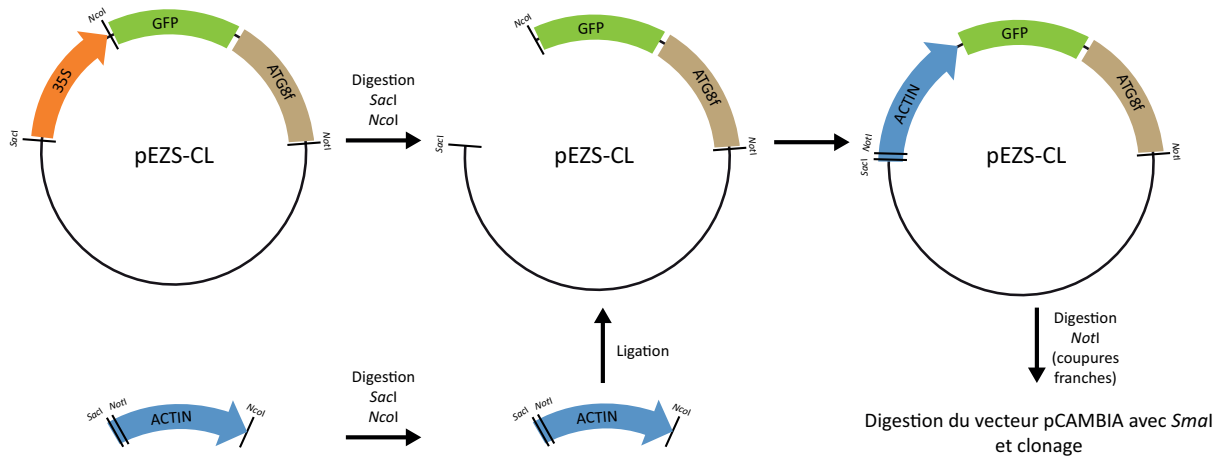


Figure 37. Schéma de la stratégie de clonage de la construction *Prom<sub>ACTIN</sub>::GFP::ATG8f* pour la transformation d'*Arabidopsis thaliana*.

### II.2.2.2 PCR quantitative

#### II.2.2.2.1 Extraction et purification des ARN totaux

Lors de la récolte, les siliques sont immédiatement congelées dans l'azote liquide, puis conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Lors de l'extraction, trois siliques sont broyées au mortier et pilon dans l'azote liquide. Afin d'éviter l'obtention d'une pâte visqueuse, un volume de  $250\ \mu\text{L}$  de tampon d'extraction ( $0,1\ \text{M LiCl}$  ;  $0,1\ \text{M Tris pH 8}$  ;  $10\ \text{mM EDTA}$  ;  $1\%$  SDS ;  $1,5\%$   $\beta$ -mercaptoéthanol) est ajouté dans le mortier froid pendant le broyage. La poudre fine obtenue est transférée dans un tube de  $2\ \text{mL}$  et un volume de  $450\ \mu\text{L}$  de phénol/chloroforme 5:1 (Sigma, P1944) est ajouté au tube. Le mélange est vortexé vigoureusement puis centrifugé ( $13000\ \text{x g}$ ,  $15\ \text{min}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Le surnageant est transféré dans un nouveau tube de  $2\ \text{mL}$  et un volume de  $500\ \mu\text{L}$  de phénol/chloroforme 5:1 (Sigma, P1944) est ajouté. Le mélange est vortexé et centrifugé ( $13000\ \text{x g}$ ,  $5\ \text{min}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Le surnageant est transféré dans un nouveau tube de  $2\ \text{mL}$  et un volume de  $400\ \mu\text{L}$  d'une solution de LiCl  $8\text{M}$  est ajouté et mélangé par retournements du tube. Les ARN sont ensuite précipités pendant une heure à  $-80^{\circ}\text{C}$ , puis le tube est centrifugé ( $13000\ \text{x g}$ ,  $30\ \text{min}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Un volume de  $1\ \text{mL}$  d'éthanol  $70\%$  froid est ajouté dans le tube qui est de nouveau centrifugé ( $13000\ \text{x g}$ ,  $5\ \text{min}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Le surnageant est alors éliminé et le culot contenant les ARN est asséché par pipetage. Le culot d'ARN est repris dans  $40\ \mu\text{L}$  d'eau RNase-free (rendement moyen :  $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ).

Les ARN extraits sont ensuite purifiés sur une colonne « Micro Bio-Spin » (Biorad, 7326206). Pour ce faire,  $5\ \text{mg}$  de PVPP insoluble sont ajoutés dans la colonne, puis un volume de  $400\ \mu\text{L}$  d'eau RNase-free y est ajouté. La colonne est placée sur un tube de  $2\ \text{mL}$  puis centrifugée ( $1000\ \text{x g}$ ,  $2\ \text{min}$ , température ambiante). L'eau est jetée et deux lavages avec  $400\ \mu\text{L}$  d'eau sont réalisés. La colonne préparée est ensuite placée sur un nouveau tube de  $2\ \text{mL}$  et les  $40\ \mu\text{L}$  d'ARN extraits précédemment

sont disposés sur la colonne. Après une attente de 5 min, le montage est centrifugé (1000 x g, 2 min, 4°C). L'éluat contenant les ARN est récupéré et repassé sur la colonne deux fois. Les ARN sont collectés avec un rendement moyen de 0,5 µg/µL.

Les ARN subissent ensuite un traitement à la DNase afin de dégrader l'ADN génomique. Pour cela, 2 µg d'ARN sont traités avec la DNase commerciale « DNase I, RNase-free » (Thermo Scientific, EN0521) selon le protocole du kit. Le mélange réactionnel est additionné d'un inhibiteur de RNase commercial « RiboLock RNase Inhibitor » (Thermo Scientific, E00382). Les ARN extraits sont alors utilisables pour l'étape suivante de transcription inverse en ADNc.

### *II.2.2.2.2 Transcription inverse*

La transcription inverse des ARN totaux extraits en ADNc est réalisée selon le protocole du kit commercial « M-MuLV Reverse Transcriptase » (Thermo Scientific, EP0352). Les ADNc obtenus peuvent être dilués pour l'analyse en PCR quantitative.

### *II.2.2.2.3 PCR quantitative*

Les réactions de PCR quantitative sont réalisées dans un thermocycleur « CFX 96 » (Biorad). Le volume réactionnel de 20 µL comprend un mélange de 5 µL d'ADNc (comprenant de  $25 \cdot 10^{-2}$  à  $25 \cdot 10^{-5}$  µg d'ADNc), 0,6 µg de chacune des deux amorces à 10 µM, 10 µL d'une solution commerciale « Takyon Rox SYBR MasterMix dTT Blue » (Eurogentec, UF-RSMT-B0710) contenant la Taq polymérase, les dNTP et le Sybr Green dans un tampon de réaction, et 3,8 µL d'eau. Les ADNc sont dénaturés pendant 5 min à 95°C. Cette étape permet également d'activer la Taq polymérase utilisée (« hot start »). Chaque cycle de PCR comprend ensuite une phase de dénaturation de l'ADN à 95°C (5 s), une étape d'hybridation des amorces à 60°C (20 s) et une phase d'élongation à 72°C (20 s). Afin de vérifier la spécificité du produit amplifié, la PCR quantitative est suivie d'une lente montée en température à raison de 0,1°C par seconde jusqu'à 95°C. Au cours de cette rampe de température, la fluorescence diminue et chute brusquement lorsque la  $T_m$  (température de demi-dénaturation) du produit de PCR est atteinte. Il est ainsi possible de déterminer la nature et la pureté du produit PCR, chaque fragment amplifié ayant une  $T_m$  spécifique.

### *II.2.2.2.4 Choix des amorces*

Les amorces utilisées ont une longueur moyenne de 20 bases et permettent d'amplifier un fragment de 150 à 300 pb. Pour l'ensemble des études d'expression menées, deux gènes de référence ont été utilisés : *E1Fα* et *APC2* pour les graines en développement, *ASAR1* et *MAP2B* pour les graines au cours de la germination (Dekkers et al., 2012). Chacun des couples d'amorces utilisés a une efficacité de 100% ( $\pm$  5%). Afin de déterminer l'efficacité des amorces, une gamme décroissante de concentrations en ADNc est réalisée et le couple d'amorces dont on souhaite déterminer

l'efficacité est testé sur chaque dilution. A chaque dilution correspond un nombre spécifique de cycles (croissant avec la dilution) nécessaire pour l'obtention d'une même quantité arbitraire de copies. La représentation graphique de ce nombre de cycles en fonction du logarithme de la concentration en ADNc permet de déterminer la relation linéaire entre ces deux variables. La pente de la droite obtenue permet de calculer l'efficacité du couple d'amorces testé. Les amorces utilisées sont présentées en annexe 2.

### **II.2.3 Analyses biométriques**

#### **II.2.3.1 Mesure de la taille des graines**

Des graines sèches d'Arabidopsis sont disposées sur un ruban adhésif double face préalablement collé sur une feuille de papier blanc, puis scannées avec une résolution d'au moins 300 dpi. Les images obtenues sont importées dans le logiciel de traitement et d'analyse d'images « ImageJ ». La fonction « Analyze Particles » du logiciel permet de mesurer automatiquement la surface des graines.

#### **II.2.3.2 Mesure de la masse et du contenu en eau des graines**

Après ouverture des siliques, les graines d'Arabidopsis extraites sont disposées dans des tubes hermétiques conservés sur glace. Ces graines sont ensuite rapidement pesées afin d'éviter le dessèchement, en particulier s'il s'agit de jeunes graines en cours de développement. Une microbalance de précision (Mettler Toledo, XS3DU) est utilisée pour mesurer la masse fraîche des graines. Les graines sont ensuite disposées dans un four à 70°C pendant 24h, puis pesées de nouveau. La différence de masse entre graines fraîches et graines sèches permet de calculer la teneur en eau des graines.

#### **II.2.3.3 Mesure de l'aire de diffusion des mucilages solubles et insolubles**

Le rouge de ruthénium est un colorant qui interagit avec les homogalacturonanes des pectines du mucilage de la graine. Afin d'observer l'aire de diffusion du mucilage soluble, 10 mL d'agarose à 0,5% contenant 0,01% de rouge de ruthénium sont coulés dans une boîte de Pétri. Les graines matures d'Arabidopsis sont déposées sur le gel. Les graines s'imbibent et le mucilage présent dans le tégument de la graine est extrudé et diffuse à la surface du gel en se colorant en rouge. Après une demi-heure, les graines sont observées à la loupe binoculaire et la taille du halo mucilagineux est quantifié avec le logiciel « ImageJ ».

Pour le mucilage adhérent, des graines sont immergées dans une solution de rouge de ruthénium à 0,01% pendant 15 minutes, puis rincées trois fois à l'eau distillée. Seul le mucilage

adhérent reste sur la graine, le mucilage soluble ayant été solubilisé. Les graines sont ensuite observées dans une goutte d'eau à la loupe binoculaire et le halo mucilagineux est mesuré avec le logiciel « ImageJ ».

### II.2.4 Analyses biochimiques

#### II.2.4.1 Quantification du carbone et de l'azote total

Après dessiccation au four à 70°C, 1 à 2 µg de graines sont pesés dans des capsules d'étain afin de déterminer le contenu en azote et en carbone total *via* un analyseur élémentaire « FLASH 2000 organic » (Thermo Fisher Scientific) selon la méthode de Dumas.

#### II.2.4.2 Dosage des acides gras

La quantité et la composition des acides gras de la graine en développement sont déterminées par chromatographie en phase gazeuse par analyse des esters méthyliques d'acides gras correspondants. 100 graines lyophilisées et pesées sont placées dans un tube en verre avant d'y ajouter un mélange méthanol:acide sulfurique:toluène (100:2,5:30, v/v/v) contenant également une quantité connue d'acide gras C17:0 comme référence (Li et al., 2006). Après dérivation des acides gras en esters méthyliques pendant 90 min à 95°C, ces derniers sont extraits dans l'hexane et séparés par chromatographie en phase gazeuse puis analysés selon la méthode utilisée par Miquel et al. (2014).

#### II.2.4.3 Dosage des protéines totales

Lors de la récolte, les siliques sont ouvertes pour en extraire les graines en développement. Les graines sont immédiatement congelées dans l'azote liquide, puis lyophilisées. 2 mg de graines sèches sont broyées au broyeur à billes avec 50 µL de tampon d'extraction (Hepes 50 mM pH 7,5 ; SDS 3%, Glycérol 10% ; NaCl 150 mM ; inhibiteurs de protéases « cOmplete Protease Inhibitor Cocktail™ » 1X (Roche, 11697498001) ; inhibiteur du protéasome MG132 (Sigma, M7449) 0,1 mM ; DTT 20 mM). Le broyat est ensuite centrifugé (13000 x g, 15 min, température ambiante) et le surnageant conservé. 10 µL d'extrait protéique sont utilisés pour le dosage des protéines totales avec le kit commercial « 2D-Quant kit » (GE Healthare, GE80-6483-56).

#### II.2.4.4 Séparation des protéines

##### II.2.4.4.1 Electrophorèse SDS-PAGE à une dimension

L'extraction des protéines totales est effectuée à partir de 2 mg de graines pour chaque échantillon (avec 3 réplicats biologiques) selon le protocole utilisé par Deruyffelaere et al. (2015). La



séparation des protéines et le western blot sont également conduits d'après le protocole de Deruyffelaere et al. (2015).

Les sérums polyclonaux utilisés contre les albumines 2S et les globulines 12S ont été produits par immunisation sous-cutanée d'un lapin avec les protéines purifiées obtenues selon Bérot et al. (2005). Un mg de protéines 2S ou de protéines 12S dans du PBS (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,2), émulsifiées de façon complète (première injection) ou incomplète (injection de rappel) avec l'adjuvant de Freund ont été injectées tous les 15 jours. Les sérums ont été collectés après la quatrième injection. Ces sérums ont été produits dans le cadre des travaux de Colette Larré (INRA de Nantes, travaux non publiés) et utilisés dans les travaux de d'Andréa et al. (2007) et Jolivet et al. (2011).

### *II.2.4.4.2 Electrophorèse SDS-PAGE à deux dimensions*

Afin de séparer et d'identifier les protéines par SDS-PAGE en deux dimensions, un tampon d'extraction spécifique sans SDS doit être utilisé. Trente mg de graines sèches de chaque échantillon (avec 3 réplicats biologiques) sont broyés au mortier et pilon dans l'azote liquide pendant 1 min. Le tampon d'extraction contenant un inhibiteur de protéase (Rajjou et al., 2008) est ajouté dans le mortier avant de continuer le broyage pendant 2 min. Le broyat obtenu est ensuite placé dans un tube et additionné d'une solution composée d'un mélange de DNase, RNase et DTT (Nguyen et al., 2015) puis incubé 1h à 4°C. Le tube est centrifugé (13000 x g, 10 min, 4°C) et l'extrait protéique (surnageant) est récupéré.

La séparation des protéines est effectuée à partir d'un volume de 20 µL d'extrait protéique, qui équivaut à environ 150 µg de protéines. L'électrophorèse sur gel en deux dimensions (2D) est conduite selon le protocole utilisé par Nguyen et al. (2015).

Les gels 2D sont ensuite colorés au nitrate d'argent d'après le protocole de Rajjou et al. (2008) puis séchés (Nguyen et al., 2015). Les images des gels sont obtenues avec un scanner « Epsom Perfection V700 ». L'analyse quantitative sur images est ensuite réalisée avec le logiciel « Progenesis Samespot » pour quantifier les points (spots) et détecter les différences d'accumulation de protéines. L'Analyse en Composante Principale (ACP) est réalisée d'après la différence d'abondance des protéines qui est corrélée à l'intensité des spots.

Les spots dont l'intensité varie fortement en fonction du génotype et/ou de la condition de nutrition ont été découpés des gels et envoyés à la Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest (PAPPSO) afin d'identifier les séquences peptidiques des protéines, après digestion à la trypsine et analyse par LC-MS/MS.

## II.2.5 Analyses cytologiques

### II.2.5.1 Fixation

Le matériel est récolté et immédiatement fixé sous vide dans le formaldéhyde. Les siliques sont scarifiées ou coupées en deux afin que le fixateur pénètre mieux les tissus. Après avoir cassé le vide trois fois de suite, la fixation s'effectue pendant la nuit à 4°C, toujours sous vide. Le formaldéhyde est préparé extemporanément, à la concentration de 4%, à partir de paraformaldéhyde dans un tampon PBS (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,2).

### II.2.5.2 Décoloration des graines

#### *II.2.5.2.1 Décoloration à l'hydrate de chloral*

Afin de suivre la morphogenèse de l'embryon, des siliques de 2 à 12 JAF sont disséquées et les graines qu'elles contiennent sont décolorées pendant 2 à 24h par une solution d'hydrate de chloral/glycérol/eau (8:2:1, p/v/v), qui possède la propriété de vider les cellules de leur contenu. Les graines sont montées entre lame et lamelle et observées au microscope (Zeiss) avec des objectifs Nomarski (objectifs à contraste de phases).

#### *II.2.5.2.2 Décoloration à l'hydroxyde de sodium*

Après récolte, les siliques sont disséquées et les graines qui en sont extraites sont fixées (voir II.2.5.1). Les graines sont éclaircies pendant au moins 2h à 37°C dans une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH 200 mM, SDS 1%) puis lavées deux fois dans des bains d'eau pendant 5 min. A cette étape, les tannins s'oxydent et les jeunes graines initialement vertes/transparentes deviennent roses. Ces graines sont ensuite décolorées pendant 30 min à température ambiante dans une solution de Javel 5%, puis lavées deux fois dans des bains d'eau de 5 min. Cette technique de décoloration peut être utilisée sur des graines après une coloration GUS.

### II.2.5.3 Coloration GUS

La détection de l'activité GUS au niveau tissulaire nécessite l'utilisation de l'acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronique (X-GlucA), dissout dans le diméthylformamide à une concentration stock de 10 mg pour 100  $\mu$ L. Celui-ci est transformé par la  $\beta$ -Glucuronidase en acide glucuronique et ClBr-indigo. Les tissus à analyser sont récoltés et fixés (voir II.2.5.1), puis sont incubés dans un tampon d'infiltration (tampon GUS) préparé extemporanément (tampon phosphate 50 mM pH 7, EDTA 10 mM, Triton X-100 1%, X-GlucA 2 mM). Lorsque l'activité GUS étudiée est particulièrement forte, l'ajout de ferricyanure et de ferrocyanure dans le tampon permet d'éviter la diffusion du composé indigo. Après infiltration des échantillons sous vide, ceux-ci sont placés à 37°C, à l'obscurité,

durant 2 à 24h selon l'activité du promoteur étudié. Après incubation, les tissus sont inclus en résine ou directement observés au microscope.

#### II.2.5.4 Coloration des parois cellulaires au calcofluor

Après coupe au microtome (voir II.2.5.5.4) ou décoloration de graines entières à l'hydroxyde de sodium (voir II.2.5.2.2), les tissus des graines peuvent être marqués au calcofluor afin d'observer les parois cellulaires au microscope confocal (excitation = 365-395 nm, émission = 420 nm). Les lames ou les graines entières sont immergées dans une solution de calcofluor 0,5% (Sigma, F3543) pendant 10 min (coupes sur lames) à plusieurs jours (graines entières). Les échantillons sont ensuite lavés trois fois dans l'eau pendant 10 min.

#### II.2.5.5 Coupes du matériel végétal

##### II.2.5.5.1 Déshydratation dans l'éthanol

Pour inclure les siliques dans la résine ou la cire, celles-ci doivent au préalable être déshydratées dans l'éthanol. En effet, les milieux d'inclusion sont miscibles dans l'alcool mais pas dans l'eau. Les siliques fixées sont ainsi plongées dans des bains successifs avec une concentration d'éthanol croissante (Tableau 3).

Bains (4°C)	Ethanol 100%	PBS	Durée
1	1/3	2/3	1 h
2	1/2	1/2	1 h
3	2/3	1/3	1 h
4	pur	-	1h

Tableau 3. Bains successifs pour la déshydratation des siliques dans l'éthanol.

##### II.2.5.5.2 Inclusion en résine

Après coloration selon la méthode GUS (voir II.2.5.3), les siliques sont déshydratées dans l'éthanol (voir II.2.5.5.1) puis subissent des bains successifs d'éthanol contenant une concentration croissante en résine d'un kit commercial « Technovit 7100 » (Technovit, 14655) (Tableau 4). Une fois l'éthanol remplacé en totalité par la résine liquide, les siliques sont disposées dans des moules en silicone. La résine est additionnée d'un durcisseur « Hardener II » contenu dans le kit et versée délicatement dans les moules. Les moules sont recouverts d'un parafilm pour faciliter la polymérisation de la résine en anaérobie à 4°C. Une fois polymérisés, les blocs de résine sont démoulés et coupés grâce à un microtome à rotation (Leica) à une épaisseur de 10 µm. Les coupes obtenues sont alors déposées sur lames de verre.

Bains (4°C)	Ethanol 100%	Résine	Durée
1	2/3	1/3	12 h
2	1/2	1/2	12 h
3	1/3	2/3	24 h
4	-	pure	5 jours

Tableau 4. Bains successifs de résine pour l'inclusion des siliques. Au cours du dernier bain, la résine doit être remplacée au moins une fois par jour.

#### II.2.5.5.3 Inclusion en gélose

L'inclusion en gélose est utilisée pour réaliser des coupes au vibratome. Les siliques fraîchement récoltées sont ouvertes le long du replum et sont disposées au fond de moules en plastique. Un milieu d'inclusion gélosé composé de 8% d'agarose à faible température de fusion (Sigma, A9414) est coulé tiède dans les moules. Après solidification, les blocs de gélose sont démoulés et coupés au vibratome (Leica) avec une épaisseur de 50 µm.

#### II.2.5.5.4 Inclusion en cire

L'inclusion en cire est utilisée avant l'immunolocalisation sur lames. Après fixation (voir II.2.5.1) et déshydratation (voir II.2.5.5.1), les siliques sont plongées dans des bains successifs d'éthanol et de cire (Polyéthylène glycol/1-hexadecanol 9:1 m/m) à 40°C (Tableau 5). Les siliques sont ensuite déposées au fond de moules en silicone puis recouvertes de cire. La cire durcit à température ambiante en quelques minutes. Les blocs sont ensuite démoulés et coupés grâce à un microtome à rotation (Leica) à une épaisseur de 10 µm.

Bains (40°C)	Ethanol 100%	Cire	Durée
1	1/2	1/2	12h
2	-	pure	12h
3	-	pure	12h
4	-	pure	12h

Tableau 5. Bains successifs de cire pour l'inclusion des siliques.

#### II.2.5.6 Immunolocalisation

L'immunolocalisation est effectuée sur des siliques de plantes exprimant la construction Prom<sub>Actine</sub>::GFP::ATG8f. Les siliques sont incluses dans la cire et coupées au microtome (voir II.2.5.5.4).

Les coupes sont disposées sur une lame en verre « Polysine » recouverte d'un adhésif (Thermo Scientific, P4981) qui est plongée dans différents bains d'alcool afin d'éliminer la cire (tableau 6). La lame subit ensuite deux bains dans un tampon citrate (Promega, 4261) pendant 1 min à 90°C puis est rincée dans du PBS (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,2) pendant 5 min. Le blocage des sites d'interactions non spécifiques entre les tissus végétaux et les anticorps est réalisé en plongeant la lame dans une solution d'albumine de sérum bovin (PBS, BSA 1%) pendant une heure à température ambiante. Une solution de 500 µL d'anticorps primaires (anticorps commerciaux monoclonaux anti-GFP (Clontech, 632381) dilués au 1/500<sup>ème</sup>, PBS, BSA 1%) produits chez la souris est déposée sur la lame qui est incubée une nuit à 4°C dans une chambre humide. La lame est ensuite rincée trois fois pendant 10 min dans du PBS avant d'y déposer 500 µL d'une solution d'anticorps secondaires (anticorps « Alexa Fluor 488 » dilués au 1/250<sup>ème</sup> (Life technologies, 1711001), PBS) produits chez la chèvre. Une lamelle est enfin montée sur la lame avec une solution composée de 50% de glycérol et de 50% de PBS.

Bains (22°C)	Ethanol 100%	PBS	Durée
1	pur	-	10 min
2	pur	-	10 min
3	1/2	1/2	5 min
4	1/3	2/3	5 min
5	-	pur	5 min
6	-	pur	5 min

Tableau 6. Bains successifs d'élimination de la cire sur lames. Les échantillons restent fixés aux lames « Polysines » recouvertes d'un adhésif.

## II.2.6 Microscopie

Toutes les observations en microscopie confocale ont été effectuées sur un microscope TCS SP5 (Leica) à l'exception de l'observation des autophagosomes dans l'embryon au cours de la germination qui a été réalisée sur un microscope TCS SP2 (Leica).

Les observations en lumière blanche ont été réalisées sur un microscope DMRB (Leica) et celles en lumière transmise avec un objectif de Nomarski (DIC) sur un microscope AxioObserver (Zeiss).

### III. RESULTATS

#### III.1 Autophagie et remplissage de la graine

Chez *Arabidopsis thaliana*, la mutation d'un gène unique impliqué dans la « core machinery » de l'autophagie entraîne systématiquement l'apparition de phénotypes tels qu'une réduction de la taille des rosettes, une senescence précoce et une forte réduction du rendement en graines (Yoshimoto et al., 2010). Les plantes mutantes pour les gènes *ATG5* et *ATG2* par exemple ne sont plus capables de produire des autophagosomes et montrent des phénotypes parmi les plus sévères à l'échelle de la plante entière, et notamment au niveau du rendement en graines (Guiboileau et al., 2012).

Le mutant *atg2* a été initialement incorporé à nos études, mais le très faible rendement de ce mutant rend difficile son utilisation pour la caractérisation des phénotypes liés à l'autophagie sur la graine. Nous avons donc été contraints d'en arrêter l'étude. En ce qui concerne le mutant *atg5*, nous disposons de deux lignées d'origines différentes (voir II.1.1.2). Tous les travaux préliminaires ont montré que ces deux mutants présentaient les mêmes phénotypes quantitativement et qualitativement. Nous avons donc axé notre étude uniquement sur le mutant *atg5.1*.

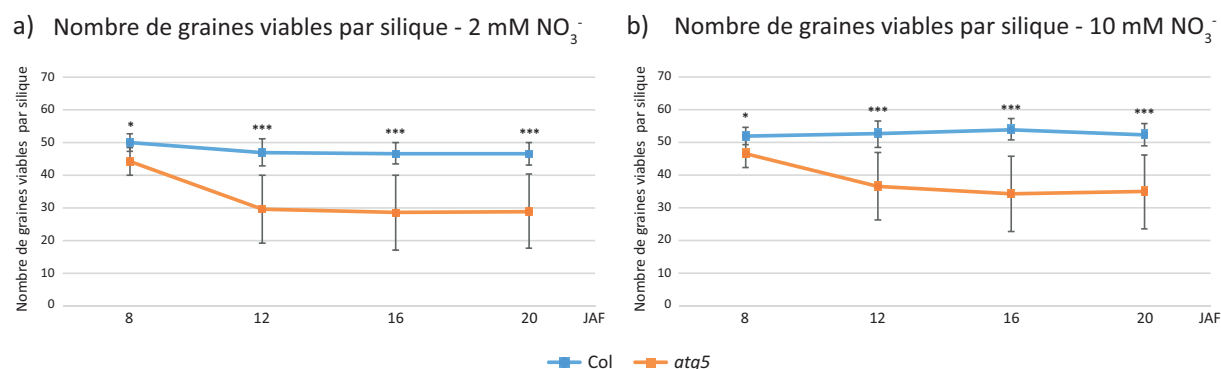
Ce chapitre traitera ainsi des phénotypes observables sur des graines de plantes mutantes *atg5.1* cultivées avec un apport pléthorique ou limité en nitrate. Ces deux conditions de culture sont essentielles pour distinguer les phénotypes liés à la nutrition de la plante mère influençant le remplissage des grains, des phénotypes qui sont liés au déficit d'autophagie dans la graine.

##### III.1.1 Autophagie et arrêt de croissance de l'embryon

###### III.1.1.1 Nombre de graines par silique et taux d'avortement

Les plantes mutantes *atg5* produisent moins de hampes florales et donc moins de siliques que les plantes sauvages. Le nombre de graines viables par silique a été comptabilisé chez ce mutant au cours du développement du fruit, de 8 à 20 jours après fécondation de la fleur (JAF) (Fig. 38). Les graines qui apparaissent petites, fripées et desséchées au cours du développement sont incapables de germer après 28 JAF et n'ont pas été prises en compte. On observe ainsi qu'en condition de culture avec 2 mM ou 10 mM de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), dès 8 JAF, les siliques sauvages contiennent davantage de graines que les siliques mutantes, et cet écart se creuse encore davantage dès 12 JAF. En effet, tandis que chez Col le nombre de graines viables par silique reste quasiment le même tout au long du développement, on observe à 12 JAF une diminution importante du nombre de graines viables par silique chez le mutant *atg5*, allant jusqu'à une diminution d'un tiers pour la culture à 2

mM de nitrate et à un cinquième pour celle à 10 mM de nitrate (Fig.38). Ainsi, la grande différence du nombre de graines viables par silique entre plantes sauvages et mutantes résulte du taux important d'avortement chez *atg5* au cours du développement de l'embryon. Il est à noter que dans la majorité des cas, les graines avortées sont localisées vers la pointe des siliques (Fig. 39) qui présentent un rétrécissement dans leur partie haute, accompagné d'un blanchissement des tissus. Les graines contenues dans cette portion de la silique sont brunes et desséchées, dépourvues d'embryon à la dissection. Cette portion de silique correspond au point le plus éloigné du pédoncule par lequel arrivent les nutriments nécessaires au développement de l'embryon et au remplissage du grain. Par ailleurs, bien que ce phénotype soit plus fort en condition de limitation nutritionnelle, le fait qu'il soit également observé en condition non limitante d'azote montre qu'il ne s'agit pas d'un phénotype lié à la nutrition par la plante mère, mais bien lié au déficit d'autophagie dans la silique ou la graine.



c)

Pourcentage moyen d'avortement des graines par silique entre 8 et 12 JAF	Col	<i>atg5</i>
2 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5,9%	33,2%
10 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0%	21,2%

Figure 38. Graphiques présentant les courbes d'évolution du nombre de graines viables au cours du développement chez le mutant *atg5* en condition de limitation nutritionnelle en azote (a) et en condition d'azote non limitante (b). Le pourcentage moyen de graines avortées dans une silique entre 8 et 12 jours de développement (JAF) est présenté en (c). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés sur 20 échantillons biologiques ; \* : p-value<5%, \*\* : p-value<1%, \*\*\* : p-value<1‰.

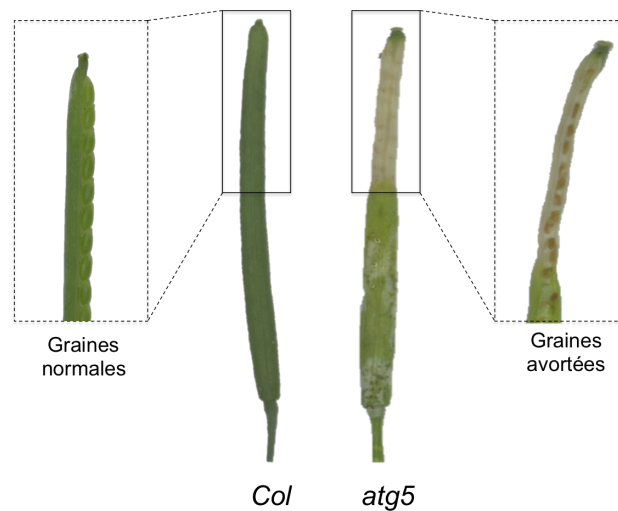


Figure 39. Photographies des zones apicales de siliques de plantes sauvage et du mutant *atg5*. Les zones apicales de siliques d'une plante sauvage et d'une plante mutante *atg5* récoltées 16 jours après fécondation de la fleur et contenant respectivement des graines normales et des graines normales et avortées sont présentées.

#### III.1.1.2 Suivi du développement de l'embryon

En prenant en considération le fait que le taux d'avortement des graines du mutant *atg5* est important avant 12 JAF, c'est à dire au cours du développement embryonnaire, le suivi de l'évolution de la morphologie de l'embryon a été réalisé par la technique de Nomarski de 4 à 12 JAF en condition de nutrition non limitante (Fig. 40). On observe ainsi que les graines sauvages *Col* se développent normalement, avec un embryon évoluant successivement du stade globulaire, au stade cœur, puis torpille, avant d'atteindre le stade embryon mature vert à 12 JAF. Chez le mutant *atg5* en revanche, on observe dès 4 JAF et jusqu'à 6 JAF un léger retard dans le développement de l'embryon, l'embryon étant respectivement au stade pré-globulaire et pré-cœur. Néanmoins, ce retard entre sauvage et mutant ne représente qu'une douzaine d'heures dans le processus du développement de l'embryon. À partir de 8 JAF, environ 80% graines se développent normalement et ont même rattrapé leur retard de développement par rapport au sauvage, et 20% des autres graines, elles, restent entre le stade cœur et le stade jeune torpille. À 10 et 12 JAF, de la même façon, certaines graines ont continué leur développement normal tandis que d'autres sont toujours bloquées au stade torpille chez le mutant *atg5*. L'avortement des graines du mutant *atg5* résulterait donc d'un arrêt de l'embryogenèse à partir du stade torpille. Ces graines stoppées dans leur développement meurent après 12 JAF et se dessèchent.

Une étude a montré que lorsque l'arrêt de l'embryogenèse survient au stade torpille, un endosperme persistant peut être impliqué. En effet, dans les graines du mutant *zhoupi* dont



l'endosperme n'est pas dégradé, l'embryon ne peut se développer au-delà du stade torpille faute de place (Yang et al., 2008). Nous avons donc observé en microscopie l'endosperme du mutant *atg5* afin de suivre sa dégradation.

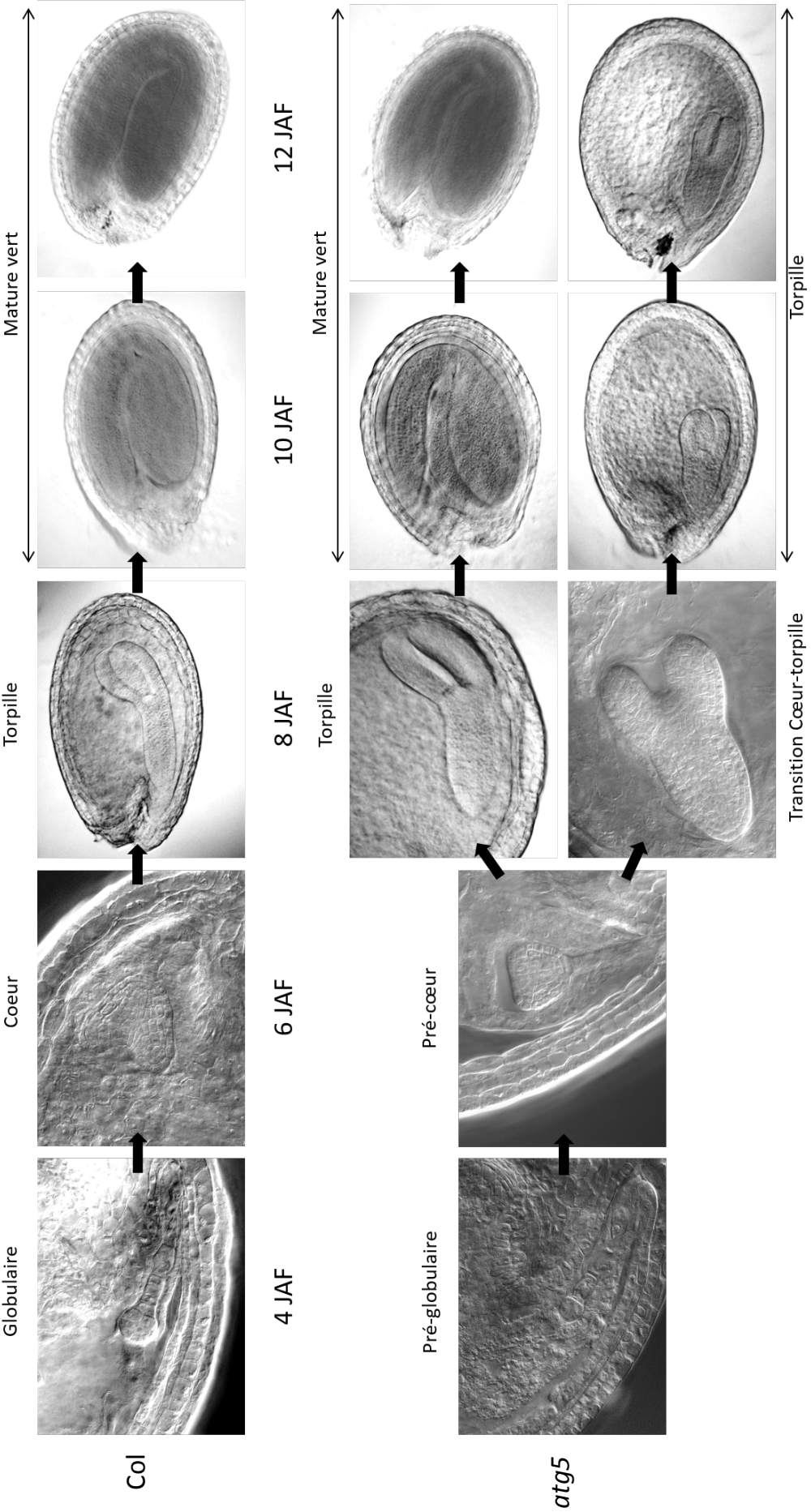


Figure 40. Observations de l'évolution du développement embryonnaire du sauvage et du mutant atg5 par la méthode de Nomarski. A partir de 8 jours après fécondation de l'ovule (JAF), il y a un arrêt du développement de l'embryon pour 20% des graines chez le mutant atg5 au stade jeune torpille.

### III.1.1.3 Dégradation de l'endosperme

Afin de comprendre si l'arrêt du développement embryonnaire de 20% des graines de la silique du mutant *atg5* est dû à un endosperme persistant qui n'est pas dégradé, des observations en microscopie confocale de l'embryon au stade torpille ont été réalisées. En effet, à ce stade, l'endosperme est complètement formé et commence à être dégradé au fur et à mesure de la croissance de l'embryon. Les graines récoltées ont été éclaircies et traitées au calcofluore afin de marquer spécifiquement la cellulose et permettre ainsi de visualiser les parois cellulaires des différents tissus de la graine, dont les cellules de l'endosperme. L'observation de l'endosperme de la graine du mutant *atg5* au stade torpille est présentée en figure 41. On remarque chez Col que l'endosperme entourant l'embryon présente des cellules dont les parois sont bien définies. On note également que les futurs cotylédons ne sont pas collés l'un à l'autre et que l'espace les séparant n'est pas comblé par l'endosperme. Chez le mutant *atg5*, on observe environ 80% de graines semblables aux graines sauvages, et également 20% de graines dont l'endosperme semble plus comprimé autour de l'embryon. Par ailleurs, l'embryon lui-même semble plus compacté, ses futurs cotylédons plus trapus et plaqués l'un à l'autre. Il se pourrait alors que l'endosperme ne soit pas dégradé et adhère à l'embryon, l'empêchant d'avoir la place nécessaire pour se développer. Des observations sur coupe en microscopie électronique seraient nécessaires afin de confirmer qu'il y a bien adhérence de l'endosperme à l'embryon chez le mutant *atg5*.

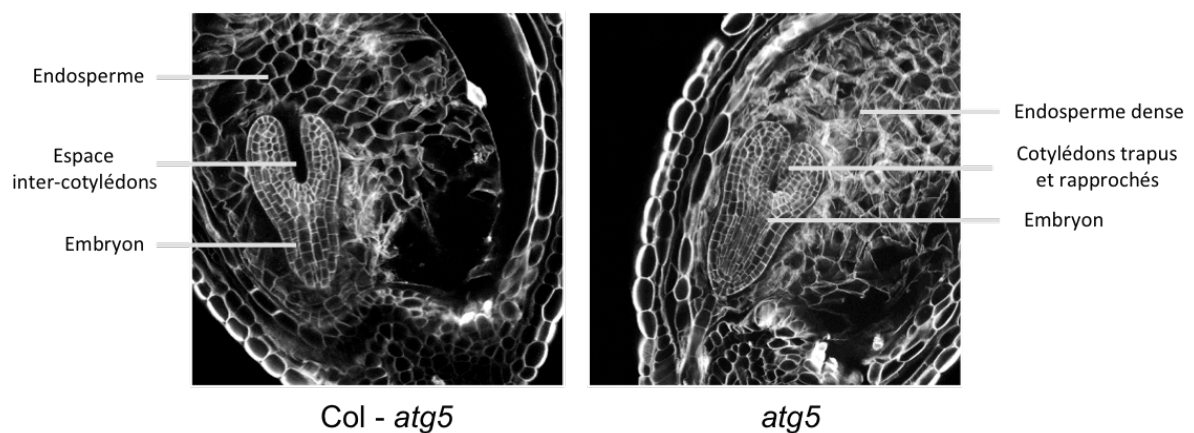


Figure 41. Observations de l'endosperme de la graine au stade torpille du sauvage et du mutant *atg5* par microscopie confocale après marquage au calcofluore. A gauche, une graine représentative des graines sauvages et de 80% des graines mutantes. A droite, une graine représentative d'environ 20% des graines mutantes avortées.

#### III.1.1.4 Conclusion intermédiaire – Autophagie et taux d'avortement

La mutation du gène *ATG5* induit un taux important d'avortement (20 à 30% selon la nutrition azotée) au cours du développement de la graine, et plus spécifiquement au stade « embryon torpille ». Ce taux d'avortement est d'autant plus fort lors d'une limitation nutritionnelle azotée. Deux hypothèses peuvent être avancées afin d'expliquer ce phénomène :

- Il a été montré que le mutant d'autophagie *atg5* présente un défaut de remobilisation de l'azote des feuilles senescences vers les graines (Guiboileau et al., 2012). En considérant le fait que les graines avortées sont préférentiellement localisées dans la pointe de la silique, c'est-à-dire au point le plus éloigné du pédoncule et donc de la source en éléments nutritifs, on peut penser que l'autophagie influe également au niveau de la silique sur le transfert des nutriments *via* le système vasculaire. Dans ce cas, les embryons des graines du mutant *atg5* situées à l'extrémité de la silique ne recevraient pas les apports nutritifs nécessaires, stoppant ainsi leur développement. Ce point sera développé dans le chapitre 2.
- D'autre part, étant donné que le développement de l'embryon s'arrête au stade torpille chez 20% des graines du mutant *atg5*, il est légitime de penser que comme chez le mutant *zhoupi*, un endosperme persistant empêche mécaniquement l'embryon de croître (Yang et al., 2008). Dans ce cas, l'autophagie interviendrait en faveur de modifications de la paroi des cellules de l'endosperme pour permettre sa dégradation. Cependant, bien que l'endosperme du mutant *atg5* semble être différent de celui du sauvage, des observations plus fines sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

#### III.1.2 Autophagie et phénotypes morphologiques des graines viables

Afin de déterminer si l'autophagie influence certains caractères morphologiques de la graine tels que sa masse, sa taille, son contenu en eau, et sa couleur, des graines viables du mutant d'autophagie *atg5* ont été comparées à celles de plantes sauvages Col d'après ces critères.

##### III.1.2.1 Masse des graines au cours du développement

L'un des paramètres les plus simples à étudier pour comparer les graines de plantes sauvages et de plantes mutantes *atg5* est de suivre l'évolution de leur masse au cours du développement. Des graines de 8 à 20 jours après fécondation de la fleur et des graines sèches ont ainsi été récoltées et pesées, puis séchées au four et repesées. L'évolution des masses fraîche et sèche des graines du mutant *atg5* au cours du développement a été quantifiée (Fig. 42a et 42b). On remarque que quelle que soit la nutrition azotée, en fin de maturation lorsque la graine est sèche, les graines du mutant *atg5* ont une masse sèche inférieure à celles du sauvage Col. Cette réduction de masse des graines

*atg5* par rapport au sauvage est de l'ordre de 15% sur 2 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et 8% sur 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. D'autre part, tandis que la masse des graines sèches Col est significativement supérieure en condition d'azote limitant (22,2 µg/graine) par rapport à la condition d'azote pléthorique (20,6 µg/graine), aucune différence significative de masse n'est observée pour les graines du mutant *atg5* sur les deux conditions de nutrition azotée (18,8 µg/graine sur 2 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et 19,0 µg/graine sur 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Le mutant *atg5* est donc moins sensible aux variations de nutriments azotés que le sauvage concernant ce caractère.

D'autre part, la mesure du contenu en eau (masse fraîche – masse sèche) des graines au cours du développement (Fig. 42c et 42d) étant très hétérogène entre les échantillons, aucune différence significative (p-value>5%) n'a pu être observée entre les graines Col et *atg5*. Néanmoins, sur 2 et 10 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, les cinétiques d'accumulation d'eau semblent décalées entre sauvage et mutant. En effet, *atg5* atteint un pic d'hydratation vers 12 JAF tandis que Col atteint son maximum d'hydratation vers 16 JAF. Le processus de dessiccation de la graine commence également de façon plus précoce chez le mutant *atg5*.

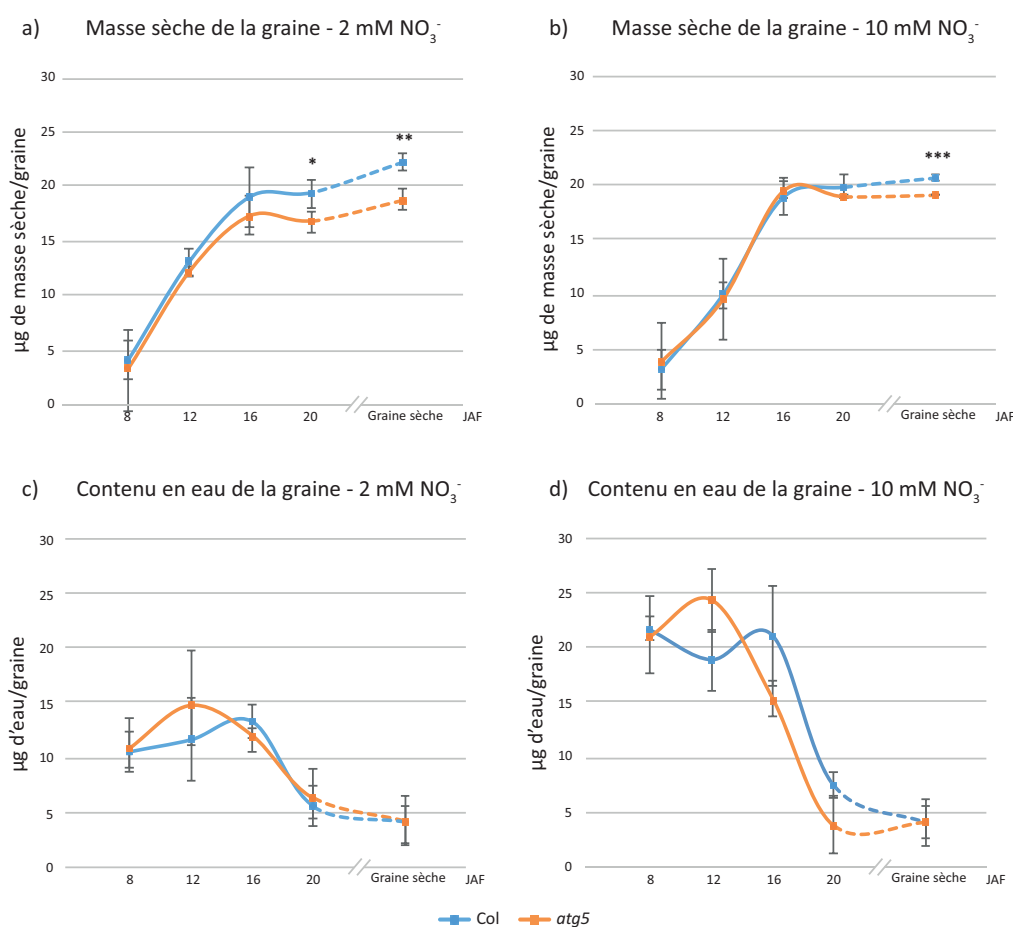


Figure 42. Courbes d'évolution de la masse sèche (a, b) et du contenu en eau (c, d) dans les graines de plantes sauvages Col et mutantes *atg5* au cours de leur développement sur deux conditions de nutrition azotée

(2 et 10 mM  $\text{NO}_3^-$ ). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés sur les valeurs obtenues des graines de 3 siliques récoltées sur 3 plantes par culture et sur 3 cultures indépendantes, soit environ 400 graines par condition. JAF : Jours Après Fécondation de la graine. \* :  $p$ -value<5%, \*\* :  $p$ -value<1%, \*\*\* :  $p$ -value<1%.

### III.1.2.2 Surface des graines sèches

La taille des graines, ou plutôt leur surface plane, peut facilement être mesurée à l'aide d'un outil informatique par des analyses d'images. Ainsi, des photographies de graines matures Col et *atg5* ont été utilisées via le logiciel ImageJ afin de déterminer leur surface plane moyenne (Fig. 43). On remarque qu'à la fois dans les conditions de culture avec azote limitant ou pléthorique, le mutant *atg5* présente une surface de graine inférieure à celle des graines sauvages. On constate également que la nutrition azotée influence la taille des graines sauvages, mais pas celle des graines mutantes. En effet, les graines Col cultivées sur 2 mM de nitrate ont une surface supérieure de 3,5% par rapport à celles cultivées sur 10 mM de nitrate. En revanche, la surface des graines *atg5* reste quasiment identique quelle que soit la condition de nutrition et est 5,1% inférieure à celle de Col sur 2 mM de nitrate et 2,3% inférieure sur 10 mM de nitrate. Comme pour la masse sèche de la graine, le mutant *atg5* semble donc moins sensible à la limitation nutritive pour ce paramètre.

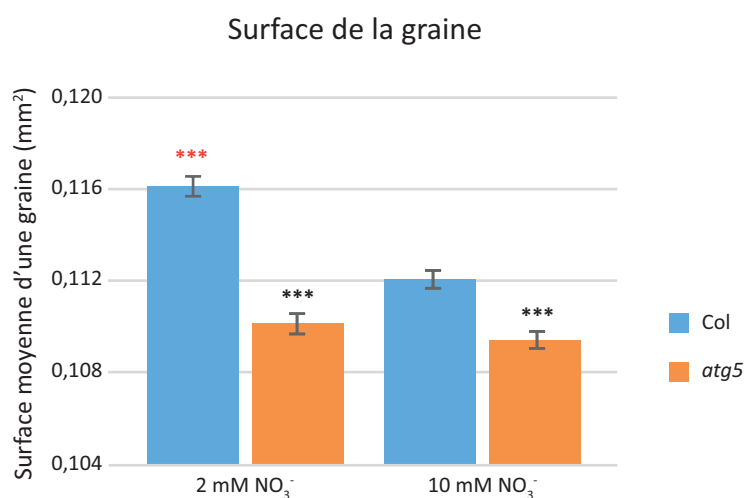


Figure 43. Diagramme de la surface plane des graines sèches Col et *atg5* de plantes cultivées sur 2 et 10 mM de nitrate. Les barres d'erreur représentées correspondent à l'erreur standard calculée sur environ 500 graines sur 3 cultures indépendantes, soit 1500 graines par condition. Les astérisques noires (\*) indiquent la significativité des différences du mutant *atg5* par rapport au sauvage Col sur les deux nutritons. Les astérisques rouges (\*) indiquent la significativité des différences de la culture sur 2 mM de nitrate par rapport à la culture sur 10 mM de nitrate au sein d'un même génotype. \* :  $p$ -value<5%, \*\* :  $p$ -value<1%, \*\*\* :  $p$ -value<1%.

### III.1.2.3 Couleur des graines au cours du développement

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires responsables de la coloration brune de la graine au cours de son développement. Deux types de flavonoïdes, les flavonols et les proanthocyanidines, sont des polymères incolores localisées dans la testa de la graine, et exclusivement dans l'endothélium pour les proanthocyanidines, et ce dès le début du développement (Debeaujon et al., 2003). Ces polymères sont contenus dans des petites vésicules formées à partir du réticulum endoplasmique qui vont fusionner ensuite avec la vacuole centrale. Lors de la sénescence des tissus maternels de la graine causant une déstructuration des cellules, ces flavonols sont libérés dans le cytoplasme et oxydés, conférant la couleur brune à la graine (Stafford, 1988). Des modifications de coloration de la graine au cours du développement peuvent indiquer une différence dans la synthèse des flavonols, et/ou de leur oxydation, ou encore indiquer l'état de sénescence de la graine. Des graines sauvages et *atg5* de 8 à 20 jours de développement ont ainsi été observées afin de suivre la cinétique de leur coloration (Fig. 44). À 8 jours de développement de l'embryon, c'est à dire au stade cœur, les graines sont translucides, quelle que soit la nutrition ou le génotype. À 12 JAF, l'embryon est riche en chlorophylle et confère une couleur verte à la graine. A ce stade, aucune différence de couleur n'est observée entre sauvage et mutant *atg5* sur les deux nutritions. A partir de 16 JAF, on observe que les graines sauvages sont vertes sur 2 et 10 mM de nitrate, tandis qu'elles sont devenues brunes chez le mutant *atg5*. A 20 JAF, l'oxydation des flavonols est maximale pour les deux génotypes et la couleur des graines est similaire.

Cette différence de coloration des graines à 16 JAF chez le mutant *atg5* pourrait s'expliquer par une oxydation précoce des flavonols de la testa et ainsi révéler une sénescence anticipée des tissus maternels de la graine. En effet, le mutant *atg5* a été caractérisé par son phénotype de sénescence précoce au niveau des feuilles, qui semble également toucher d'autres tissus comme le tégument de la graine.

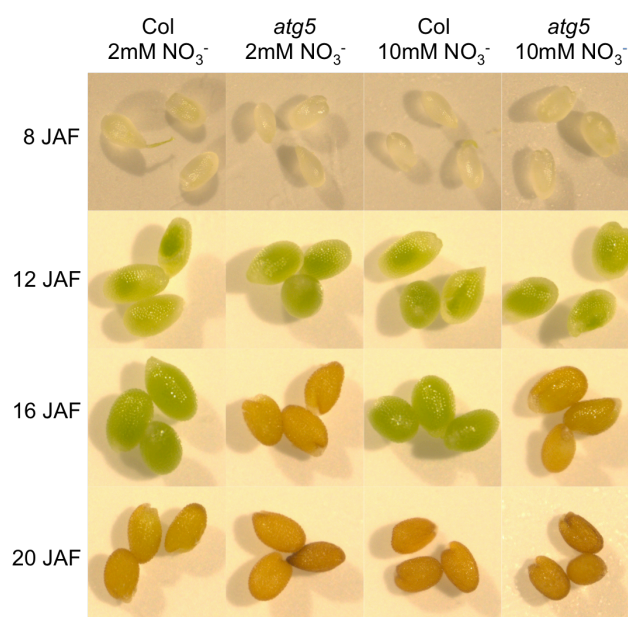


Figure 44. Photographies présentant l'évolution de la couleur des graines sauvages et mutantes *atg5* au cours de leur développement. Les graines sauvages (*Col*) et mutantes (*atg5*) ont été cultivées sur 2 et 10 mM de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) et photographiées de 8 à 20 jours après fécondation de la fleur (JAF).

Nous avons ensuite voulu déterminer si la cinétique de remplissage de la graine d'*atg5* différait quantitativement et qualitativement de celle de la graine sauvage.

### III.1.3 Autophagie et constitution des réserves de la graine

La graine viable du mutant *atg5* présente une maturation accélérée par rapport à celle de la graine sauvage. Nous avons donc voulu caractériser la cinétique de constitution des réserves lipidiques (molécules riches en carbone) et protéiques (riches en azote) de la graine et aussi comprendre dans quelle mesure l'autophagie est impliquée dans le remplissage de la graine au cours de sa maturation. La quantification du carbone (C) et de l'azote (N) total, des dosages de lipides et de protéines ont donc été effectués sur une cinétique de développement de la graine chez des plantes sauvages (*Col*) et mutantes *atg5* d'*Arabidopsis thaliana*. Ces plantes ont été cultivées en condition de limitation azotée (2 mM de nitrate  $\text{NO}_3^-$ ) et en condition pléthorique d'azote (10 mM de  $\text{NO}_3^-$ ) afin de comparer les phénotypes dus au facteur génétique de ceux dus au facteur nutritionnel.

#### III.1.3.1 Quantification du carbone et de l'azote total

Des graines en développement de 8, 12, 16 et 20 JAF et des graines sèches ont été utilisées sur 3 cultures indépendantes afin de quantifier le pourcentage de carbone et d'azote total par un analyseur élémentaire. Les résultats de cette analyse sont présentés en figure 45. En condition de limitation azotée (2 mM de  $\text{NO}_3^-$ ), les graines sauvages présentent un pourcentage de carbone plus



élevé que les graines du mutant *atg5* dès la fin de l'embryogenèse à 12 JAF et cet écart s'accroît à mesure que la graine arrive à maturité. En effet, 20 jours après fécondation, les graines sauvages contiennent en moyenne 57,4% de carbone, soit 2,5% de plus que les graines du mutant *atg5* qui n'en contiennent que 54,9%. Entre 20 JAF et le stade graine sèche, on assiste à une diminution de la quantité de carbone due à la mobilisation de lipides (Baud et al., 2002). A ce stade, la graine sauvage contient toujours 2,5% de carbone en plus qu'*atg5*. En revanche, en condition non limitante d'azote (10 mM de  $\text{NO}_3^-$ ), il n'y a pas de différence significative ( $p$ -value>5%) de pourcentage de carbone entre graines sauvages et mutantes au cours du développement ( $\approx$ 54% de carbone dans les deux conditions de nutrition à 20 JAF). Au stade graine sèche, bien que les différences ne soient pas significatives ( $p$ -value>5%), la graine mutante *atg5* semble contenir moins de carbone que Col (Fig. 45a et 45b).

En ce qui concerne la quantification de l'azote total (Fig. 45c et 45d), on observe sur 2 mM de nitrate une plus forte concentration en azote dans les graines du mutant *atg5* que dans les graines sauvages. En effet, pendant le développement de la graine, la concentration en azote semble rester relativement stable au cours du temps : autour de 3,4% pour le sauvage Col, et 4,2% pour le mutant *atg5*. De plus, de la même façon que pour le carbone, les graines issues de plantes cultivées avec 10 mM de nitrate ne présentent pas de différence en terme de concentration totale d'azote entre sauvage et mutant de 8 JAF jusqu'au stade graine sèche.

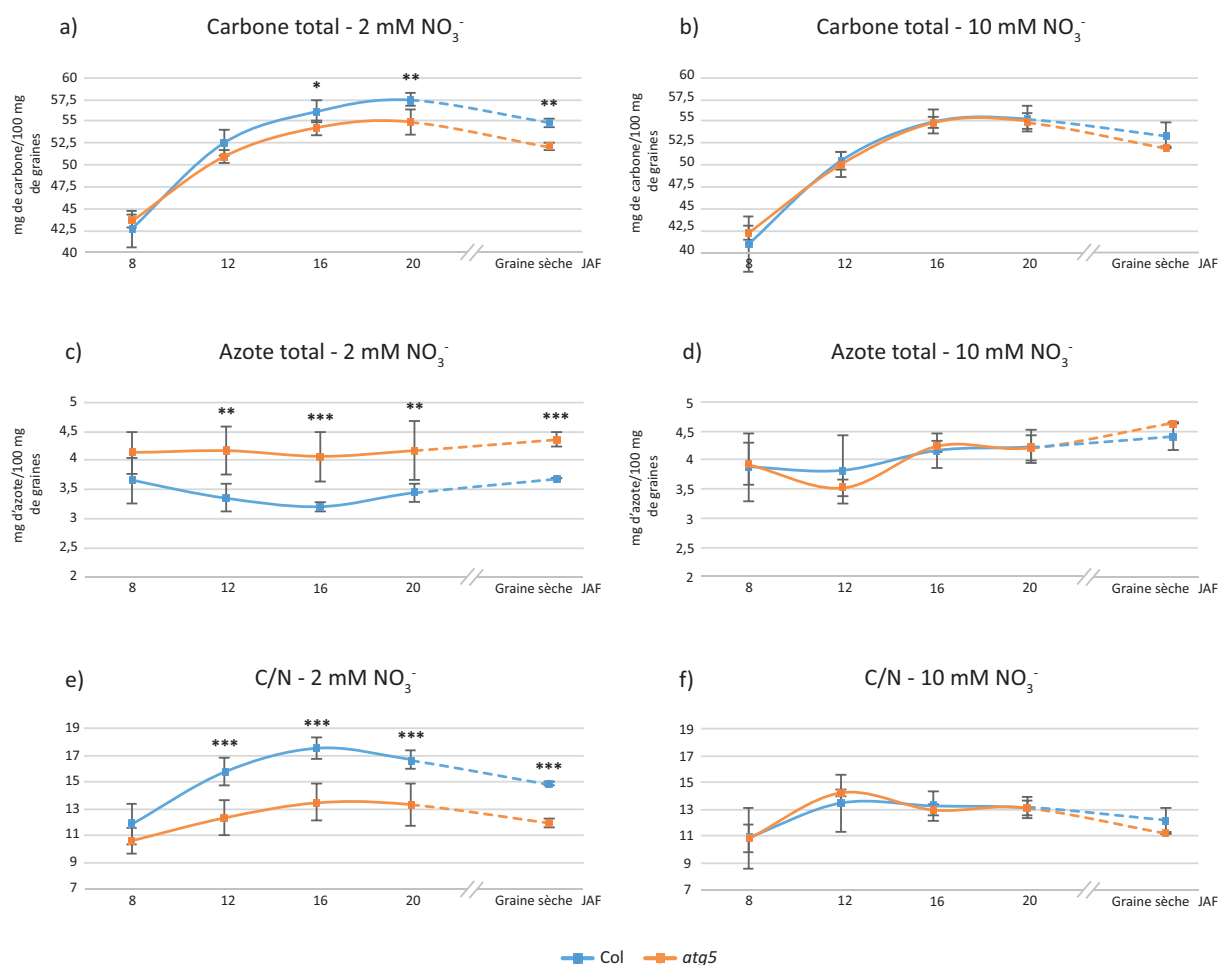


Figure 45. Graphiques présentant le pourcentage de carbone total (a, b), d'azote total (c, d) et le ratio C/N (e, f) quantifiés à poids constants sur des graines en cours de développement de 8 à 20 jours après fécondation de la fleur (JAF) et dans la graine sèche chez des plantes sauvages (Col) et mutantes (atg5) cultivées sur 2 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (a, c, e) et 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (b, d, f). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés sur 6 échantillons biologiques issus de 3 cultures indépendantes. \* : p-value<5%, \*\* : p-value<1%, \*\*\* : p-value<1%.

Cette analyse globale montre que le ratio C/N est davantage influencé par le facteur nutritionnel que par un facteur génétique chez le mutant d'autophagie (Fig. 45e et 45f). En effet, les importantes différences de pourcentage de carbone et d'azote ne sont observées qu'en condition de limitation en nitrate.

Il a été montré que les teneurs totales en carbone et en azote suivent une corrélation linéaire dans les graines de colza (Jolivet et al., 2013) et d'Arabidopsis (communication personnelle de Fabien Chardon (INRA de Versailles, IJPB)). De fait, si on assiste à une diminution des quantités de carbone dans les graines, il y aura une augmentation des quantités d'azote et *vice versa*. L'existence de cette balance ne nous permet donc pas de déterminer si l'autophagie influence davantage le métabolisme du carbone ou celui de l'azote pour la constitution des réserves de la graine. Il est en outre important

de noter que toutes les molécules carbonées et azotées de la graine ne sont pas des molécules de réserve. En effet, le carbone est majoritairement retrouvé dans les lipides et les carbohydrates. Or, les lipides peuvent être utilisés pour la formation de membranes ou bien être stockés sous la forme de lipides de réserves. De la même façon, les sucres peuvent être utilisés en tant que réserves nutritives, et constituent également les parois pectocellulosiques et le mucilage de la graine. En ce qui concerne les molécules azotées, la majorité constitue les protéines de réserve ou non, ainsi que les acides aminés libres et les formes non organiques comme le nitrate. Nous avons donc entrepris de doser dans un premier temps les molécules azotées et carbonées destinées aux réserves.

### III.1.3.2 Dosage des acides gras

Les principaux acides gras composant les lipides ont été dosés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) sur trois cultures indépendantes au cours du développement de graines sauvages (Col) et mutantes (*atg5*) cultivées sur deux nutritives azotées (2 et 10 mM  $\text{NO}_3^-$ ). La figure 46 présente les concentrations en acides gras totaux détectés au cours du développement de la graine. En condition de limitation nutritionnelle (Fig. 46a et 46c), la concentration en acides gras totaux reste identique entre graines sauvages et mutantes jusqu'à la fin du développement embryonnaire, soit 12 jours après fécondation de l'ovule. Après 12 jours, on observe une augmentation de la concentration en acides gras plus rapide chez le sauvage. Puis, de 20 JAF jusqu'à dessiccation totale de la graine, on assiste à une importante diminution de la teneur en acides gras, qui correspond à la mobilisation des lipides pour fournir l'énergie indispensable aux dernières étapes de maturation de l'embryon. Dans la graine sèche, il y a autant d'acides gras chez *atg5* et Col en condition d'azote limitant ( $1,8 \mu\text{g}/\text{graine}$ ). La concentration en acides gras ( $\mu\text{g}$  d'acides gras/mg de graines sèches) (Fig 46c) montre un profil d'accumulation identique à celui de la quantité représentée par graine (Fig. 46a).

La cinétique d'accumulation des acides gras est très différente avec les graines cultivées sur 10 mM de nitrate (Fig. 46b et 46d). Dès le développement embryonnaire, le mutant *atg5* accumule davantage d'acides gras et plus rapidement que le sauvage jusqu'à atteindre un pic à 12 JAF. Ce pic d'accumulation est atteint à 16 JAF dans les graines sauvages. Après 16 JAF, on assiste à une remobilisation des lipides qui entraîne une diminution de la concentration en acides gras totaux à la fois chez le sauvage et chez le mutant *atg5*. De 20 JAF jusqu'au stade graine sèche, bien que les différences ne soient pas significatives ( $p\text{-value} > 5\%$ ), les graines sauvages semblent contenir davantage d'acides gras que les graines mutantes. Les graines sèches issues de cultures en condition d'azote pléthorique contiennent environ trois fois plus d'acides gras totaux que celles cultivées en condition d'azote limitant.

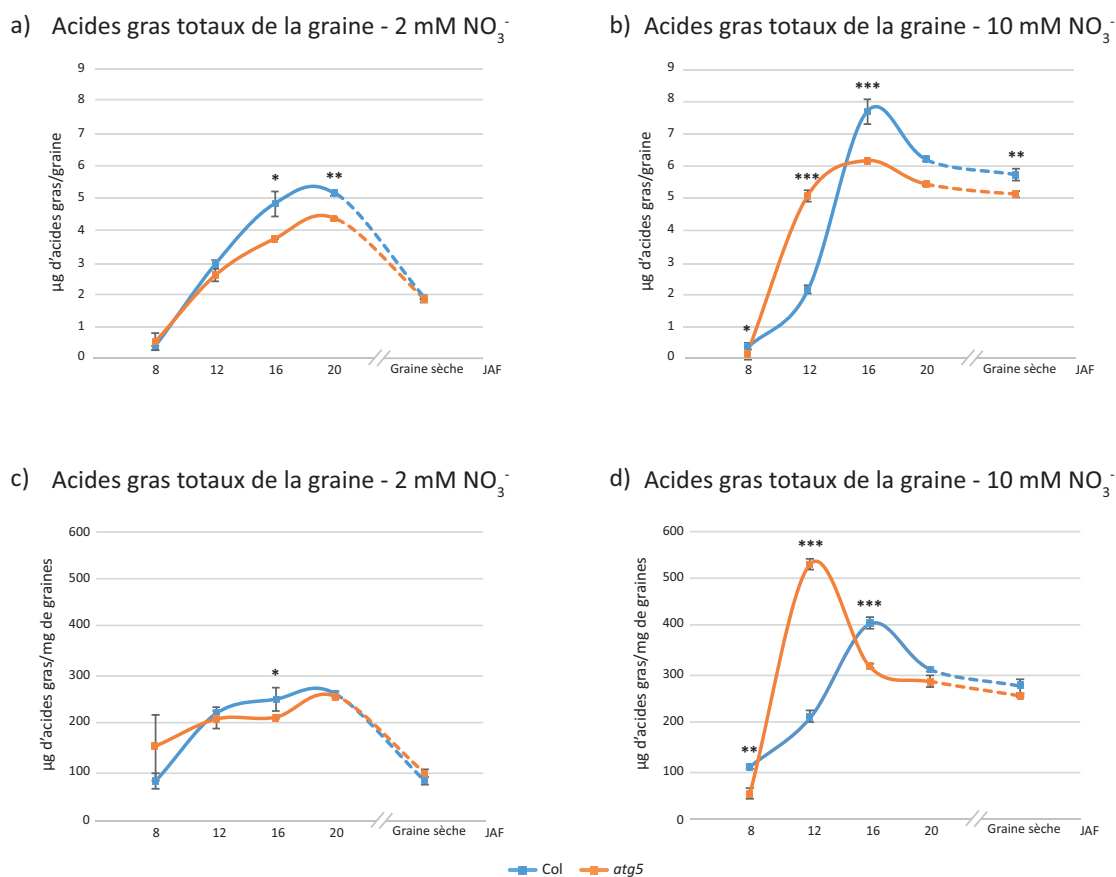


Figure 46. Graphiques présentant la cinétique d'accumulation des acides gras totaux au cours du développement de la graine Col et du mutant *atg5*. Les quantités d'acides gras contenues par graine (a, b) et par masse de graines (c, d) sont présentées. Les graines sont cultivées en condition d'azote limitant (a, c) et d'azote pléthorique (b, d). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés sur 6 échantillons biologiques provenant de 3 cultures indépendantes. JAF : Jours Après Fécondation de la graine. \* :  $p$ -value < 5%, \*\* :  $p$ -value < 1%, \*\*\* :  $p$ -value < 0.1%.

Les acides gras à chaînes courtes ( $\leq 18$  C) majoritairement impliqués dans la synthèse des membranes de la cellule (Fig. 47a et 47b), les acides gras à chaînes longues ( $> 18$  C) principalement impliqués dans la synthèse des lipides de réserve (Fig. 47c et 47d), et les acides gras minoritaires à la fois impliqués dans la synthèse des membranes et des lipides de réserve (Fig. 47e et 47f) ont été analysés séparément. Sur 2 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, quelle que soit la longueur de la chaîne carbonée, il n'y a pas de différence dans la cinétique d'accumulation et de mobilisation des acides gras (Fig. 47a, 47c et 47e). A 20 JAF, lors du pic d'accumulation, les graines sauvages Col présentent davantage d'acides gras à courtes chaînes et longues chaînes que le mutant *atg5*. Il est par ailleurs à noter que dans la graine sèche des deux génotypes, la quasi-totalité des acides gras à longues chaînes ont été consommés. Les graines issues de culture en condition d'azote limitant ne présentent donc que très peu de lipides de réserve.

En ce qui concerne la culture en condition d'azote pléthorique (Fig. 47b, 47d et 47f), on remarque que chez le mutant *atg5*, la cinétique de synthèse des acides gras minoritaires et à courtes chaînes se déroule de manière plus précoce que chez Col. En effet, le pic d'accumulation de ces acides gras est atteint vers 12 JAF chez *atg5*, tandis qu'il est atteint à 16 JAF chez Col. En revanche les acides gras à longues chaînes impliqués dans la synthèse des lipides de réserve ont un pic maximal d'accumulation au même moment pour les deux génotypes, à 16 JAF. Ces pics d'accumulation sont toujours plus faibles en terme de quantités par graine chez le mutant d'autophagie par rapport au sauvage, quelle que soit la nutrition ou le type d'acide gras considéré.

Ces résultats montrent que le mutant d'autophagie accumule moins d'acides gras par graine et suggèrent qu'en condition non limitante d'azote, les graines du mutant *atg5* accélèrent leur processus de synthèse des lipides membranaires pour atteindre rapidement une quantité maximale seuil avant d'entamer leur processus de dessiccation, qui est lui aussi plus précoce (Fig. 47b et 47f). La cinétique d'accumulation des acides gras à longues chaînes n'est pas plus précoce chez le mutant d'autophagie, suggérant que la mise en place des lipides de réserve n'est pas affectée dans le temps chez *atg5* dans ces conditions de nutrition.

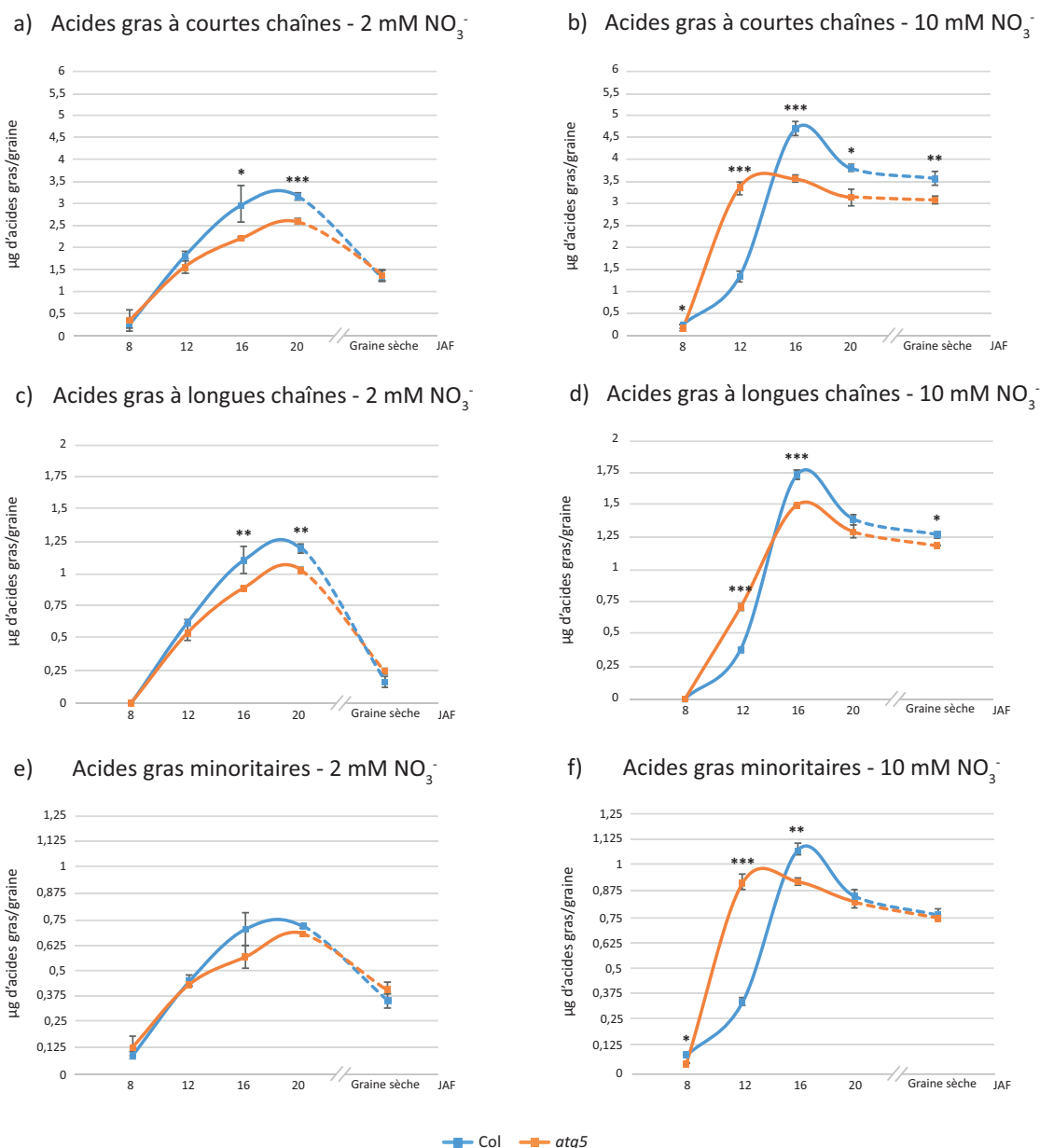


Figure 47. Graphiques des dosages des acides gras à chaînes courtes (C18:1, C18:2, C18:3) (a, b), à chaînes longues (C20:1, C22:1, C24:1) (c, d) et minoritaires (C16:0, C16:1c, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0) (e, f) contenus dans une graine au cours du développement chez des plantes sauvages (*Col*) et mutantes (*atg5*) cultivées en condition d'azote limitant (a, c, e) et d'azote pléthorique (b, d, f). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés sur 6 échantillons biologiques provenant de 3 cultures indépendantes. JAF : Jours Après Fécondation de la graine. \* : p-value<5%, \*\* : p-value<1%, \*\*\* : p-value<1‰.

### III.1.3.3 Diffusion du mucilage de la graine mature

Le mucilage est un gel pectique qui est libéré lors de l'imbibition de la graine. Les monosaccharides constitutifs du mucilage sont synthétisés au cours du développement de la graine dans les cellules du tégument (Western et al., 2000). Il existe deux types de mucilage : celui dit non adhérent qui se solubilise rapidement dans l'eau, et celui dit adhérent, riche en cellulose, qui reste

attaché au tégument. Ces mucilages représentent environ 2% de la quantité totale de carbone de la graine (Macquet et al., 2007).

Lorsqu'une graine est imbibée sur une surface plane, le mucilage libéré forme un halo qui peut être coloré au rouge de ruthénium et ainsi devenir visible à l'œil nu. On considère que la quantité de mucilage produite est corrélée à la taille des halos de diffusion des mucilages solubles et insolubles. Des mesures d'aires de diffusion du mucilage ont ainsi été effectuées à l'aide du logiciel ImageJ sur des graines matures Col et *atg5* de plantes cultivées sur 2 et 10 mM de nitrate (Fig. 48a). On remarque qu'il n'y a pas de différence significative de surface de diffusion du mucilage soluble entre graines sauvages et mutantes ( $p$ -value>5%) en condition d'azote limitant ou pléthorique. Les graines sauvages cultivées sur 10 mM de nitrate présentent une diminution significative de 10% de la surface de ce mucilage non adhérent comparées aux graines Col cultivées sur 2 mM de nitrate (Fig. 49a). Cette différence entre les deux conditions de nutrition n'est pas observée pour les graines du mutant *atg5*. Il est à noter que ces résultats sont à mettre en relation avec ceux obtenus lors de la mesure de la surface moyenne des graines sauvages et mutantes. En effet, les graines issues de cultures à 2 mM  $\text{NO}_3^-$  ont une surface supérieure à celles cultivées sur 10 mM  $\text{NO}_3^-$ . Or la quantification de la surface de diffusion du mucilage soluble prend également en considération la surface de la graine, qui se trouve au centre du halo de diffusion. Il se pourrait ainsi que la différence d'aire de diffusion du mucilage soluble observée au sein du génotype Col entre 2 et 10 mM  $\text{NO}_3^-$  ne soit due qu'à la différence de taille des graines. De fait, afin d'augmenter la rigueur de cette analyse, il conviendrait de soustraire l'aire des graines à celle de diffusion du mucilage soluble.

En ce qui concerne le mucilage adhérent (Fig. 48b), on remarque qu'avec les deux nutritives, l'épaisseur du mucilage entourant la graine est moins importante chez *atg5* que chez Col. On note en effet une diminution de 20% et 18% de l'épaisseur du mucilage insoluble du mutant par rapport au sauvage pour les nutritives 2 mM et 10 mM de nitrate respectivement (Fig. 49b). Par ailleurs, la quantité de mucilage adhérent est également affectée par la nutrition sur les deux génotypes. Le mucilage insoluble est significativement plus abondant en condition d'azote pléthorique.

Les travaux de Shi et al. (2012) ont montré que lorsqu'il y avait absence ou diminution de production de mucilage, la synthèse d'acides gras était d'autant plus importante dans la graine. Or dans le cas présent, le mutant d'autophagie *atg5* produit à la fois moins de mucilage et moins d'acides gras que les plantes sauvages. L'approvisionnement en carbone semble ainsi constituer un facteur limitant pour la synthèse de molécules organiques au cours du développement de la graine des plantes mutantes *atg5* qui sont incapables de réaliser l'autophagie. Cette hypothèse est par

ailleurs cohérente avec les résultats obtenus lors de la quantification du carbone total qui montrent que les graines *atg5* contiennent moins de carbone que les graines de Col (voir III.1.3.1).

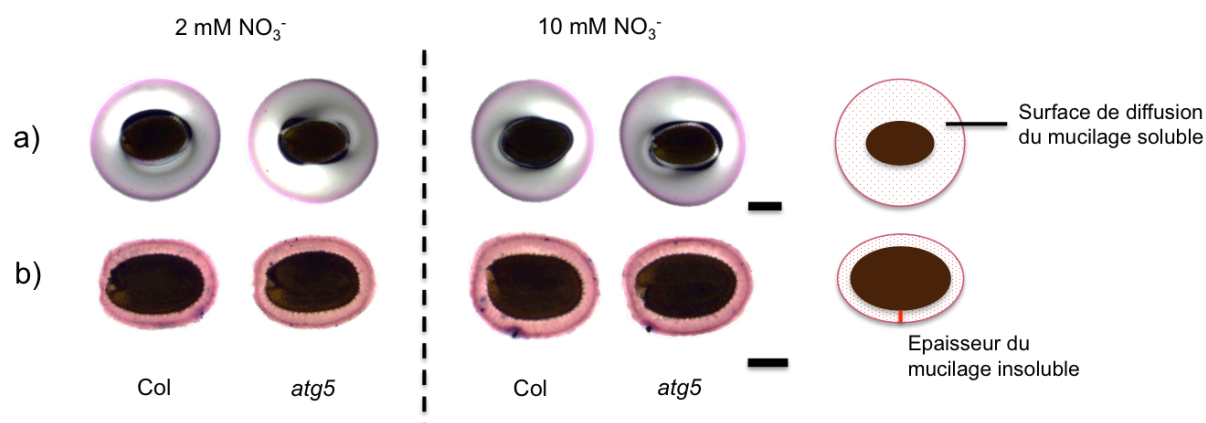


Figure 48. Photographies des mucilages solubles (a) et insolubles (b) de graines d'Arabidopsis sauvages (Col) et mutantes (*atg5*) cultivées sur 2 et 10 mM de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ). La mesure de la surface de diffusion du mucilage soluble et de l'épaisseur du mucilage insoluble est effectuée par analyse d'image sur 40 graines par condition. Barres d'échelle, a) 0,25 mm ; b) 0,2 mm.

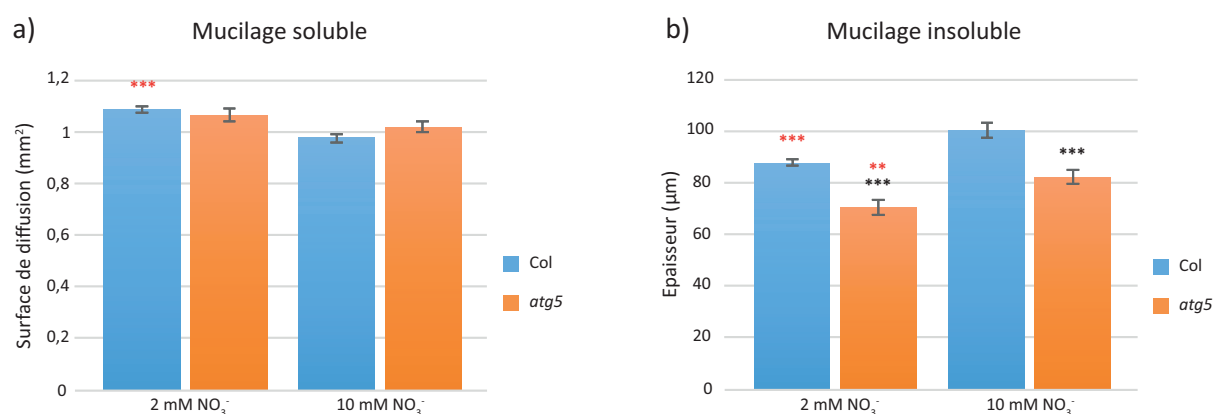


Figure 49. Graphiques présentant la surface de diffusion du mucilage soluble et l'épaisseur du mucilage insoluble quantifiées sur des graines sauvages Col et mutantes *atg5* de plantes cultivées en condition d'azote limitant (2 mM de nitrate) et pléthorique (10 mM de nitrate). Les barres d'erreur représentées correspondent à l'erreur standard calculée sur environ 40 graines par condition. Les astérisques noires (\*) indiquent la significativité des différences du mutant *atg5* par rapport au sauvage Col sur les deux nutritions. Les astérisques rouges (\*) indiquent la significativité des différences de la culture sur 2 mM de nitrate par rapport à la culture sur 10 mM de nitrate au sein d'un même génotype. \* :  $p$ -value < 5%, \*\* :  $p$ -value < 1%, \*\*\* :  $p$ -value < 1%.



### III.1.3.4 Dosage des protéines de réserve

#### III.1.3.4.1 Dosage des protéines totales

Au cours du développement, la graine d'Arabidopsis accumule des protéines qui sont stockées dans les vacuoles de réserves protéiques (PSV). Afin de déterminer l'impact de l'autophagie sur la constitution des protéines de réserve, des dosages de protéines totales ont été effectués sur des graines de 8 à 20 JAF et sur graines sèches Col et mutantes *atg5* de plantes cultivées sur 2 et 10 mM de nitrate (Fig. 50). En condition d'azote limitant (Fig. 50a), on observe que dès 8 JAF le mutant *atg5* accumule davantage de protéines que le sauvage. En effet de 8 à 16 JAF, la concentration en protéines totales est de 40 à 50% supérieure à celle du sauvage. De 20 JAF jusqu'au stade graine sèche, cet écart se réduit puisque les graines *atg5* ne présentent plus qu'une concentration protéique environ 10% supérieure à celle de Col. En condition d'azote pléthorique (Fig. 50b), la concentration en protéines totales est également supérieure chez le mutant par rapport au sauvage. Cette concentration est supérieure d'environ 25% chez *atg5* de 8 à 12 JAF, puis augmente à près de 70% à 16 JAF par rapport à Col. Au stade graine sèche, comme pour la culture sur 2 mM  $\text{NO}_3^-$ , les graines *atg5* présentent environ 10% de protéines totales en plus que Col.

Ainsi, on observe que les graines de plantes mutantes *atg5* présentent significativement plus de protéines totales que les graines de plantes sauvages, et ce quelle que soit la nutrition azotée. Cette différence sera d'autant plus importante si elle est ramenée à une concentration de protéines exprimée par rapport à une masse de graines sèches, puisque la masse des graines du mutant *atg5* est plus faible que celle du sauvage (Fig. 50c et 50d).

Les travaux réalisés par Guiboileau et al. (2013) ont montré une accumulation similaire des protéines solubles chez plusieurs mutants d'autophagie dans la rosette de plantes cultivées sur 2 ou 10 mM de nitrate. Cette suraccumulation de protéines pourrait s'expliquer par le défaut d'autophagie qui affecte la dégradation normale de ces protéines. Le même phénomène semble donc être observé dans la graine. Ainsi, en considérant que les mutants d'autophagie remobilisent moins d'azote des feuilles vers les graines, ces résultats montrent l'importance de l'activité autophagique au sein même des graines.

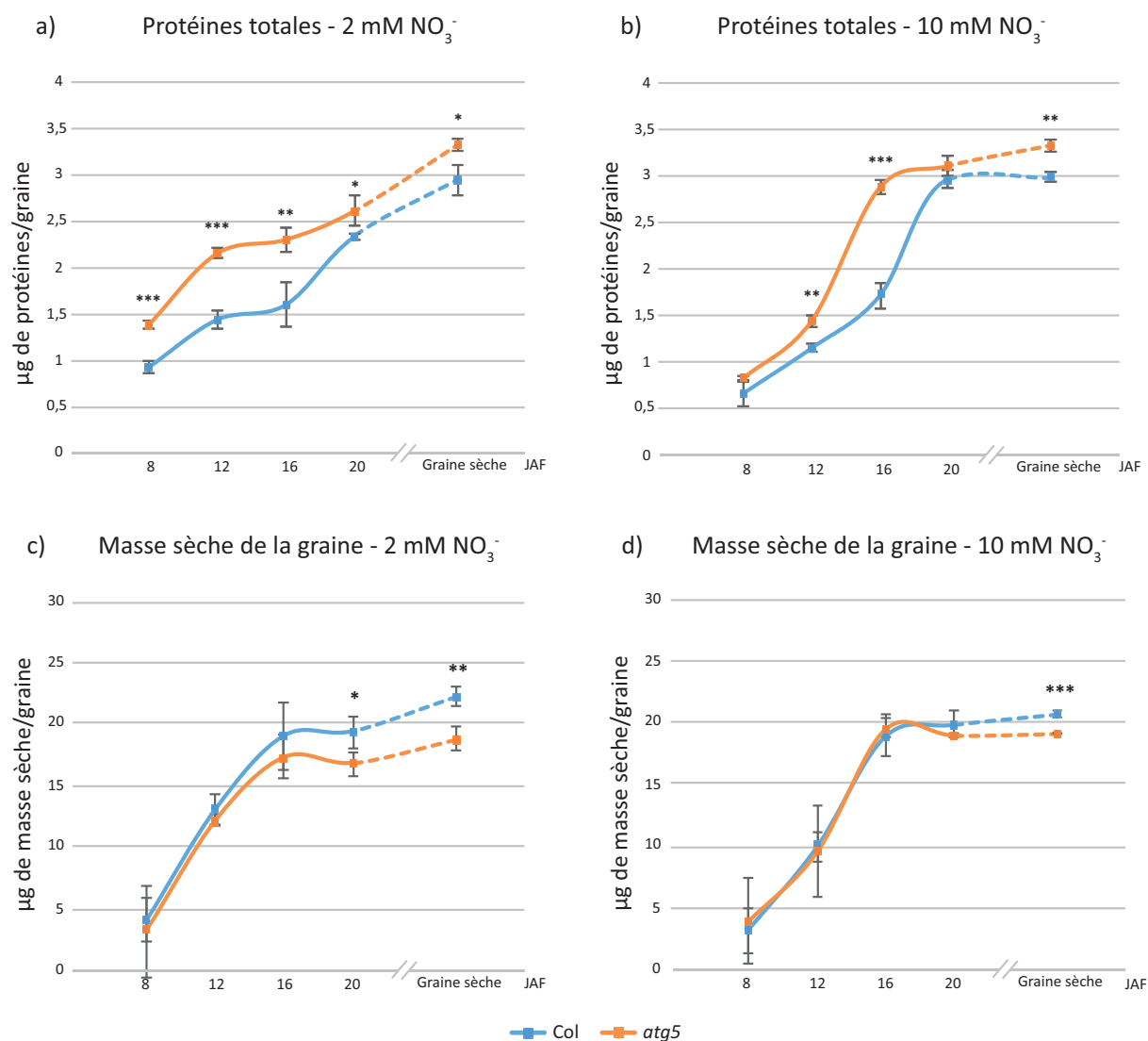


Figure 50. Graphiques présentant le dosage des protéines totales contenues par graine au cours de leur développement et à maturité chez des plantes sauvages (Col) et mutantes (atg5) cultivées en condition d'azote limitant (a) et d'azote pléthorique (b). Les masses sèches des graines au cours du développement des deux génotypes sont présentées en c) et d). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés sur les moyennes de 3 réplicats techniques provenant de 3 cultures indépendantes. JAF : Jours Après Fécondation de la graine. \* : p-value<5%, \*\* : p-value<1%, \*\*\* : p-value<1‰.

### III.1.3.4.2 Estimation des quantités relatives de globulines 12S et albumines 2S

Les globulines 12S et les albumines 2S sont les protéines de réserve majoritairement accumulées chez *Arabidopsis thaliana*. Dans le but de suivre la cinétique d'accumulation au cours du développement et d'estimer les proportions de chacune de ces protéines dans les graines sèches de plantes sauvages Col et mutantes atg5, des extraits protéiques totaux ont été utilisés pour réaliser des gels SDS-PAGE suivis de western blots avec des anticorps primaires polyclonaux anti-12S et anti-2S.

Le western blot réalisé avec les anticorps anti-12S sur des extraits protéiques de graines Col et *atg5* cultivées sur 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en cours du développement (Fig. 51a), montre pour les deux génotypes la présence à 20 JAF d'une série de bandes caractéristiques des deux sous-unités des globulines 12S : la sous-unité α (25-35 kDa), et la sous-unité β (20-23 kDa). Chez Col, ces globulines sont très légèrement observables à 16 JAF, et fortement accumulées dans la graine à 20 JAF. En revanche, chez le mutant *atg5*, les globulines 12S sont fortement accumulées dès 16 JAF, et ce jusqu'à 20 JAF.

Quant aux albumines 2S (Fig. 51b), le western blot réalisé montre une unique bande de 6 à 10 kDa qui est observable chez les deux génotypes. Cette bande caractéristique des albumines 2S est légèrement observable des 12 JAF chez le mutant *atg5*, tandis qu'elle n'apparaît qu'à 16 JAF chez Col. Ainsi, le mutant d'autophagie *atg5* accumule de façon précoce les protéines de réserve 12S et 2S par rapport à Col.

Cette expérience avait pour but de suivre la cinétique d'accumulation des protéines 2S et 12S et a été réalisée à nombre constant de graines, et non pas à masse constante de graines, ce qui ne permet pas de conclure sur les quantités relatives de chacune de ces protéines.

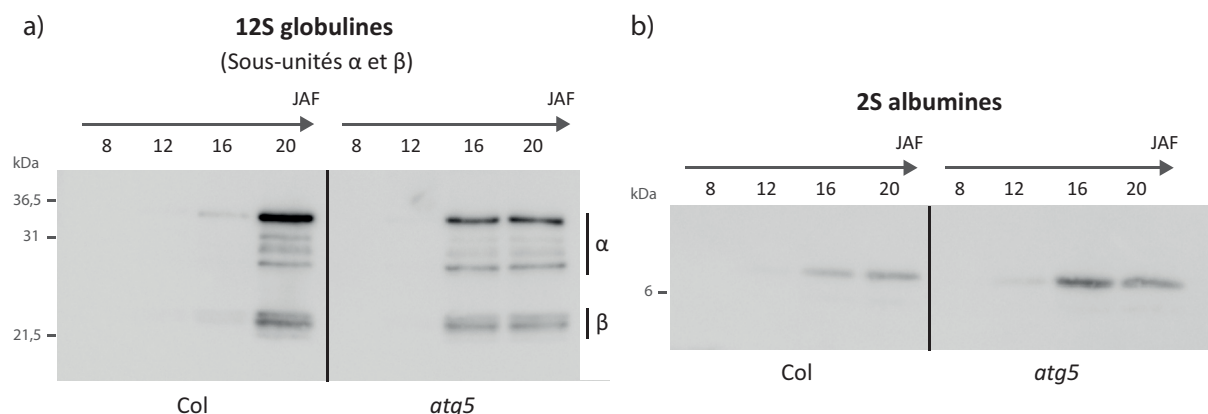


Figure 51. Western blots anti-12S (a) et anti-2S (b) réalisés sur extraits de protéines totales de graines sauvages Col et mutantes *atg5* de 8 à 20 JAF (Jours Après Fécondation) après culture sur 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Les puits des gels SDS-PAGE ayant servis aux western blots ont été chargés avec des protéines extraites d'un nombre constant de graines.

Ainsi, des western blots ont été réalisés au stade graines sèches afin d'estimer les quantités relatives de globulines 12S et d'albumines 2S chez Col et *atg5* (Fig. 52a et 52c). Deux mutants témoins ont également été utilisés : le triple mutant *cru-* qui ne produit pas de globulines 12S et le mutant *RNAi-napin* (appelé *napin*) qui ne produit pas d'albumines 2S. La quantification de l'intensité

des bandes spécifiques aux globulines 12S (Fig. 52b) montre que quelle que soit la nutrition azotée, le mutant *atg5* présente moins de protéines 12S que le sauvage Col.

En ce qui concerne les albumines 2S (Fig. 52d), aucune différence significative n'est observée ( $p$ -value>5%) en terme d'intensité et donc de quantité d'albumines 2S entre sauvage Col et mutant *atg5*, quelle que soit la condition de nutrition azotée.

Chez le mutant *cru-* (qui ne produit pas de globulines), on observe davantage d'albumines 2S que dans les graines Col, tandis que chez le mutant *napin* (qui ne produit pas d'albumines) il y a une plus forte concentration de globulines que chez Col. Les deux mutants témoins *cru-* et *napin* montrent ainsi qu'en l'absence de l'une des deux formes de protéines majoritaires de réserve, 2S ou 12S, il y a compensation par accumulation de l'autre forme de protéines de réserve dans la graine (Fig. 52). Chez le mutant *atg5* où il y a une diminution moyenne de 35% des globulines 12S sur les deux nutriments azotés par rapport à Col, on n'observe pas de compensation par suraccumulation d'albumines 2S. La synthèse des globulines semble donc être la seule affectée chez le mutant *atg5*.

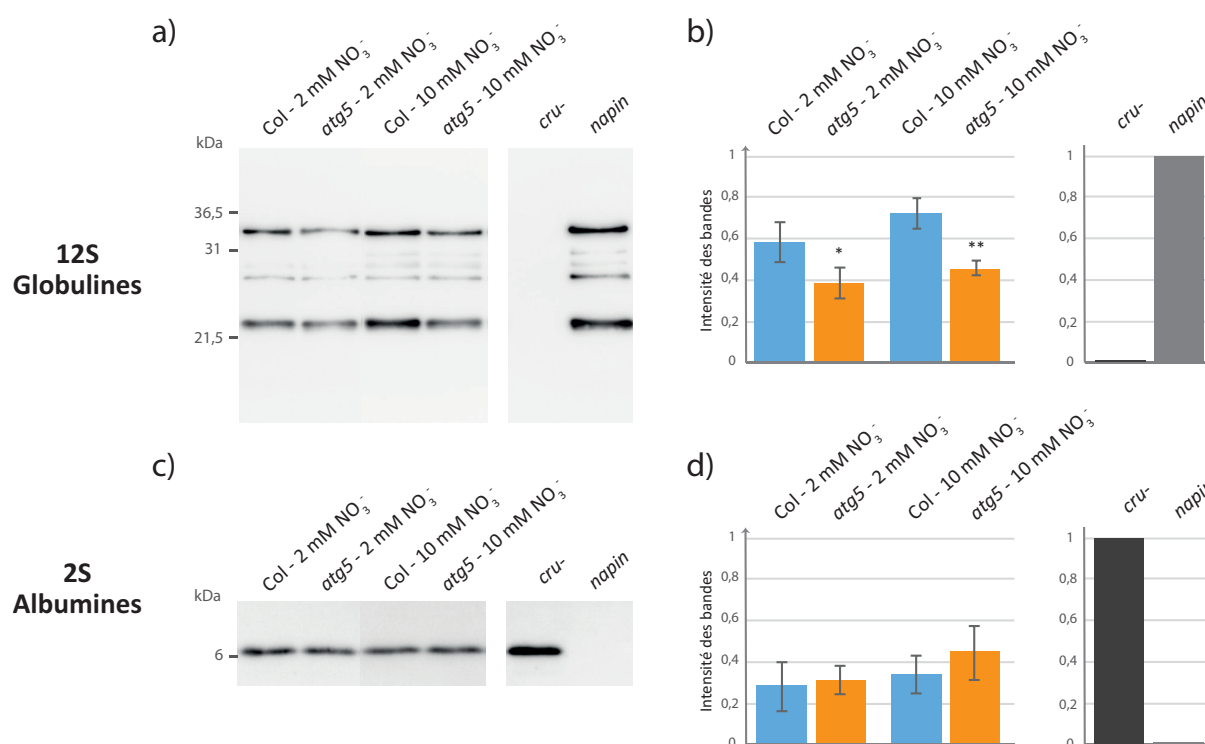


Figure 52. Western blots anti-12S et anti-2S réalisés sur extraits de protéines totales de graines sèches de plante sauvage Col, de mutant *atg5*, et de mutants *cru-* et *napin*. Les mutants *cru-* et *napin* présentent un défaut de synthèse des globulines 12S et des albumines 2S, respectivement. Les extractions de protéines sont réalisées avec une masse constante de graines et avec le même volume de tampon d'extraction. Les puits du gel SDS-PAGE sont chargés avec un même volume d'extrait protéique avant transfert sur membrane pour le western blot. a) western blot anti-12S. b) Quantification de l'intensité du signal révélé par western blot avec les

anticorps anti-12S. c) western blot anti-2S. d) Quantification de l'intensité du signal révélé par western blot avec les anticorps anti-2S. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés sur 3 réplicats biologiques provenant de 3 cultures indépendantes. \* :  $p$ -value<5%, \*\* :  $p$ -value<1%, \*\*\* :  $p$ -value<1%.

Enfin, l'analyse de gels SDS-PAGE colorés au bleu de coomassie (Fig. 53) montre en effet que la quantité de globulines 12S (20-35 kDa) est affectée dans les graines matures du mutant *atg5* (20-35 kDa) et que la quantité d'albumines 2S (6-10 kDa) reste identique entre les deux génotypes.

Sur les deux conditions de nutrition azotée, on observe une forte accumulation de protéines de haut poids moléculaire (de 36,5 à 200 kDa) chez le mutant *atg5*. Ces protéines de haut poids moléculaire pourraient en partie correspondre aux précurseurs des globulines 12S (Li et al., 2006). Il est ainsi envisageable que l'efficacité de maturation des précurseurs de globulines soit affectée chez le mutant *atg5* provoquant une accumulation de ces précurseurs et une diminution de la quantité de globulines 12S matures.

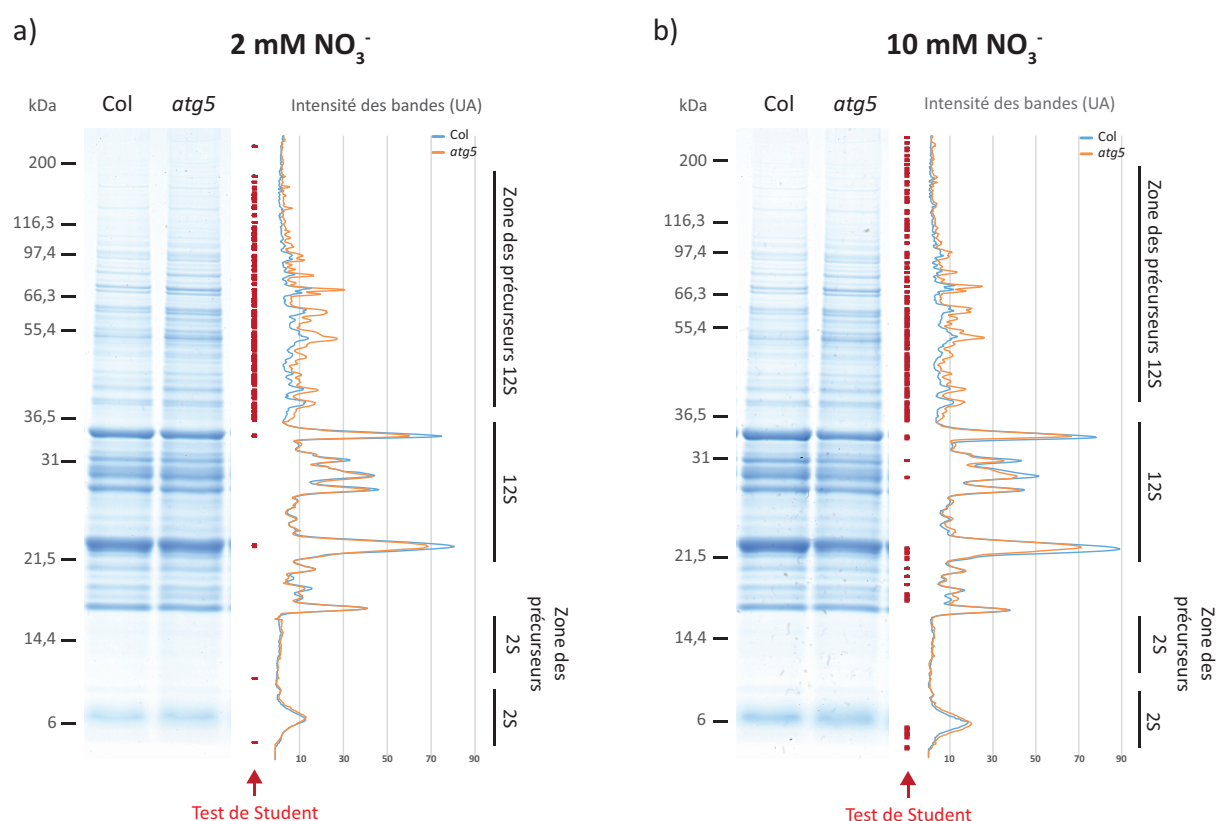


Figure 53. Electrophorèse SDS-PAGE réalisée sur protéines totales puis coloration au bleu de coomassie. La totalité des protéines extraites sont colorées en bleu. Les extraits protéiques sont réalisés avec une masse constante de graines par échantillon. a) Gel réalisé avec des extraits protéiques de graines sèches sauvages (Col) et mutantes (*atg5*) cultivées sur 2 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. b) Gel réalisé avec des extraits protéiques de graines sèches sauvages (Col) et mutantes (*atg5*) cultivées sur 10 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Les profils d'intensité des bandes révélées sur gel présentés à droite de chaque figure sont réalisés en effectuant la moyenne des intensités des bandes de 3

*profils provenant de graines issues de trois cultures indépendantes. Les bandes définies comme «zones des précurseurs 12S» entre 36,5 et 200 kDa sont des protéines de haut poids moléculaire qui peuvent être des précurseurs pour la synthèse des protéines 12S matures. Les points rouges indiquent les zones sur lesquelles l'intensité des bandes est significativement différente entre Col et atg5, avec un risque de 5%.*

#### III.1.3.4.3 Gels SDS-PAGE à deux dimensions

Dans le but de séparer toutes les protéines de haut poids moléculaire, des gels SDS-PAGE à deux dimensions qui permettent dans un premier temps de séparer les protéines selon leur point isoélectrique (pI), puis dans un second temps selon leur masse molaire (MM), ont été réalisés avec des extraits protéiques de graines matures de plantes sauvages Col et *atg5*, cultivées sur 2 et 10 mM de nitrate. Trois gels par génotype et par condition ont ainsi été réalisés avec des graines issues de 3 cultures indépendantes. Par ailleurs, trois autres gels ont été réalisés avec un mélange des différents extraits protéiques. Ces gels, utilisés comme références, présentent toutes les protéines (spots) qui peuvent être observées dans les conditions étudiées (Fig. 54). Les protéines sont colorées sur gel au nitrate d'argent pour révéler les spots, puis les gels sont séchés et scannés pour analyse informatique. Sur le gel de référence présenté en figure 54, les globulines 12S sont facilement reconnaissables puisqu'elles sont les plus abondantes. La forte concentration de ces protéines entraîne rapidement une saturation de la coloration au nitrate d'argent, empêchant de quantifier les globulines. Néanmoins, les protéines de haut poids moléculaire (supérieur à 35 kDa), moins abondantes, peuvent être comparées selon les conditions de génotypes et de nutritons étudiées. Ainsi, des analyses statistiques ont été effectuées en considérant les variations d'intensités (et donc de concentrations en protéines) des différents spots.

Remarque : il est important de garder en considération que :

- Différents spots peuvent contenir les mêmes protéines à différents stades de maturation, ayant ainsi un pI et une MM différents ;
- Un même spot peut contenir plusieurs protéines différentes avec des pI et MM proches.

Afin d'évaluer lequel des deux facteurs, génotype ou nutrition, influence davantage la variation des concentrations en protéines de la graine, une ACP (Analyse en Composante Principale) a été réalisée. L'ACP présentée en figure 55 est une représentation graphique de la variation d'intensité des spots selon deux axes qui définissent les facteurs génotype (axe vertical) et nutrition (axe horizontal). Cette ACP est effectuée par comparaison de 169 spots dont l'intensité varie avec une p-value inférieure à 5%. On observe alors que le facteur génotype permet d'expliquer 58% des variations de protéines dans les graines tandis que le facteur nutrition n'en explique que 11%. La variation des quantités de protéines est donc davantage influencée par le défaut d'autophagie que

par l'état de nutrition azotée de la plante. Par ailleurs, le mutant *atg5* semble être moins sensible à la variation de nutrition que le sauvage en terme de variation de concentrations en protéines.

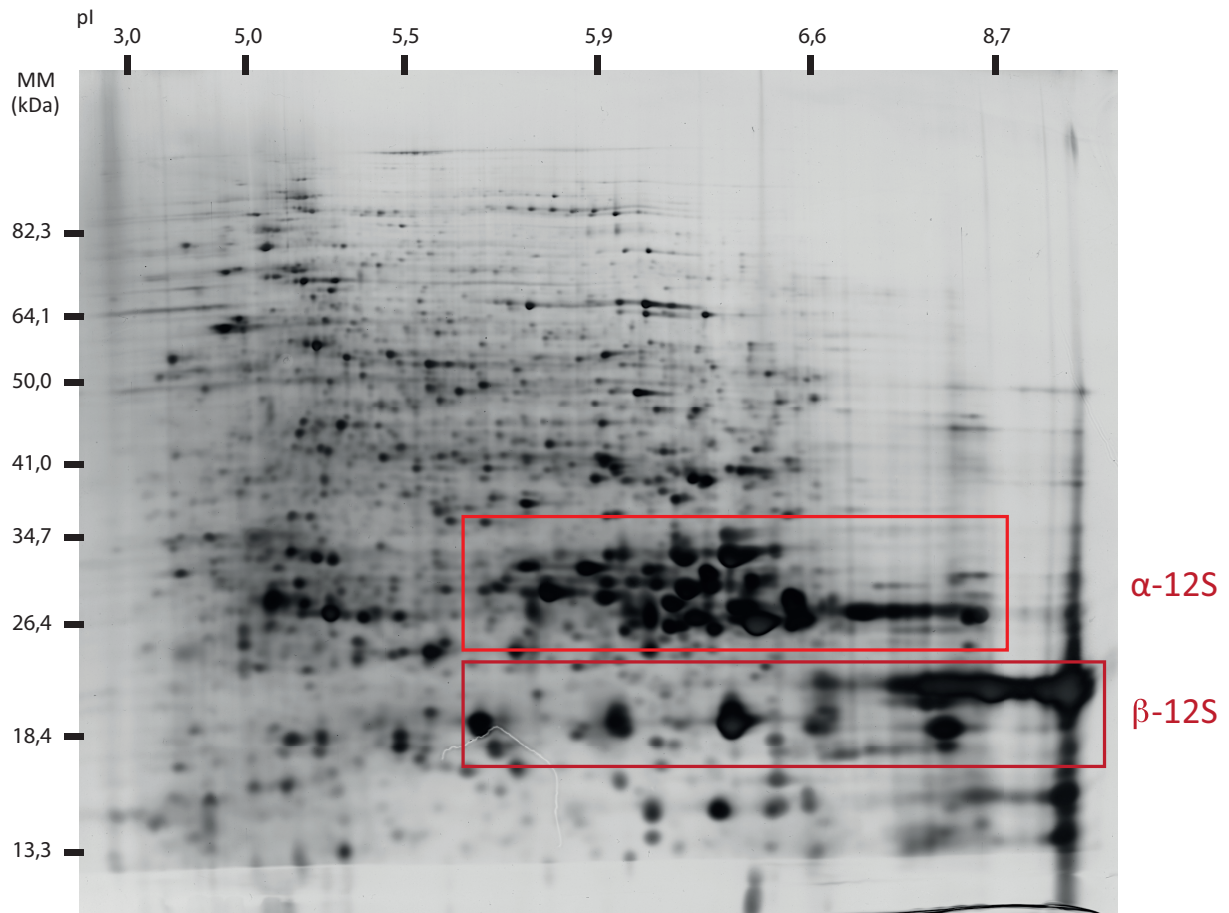


Figure 54. Gel SDS-PAGE à deux dimensions réalisé avec un mélange d'extraits protéiques de graines matures Col et *atg5* cultivées sur 2 et 10 mM de nitrate. Un tel gel de référence est nécessaire pour visualiser la totalité des spots qui existent dans les conditions étudiées, afin de comparer leur intensité selon le génotype et la nutrition. Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des globulines 12S sont encadrées en rouge.

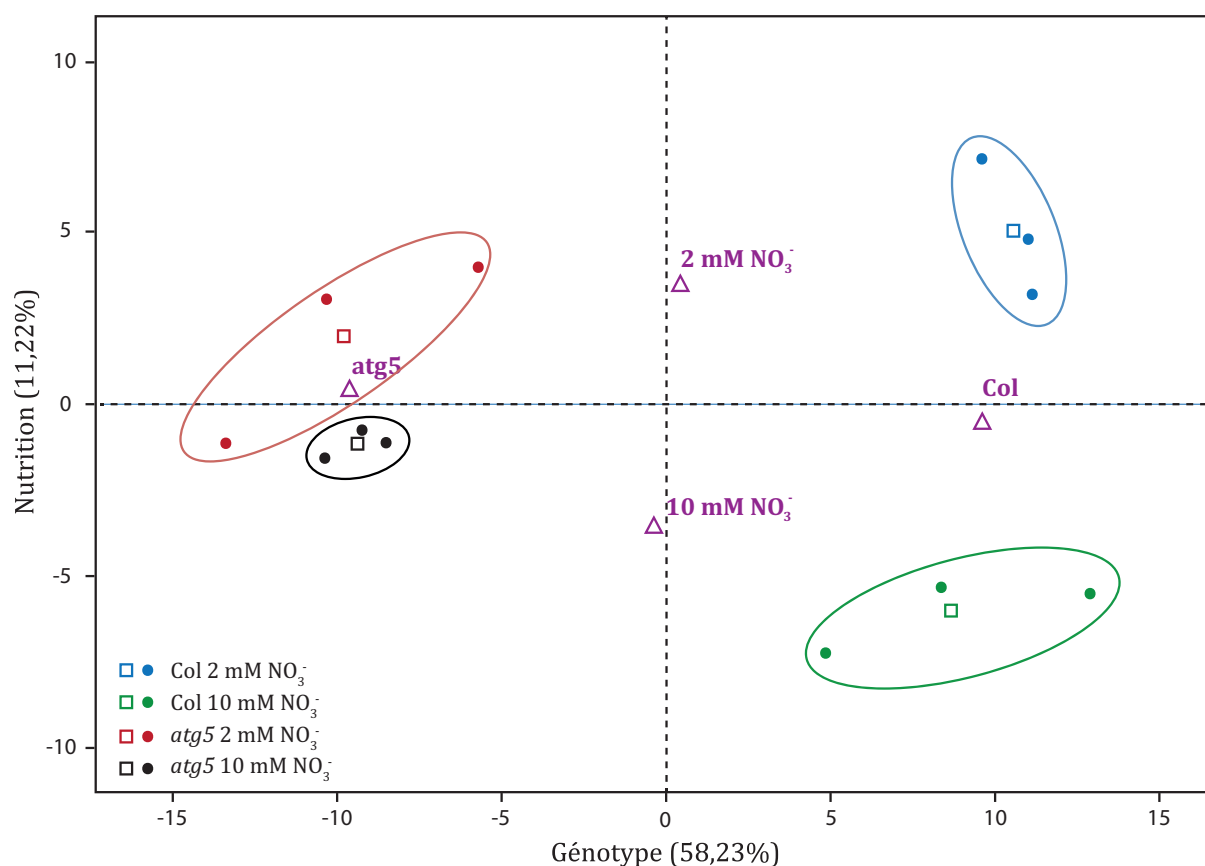


Figure 55. Analyse en Composante Principale (ACP) des variations d'intensité de 169 spots sur 993 identifiés sur gels à deux dimensions ayant une *p*-value inférieure à 5%. Les cercles regroupent les 3 points correspondant aux 3 réplicats biologiques effectués pour chaque couple de conditions. Les carrés représentent les barycentres des projections des 3 réplicats biologiques, et les triangles représentent les barycentres de tous les points par facteur individuel (génotype ou nutrition).

Les résultats d'une ANOVA (ANALYSIS OF VARIANCE) réalisée sur les spots d'intensités variables ( $p$ -value < 0,05) et prenant en compte les facteurs génotype (Col ou *atg5*) et nutrition (2 ou 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) sont présentés en figure 56. Sur 273 spots analysés, l'intensité de 23 spots varie uniquement en fonction du facteur nutrition, celle de 25 spots varie à la fois en fonction du facteur nutrition et du facteur génotype, et celle de 225 spots varie uniquement en fonction du facteur génotype. Le facteur génotype est donc le facteur qui permet de moduler l'intensité du plus grand nombre de spots. Parmi les spots variant uniquement en fonction du génotype, 85 présentent des protéines qui sont suraccumulées chez le mutant *atg5* par rapport à Col tandis que 140 sont sous-accumulées. La localisation des spots sur gel montre que la majorité des spots suraccumulés chez *atg5* correspondent à des protéines de haut poids moléculaire. Il est à noter qu'un nombre de spots n'est pas corrélé à une quantité de protéines. Ainsi, en considérant que le mutant d'autophagie *atg5* présente une concentration en protéines totales dans la graine sèche supérieure à Col (Fig. 50) et que ce mutant accumule davantage de protéines de haut poids moléculaire (Fig. 53), on peut



supposer qu'une plus grande quantité de protéines est représentée dans les 85 spots suraccumulés que dans les 140 spots sous-accumulés. Ces protéines de haut poids moléculaire peuvent être des précurseurs de protéines de réserve qui ne peuvent être maturés en absence d'autophagie et/ou des protéines spécifiquement ciblées par l'autophagie afin d'être dégradées.

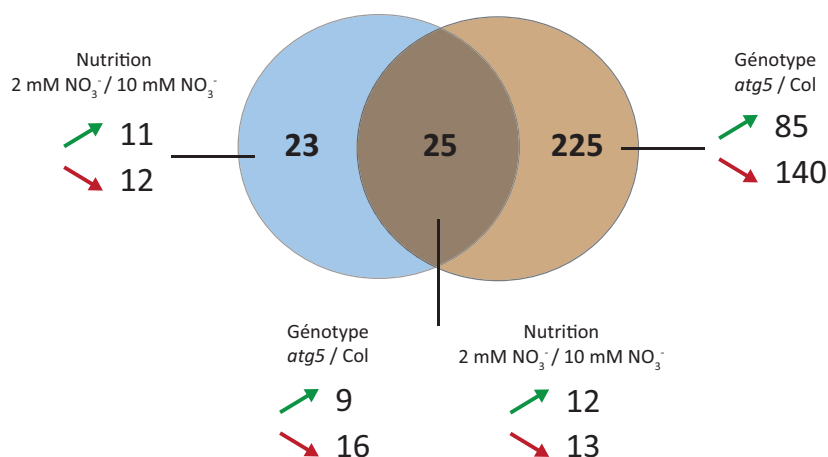


Figure 56. Diagramme de Venn présentant une ANOVA à deux facteurs (génotype et nutrition) réalisée sur la variation d'intensité des spots identifiés sur gels à deux dimensions ( $p$ -value < 0,05). Les flèches vertes indiquent le nombre de spots dont les protéines sont suraccumulées sur 2 mM par rapport à 10 mM de nitrate ou chez atg5 par rapport à Col. À l'inverse, les flèches rouges indiquent les protéines sous-accumulées pour chacune de ces conditions.

Afin d'identifier les protéines suraccumulées et sous-accumulées dans les graines de ce mutant d'autophagie, nos gels sont comparés à des gels de référence accessibles sur la base de données [www.seed-proteome.com](http://www.seed-proteome.com). La migration des protéines, et donc la disposition des spots, étant dépendante des conditions expérimentales, les spots des gels expérimentaux doivent être identifiés sur le gel de référence par triangulation avec les différents spots qui l'entourent. Cette technique utilisée pour l'identification des spots, qui est actuellement en cours, a dû être validée au préalable dans nos conditions expérimentales. Pour ce faire, 7 spots ayant une intensité qui varie de façon significative selon le génotype ou la nutrition (identifiés selon une estimation FDR (False Discovery Rate) au risque d'erreur de 5%) ont été identifiés *via* la comparaison avec les gels de référence de la base de données puis découpés pour une analyse en « shotgun proteomics ». Cette technique repose sur la digestion des protéines en peptides qui sont ensuite analysés par spectrométrie de masse en tandem. Le résultat de l'identification des 7 spots est présenté dans le tableau 7. Sur les 7 spots mentionnés, 4 ont pu être identifiés grâce à la base de données. L'analyse en shotgun confirme ainsi la bonne identification des 4 spots, les 3 autres n'ayant pas été référencés. Cependant, cette analyse protéomique indique également que certains des spots identifiés constituent des mélanges de

protéines. Par exemple, le spot n°4 contient majoritairement l'enzyme Hydroxyméthyltransférase, mais également la Catalase 2. L'utilisation de la base de données ne permet d'identifier que la protéine majoritaire de chaque spot.

Ces résultats montrent ainsi que même si toutes les protéines ne sont pas référencées, la base de données peut permettre d'identifier des protéines suraccumulées et sous-accumulées chez le mutant d'autophagie. Cette identification est actuellement en cours.

N° spot	Identification par analogie des spots <i>via</i> la base de données ( <a href="http://www.seed-proteome.com">www.seed-proteome.com</a> )		Identification par analyse en shotgun proteomics (PAPPSO)	
	Gène (AGI)	Protéine(s)	Gène (AGI)	Protéine(s)
1	-	Non déterminée(s)	At5g44120	CRU1, sous-unité de protéines 12S
2	<b>At3g22640</b>	PAP85 (famille des cupines)	<b>At3g22640</b>	PAP85 (famille des cupines)
3	-	Non déterminée(s)	At5g08670 At2g14170	Protéine de la famille des ATP synthase $\alpha/\beta$ Aldéhyde déshydrogénase ALDH6B2
4	<b>At4g13930</b>	Hydroxyméthyltransférase SHM4	<b>At4g13930</b> At4g35090	Hydroxyméthyltransférase SHM4 Catalase 2 CAT2
5	<b>At5g44120</b>	CRU1, sous-unité de protéines 12S	<b>At5g44120</b>	CRU1, sous-unité de protéines 12S
6	<b>At4g36700</b>	Protéine de la famille des cupines	<b>At4g36700</b>	Protéine de la famille des cupines
7	-	Non déterminée(s)	At4g12580 At5g02500 At1g16030 At5g28540 At5g42020 At4g25100 At1g79550	Protéine « Heat shock » HSP70 Protéine « Heat shock » HSP70-1 Protéine « Heat shock » HSP70b Protéine « Heat shock » BIP1 Protéine « Heat shock » BIP2 Fe superoxyde dismutase FSD1 Phosphoglycérate kinase PGK1

Tableau 7. Comparaison de l'identification de spots protéiques sur gels 2D par « shotgun proteomics » et par l'utilisation d'une base de données ([www.seed-proteome.com](http://www.seed-proteome.com)).

### III.1.3.5 Conclusion - Autophagie et remplissage de la graine

Dans les travaux de Masclaux-Daubresse et Chardon (2011), il est montré chez 19 accessions d'*Arabidopsis* que la masse sèche des graines est plus importante chez les plantes sauvages cultivées avec 2 mM de nitrate que chez les plantes cultivées sur 10 mM de nitrate. Cette tendance est

effectivement retrouvée lors de la mesure de la masse sèche et de la surface des graines du génotype sauvage Col. En effet, avec 2 mM  $\text{NO}_3^-$ , les plantes sauvages produisent moins de graines mais mieux remplies malgré la limitation en azote. En revanche, aucune différence de masse ou de surface n'est observée sur les graines sèches de mutant *atg5* sur les deux conditions de nutrition azotée.

Bien que les différences ne soient pas significatives entre sauvage et mutant au cours du développement ( $p\text{-value} > 5\%$ ), il apparaît que les graines du mutant *atg5* ont une cinétique d'absorption d'eau décalée par rapport à celle du sauvage. Le pic maximal d'eau dans la graine est atteint à 12 JAF chez *atg5* alors qu'il n'est atteint qu'à 16 JAF chez le sauvage. Ce même type de décalage temporel est observé avec la coloration de la graine en développement. À 16 JAF, les graines sauvages sont encore vertes, tandis qu'elles sont devenues brunes chez le mutant *atg5*, et ce quelle que soit la nutrition azotée de la plante. Ces décalages dans les cinétiques d'absorption d'eau et de coloration de la graine, laissent penser que le défaut d'autophagie accélère la maturation des tissus maternels de la graine, c'est-à-dire les différentes couches cellulaires de la testa, mais sans décaler la cinétique d'évolution de la biomasse de l'embryon.

D'autre part, les différences de ratio C/N au cours du développement montrent que la graine du mutant d'autophagie contient d'avantage d'azote et moins de carbone total que Col en condition d'azote limitant. En revanche en condition d'azote pléthorique, aucune différence de ratio C/N n'est observée entre les génotypes. En comparant les ratios C/N non pas par nutrition en fonction du génotype (Fig. 45e et 45f), mais par génotype en fonction de la nutrition (Fig. 57), on constate que dans les graines sauvages, plus la concentration en nitrate apporté est élevée, plus le ratio C/N diminue. En revanche dans les graines *atg5*, ce ratio reste le même tout au long du développement de la graine.

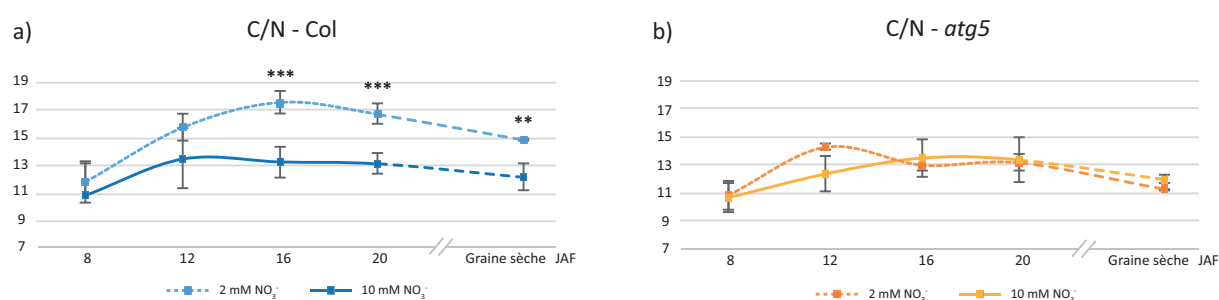


Figure 57. Graphiques présentant la quantification du ratio C/N par génotype en fonction de la nutrition. Ratios C/N quantifiés à poids constants sur des graines en cours de développement de 8 à 20 jours après fécondation de la fleur (JAF) et dans la graine sèche chez des plantes sauvages Col (a) et mutantes *atg5* (b)

cultivées sur 2 mM et 10 mM  $\text{NO}_3^-$ . Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés sur 6 échantillons biologiques issus de 3 cultures indépendantes. \* :  $p\text{-value}<5\%$ , \*\* :  $p\text{-value}<1\%$ , \*\*\* :  $p\text{-value}<1\%$ .

Ainsi, en considérant qu'au stade graine sèche la masse, la surface et le ratio C/N ne sont pas affectés chez le mutant *atg5* lorsque la plante est cultivée sur 2 ou 10 mM de nitrate, il apparaît que le mutant d'autophagie est moins sensible aux variations de nutrition azotée que Col. Le mutant *atg5* produisant moins de graines que Col, il est probable que même en condition d'azote limitant, la plante ait suffisamment d'azote pour remplir le peu de graines produites. Une culture avec un apport en nitrate inférieur à 2 mM serait alors nécessaire afin de créer de réelles conditions de limitation pour le remplissage de la graine et de vérifier cette hypothèse.

Par ailleurs, on observe que sur les deux nutritives azotées, la graine du mutant *atg5* présente plus de protéines totales et moins de mucilage adhérent que Col. De plus, bien qu'une graine sauvage contienne davantage d'acides gras qu'une graine mutante, la concentration exprimée par rapport à la masse de la graine reste identique. La teneur en acides gras n'est donc pas significativement affectée chez le mutant d'autophagie ( $p\text{-value}>5\%$ ).

La cinétique d'accumulation des acides gras au cours du développement de la graine à 10 mM  $\text{NO}_3^-$  montre que les acides gras à chaînes courtes sont précocement accumulés chez le mutant *atg5*. Ces acides gras sont majoritairement impliqués dans la synthèse des membranes de la cellule. On observe également que le mutant d'autophagie accumule des protéines de façon plus précoce à 10 mM  $\text{NO}_3^-$ , et notamment des protéines 12S. Ces résultats sont en accord avec la corrélation linéaire qui existe entre les quantités d'azote et de carbone totales de la graine (voir 1.2.4). Ces données suggèrent aussi que des lipides membranaires sont nécessaires de manière anticipée chez le mutant *atg5*, peut-être pour former les PSV dans lesquelles seront stockées les protéines de réserve.

Les globulines 12S semblent elles aussi synthétisées plus tôt au cours de la maturation de la graine du mutant *atg5*, toutefois elles s'accumulent en plus faibles quantités que chez Col. La concentration élevée en protéines totales dans la graine du mutant d'autophagie proviendrait alors d'une accumulation de protéines de haut poids moléculaire, susceptibles d'être des précurseurs non maturés des globulines 12S. Des analyses sont actuellement en cours afin d'identifier ces protéines sur-accumulées dans la graine mature du mutant *atg5*. D'autre part, les albumines 2S étant présentes en quantités beaucoup plus faibles que les globulines 12S dans la graine, il est possible que nous n'ayons pas pu observer des différences plus fines existant entre Col et *atg5* lors de l'expérience menée. Afin de vérifier cette hypothèse, il conviendrait d'utiliser des anticorps anti-2S et anti-12S spécifiques des formes matures ainsi que de leurs précurseurs, pour observer

l'accumulation de ces derniers chez *atg5*. En effet les anticorps utilisés au cours de ce travail de thèse ne marquent aucune forme précurseur des globulines et des albumines.

## III.2 Localisation d'expression génique et activité autophagique

### III.2.1 Expression des gènes *ATG* au cours du développement de la graine

L'étude de l'expression des gènes *ATG* au cours du développement de la graine donne des informations précieuses quant au rôle de l'autophagie dans cet organe. En effet, des variations d'expression peuvent avoir lieu lors d'étapes particulières, comme par exemple au cours du développement embryonnaire et de la mise en place des réserves, ou bien pendant la phase de maturation avec la mort des tissus maternels de la testa, l'induction de la dormance et la dessiccation de la graine.

La base de données transcriptomiques eFP-Brower (<http://bar.utoronto.ca/efp>) créée par le laboratoire Provar du département « Cell & Systems Biology » de l'Université de Toronto, fournit une application permettant de générer des représentations « électroniques fluorescentes pictographiques » (eFP) du profil d'expression d'une importante quantité de gènes d'*Arabidopsis* dans différents organes de la plante. D'après cette base de données, la plupart des gènes impliqués dans la « core machinery » de l'autophagie chez *Arabidopsis thaliana* sont fortement exprimés dans les feuilles sénescents, et également dans les graines. Cette base de données permet ainsi de suivre l'évolution de l'expression des gènes d'autophagie dans les différents tissus de la graine, du stade pré-globulaire de l'embryon au stade embryon mature vert. L'application eFP-Browser ne donne cependant aucune indication sur l'expression des gènes après développement de l'embryon, c'est-à-dire pendant les phases de maturation et de dessiccation de la graine.

Ainsi, dans le but d'avoir une représentation globale de l'expression des gènes d'autophagie au cours du développement de la graine (c'est-à-dire de son développement embryonnaire jusqu'à sa maturation et sa dessiccation), une étude cinétique en PCR quantitative a été réalisée sur des ADNc issus de siliques de 4 jours à 28 jours après fécondation des ovules. Des siliques entières (avec péricarpes, septum et graines) ont été utilisées en considérant que les valves du péricarpe ainsi que le septum sont des tissus sénescents qui meurent rapidement après le développement de l'embryon et ne contiennent donc que peu d'ARN. Deux gènes de référence ont été utilisés, *E1Fa* (*At5g60390*) et *APC2* (*At2g04660*), qui ont préalablement été sélectionnés pour leur stabilité d'expression au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis* (Dekkers et al., 2012). Les résultats obtenus sont présentés en annexe 3. Les valeurs d'expression de chaque gène d'autophagie étudié ont été normalisées par rapport à l'expression de ces deux gènes de référence (annexe 4). Après vérification de la cohérence des niveaux d'expression en utilisant séparément ces deux gènes, seul *E1Fa* a été conservé pour la présentation des résultats de l'expérience. Le niveau de transcrits d'un total de 34

gènes d'autophagie a ainsi été mesuré par PCR quantitative. Les valeurs d'expression de ces 34 gènes ont de nouveau été normalisées, mais cette fois par rapport à la valeur maximale d'expression de chacun des gènes afin de comparer les profils d'expression au cours du développement de la silique. Il a alors été possible de représenter l'expression moyenne des 34 gènes étudiés pour les 4 points testés de cinétique de développement de la graine (Fig. 58, courbe bleue). Les valeurs issues de la base de données eFP-Browser disponibles au cours du développement de l'embryon ont également été représentées sur le même graphique (Fig. 58, courbe rouge).

Ce graphique montre qu'au cours du développement de l'embryon, il y a une légère augmentation de l'expression des gènes d'autophagie au tout début de l'embryogenèse, entre les stades embryon pré-globulaire (2 JAF) et embryon globulaire (4 JAF), et également entre les stades embryon linéaire (8 JAF) et embryon mature encore vert (12 JAF). Une fois que le développement embryonnaire est fini et que la maturation de la graine commence (12 JAF), on observe une très forte augmentation de l'expression des gènes d'autophagie jusqu'à ce que la graine soit mature et sèche. Ces résultats tendent à montrer un rôle de l'autophagie au cours de la maturation de la graine, que ce soit pour la mise en place des molécules de réserve, la mort cellulaire programmée des couches tégumentaires, ou encore l'initiation de la dessiccation.

En considérant l'ensemble des profils d'expression individuels de chaque gène, il est possible de définir des classes de profils types dans lesquels se répartissent les gènes d'autophagie. Cinq groupes de profils d'expression distincts ont ainsi pu être statistiquement identifiés et sont présentés en figure 59. Une majorité de gènes s'expriment de façon croissante et linéaire dès le début du développement de l'embryon (groupe 1), tandis que d'autres montrent une forte induction de leur expression à partir de 12 jours après fécondation des ovules, c'est à dire juste après le développement de l'embryon (groupes 2 et 3). D'autres gènes s'expriment très fortement 20 jours après fécondation, soit après accumulation des réserves et pendant la phase de dessiccation de la graine (groupe 4). Enfin, les 3 gènes *ATG13a*, *ATG1c* et *ATG4c* sont les seuls à présenter un niveau d'expression décroissant au cours du développement de la silique (groupe 5). Ces différents profils d'expression mettent en lumière plusieurs points :

- Au sein d'une même famille multigénique, les gènes ne présentent pas tous le même profil d'expression. Par exemple, l'expression du gène *ATG13b* augmente après la fin de l'embryogenèse, tandis que l'expression du gène *ATG13a* diminue tout au long du développement de la graine. Des différences de profils d'expression existent aussi pour les gènes des familles multigéniques *ATG1*, *ATG18* et *ATG8*. Ces différences montrent que l'expression des gènes d'une famille multigénique peut varier en fonction du stade

de développement de la plante et/ou en fonction du tissu considéré et ainsi montrer des spécificités de fonctions.

Remarque : Il est important de garder en considération que l'autophagie intervient à un état basal dans les cellules.

- Par ailleurs, en considérant que les gènes uniques tels que *ATG2*, *ATG3*, *ATG5*, *ATG6*, *ATG9* et *ATG10* sont essentiels à la formation des autophagosomes et donc à la macroautophagie, on peut émettre l'hypothèse que c'est au moment où les quantités de transcrits de tous les gènes indispensables à la « core machinery » sont les plus élevés que l'autophagie est induite. Cette quantité maximale de transcrits est atteinte à la fin de la dessiccation de la graine. Ces transcrits sont donc soit utilisés pour le processus autophagique à la fin de la maturation de la graine, soit stockés pour être utilisés lors des premières étapes de la germination.

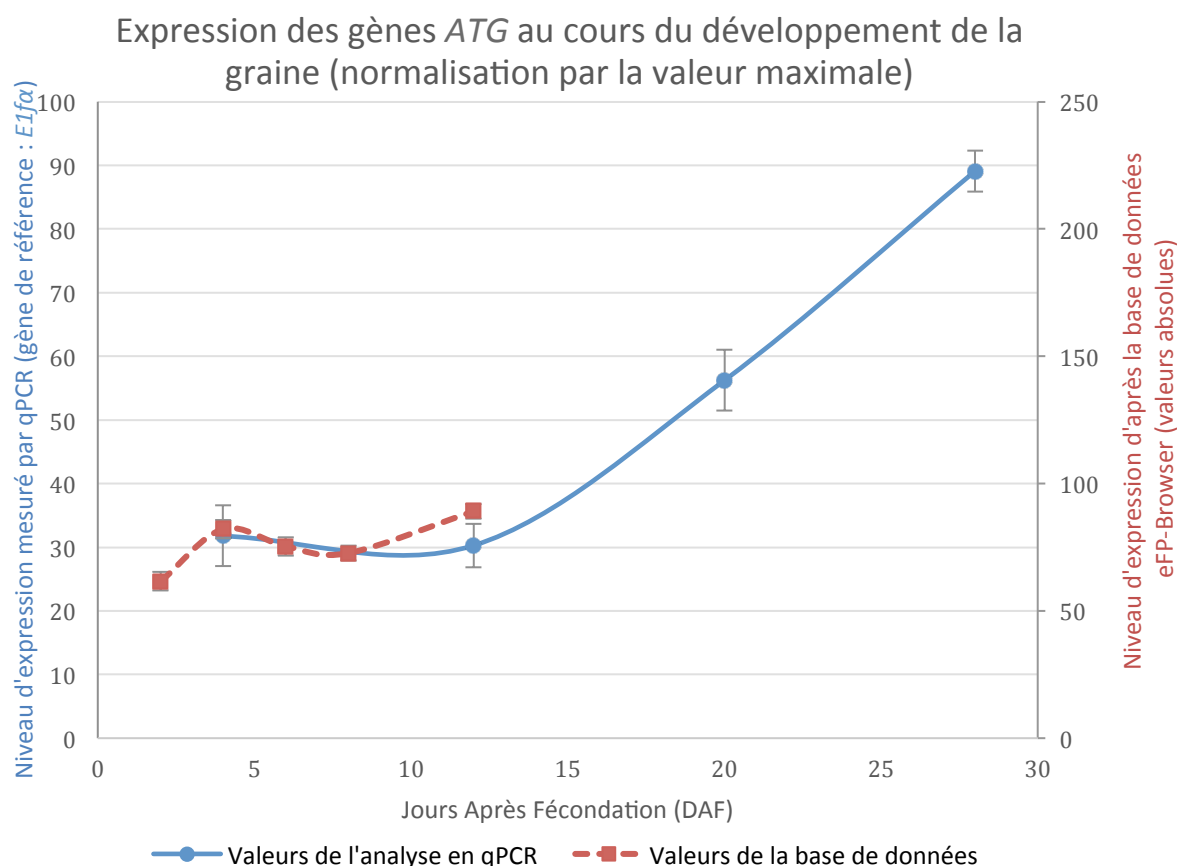


Figure 58. Graphique de l'expression moyenne de 34 gènes d'autophagie (*ATG*) dont les valeurs individuelles ont été normalisées par la valeur maximale d'expression au cours du développement de la graine, de 4 à 28 jours après fécondation de la fleur (JAF). La courbe en rouge représente la cinétique d'expression des gènes d'autophagie au cours du développement de l'embryon d'après la base de données eFP-Browser. La



courbe en bleu montre l'expression moyenne des gènes ATG jusqu'au stade graine sèche (28 JAF). Ces dernières données ont été obtenues par analyse en PCR quantitative en utilisant le gène de référence E1fa. Les barres d'erreur représentées correspondent à l'erreur standard calculée sur les valeurs des 34 gènes étudiés à chaque point de cinétique.

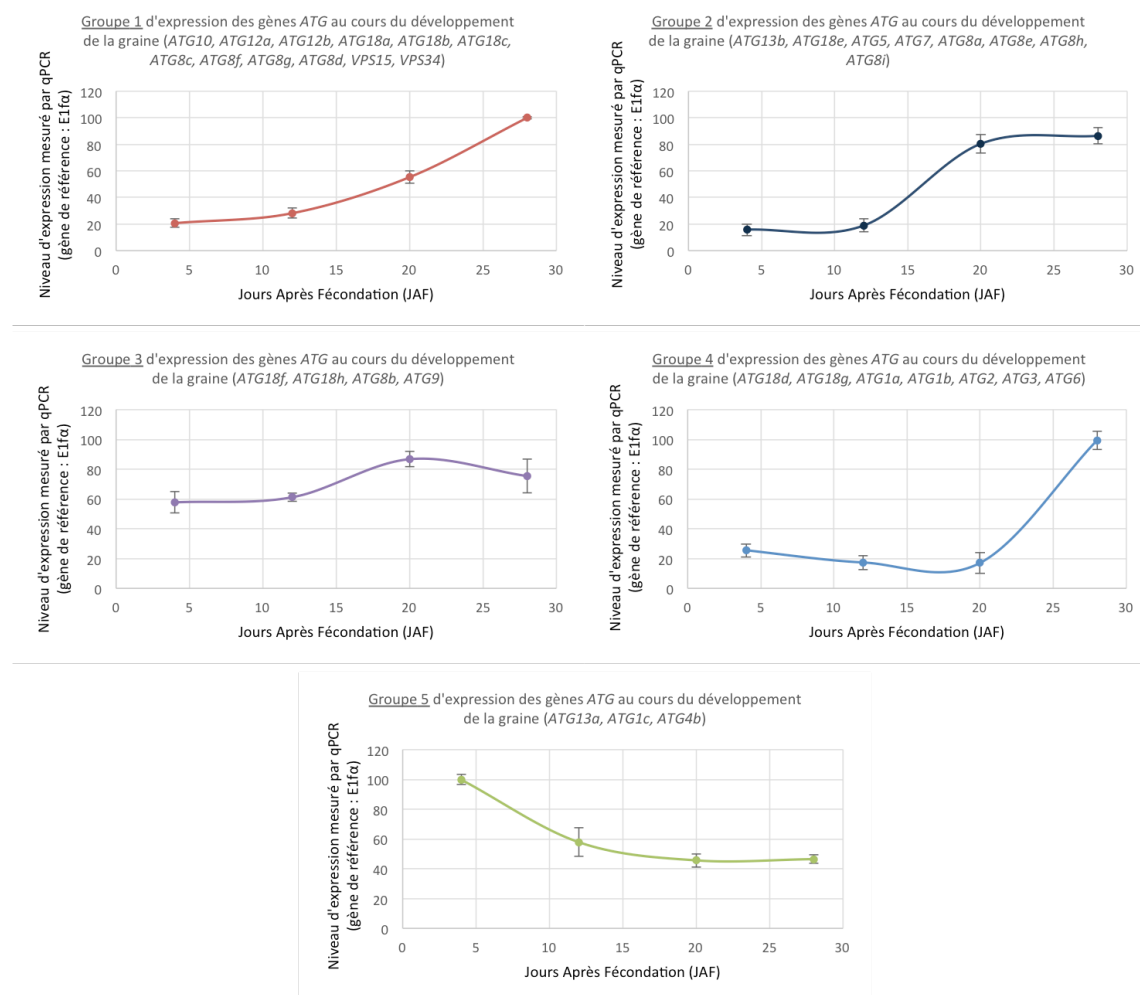


Figure 59. Graphiques présentant la cinétique d'expression moyenne de 34 gènes d'autophagie répartis en 5 groupes selon leur profil d'expression.

### III.2.2 Localisation tissulaire de l'expression des gènes *ATG8*

La protéine ATG8 est considérée comme une protéine clé de la « core machinery » de la macro-autophagie. D'après la base de données eFP-Browser et les données collectées en qPCR (annexes 3 et 4), les 9 gènes de la famille multigénique *ATG8* ne sont pas exprimés aux mêmes moments ni dans les mêmes tissus de la plante, laissant ainsi penser que les protéines ATG8 ont des spécificités de fonction. Dans le but de mieux comprendre le rôle de l'autophagie dans la graine, la localisation de l'expression génique de 4 des 9 gènes *ATG8* (*ATG8c*, *ATG8e*, *ATG8f*, *ATG8g*) a ainsi été étudiée dans la silique et la graine en développement. Les fusions transcriptionnelles avec le gène rapporteur *uidA* (*GUS*) utilisées ont été fournies par l'équipe de recherche de Gad Galili de l'institut Weizmann en Israël (Sláviková et al., 2005).

Nous avons ainsi cherché à observer l'expression de gènes *ATG8* dans les péricarpes du fruit, dans le funicule rattachant la graine au placenta (le replum) et dans la graine elle-même.

#### III.2.2.1 Dans la silique

Les siliques sont des organes photosynthétiques qui entrent en senescence et ont des profils transcriptionnels relativement similaires à ceux des feuilles (Wagstaff et al., 2009). Il est ainsi probable qu'à l'instar des feuilles, il y ait un processus de remobilisation de l'azote de la silique sénescente pour participer au remplissage du grain *via* l'autophagie. Afin de comprendre si l'autophagie est impliquée au cours de ce processus de senescence, la construction Prom<sub>ATG8f</sub>::ATG8f::GUS a été utilisée afin d'observer la localisation d'expression d'*ATG8f* dans les tissus de la silique mature (Fig. 60 et 61). La figure 60 présente une coupe transversale d'une valve de silique où la localisation d'expression du gène *ATG8f* est caractérisée par la coloration bleue des tissus. On observe qu'*ATG8f* s'exprime de façon très spécifique dans des cellules longilignes de la silique, qui se situent de part et d'autre du xylème. Ces cellules sont donc associées au système vasculaire de la silique.

Des plantes transformées exprimant la construction Prom<sub>ATG8f</sub>::GFP ont été utilisées en microscopie confocale afin d'affiner l'observation de la localisation d'expression du gène *ATG8f* dans les tissus vasculaires de la silique (Fig. 61). On observe une très forte fluorescence de la GFP dans des cellules allongées présentant des chloroplastes alignés (présentés en rouge). La forme de ces cellules et la présence de chloroplastes en enfilade sont caractéristiques des cellules compagnes du phloème (Cayla et al., 2015). On observe également de part et d'autre des cellules compagnes des cellules plus larges dont le cytoplasme (qui fluoresce avec la GFP) est plaqué contre la membrane plasmique. Les chloroplastes sont ainsi eux-mêmes localisés sur le pourtour de la cellule. Ces cellules constituent le

parenchyme phloémien (Cayla et al., 2015). En revanche, aucune fluorescence n'est observée dans les autres cellules du parenchyme de la silique.

### III.2.2.2 Dans le funicule

L'observation du funicule, qui rattache la graine en développement au replum (placenta) montre également une expression du gène *ATG8f* dans des cellules très spécifiques du tissu vasculaire (Fig. 62). En effet, la coupe transversale d'un funicule montre que l'expression d'*ATG8f* est localisée dans seulement quatre cellules sur une section.

Au sein du fruit, la localisation d'expression du gène *ATG8f* est très spécifique des tissus vasculaires, qu'il s'agisse des cellules compagnes ou du parenchyme phloémien du péricarpe, ou des cellules identifiées dans le funicule, bien que l'identité de ces dernières n'ait pas été déterminée avec précision. Cela suggère ainsi un rôle de l'autophagie dans la dégradation de protéines et/ou d'organites permettant la libération d'acides aminés et/ou de sucres qui seront chargés dans le phloème pour être transportés vers d'autres organes comme la graine. L'autophagie pourrait donc jouer un rôle majeur dans la mise à disposition des molécules qui composent la sève élaborée.

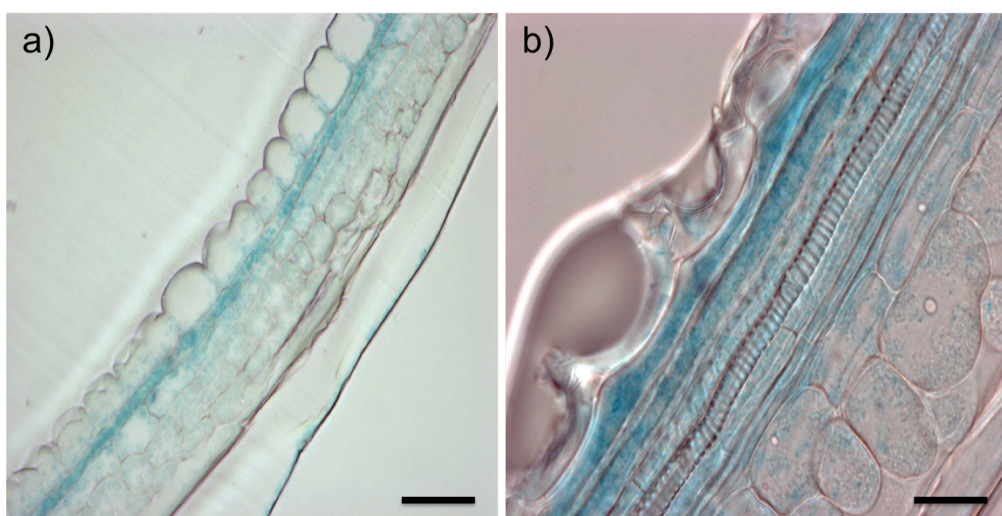


Figure 60. Image de coupe longitudinale d'une valve de silique exprimant la construction *Prom<sub>ATG8f</sub>::ATG8f::GUS* incluse en résine et présentée à deux grossissements en a) et b). La coloration bleue reflète la localisation d'expression du gène *ATG8f*. Barres d'échelle, a) 50 µm ; b) 20 µm.

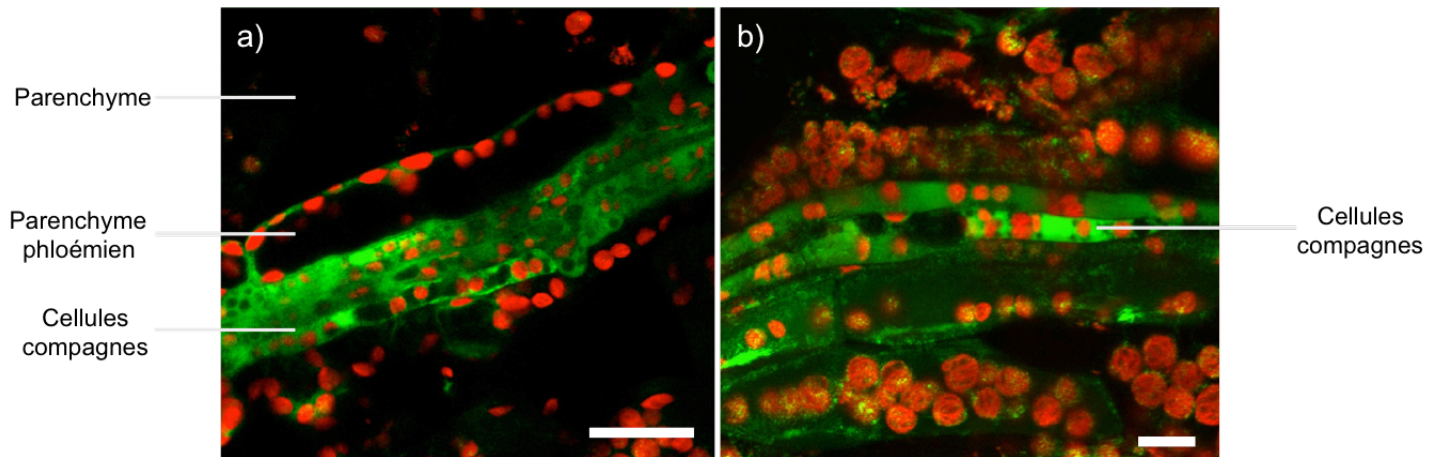


Figure 61. Observation en microscopie confocale des tissus vasculaires d'une silique exprimant la construction  $Prom_{ATG8f}::GFP$ . L'expression de la fusion  $Prom_{ATG8f}::GFP$  apparaît en vert et l'autofluorescence des chloroplastes apparaît en rouge. Barres d'échelle, a) 25  $\mu m$  ; b) 10  $\mu m$ .

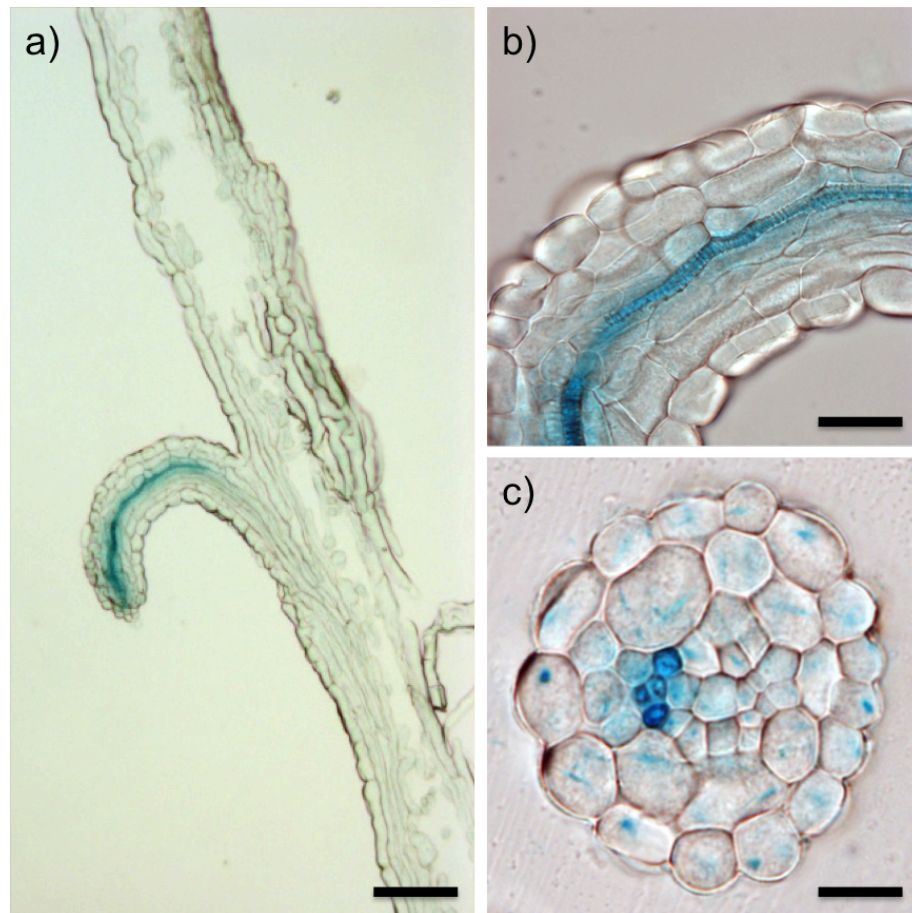


Figure 62. Images de coupes d'un replum (placenta) et d'un funicule exprimant la construction  $Prom_{ATG8f}::ATG8f::GUS$  après inclusion en résine. La coloration bleue reflète la localisation d'expression du gène  $ATG8f$ . a) Coupe longitudinale d'un replum avec un funicule. b) Coupe longitudinale de funicule. c) Coupe transversale de funicule. Barres d'échelle, a) 50  $\mu m$  ; b) 20  $\mu m$  ; c) 10  $\mu m$ .

### III.2.2.3 Dans la graine au cours du développement

A partir des fusions transcriptionnelles  $\text{Prom}_{\text{ATG8}}::\text{ATG8}::\text{GUS}$  dont nous disposons, en présence de son substrat, la  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) codée par le gène *uidA* fusionnée à son extrémité N-terminale à la protéine ATG8 colore en bleu les cellules dans lesquelles le gène *ATG8* s'exprime. Ainsi une cinétique de coloration GUS a été effectuée au cours du développement de la graine pour suivre la localisation d'expression des gènes *ATG8c*, *ATG8e*, *ATG8f* et *ATG8g*. Des observations en microscopie réalisées sur graines entières pendant le développement de l'embryon sont présentées en figure 63, et des observations réalisées sur coupes pendant la maturation sont présentées en figure 64. Une fois l'embryon complètement développé, l'oxydation des tannins opacifie les téguments et ne permet plus de visualiser les différents tissus de la graine par transparence. On remarque ainsi qu'au cours du développement embryonnaire, l'expression du gène *ATG8c* (Fig. 63) est très spécifiquement localisée dans les tissus vasculaires qui arrivent du funicule jusqu'à la graine. Cette coloration est perceptible du stade globulaire de l'embryon jusqu'au stade cotylédons retournés. Le gène *ATG8c* ne semble plus s'exprimer lorsque l'embryon est mature. Le gène *ATG8e* quant à lui, s'exprime particulièrement dans la chalaze tout au long du développement de l'embryon. Une coloration bleue diffuse semble également indiquer une expression dans les autres tissus de la testa à partir du stade globulaire jusqu'au stade cœur. Le gène *ATG8f* a le même profil d'expression qu'*ATG8e*, c'est-à-dire dans la chalaze et de manière diffuse dans les autres tissus de la testa, du stade globulaire au stade cotylédons retournés. En revanche, lorsque l'embryon est complètement développé, il y a une forte expression du gène *ATG8f* dans la graine. A ce stade de développement, à la fois l'embryon et les différents tissus maternels de la graine sont colorés en bleu. Enfin, l'expression du gène *ATG8g* est faible dans la graine, seule une coloration bleue est visible au stade cotylédons retournés, au niveau des tissus vasculaires qui sont raccordés au funicule.

Une coloration GUS a également été effectuée sur des siliques entières, qui ont ensuite été incluses dans la résine et coupées au microtome (Fig. 64). Le protocole de coloration a été adapté par rapport à celui utilisé sur graines entières (Fig. 63) afin d'éviter la diffusion de coloration entre différents tissus. On observe ainsi une coloration des cellules de la chalaze, de l'embryon, de l'endosperme micropylaire, mais surtout une forte coloration de l'endothélium et des tissus vasculaires au stade globulaire (Fig. 64). Par ailleurs, au stade jeune embryon mature, on observe une expression diffuse d'*ATG8f* dans l'embryon et une expression plus intense dans la couche externe du tégument, c'est-à-dire les cellules à mucilage, où les columelles en formation apparaissent en bleu. Enfin, au stade embryon mature vert, lorsque l'embryon commence sa dessiccation, on observe de nouveau une coloration bleue au niveau de l'embryon et de l'endothélium avec la construction  $\text{Prom}_{\text{ATG8f}}::\text{ATG8f}::\text{GUS}$ .

Au cours du développement de la graine, les gènes *ATG8* ne s'expriment pas avec la même cinétique ni dans les mêmes tissus. Le gène *ATG8f*, qui est le gène *ATG8* le plus exprimé dans la graine (annexe 3), s'exprime particulièrement dans les derniers tissus vasculaires issus de la jonction avec le funicule, ainsi que dans la chalaze, l'endothélium, l'endosperme micropylaire et l'embryon. D'autres observations sont cependant nécessaires afin de suivre l'expression de ce gène à des stades intermédiaires de développement de la graine, comme au stade torpille où l'endosperme est complètement développé. Ces observations montrent que des gènes *ATG8* nécessaires à l'autophagie sont exprimés dans les tissus maternels de la graine et dans l'embryon au cours du développement.

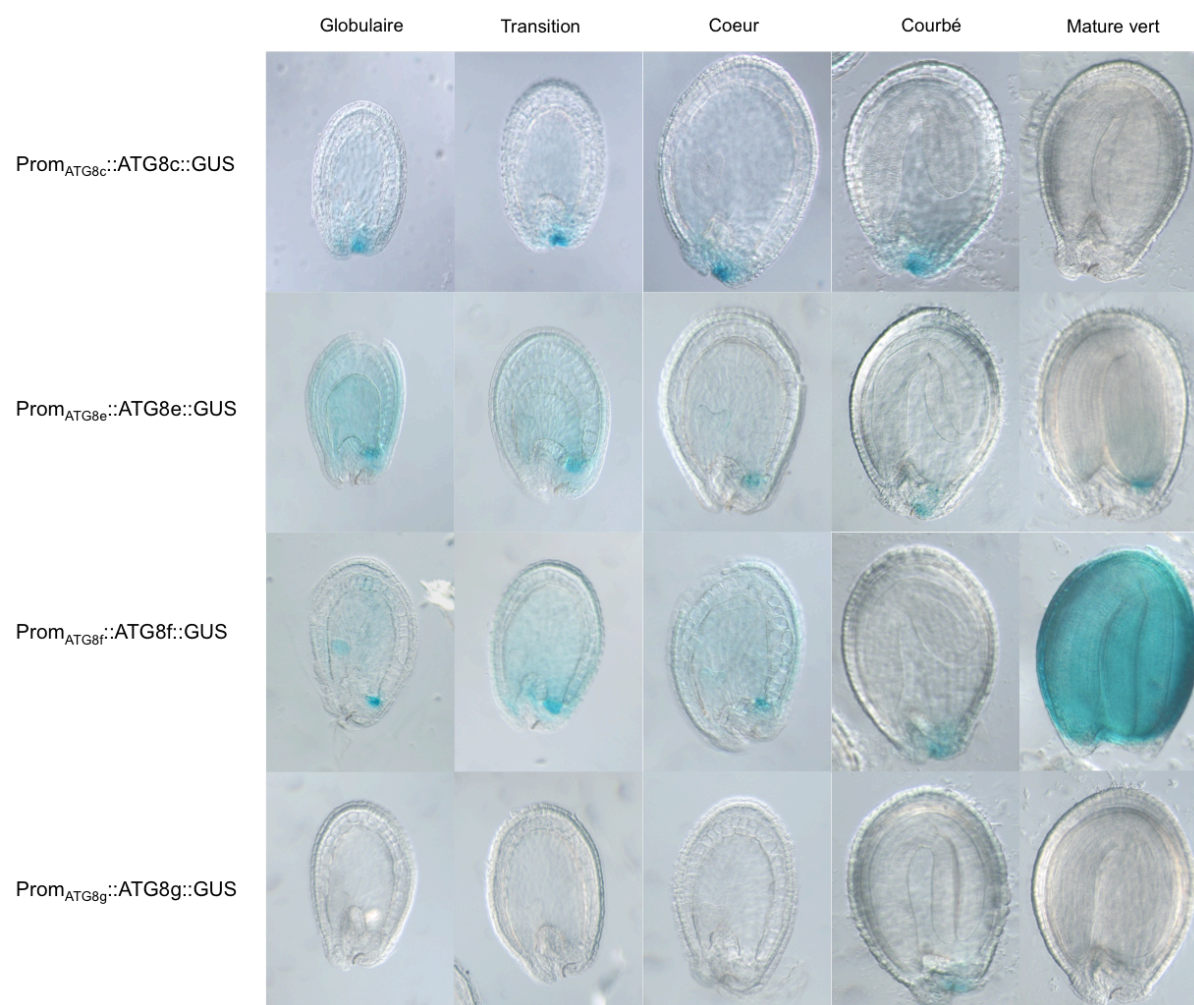


Figure 63. Suivi de la localisation d'expression par coloration GUS de 4 gènes *ATG8* au cours du développement embryonnaire d'*Arabidopsis*, du stade embryon globulaire au stade embryon mature vert. Les observations sont réalisées sur graines entières après éclaircissement des tissus.

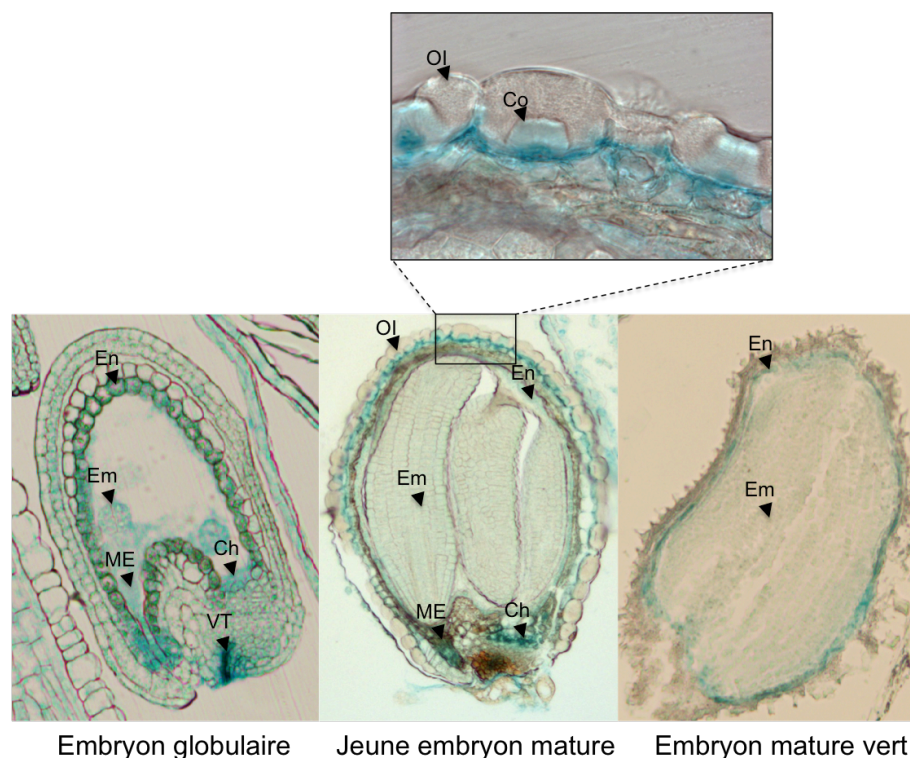


Figure 64. Images de la localisation d'expression par coloration GUS du gène ATG8f au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis* aux stades embryon globulaire, jeune embryon mature et embryon mature vert. Les observations sont réalisées sur coupes après inclusion en résine. En : endothélium, Em : embryon, ME : endosperme micropylaire, Ch : chalaze, VT : tissus vasculaires, Ol : tégument externe, Co : columelle.

### III.2.3 Activité autophagique dans la graine en développement

La technique la plus couramment utilisée pour étudier les flux autophagiques repose sur l'observation des autophagosomes. On considère en effet que l'abondance des autophagosomes dans une cellule est directement corrélée à l'activité autophagique. La protéine ATG8 qui est enchâssée dans la membrane interne de l'autophagosome est un marqueur de choix pour observer ces vésicules en microscopie confocale (voir I.1.2.2.2). Ainsi, des plantes sauvages Col ont été transformées avec des constructions GFP::ATG8 sous le contrôle de deux promoteurs de gènes à l'expression ubiquitaire : Prom<sub>ACTIN</sub> et Prom<sub>UBQ10</sub>. La fluorescence des protéines ATG8 chimériques couplées à la GFP est ainsi visualisable au microscope confocal. Des observations d'autophagosomes ont donc été réalisées sur des graines en cours de développement.

Dès le début du développement de la graine, les cellules de l'endothélium commencent à accumuler des proanthocyanidines. Avant même leur oxydation (qui confère une couleur brune aux téguments), ces flavonoïdes présentent une forte autofluorescence sur un large spectre d'émission lors d'une excitation laser au microscope confocal. Cette autofluorescence rend difficile l'observation

des différents tissus de la graine fraîche après 10 JAF. La réalisation de coupes fines de graines au cours du développement a ainsi été effectuée. Plusieurs essais de coupe de matériel frais au cryotome ont montré que les tissus coupés présentaient de nombreuses déchirures. Des essais de coupe au vibratome après inclusion en gélose de siliques exprimant la construction GFP::ATG8a sous le contrôle du promoteur du gène *UBQ10* ont permis de réaliser quelques coupes de graines au stade torpille. On observe sur la figure 65a où l'embryon s'est détaché et n'apparaît pas, une forte fluorescence de la GFP dans des cellules rondes localisées autour de la cavité centrale de la graine. Ces cellules semblent être des cellules de l'endosperme. Sur la figure 65b, l'embryon est cette fois présent et montre également un signal GFP. Cependant, aucune structure particulière (vésicule ronde d'environ 1  $\mu\text{m}$  de diamètre) pouvant s'apparenter à des autophagosomes n'a été observée dans ces cellules fluorescentes. Le contrôle négatif avec la construction GFP::ATG8a dans le fond *atg5* n'a pas été réalisée car les plantes sont en cours de sélection. De plus le faible taux de réussite des coupes a rendu difficile la réalisation de répétitions de l'expérience.

La technique choisie a consisté à inclure dans la cire des siliques fraîches de plantes Col et *atg5* exprimant la construction GFP::ATG8, et à réaliser une immunolocalisation sur lame après coupe au microtome, en utilisant des anticorps primaires anti-GFP afin de marquer les autophagosomes (Fig. 66 et 67).



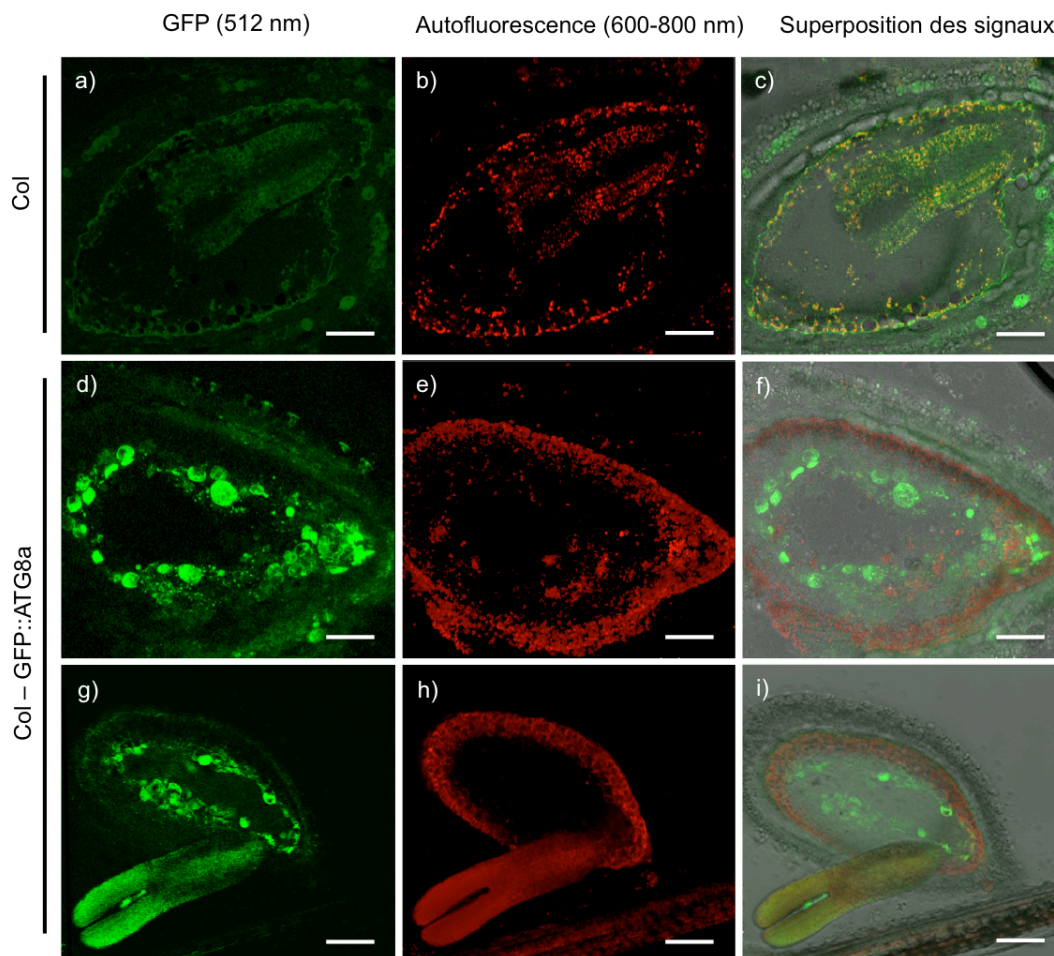


Figure 65. Observations au microscope confocal d'une graine sauvage Col (a, b, c) et de graines exprimant la construction  $Prom_{UBQ10}::GFP::ATG8a$  (d, e, f, g, h, i) au stade torpille. L'expression de la fusion  $Prom_{UBQ10}::GFP::ATG8a$  apparaît en vert et l'autofluorescence des tissus apparaît en rouge. Barres d'échelle, 50  $\mu m$ .

La construction  $Prom_{ACTIN}::GFP::ATG8f$  qui emploie un autre promoteur ubiquitaire a été réalisée. Le gène  $ATG8f$  a été choisi parmi les 9 gènes de la famille multigénique  $ATG8$  car il est le plus exprimé dans tous les organes de la plante, y compris dans la graine d'après les résultats de qPCR obtenus et la base de données eFP-Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp>). Cette fusion a été utilisée pour réaliser des coupes de siliques incluses en cire sur lesquelles une immunolocalisation avec des anticorps anti-GFP a été réalisée. Sur ces coupes, les observations au microscope confocal montrent dans les embryons sauvages la présence de structures rondes d'environ 1  $\mu m$  de diamètre qui fluorescent (Fig. 66 et 67). Chez  $atg5$ , la fusion  $GFP::ATG8f$  a une localisation cytosolique diffuse sans structure visible. Leur absence chez le mutant  $atg5$  permet d'affirmer qu'il s'agit d'autophagosomes. Cependant, la technique de l'immunolocalisation fige les structures cellulaires et ne permet donc pas de visualiser le déplacement des autophagosomes du cytoplasme à la vacuole, ce qui constitue un critère pour leur identification.

Bien que l'autophagie soit un processus ubiquitaire intervenant à un état basal dans toutes les cellules, ces autophagosomes ne sont observés que dans l'embryon, et dans aucun autre tissu de la graine. Il est possible d'envisager que la construction utilisée, avec le promoteur *ACTIN*, ne permette pas une expression de la fusion GFP::ATG8f dans d'autres tissus tels que l'endosperme et les différents tissus maternels. Il conviendrait alors d'utiliser la construction utilisant le promoteur endogène d'*ATG8f*, qui est en cours d'obtention.

Par ailleurs, un nombre croissant d'autophagosomes semble être observé dans les cellules d'embryon entre 4 et 12 JAF. Le dénombrement des autophagosomes par cellule réalisé sur une cinétique de développement permettrait de quantifier l'activité autophagique.

Enfin, il est à noter que sur la figure 67, on observe que les cellules de l'embryon commencent à accumuler des vacuoles de stockage protéiques (PSV) (apparaissant en noir) en fin d'embryogenèse à 12 JAF. Le grand nombre de vacuoles par cellule rend difficile la détermination précise de la localisation des autophagosomes dans le cytoplasme et/ou des corps autophagiques dans les vacuoles. Néanmoins, la démonstration de l'accumulation de structures autophagiques au cours de la maturation de l'embryon pourrait coïncider avec la formation des PSV et suggérer un rôle de l'autophagie dans la mise en place des molécules de réserve.

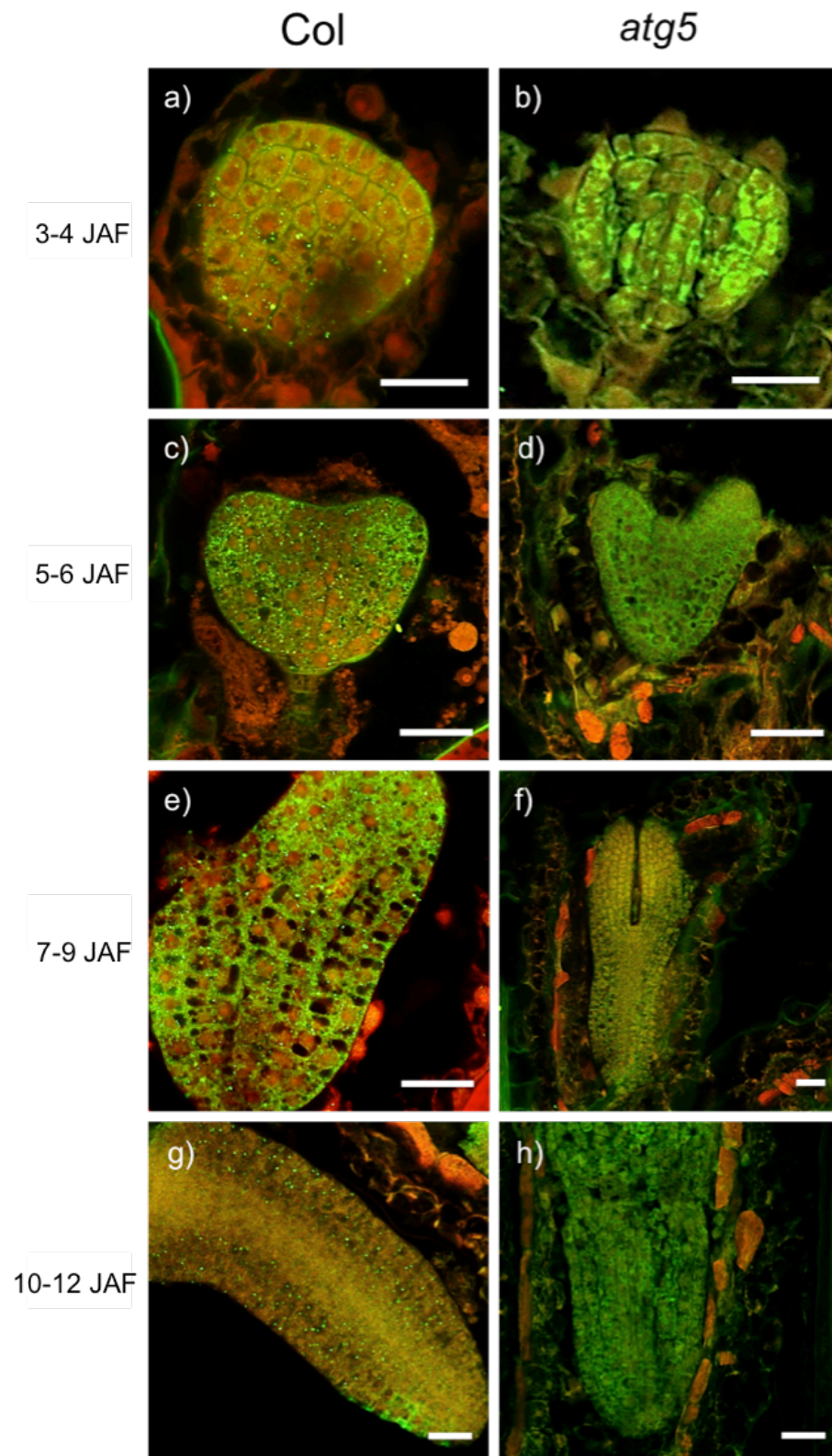


Figure 66. Observations au microscope confocal d'embryons de graines exprimant la construction  $Prom_{ACTIN}::GFP::ATG8f$  dans un fond génétique sauvage Col (a, c, e, g) et mutant *atg5* (b, d, f, h) au cours du développement de la graine. L'expression de la fusion  $Prom_{ACTIN}::GFP::ATG8f$  apparaît en vert et l'autofluorescence des tissus apparaît en rouge. Barres d'échelle, 20  $\mu m$ .

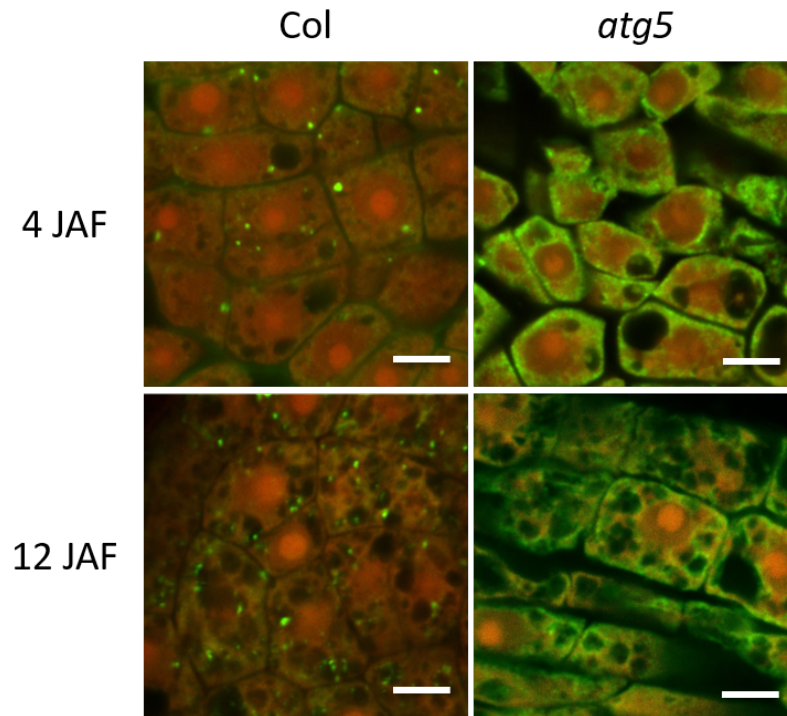


Figure 67. Agrandissement des observations au microscope confocal de cellules d'embryons exprimant la construction  $Prom_{ACTIN}::GFP::ATG8f$  dans un fond génétique sauvage Col et mutant  $atg5$  à 4 et 12 JAF. L'expression de la fusion  $Prom_{ACTIN}::GFP::ATG8f$  apparaît en vert et l'autofluorescence des tissus apparaît en rouge. Barres d'échelle, 5  $\mu m$ .

### III.3 Autophagie et germination de la graine

Au cours du développement, la graine accumule des molécules de réserve afin de fournir l'énergie nécessaire au processus de germination et au développement de la plantule avant qu'elle n'atteigne l'état d'autotrophie. Lors de la germination, ces molécules de réserve (protéines et lipides chez *Arabidopsis*) sont progressivement hydrolysées. Afin de déterminer si l'autophagie joue un rôle lors de la mobilisation de ces réserves, des dosages d'acides gras et de protéines totales ont été réalisés au cours de la germination jusqu'au début du développement de la plantule. Ces dosages sont des analyses préliminaires réalisées sur une seule culture en condition non limitante d'azote.

#### III.3.1 Mobilisation des réserves

##### III.3.1.1 Mobilisation des acides gras

Afin de suivre la mobilisation des lipides de réserve, des dosages d'acides gras ont été réalisés au cours de la germination *stricto sensu* et du début du développement de la graine jusqu'à 72h après imbibition. Le dosage des acides gras totaux (Fig. 68) montre que le mutant d'autophagie présente moins de lipides que le sauvage, et ce tout au long du processus de mobilisation des réserves jusqu'à 72h d'imbibition. D'autre part, les embryons du mutant *atg5* et du sauvage Col mobilisent peu d'acides gras au cours de la germination *stricto sensu* par rapport à la phase de développement de la plantule intervenant après 24h d'imbibition. En effet, de 0 à 32h après imbibition, on assiste à une mobilisation de 14% des acides gras initialement présents chez Col, et de 22% de ceux d'*atg5*. Ensuite, de 32 à 50h d'imbibition, les lipides sont plus rapidement mobilisés avec 63% des acides gras initialement présents de Col consommés, contre 69% pour le mutant *atg5*. Enfin, de 50 à 72h d'imbibition, la mobilisation des lipides ralentit et à 72h, 78,7% des acides gras totaux présents au début de la germination ont été consommés, soit le même pourcentage pour les deux génotypes. A ce stade, la plantule acquiert l'état d'autotrophie et ne dépend plus des réserves mises en place au cours du développement. Il est à noter qu'il s'agisse d'acides gras à chaînes longues ou courtes, la cinétique de mobilisation est la même entre sauvage et mutant d'autophagie (annexe 5). Le mutant d'autophagie présente ainsi moins d'acides gras que le sauvage, mais ne semble pas affecté dans le processus de mobilisation des réserves lipidiques.

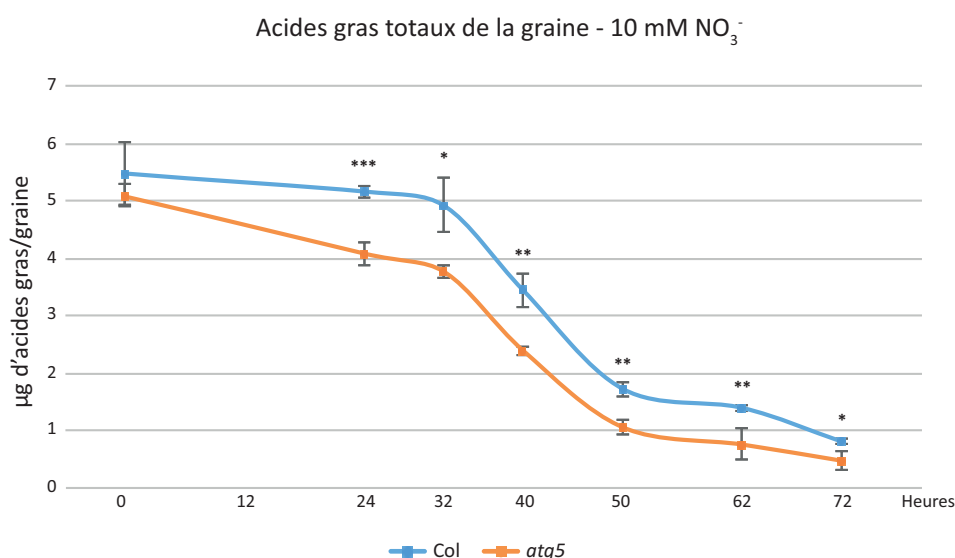


Figure 68. Graphique des dosages des acides gras totaux contenus dans une graine au cours de la germination et du début du développement de la plantule (soit jusqu'à 72h après imbibition de la graine) chez des plantes sauvages (Col) et mutantes (atg5) cultivées en condition d'azote pléthorique (10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés sur 3 échantillons biologiques provenant d'une culture. \* : p-value<5%, \*\* : p-value<1%, \*\*\* : p-value<1‰.

### III.3.1.2 Mobilisation des protéines de réserve

De la même façon que pour les acides gras, des dosages préliminaires de protéines ont été effectués de 0 à 72h d'imbibition de la graine (Fig. 69). On remarque que pour le sauvage Col, la mobilisation des protéines de réserve intervient bien après la germination *stricto sensu*. En effet, tandis que de 0 à 50 h d'imbibition, la graine a mobilisé 5% de ses réserves protéiques, de 50 à 72h d'imbibition, elle en a consommé 77%. En revanche, chez le mutant d'autophagie *atg5*, de 0 à 72h d'imbibition, la graine n'a consommé que 2,5% de ses réserves protéiques initiales. Le mutant *atg5* semble donc fortement affecté dans son processus de mobilisation des protéines stockées au cours du développement sur 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

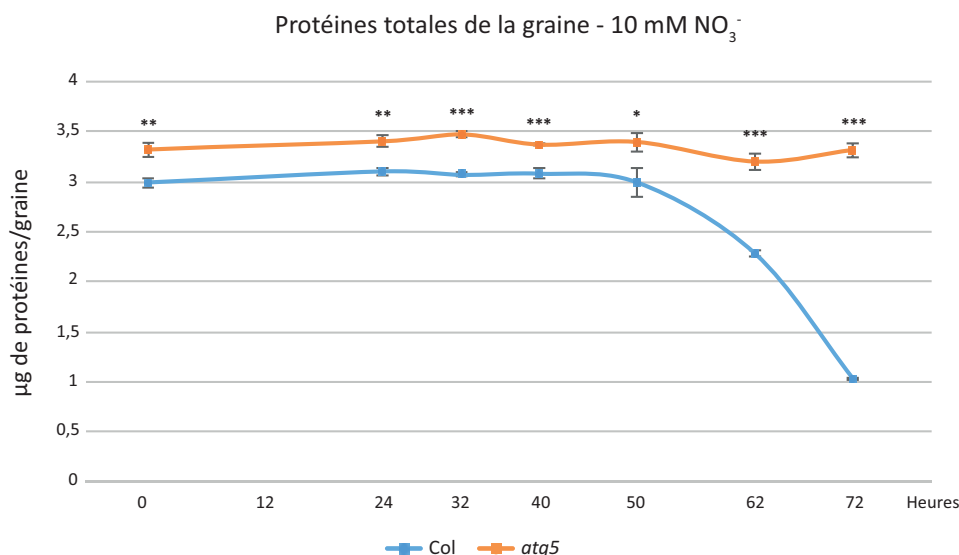


Figure 69. Graphique des dosages des protéines totales contenues par graine au cours de la germination et du début du développement de la plantule (soit jusqu'à 72h après imbibition de la graine) chez des plantes sauvages (Col) et mutantes (atg5) cultivées en condition d'azote pléthorique. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés sur les moyennes de 3 réplicats biologiques provenant d'une culture. \* : p-value<5%, \*\* : p-value<1%, \*\*\* : p-value<1‰.

### III.3.2 Expression des gènes ATG au cours de la germination de la graine

L'étude de l'expression des gènes ATG au cours du développement de la graine a montré que la majorité de ces gènes s'exprime de façon croissante du début de l'embryogenèse jusqu'à la fin de la maturation de la graine. Concernant l'expression des gènes ATG au cours de la germination *stricto sensu*, c'est-à-dire à partir de l'imbibition de la graine sèche jusqu'à ce que la radicule émerge du tégument, des données transcriptomiques sont également disponibles sur la base de données eFP-Viewer. Afin de confirmer ces données, des analyses en qPCR ont été effectuées.

Ainsi, de la même façon que pour le développement de la graine, des ADNc produits après extraction des ARN de graines en germination ont été utilisés pour suivre la quantité de transcrits et donc l'expression des gènes d'autophagie. D'un point de vue biologique, on considère que la germination prend fin au moment où la radicule émerge de la graine, c'est à dire 24h après son imbibition chez l'écotype *Columbia* (Col). A partir de ce moment, on considère qu'il ne s'agit plus d'une graine, mais d'une plantule en développement. La cinétique d'expression réalisée débute ainsi 30 minutes après imbibition de la graine et se poursuit jusqu'à 24 heures. Les analyses en PCR quantitative ont été menées en utilisant deux gènes de référence : *ASAR1* (*At4g02080*) et *MAP2B* (*At3g59990*) ayant une grande stabilité d'expression dans la graine au cours de la germination (Dekkers *et al.*, 2012). Les résultats obtenus figurent en annexe 6. Les moyennes d'expression de 34

gènes d'autophagie au cours de la germination sont présentées en figure 70. La courbe rouge représente les valeurs disponibles sur la base de données eFP-Browser et la courbe bleue représente les valeurs obtenues par PCR quantitative. On remarque que dans les deux expériences, l'expression moyenne des gènes *ATG* décroît au cours de la germination. Il est à noter que les résultats obtenus par PCR quantitative montrent une légère augmentation du niveau de transcrits à partir de 16h d'imbibition. Cette diminution globale de la quantité de transcrits des gènes *ATG* montre qu'il n'y a pas de synthèse *de novo* des ARNm nécessaires à la mise en place de l'autophagie au cours de la germination. Cela n'exclue cependant pas la possibilité d'une activité autophagique au cours de la germination. En effet, les transcrits synthétisés au cours du développement peuvent être accumulés et stockés dans la graine sèche pour être utilisés au cours des premières étapes de la germination.

Comme pour le développement de la graine, les gènes d'autophagie peuvent être répartis après normalisation par la valeur maximale (annexe 7) selon des profils d'expression types au cours de la germination (Fig. 71). Les gènes du groupe 1 montrent une diminution de la quantité de transcrits tout au long de la germination. Cette diminution est particulièrement rapide jusqu'à 6h où on observe une réduction moyenne de plus de 60% de la quantité de transcrits présents au début de l'imbibition. Entre 6h et 16h d'imbibition, le niveau de transcrits diminue moins rapidement, avec une nouvelle baisse moyenne de 16%. De 16h jusqu'à la fin de la germination, on observe cette fois une légère hausse de 8% du niveau de transcrits. Ce profil d'expression regroupe la majorité des gènes *ATG*, avec 20 des 34 gènes d'autophagie étudiés dont 4 gènes uniques de la « core machinery » ainsi que les 9 gènes de la famille multigénique *ATG8*. Le profil des gènes du groupe 1 est similaire à celui de l'ensemble des gènes (Fig. 71). Les gènes du groupe 2, eux, ont un pic d'expression entre 30min et 16h d'imbibition qui diminue ensuite rapidement. Les gènes du groupe 3, dont les gènes uniques *ATG2*, *ATG7* et *ATG10*, ont une expression moyenne relativement constante jusqu'à 16h d'imbibition de la graine, puis montrent une augmentation du niveau d'expression de près de 50% à la fin de la germination.

L'expression de tous les gènes uniques nécessaires à l'autophagie n'est pas induite au même moment dans le processus de germination. L'expression tardive des gènes uniques *ATG2*, *ATG7* et *ATG10* suggère ainsi une potentielle activité autophagique après la germination, c'est-à-dire pendant le développement de la plantule. Afin de vérifier cette hypothèse, l'activité autophagique doit être évaluée par l'observation d'autophagosomes au cours de la germination.



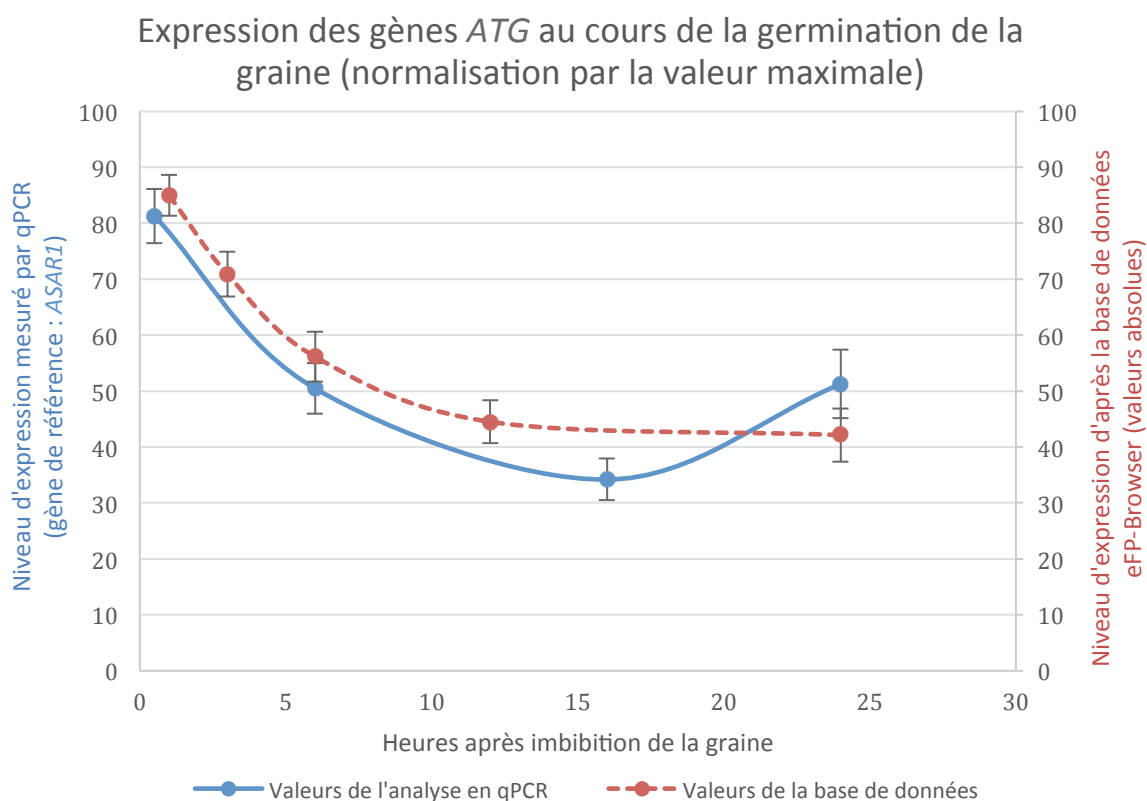


Figure 70. Graphique présentant l'expression moyenne de 34 gènes d'autophagie (*ATG*) dont les valeurs individuelles ont été normalisées par la valeur maximale d'expression au cours de la germination, de 30 minutes à 24 heures après début de l'imbibition de la graine. La courbe en rouge caractérise l'expérience dont les données sont disponibles sur eFP-Browser et la courbe bleue représente celle réalisée par PCR quantitative. Les données de cette dernière ont été obtenues en utilisant le gène de référence *ASAR1*. Les barres d'erreur représentées correspondent à l'erreur standard calculée sur les valeurs des 34 gènes étudiés à chaque point de cinétique.

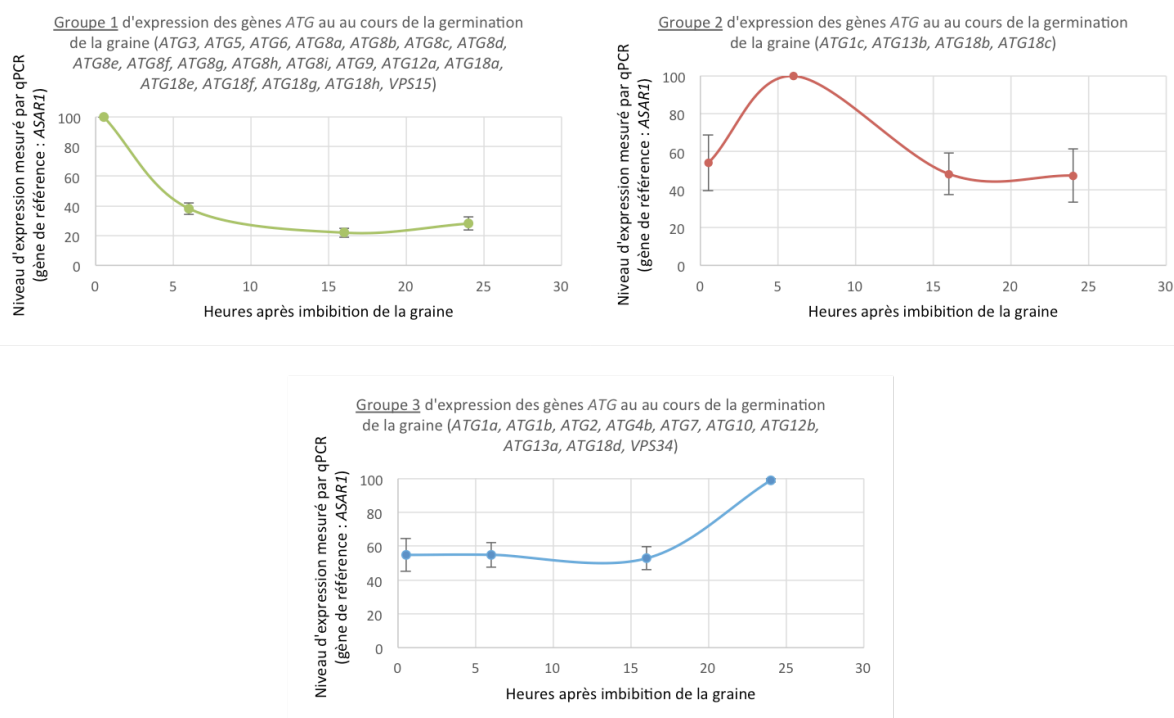


Figure 71. Graphiques présentant la cinétique d'expression moyenne de 34 gènes d'autophagie répartis en 3 groupes selon leur profil d'expression. Les barres d'erreur représentées correspondent à l'erreur standard calculée sur les valeurs des 34 gènes étudiés à chaque point de cinétique répartis dans les 3 groupes.

### III.3.3 Observation de la localisation de la protéine ATG8 au cours de la germination de la graine

Dans la graine sèche, les tissus maternels constituant la testa sont des tissus morts, seuls l'embryon et une unique couche cellulaire de l'endosperme sont vivants et en état de stase. Au début de l'imbibition de la graine, les cellules de l'embryon qui sont remplies de vacuoles de réserves protéiques et de corps lipidiques reprennent leur activité métabolique pour initier la germination. Ainsi, dans le but de comprendre si l'autophagie joue un rôle dans le processus de germination, l'observation d'embryons de plantes homozygotes transformées avec la construction Prom<sub>ACTIN</sub>::GFP::ATG8f a été réalisée au cours de l'imbibition de graines sauvages Col et mutantes *atg5*. Des observations en microscopie confocale de cellules de l'épiderme de l'embryon 6h et 24h après imbibition sont présentées en figure 72 et 73 respectivement. Sur la figure 72, on remarque qu'avec les deux génotypes on observe à la longueur d'onde d'émission de la GFP (512 nm) des cellules dont les vacuoles de stockage fluorescent légèrement, ainsi que de petites structures en anneau d'environ 1 à 2 µm de diamètre fortement fluorescentes (Fig. 72a et 72c). Ces structures fluorescentes présentent parfois des zones plus élargies, faisant penser à un solitaire sur une bague (Fig. 73a). D'autre part, une forte autofluorescence (visible à une longueur d'onde comprise entre

600 et 800 nm) (Fig. 72b, 72d et 72f) est observable dans une zone située à l'intérieur de ces structures marquées à la GFP (Fig. 72a). Ces structures sont donc partiellement autofluorescentes sur un large spectre d'émission et présentent un signal spécifique de la GFP sur le pourtour de ce qui semble être une membrane. En effet, le contour de ces structures n'est pas observé dans les graines Col témoins. La protéine ATG8f serait donc localisée dans ou sur la membrane de ces structures. Cependant, le fait que ces structures soient observables dans les cellules de l'embryon du mutant *atg5* nous indique qu'il ne s'agit pas d'autophagosomes. En effet le mutant *atg5* est incapable de former des vésicules autophagiques.

D'autre part, les autophagosomes sont généralement caractérisés par leur mobilité dans la cellule. Or les structures observées restent statiques. Il faut cependant garder en considération que les cellules d'embryon sont remplies de vacuoles de stockage qui laissent peu de place pour des mouvements de vésicules dans le cytoplasme. La protéine ATG8f serait alors impliquée dans d'autres processus que l'autophagie.

Les travaux de Michaeli et al. (2014) ont décrit des structures ayant un aspect similaire à celles que nous avons observées. Ces structures ont été identifiées dans des cellules de l'hypocotyle en cas de carence en carbone ou dans les cellules de feuilles sénescentes. Il s'agit de corps présentant un marquage spécifique avec des protéines ATI, pour « ATG8 interacting proteins » qui interagissent avec des plastes d'environ 1 à 2  $\mu\text{m}$  de diamètre (Fig. 74). Ces corps, appelés PS-ATI bodies, d'un diamètre de 50 à 200 nm bourgeonnent à partir des plastes et s'en détachent. Les PS-ATI bodies sont des structures destinées à être dégradées dans la vacuole (Michaeli et al, 2014). Il a été montré que la protéine ATG8f interagit avec les protéines ATI de ces vésicules, mais que leur formation ne dépend pas du processus autophagique puisqu'elles sont observées chez le mutant *atg5* (Michaeli et al., 2014). En revanche, leur adressage à la vacuole dépend lui de l'autophagie (Michaeli et al., 2014).

Ainsi, il est possible que les structures marquées avec la protéine ATG8f que nous observons dans l'embryon de graines sauvages Col et mutantes *atg5*, soient des corps similaires aux PS-ATI bodies. Ces ATI bodies correspondraient alors au « solitaire de la bague » mentionné ci-avant. En effet, leur formation n'est pas affectée chez le mutant d'autophagie et ils présentent un marquage identique avec la protéine ATG8f. Ainsi, ces structures étant toujours observables 24h après imbibition de la graine (Fig. 73), c'est-à-dire à la fin du processus de germination *stricto sensu*, un suivi de ces vésicules par des observations au-delà de 24h est nécessaire afin de déterminer si elles sont destinées à être dégradées dans la vacuole, et d'observer si une telle dégradation a lieu ou non chez le mutant *atg5*. Il serait alors possible qu'il s'agisse de plastes marqués par les PS-ATI bodies, ou bien d'un autre type de structures cellulaires marquées spécifiquement dans la graine par les

protéines ATI. Ces structures seraient amenées à être dégradées après la germination *stricto sensu*, vraisemblablement au moment de la mobilisation des réserves protéiques et lipidiques.

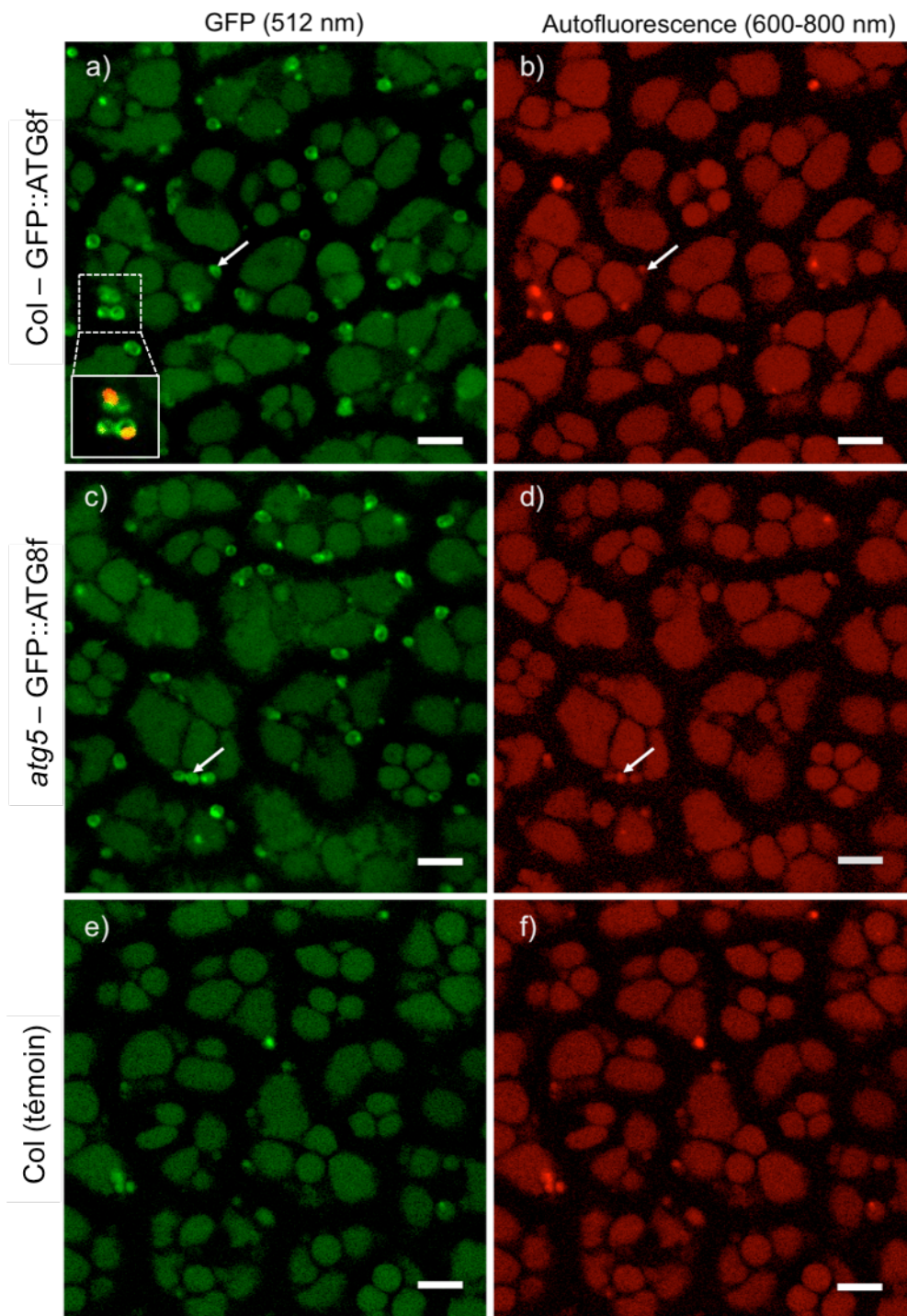


Figure 72. Observations au microscope confocal de cellules d'embryon de graines sauvages Col (a, b) et mutantes atg5 (c, d), 6 heures après imbibition, exprimant la construction GFP::ATG8f. Un témoin Col non transformé est présenté (e, f). Pour chaque génotype, les tissus ont été observés à la longueur d'onde d'émission de la GFP (a, c, e) et sur une plage de longueurs d'onde de 600 à 800 nm correspondant à l'autofluorescence des tissus, donc non spécifique de la GFP (b, d, f). Les flèches indiquent des vésicules

présentant à la fois un signal spécifique de la GFP et de l'autofluorescence. L'encadré en a) montre que l'autofluorescence observée ne colocalise pas avec le signal GFP. Barres d'échelle, 5  $\mu\text{m}$ .

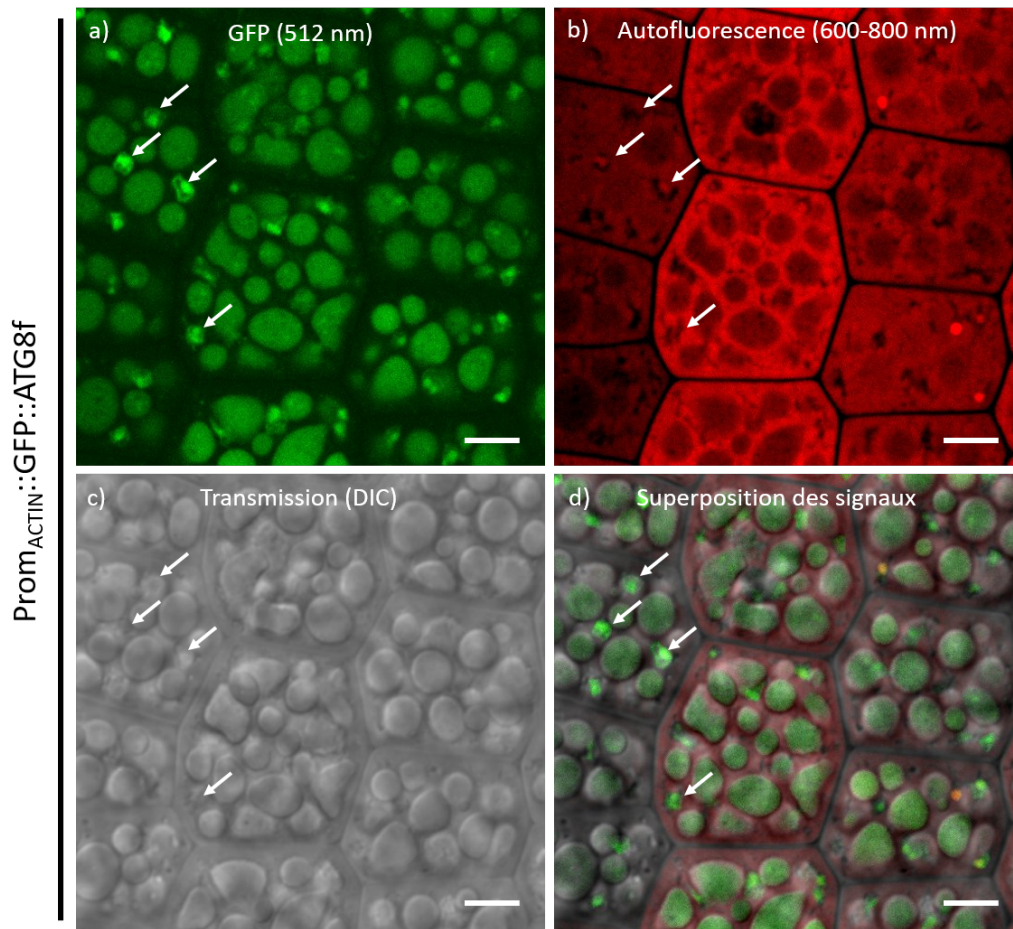


Figure 73. Observations au microscope confocal de cellules d'embryon 24h après imbibition de la graine sauvage *Col* exprimant la construction  $Prom_{ACTIN}::GFP::ATG8f$ . Les tissus ont été observés à la longueur d'onde d'émission de la GFP (a), sur une plage de longueurs d'onde de 600 à 800 nm correspondant à l'autofluorescence des tissus (b), avec un objectif à transmission (c). La figure d) montre la superposition des signaux présentés en a), b), et c). Les flèches indiquent des vésicules fortement marquées à la GFP. Barres d'échelle, 5  $\mu\text{m}$ .

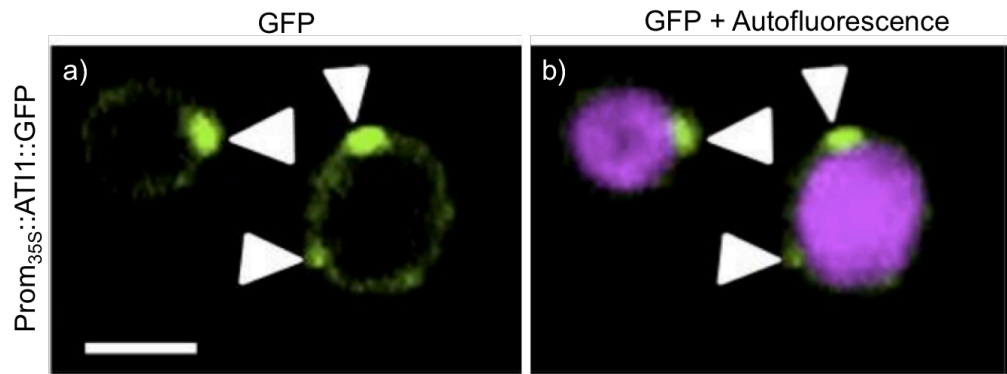


Figure 74. Observation au microscope confocal de plastes de cellules de l'épiderme de l'hypocotyle réalisée au cours des travaux de Michaeli et al. (2014) sur des plantules d'*Arabidopsis*, 7 jours après germination, soumises à un stress à l'obscurité (stress carboné), exprimant la construction *Prom<sub>35S</sub>::AT11::GFP*. a) Emission de la GFP. b) Emissions de la GFP (en vert) et de l'autofluorescence des plastes (en mauve). Les flèches blanches indiquent des PS-AT1 bodies associés aux plastes. Barres d'échelle, 2  $\mu$ m.

### III.3.4 Conclusion – Autophagie et germination de la graine

Au cours de la maturation de la graine, le mutant *atg5* accumule moins de lipides et davantage de protéines totales que le sauvage Col. Au cours de la germination, la mobilisation des lipides semble s'effectuer avec la même cinétique jusqu'à 72h après imbibition de la graine, pour les deux génotypes. En revanche, la mobilisation des protéines de réserve semble fortement affectée chez le mutant *atg5*. Elle est en effet soit retardée (au delà de 72h d'imbibition), soit altérée chez *atg5*.

D'autre part, la quantité moyenne de transcrits des gènes *ATG* diminue au cours des 24 premières heures d'imbibition de la graine, laissant supposer que l'activité autophagique n'est pas induite au cours de la germination.

Des structures rondes de 2  $\mu$ m de diamètre marquées avec la protéine ATG8f ont été observées dans les cellules épidermiques de l'embryon des génotypes sauvage Col et mutant *atg5* au cours de la germination. La protéine ATG8f interviendrait alors dans un autre processus que l'autophagie. A 24h d'imbibition, ces structures sont toujours observables chez Col et *atg5*. En considérant que la mobilisation des molécules de réserve ne débute qu'entre 32 et 50h d'imbibition, il conviendrait d'observer au delà de 24h si ces structures marquées avec ATG8f disparaissent lors de la formation de la vacuole lytique chez les deux génotypes. Si ces structures sont marquées avec la protéine ATG8f dans le but d'être amenées à la vacuole par autophagie, on s'attend à ce que qu'elles s'accumulent chez le mutant *atg5*, ce qui pourrait expliquer le retard ou le défaut de mobilisation des protéines de réserve observés chez celui-ci.

#### IV. CONCLUSIONS ET DISCUSSIONS

Les travaux réalisés au cours de ce travail de thèse montrent que les gènes d'autophagie sont majoritairement induits au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis*. De plus, l'observation d'autophagosomes *via* l'utilisation d'une fusion GFP::ATG8 permet d'affirmer qu'il y a une activité autophagique dans l'embryon au cours du développement de la graine. L'autophagie peut donc potentiellement participer aux différents évènements qui se déroulent pendant le développement de la graine, comme l'apport de nutriments depuis la silique jusqu'à l'embryon, la constitution des réserves lipidiques et protéiques, ou encore être impliquée dans la maturation et la longévité de la graine.

Au contraire, l'expression des gènes *ATG* décroît au cours de la germination *stricto sensu*. L'autophagie n'est donc pas induite au cours des 24 premières heures d'imbibition de la graine. Ce processus pourrait cependant être induit plus tard, au moment de la mobilisation des molécules de réserve pour fournir les nutriments nécessaires au bon développement de la plantule.

Les résultats obtenus sont confrontés ci-après afin de déterminer les rôles que joue l'autophagie au cours du développement et de la germination de la graine d'*Arabidopsis*.

## IV.1 Autophagie, maturation et vieillissement de la graine

Plusieurs phénotypes observés lors de la caractérisation du mutant *atg5* tendent à montrer que l'autophagie est impliquée dans le processus de sénescence et joue un rôle dans la cinétique de maturation des graines. Il a en effet été observé que :

- Les processus d'absorption d'eau et de dessiccation de la graine se produisent plus tôt chez *atg5* que chez Col.
- Le tégument des graines d'*atg5* brunit de façon plus précoce que celui des graines du sauvage Col, et ce quelle que soit la nutrition azotée.
- En condition d'azote pléthorique, les graines du mutant d'autophagie accumulent plus tôt que le sauvage les acides gras à chaînes courtes nécessaires à la synthèse des lipides membranaires.
- Les graines d'*atg5* accumulent précocement les protéines de réserve sur les deux conditions de nutrition azotée testées.

Ces résultats montrent qu'un défaut d'autophagie accélère la sénescence des tissus maternels, ainsi que le remplissage de la graine. En effet, de même que pour le phénotype de sénescence précoce observé dans les feuilles de mutants *atg5* (voir I.1.4.4), l'absence de recyclage et de « ménage » cellulaire par autophagie induirait un remplissage précoce de la graine, et ce afin de fournir une graine viable le plus tôt possible. La plupart des graines du mutant *atg5* (~80%) sont en effet viables mais présentent des quantités d'acides gras et de protéines de réserve inférieures à celles des graines sauvages. Ces plus faibles quantités de molécules de réserve contenues par graine, peuvent alors être responsables de la différence de taille et de masse des graines du mutant *atg5*.

L'autophagie jouerait aussi un rôle dans la longévité de la graine. En effet, des expériences de détérioration contrôlée mimant un vieillissement accéléré des graines (Fig. 75) ont montré que le mutant *atg5* est plus sensible au traitement que le sauvage, et que les graines *atg5* perdent leur pouvoir germinatif plus tôt (Collet and Grappin, collaboration). Cette perte de pouvoir germinatif des graines du mutant *atg5* au cours du temps a été observée de façon informelle au laboratoire.



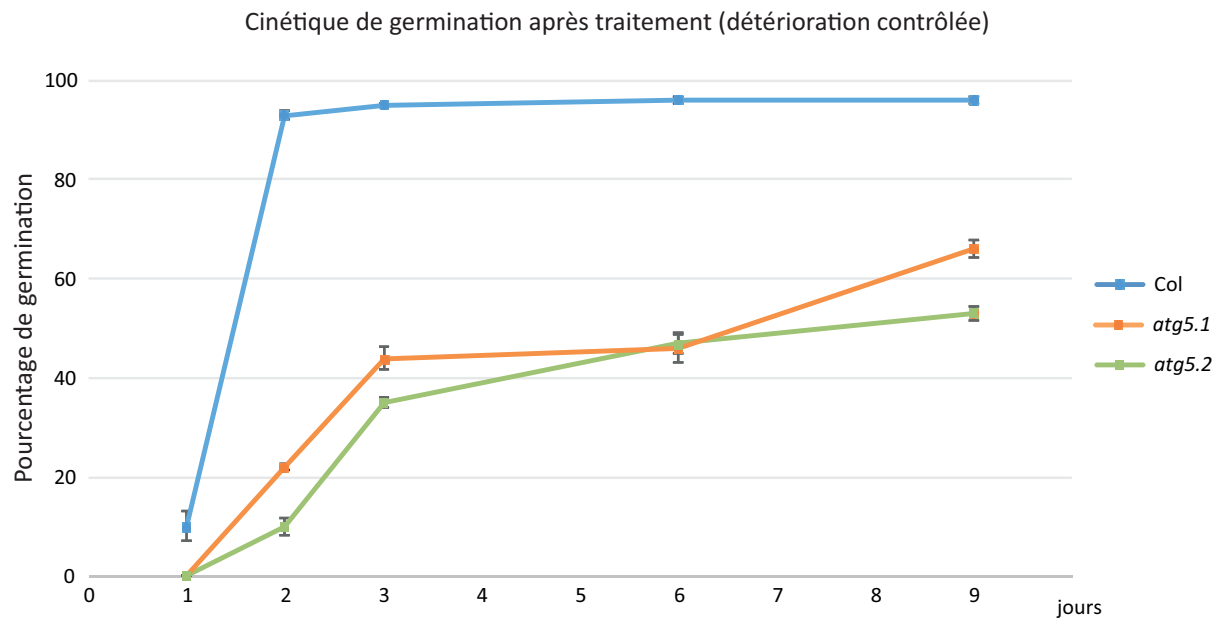


Figure 75. Graphique présentant la cinétique du taux de germination après un traitement de détérioration contrôlée. La détérioration contrôlée permet de simuler un vieillissement accéléré des graines. Le protocole de la détérioration contrôlée a été élaboré par Tesnier et al. (2002), et consiste en trois étapes : 1) Une étape d'équilibration durant laquelle des graines sont placées à 20°C pendant 3 jours avec une hygrométrie de 75 à 85% ; 2) Une étape de détérioration où les graines sont placées à 40°C pendant 24h ; 3) Une étape de rééquilibration au cours de laquelle les graines sont placées à 20°C pendant 3 jours avec une hygrométrie de 32%. Les graines sont ensuite semées sur milieu gélosé à la lumière pour induire la germination.

## IV.2 Autophagie et nutrition de la graine

Les travaux effectués suggèrent que l'autophagie peut être impliquée dans le transfert de nutriments depuis les tissus vasculaires de la silique jusqu'à l'embryon. Il a en effet été constaté que :

- De nombreuses graines du mutant *atg5*, dont le développement de l'embryon s'arrête au stade torpille, meurent dans la zone la plus éloignée du pédoncule de la silique, et donc de la source en nutriments provenant de la plante mère. Ces graines semblent également présenter un endosperme persistant.
- Les gènes *ATG8* étudiés sont exprimés dans différents tissus du fruit et de la graine, notamment :
  - Dans les tissus vasculaires de la silique et du funicule, et plus particulièrement dans les cellules compagnes du phloème et dans le parenchyme phloémien,
  - Dans la chalaze,
  - Dans les couches cellulaires du tégument externe,
  - Dans les couches cellulaires du tégument interne, dont l'endothélium,
  - Dans l'endosperme micropylaire,
  - Dans l'embryon.

Les voies de circulation des nutriments nécessaires au remplissage de la graine, le phénotype d'avortement des embryons dans la zone apicale de la silique, ainsi que la localisation d'expression des gènes *ATG8* testés, suggèrent que l'autophagie joue un rôle dans la mise à disposition des nutriments destinés à être amenés jusqu'à l'embryon. En effet, les acides aminés et les sucres sont conduits *via* les tissus vasculaires du replum (placenta) et du funicule jusqu'à la chalaze. Là, les nutriments sont déchargés, puis circulent par voie symplasmique et apoplasmique dans les couches cellulaires du tégument externe, et sont transférés vers celles du tégument interne. Des transporteurs assurent ensuite le passage de ces nutriments jusqu'à l'endosperme, qui lui nourrit l'embryon (Fig. 76).

L'autophagie pourrait intervenir dans ces différents tissus pour dégrader des protéines et/ou des organites afin de fournir davantage de nutriments destinés à alimenter l'embryon. Elle interviendrait aussi dans la PCD conduisant à la formation du xylème, ce processus étant retardé chez le mutant *atg5* (Kwon et al., 2010).

De plus, il n'est pas exclu que le défaut d'autophagie dans l'endosperme puisse affecter l'expression du facteur de transcription ZHOUP1, qui est nécessaire à la dégradation de l'endosperme

au cours de la croissance de l'embryon (Yang et al., 2008). Il serait donc intéressant de suivre l'expression de ce gène dans le mutant *atg5*.

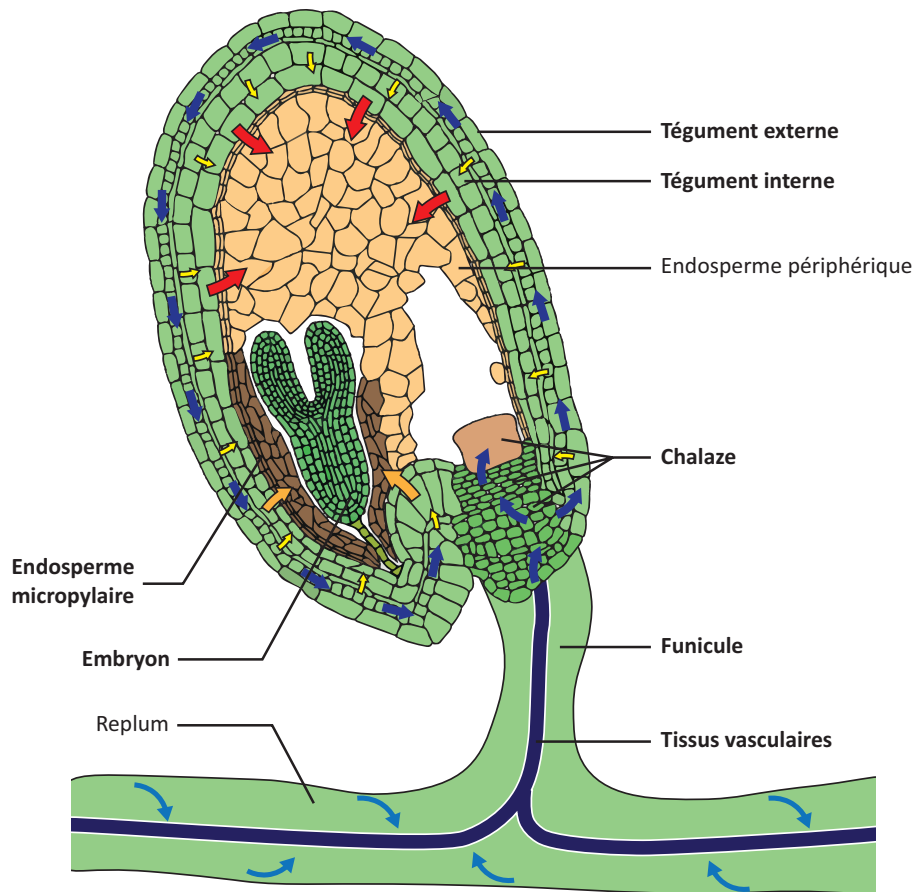


Figure 76. Schéma du transport et de la circulation des nutriments des tissus de la plante mère jusqu'à la graine. L'autophagie peut être impliquée dans ces différents tissus pour la mise à disposition de nutriments qui seront transportés. L'expression de gènes *ATG8* a été observée dans les tissus annotés en gras.

### IV.3 Autophagie et constitution des réserves de la graine

Les résultats obtenus montrent que l'autophagie est impliquée dans la constitution des réserves de la graine, et particulièrement dans celle des protéines, qui est affectée de façon indépendante de l'état de nutrition de la plante. Nous avons en effet montré que :

- Contrairement à Col, le ratio C/N dans les graines du mutant d'autophagie ne varie pas en fonction de la nutrition azotée. Les graines du mutant *atg5* contiennent de fait plus d'azote que Col en condition d'azote limitant, et la même quantité d'azote en condition d'azote pléthorique.
- Concernant les molécules riches en carbone, au stade graine sèche et quelle que soit la nutrition azotée :
  - L'épaisseur, et donc la quantité du mucilage adhérent, est moins importante chez le mutant d'autophagie comparé à Col.
  - En tenant compte de la masse des graines, la concentration en acides gras de la graine sèche est identique entre Col et *atg5*.
- Concernant les molécules riches en azote, à masse de graines égale et quelle que soit la nutrition azotée, la concentration en protéines totales est supérieure dans les graines *atg5* par rapport à celle des graines du sauvage. Et :
  - Le mutant *atg5* accumule moins de globulines 12S que Col.
  - Le mutant *atg5* accumule davantage de protéines de hauts poids moléculaires que Col. Ces protéines pourraient être des précurseurs non maturés.

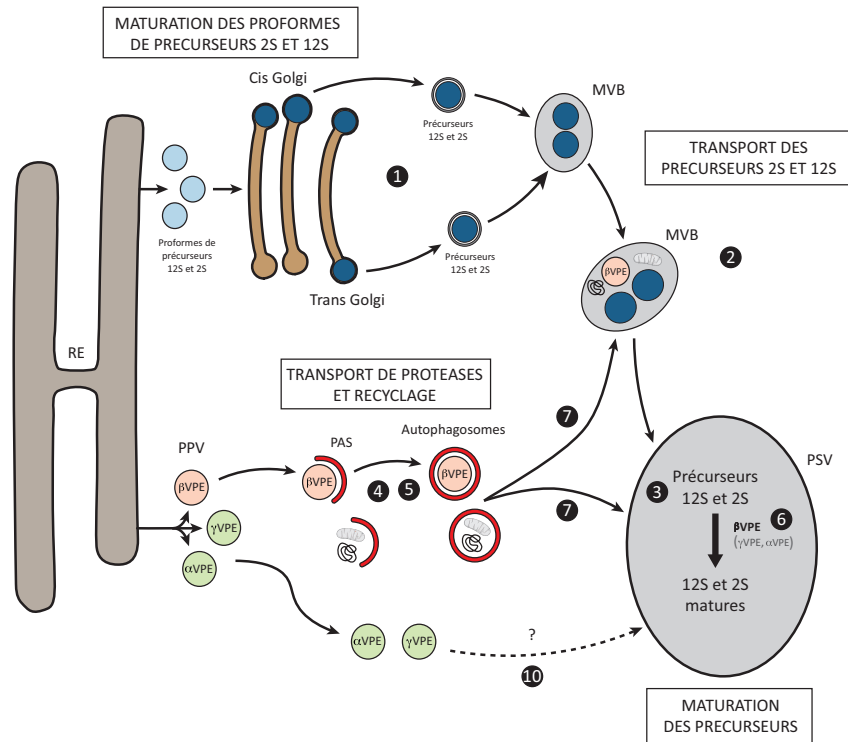
En prenant en considération le fait que la concentration en acides gras de la graine sèche est identique entre sauvage et mutant d'autophagie, et que le mucilage adhérent ne constitue qu'une très faible réserve en molécules carbonées à l'échelle de la graine, on peut considérer que la constitution et la maturation des protéines de réserve, sont les principaux mécanismes affectés par le défaut d'autophagie dans la mise en place des réserves.

Le contenu protéique est supérieur dans la graine du mutant *atg5* par rapport à Col et pourrait s'expliquer par une plus forte absorption racinaire et/ou une absorption racinaire prolongée dans le temps par rapport au sauvage. Des expériences de mesure d'absorption avec de l'azote marqué <sup>15</sup>N pourraient apporter des éléments de réponse. De plus, le mutant accumule des protéines de haut poids moléculaire, ce qui laisse présager des difficultés de maturation.

Nous nous proposons alors d'exposer des hypothèses permettant d'expliquer le rôle que joue l'autophagie dans la maturation des protéines de réserve. Ces hypothèses sont illustrées par un

schéma explicatif présenté en figure 77. Les différentes voies et mécanismes numérotés seront décrits point par point tout en exposant les cheminements ayant permis d'élaborer ces hypothèses.

a) Dans une cellule d'embryon au cours de la maturation d'une graine sauvage



b) Dans une cellule d'embryon au cours de la maturation d'une graine de mutant d'autophagie (*atg5*)

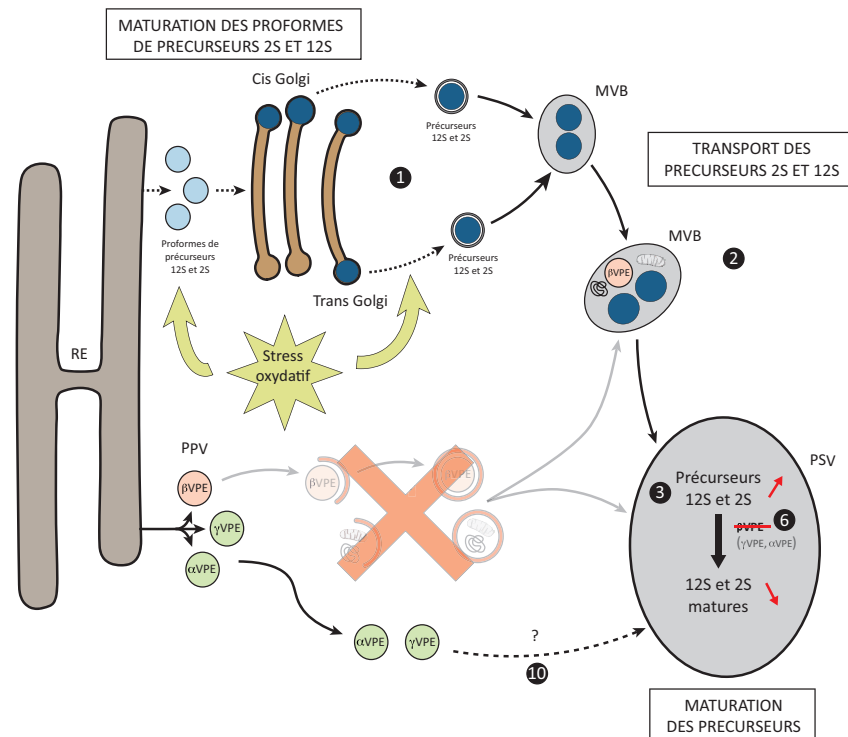


Figure 77. Modèle proposé expliquant le rôle de l'autophagie dans la maturation des protéines de réserve.

❶ Des proformes de précurseurs de protéines de réserve sont localisées dans des vésicules issues du RE et apportées au Golgi pour maturation. Des vésicules contenant les précurseurs des protéines de réserve bourgeonnent à partir de l'appareil de Golgi. ❷ Ces vésicules fusionnent ensuite avec des structures semblables à des endosomes pour former les MVB (Multi-Vesicular Bodies), qui eux-mêmes fusionnent avec les PSV (Protein Storage Vacuoles) (Otegui et al., 2006). ❸ C'est dans les PSV que les précurseurs des protéines de réserve vont être clivés par des protéases à cystéine appelées VPE, pour « Vacuolar Processing Enzymes », et produire les formes matures des protéines 2S et 12S (Hara-Nishimura et al., 1995).

❹ En prenant en considération l'induction de l'expression des gènes d'autophagie au cours d'un stress induit par un organisme pathogène chez les plantes (Liu et al., 2005), Seay et Dinesh-Kumar (2005) émettent l'hypothèse que certaines VPE, notamment impliquées dans la mort cellulaire, pourraient être adressées à la vacuole via des vésicules faisant intervenir des protéines d'autophagie telles que celles impliquées dans le complexe PI3K. Un tel mécanisme est utilisé chez la levure pour le transport de la carboxypeptidase Y (CPY) vers la vacuole (Khalfan and Klionsky, 2002, pour revue).

❺ Les travaux de Shimada et al. (2003) montrent que la  $\beta$ VPE s'exprime spécifiquement dans les graines et constitue la principale enzyme de maturation des protéines 2S et 12S chez *Arabidopsis*. Il est ainsi possible qu'une enzyme telle que la  $\beta$ VPE soit spécifiquement transportée du cytoplasme vers la vacuole par un processus impliquant l'autophagie. ❻ Dans les graines sèches du mutant *nul  $\beta$ vpe*, il a été constaté qu'il y avait une accumulation des précurseurs des globulines 12S et des albumines 2S, ainsi qu'une quantité plus faible de protéines de réserve maturées. Chez ce mutant, d'autres enzymes telles que l' $\alpha$ VPE et la  $\gamma$ VPE permettent de maturer les protéines de réserve, mais avec une efficacité moindre (Shimada et al., 2003).

❼ Les travaux de Gao et al. (2015) ont démontré que des autophagosomes sont en mesure de fusionner avec les MVB et les PSV. Chez le mutant *free1* où les autophagosomes et les MVB ne fusionnent plus avec les PSV, ils observent une accumulation des précurseurs des protéines 12S et 2S.

❽ L'une des fonctions les plus décrites de l'autophagie réside dans la capacité de « nettoyage » de ce processus, qui permet de maintenir une certaine homéostasie cellulaire en éliminant les structures dysfonctionnelles ou indésirées de la cellule. ❾ Les composés réactifs de l'oxygène et de l'azote, en engendrant un stress oxydatif qui endommage les protéines et les organites, produisent des composés cytotoxiques. Il est ainsi probable que chez le mutant *atg5*, le défaut d'autophagie entraîne l'accumulation de protéines et d'organites oxydés qui affectent l'efficacité de la machinerie cellulaire, notamment au niveau du RE et de l'appareil de Golgi. Il a en effet été montré qu'un stress

*oxydatif du RE peut provoquer une réduction de son activité, ainsi qu'un mauvais repliement des protéines (Zeeshan et al., 2016, pour revue). Ce stress pourrait ainsi perturber le processus de maturation des préformes de précurseurs de protéines de réserve qui s'effectue dans le RE, entraînant ainsi leur accumulation et un défaut de protéines matures.*

Ainsi, la  $\beta$ VPE pourrait être spécifiquement transportée du cytoplasme à la vacuole par un mécanisme dépendant de l'autophagie. Un tel mécanisme pourrait s'apparenter au CVT pathway (Cytoplasm to Vacuole Targeting pathway) qui est une forme sélective d'autophagie permettant de transporter spécifiquement une aminopeptidase jusqu'à la vacuole (Umekawa and Klionsky, 2012, pour revue). Le CVT pathway utilise la machinerie moléculaire de l'autophagie et n'a jusqu'à présent été identifié que chez la levure. Chez le mutant *atg5*, l'absence de  $\beta$ VPE dans les PSV expliquerait la diminution des quantités de protéines de réserve dans la graine par rapport au sauvage, et l'accumulation de protéines de haut poids moléculaire qui seraient des précurseurs de ces protéines. Cette hypothèse impliquerait alors que les  $\alpha$ VPE et la  $\gamma$ VPE permettant la maturation partielle des protéines de réserve seraient à *contrario* transportées jusqu'aux PSV par un mécanisme indépendant de l'autophagie (10).

Des observations en microscopie confocale permettraient de vérifier la localisation des  $\alpha$ VPE,  $\beta$ VPE et  $\gamma$ VPE dans les cellules de l'embryon de graines sauvages et mutantes d'autophagie. Selon l'hypothèse exposée, la  $\beta$ VPE serait absente des PSV chez un mutant tel qu'*atg5*.

D'autre part, l'absence de recyclage réalisé *via* l'autophagie pourrait induire un stress oxydatif affectant le RE et le Golgi. Ce stress pourrait ainsi perturber le processus de maturation des préformes de précurseurs de protéines de réserve, entraînant ainsi leur accumulation et un défaut de protéines matures.

#### IV.4 Autophagie et mobilisation des réserves de la graine

Au cours de la germination et du développement post-germination de la jeune plantule, des résultats préliminaires tendent à montrer que l'autophagie participe activement à la mobilisation des réserves de la graine. Il a en effet été observé que :

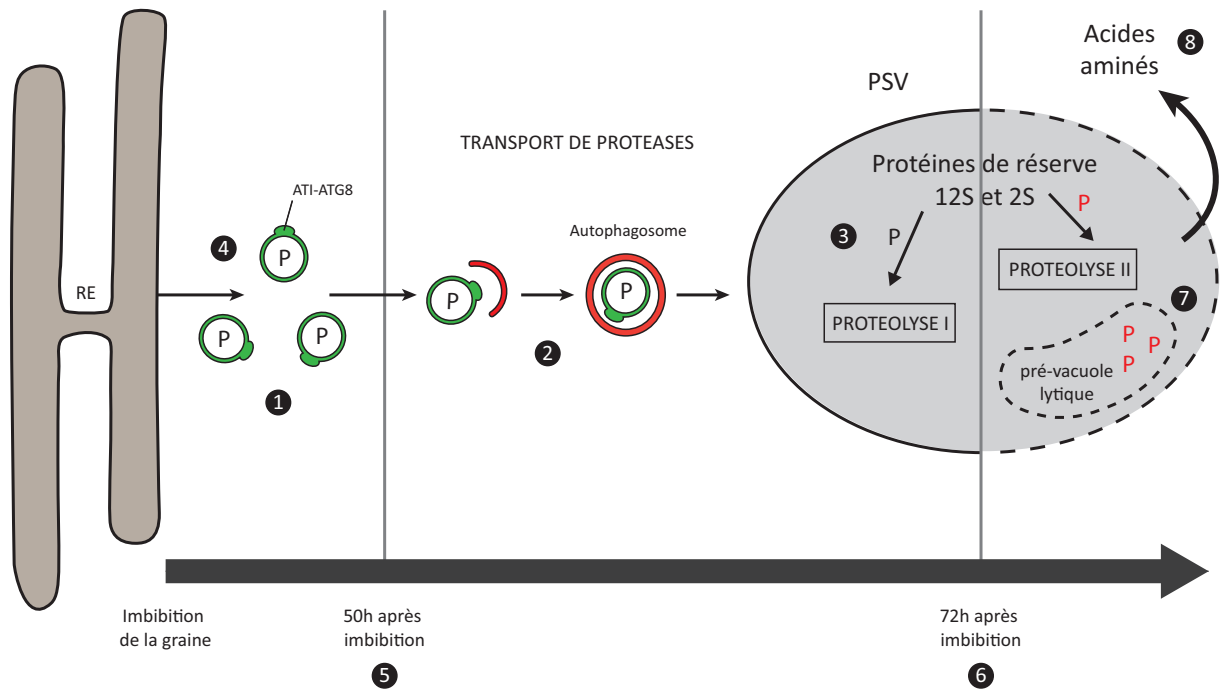
- 72h après imbibition de la graine sèche, aucune dégradation des protéines de réserve n'est observée sur *atg5*, tandis que la majorité de protéines de Col sont dégradées.
- La cinétique de dégradation des acides gras est identique entre les deux génotypes.
- Au moins jusqu'à 24h d'imbibition, la protéine ATG8f marque des structures rondes d'environ 1 à 2  $\mu\text{m}$  de diamètre observables à la fois dans les cellules épidermiques d'embryons sauvages et de mutants d'autophagie.

L'autophagie jouerait donc un rôle spécifique dans la mobilisation des réserves protéiques. Les structures marquées avec la protéine ATG8 et observées en microscopie n'ont jusqu'à présent jamais été décrites dans la graine. Nous proposons ainsi une hypothèse afin d'expliquer leur rôle potentiel dans la dégradation des protéines de réserve.

Comme précédemment, un schéma explicatif aux étapes numérotées est présenté en figure 78.



a) Dans une cellule d'embryon au cours de la maturation d'une graine sauvage



b) Dans une cellule d'embryon au cours de la maturation d'une graine de mutant d'autophagie (atg5)

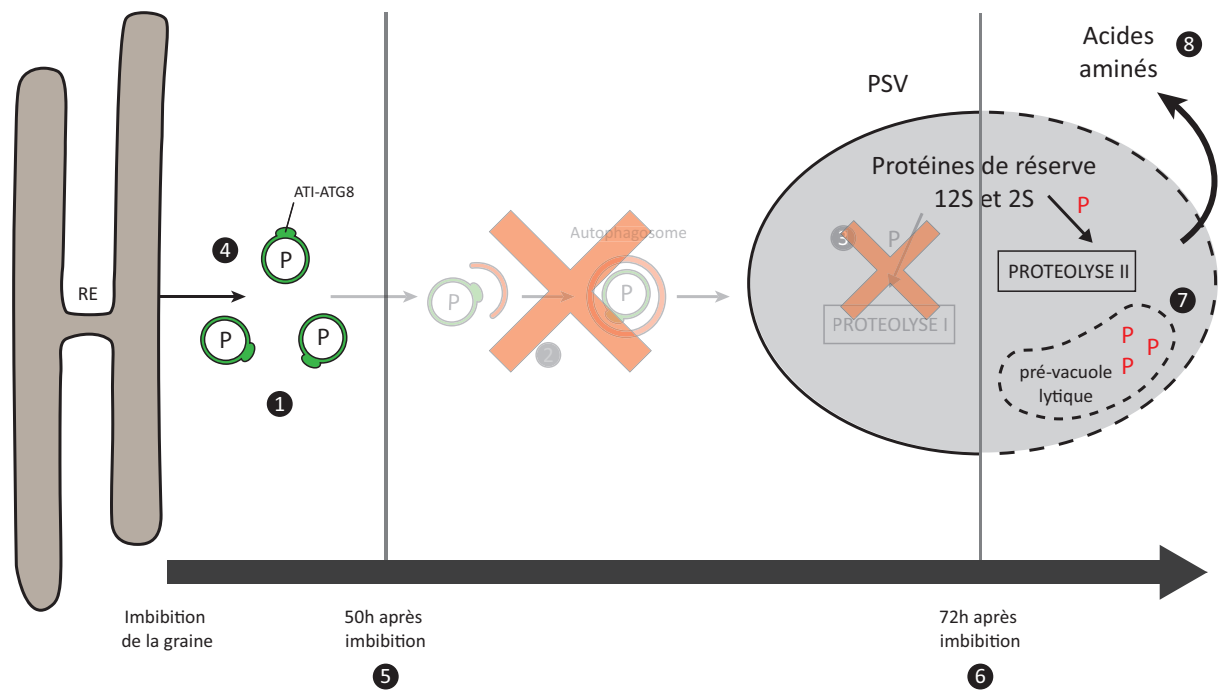


Figure 78. Modèle proposé expliquant le rôle de l'autophagie dans la mobilisation des protéines de réserve.

❶ *Les structures observées, vraisemblablement des vésicules, sont formées soit au cours de la maturation de la graine, soit de novo au cours des premières heures qui suivent le début de l'imbibition de la graine. Ces vésicules présentent dans la plupart des cas une excroissance qui ressemble aux PS-ATI bodies décrits par Michaeli et al. (2014). Les PS-ATI bodies sont associés à des plastes et contiennent des protéines ATI qui interagissent avec ATG8. Il est possible d'envisager que les PS-ATI bodies puissent être associés à d'autres structures que les plastes, telles que des vésicules.*

❷ *Les PS-ATI bodies sont adressés à la vacuole pour dégradation via l'autophagie (Michaeli et al., 2014). Si l'on considère que les vésicules observées sont associées à des corps semblables aux PS-ATI bodies, on peut supposer que ces vésicules seront destinées à être adressées à la vacuole (ou dans le cas présent aux PSV) par autophagie.*

❸ *Si les vésicules observées sont destinées à être transportées à la vacuole via l'autophagie, il se pourrait qu'elles contiennent une ou des protéases nécessaire(s) à l'initiation de la dégradation des protéines de réserve contenues dans les PSV. En effet, les PSV contiennent des protéases synthétisées au cours du développement de la graine, ainsi que de nouvelles protéases qui sont produites de novo à partir du RE et qui leur sont adressées (❹) (Müntz et al., 2001, pour revue).*

❺ *Les structures observées sont toujours visibles dans les embryons de Col et atg5, 24h après imbibition de la graine. En considérant que chez Col la dégradation des protéines ne débute qu'à partir de 50h d'imbibition, il est probable que la prise en charge des vésicules marquées avec la protéine ATG8 par l'autophagie ne débute qu'à ce moment là.*

❻ *72h après imbibition, les protéines de réserves ne sont toujours pas dégradées chez le mutant ayant un défaut d'autophagie. Cela suppose que la dégradation des protéines est soit complètement shuntée, soit retardée au-delà de 72h d'imbibition. Dans le cas où elle serait retardée, des protéases déjà présentes dans un compartiment du PSV pourraient initier dans un second temps la dégradation des protéines de réserve (❼) pour fournir des acides aminés à la cellule (❸).*

La confrontation des résultats obtenus en microscopie confocale et des dosages de protéines effectués au cours de la germination *lato sensu*, suggèrent que les vésicules marquées avec la protéine ATG8f observées sont adressées aux PSV via l'autophagie, et contiennent une ou des protéases permettant d'initier la dégradation des protéines de réserve. Dans ce cas de figure, l'autophagie interviendrait dans le transport des vésicules observées jusqu'aux PSV, au moment du début de la dégradation des protéines, c'est-à-dire 50h après imbibition de la graine.

Les dosages de protéines n'ayant pas été effectués au-delà de 72h d'imbibition de la graine, il n'est pas possible de déterminer si le défaut d'autophagie du mutant *atg5* shunte complètement ou

retarde seulement la dégradation des protéines de réserve. En considérant que le mutant *atg5* est capable de germer et de se développer, il est possible que d'autres protéases assurent de façon plus tardive la dégradation des protéines.

Les PSV ne contiennent pas que des protéines de réserve et accumulent aussi d'autres éléments comme le fer (Roschztardt et al., 2009). L'autophagie pourrait jouer un rôle dans l'apport de cet élément dans les PSV, ainsi qu'au moment de sa mobilisation lors de la post-germination. Des études complémentaires seraient à mener en comparant le stock de fer dans les différents tissus de l'embryon de graines sauvages et mutantes *atg5*.

Au cours de ces trois années, un travail de thèse novateur et prospectif, visant à déterminer les rôles que joue l'autophagie au cours du développement et de la germination de la graine d'*Arabidopsis thaliana* a été réalisé. Aux vues des résultats obtenus, plusieurs nouvelles hypothèses ont été exposées, et des modèles explicatifs ont été proposés. Ce travail ouvre ainsi des champs d'investigations pour montrer l'importance du processus autophagique dans la graine.

## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Avila-Ospina, L., Moison, M., Yoshimoto, K., Masclaux-Daubresse, C., 2014. Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *J Exp Bot*. doi:10.1093/jxb/eru039
- Baba, M., Takeshige, K., Baba, N., Ohsumi, Y., 1994. Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J Cell Biol* 124, 903–913. doi:10.1083/jcb.124.6.903
- Bailly, C., 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci Res* 14, 93–107. doi:10.1079/SSR2004159
- Balanzà, V., Ballester, P., Colombo, M., Fourquin, C., Martínez-Fernández, I., Ferrándiz, C., 2014. Genetic and phenotypic analyses of carpel development in *Arabidopsis*, in: Riechmann, J.L., Wellmer, F. (Eds.), *Flower Development*. Springer New York, New York, NY, pp. 231–249.
- Barton, K.A., Thompson, J.F., Madison, J.T., Rosenthal, R., Jarvis, N.P., Beachy, R.N., 1982. The biosynthesis and processing of high molecular weight precursors of soybean glycinin subunits. *J Biol Chem* 257, 6089–6095.
- Bassham, D.C., Laporte, M., Marty, F., Moriyasu, Y., Ohsumi, Y., K., Yoshimoto, L.J., Olsen, 2005. Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* 2, 2–11.
- Baud, S., Boutin, J.-P., Miquel, M., Lepiniec, L., Rochat, C., 2002. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiol and Biochem* 40, 151–160. doi:10.1016/S0981-9428(01)01350-X
- Baud, S., Dubreucq, B., Miquel, M., Rochat, C., Lepiniec, L., 2008. Storage reserve accumulation in *Arabidopsis*: Metabolic and developmental control of seed Ffilling. *Arabidopsis Book* 6. doi:10.1199/tab.0113
- Baud, S., Wuillème, S., Lemoine, R., Kronenberger, J., Caboche, M., Lepiniec, L., Rochat, C., 2005. The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in *Arabidopsis*. *Plant J* 43, 824–836. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02496.x
- Bazin, J., Batlla, D., Dussert, S., El-Maarouf-Bouteau, H., Bailly, C., 2011. Role of relative humidity, temperature, and water status in dormancy alleviation of sunflower seeds during dry after-ripening. *J Exp Bot* 62, 627–640. doi:10.1093/jxb/erq314

Bergamini, E., 2005. Targets for antiageing drugs. *Expert Opin Ther Targets* 9, 77–82. doi:10.1517/14728222.9.1.77

Bernales, S., McDonald, K.L., Walter, P., 2006. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biology* 4, e423. doi:10.1371/journal.pbio.0040423

Bérot, S., Compoin, J.P., Larré, C., Malabat, C., Guéguen, J., 2005. Large scale purification of rapeseed proteins (*Brassica napus* L.). *J of Chromato B, 9th International Symposium on Biochromatography: From Nanoseparations to Macropurifications* 818, 35–42. doi:10.1016/j.jchromb.2004.08.001

Bethke, P.C., Libourel, I.G.L., Aoyama, N., Chung, Y.-Y., Still, D.W., Jones, R.L., 2007. The *Arabidopsis* aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiol* 143, 1173–1188. doi:10.1104/pp.106.093435

Bewley, J.D., 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9, 1055–1066. doi:10.1105/tpc.9.7.1055

Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., Johansen, T., 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol* 171, 603–614. doi:10.1083/jcb.200507002

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 Physiol* 120, 463–472. doi:10.1104/pp.120.2.463

Bray, C.M., West, C.E., 2005. DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytol* 168, 511–528. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01548.x

Brown, R.C., Lemmon, B.E., Nguyen, H., Olsen, O.-A., 1999. Development of endosperm in *Arabidopsis thaliana*. *Sexual Plant Reprod* 12, 32–42.

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 Physiol* 122, 1217–1224.

Buitink, J., Leprince, O., 2008. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *C R Biol* 331, 788–795. doi:10.1016/j.crv.2008.08.002

Carlsbecker, A., Helariutta, Y., 2005. Phloem and xylem specification: pieces of the puzzle emerge. *Curr Opin Plant Biol* 8, 512–517. doi:10.1016/j.pbi.2005.07.001

Cayla, T., Batailler, B., Hir, R.L., Revers, F., Anstead, J.A., Thompson, G.A., Grandjean, O., Dinant, S., 2015. Live imaging of companion cells and sieve elements in *Arabidopsis* leaves. *PLOS ONE* 10, e0118122. doi:10.1371/journal.pone.0118122

Cebollero, E., Reggiori, F., Kraft, C., 2012. Reticulophagy and Ribophagy: Regulated degradation of protein production factories. *Int J Cell Biol* 1–9. doi:10.1155/2012/182834

Chanoca, A., Kovinich, N., Burkel, B., Stecha, S., Bohorquez-Restrepo, A., Ueda, T., Eliceiri, K.W., Grotewold, E., Otegui, M.S., 2015. Anthocyanin vacuolar inclusions form by a microautophagy mechanism. *Plant Cell* 27, 2545–2559. doi:10.1105/tpc.15.00589

Chapman, K.D., Dyer, J.M., Mullen, R.T., 2012. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: Thematic Review Series: Lipid droplet synthesis and metabolism: from Yeast to Man. *J Lipid Res* 53, 215–226. doi:10.1194/jlr.R021436

Chen, L.-Q., Lin, I.W., Qu, X.-Q., Sosso, D., McFarlane, H.E., Londoño, A., Samuels, A.L., Frommer, W.B., 2015. A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the *Arabidopsis* embryo. *Plant Cell* tpc.114.134585. doi:10.1105/tpc.114.134585

Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Hou, B.-H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A.R., Frommer, W.B., 2012. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335, 207–211. doi:10.1126/science.1213351

Chevalier, É., Loubert-Hudon, A., Zimmerman, E.L., Matton, D.P., 2011. Cell-cell communication and signalling pathways within the ovule: from its inception to fertilization: Tansley review. *New Phytol* 192, 13–28. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03836.x

Chiang, H.L., Terlecky, S.R., Plant, C.P., Dice, J.F., 1989. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 246, 382–385.

Ciechanover, A., 1994. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79, 13–21. doi:10.1016/0092-8674(94)90396-4

Clough, S.J., Bent, A.F., 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16, 735–743. doi:10.1046/j.1365-3113x.1998.00343.x

D' Andréa, S., Canonge, M., Beopoulos, A., Jolivet, P., Hartmann, M.A., Miquel, M., Lepiniec, L., Chardot, T., 2007. At5g50600 encodes a member of the short-chain dehydrogenase reductase superfamily with 11 $\beta$ - and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activities associated with *Arabidopsis thaliana* seed oil bodies. *Biochimie* 89, 222–229. doi:10.1016/j.biochi.2006.09.013

Dardick, C., Callahan, A.M., 2014. Evolution of the fruit endocarp: molecular mechanisms underlying adaptations in seed protection and dispersal strategies. *Fronti Plant Sci* 5. doi:10.3389/fpls.2014.00284

Debeaujon, I., Nesi, N., Perez, P., Devic, M., Grandjean, O., Caboche, M., Lepiniec, L., 2003. Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *Plant Cell* 15, 2514–2531. doi:10.1105/tpc.014043

de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F., 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* 60, 604–617.

de Duve, C., Wattiaux, R., 1966. Functions of Lysosomes. *Ann Rev of Physiol* 28, 435–492. doi:10.1146/annurev.ph.28.030166.002251

Dekkers, B.J.W., Willems, L., Bassel, G.W., Bolderen-Veldkamp, R.P., Ligterink, W., Hilhorst, H.W.M., Bentsink, L., 2012. Identification of reference genes for RT-qPCR expression analysis in *Arabidopsis* and tomato seeds. *Plant Cell Physiol* 53, 28–37. doi:10.1093/pcp/pcr113

Del Roso, A., Vittorini, S., Cavallini, G., Donati, A., Gori, Z., Masini, M., Pollera, M., Bergamini, E., 2003. Ageing-related changes in the *in vivo* function of rat liver macroautophagy and proteolysis. *Exp Gerontol* 38, 519–527.

Denton, D., Xu, T., Kumar, S., 2015. Autophagy as a pro-death pathway. *Immunol Cell Biol* 93, 35–42. doi:10.1038/icb.2014.85

Deruyffelaere, C., Bouchez, I., Morin, H., Guillot, A., Miquel, M., Froissard, M., Chardot, T., D'Andrea, S., 2015. Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of oleosins is involved in oil body mobilization during post-germinative seedling growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 56, 1374–1387. doi:10.1093/pcp/pcv056

Deter, R.L., Baudhuin, P., de Duve, C., 1967. Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *J Cell Biol* 35, C11–C16.

Dixon, R.A., Xie, D.-Y., Sharma, S.B., 2005. Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.* 165, 9–28. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01217.x

Dresselhaus, T., Sprunck, S., 2012. Plant fertilization: maximizing reproductive success. *Curr Biol* 22, R487–R489. doi:10.1016/j.cub.2012.04.048

Edwards, J.W., Walker, E.L., Coruzzi, G.M., 1990. Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 3459–3463.

Eskelinen, E.-L., Reggiori, F., Baba, M., Kovács, A.L., Seglen, P.O., 2011. Seeing is believing: The impact of electron microscopy on autophagy research. *Autophagy* 7, 935–956. doi:10.4161/auto.7.9.15760

Farré, J.-C., Manjithaya, R., Mathewson, R.D., Subramani, S., 2008. PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy. *Dev Cell* 14, 365–376. doi:10.1016/j.devcel.2007.12.011

Farré, J.-C., Subramani, S., 2016. Mechanistic insights into selective autophagy pathways: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 537–552. doi:10.1038/nrm.2016.74

Fengsrud, M., Roos, N., Berg, T., Liou, W., Slot, J.W., Seglen, P.O., 1995. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of autophagic vacuoles in isolated hepatocytes: effects of vinblastine and asparagine on vacuole distributions. *Exp Cell Res* 221, 504–519. doi:10.1006/excr.1995.1402

Fenner, M., 2004. Seed size and chemical composition: the allocation of minerals to seeds and their use in early seedling growth. *Bot J Scot* 56, 163–173. doi:10.1080/03746600408685076

Floyd, B.E., Morriss, S.C., MacIntosh, G.C., Bassham, D.C., 2015. Evidence for autophagy-dependent pathways of rRNA turnover in Arabidopsis. *Autophagy* 11, 2199–2212. doi:10.1080/15548627.2015.1106664

Fujiki, Y., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., 2007. An Arabidopsis homolog of yeast ATG6/VPS30 is essential for pollen germination. *Plant Physiol* 143, 1132–1139. doi:10.1104/pp.106.093864

Fujioka, Y., Noda, N.N., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., Inagaki, F., 2010. Dimeric coiled-coil structure of *Saccharomyces cerevisiae* Atg16 and its functional significance in autophagy. *J Biol Chem* 285, 1508–1515. doi:10.1074/jbc.M109.053520



Fujiwara, Y., Furuta, A., Kikuchi, H., Aizawa, S., Hatanaka, Y., Konya, C., Uchida, K., Yoshimura, A., Tamai, Y., Wada, K., Kabuta, T., 2013. Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy* 9, 403–409. doi:10.4161/auto.23002

Fukuda, H., 1997. Tracheary element differentiation. *Plant Cell* 9, 1147–1156.

Galluzzi, L., Kepp, O., Kroemer, G., 2011. Autophagy and innate immunity ally against bacterial invasion. *EMBO J* 30, 3213–3214.

Gao, C., Zhuang, X., Cui, Y., Fu, X., He, Y., Zhao, Q., Zeng, Y., Shen, J., Luo, M., Jiang, L., 2015. Dual roles of an Arabidopsis ESCRT component FREE1 in regulating vacuolar protein transport and autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 1886–1891. doi:10.1073/pnas.1421271112

Gillespie, J., Rogers, S.W., Deery, M., Dupree, P., Rogers, J.C., 2005. A unique family of proteins associated with internalized membranes in protein storage vacuoles of the *Brassicaceae*. *Plant J* 41, 429–441. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02303.x

Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., Blatt, M.R., 2010. A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant J* 64, 355–365. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04322.x

Gruis, D., Schulze, J., Jung, R., 2004. Storage protein accumulation in the absence of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases. *Plant Cell* 16, 270–290. doi:10.1105/tpc.016378

Guerche, P., Tire, C., Sa, F.G.D., Clercq, A.D., Montagu, M.V., Krebbers, E., 1990. Differential expression of the Arabidopsis 2S albumin genes and the effect of increasing gene family size. *Plant Cell* 2, 469–478. doi:10.1105/tpc.2.5.469

Guiboileau, A., Avila-Ospina, L., Yoshimoto, K., Soulay, F., Azzopardi, M., Marmagne, A., Lothier, J., Masclaux-Daubresse, C., 2013. Physiological and metabolic consequences of autophagy deficiency for the management of nitrogen and protein resources in Arabidopsis leaves depending on nitrate availability. *New Phytol* 199, 683–694. doi:10.1111/nph.12307

Guiboileau, A., Masclaux-Daubresse, C., 2012. L'autophagie chez les plantes : mécanismes, régulations et fonctions. *C R Biol* 335, 375–388. doi:10.1016/j.crv.2012.04.004

Guiboileau, A., Sormani, R., Meyer, C., Masclaux-Daubresse, C., 2010. Senescence and death of plant organs: Nutrient recycling and developmental regulation. *C R Biol* 333, 382–391. doi:10.1016/j.crvi.2010.01.016

Guiboileau, A., Yoshimoto, K., Soulay, F., Bataillé, M.-P., Avice, J.-C., Masclaux-Daubresse, C., 2012. Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis*. *New Phytol* 194, 732–740. doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04084.x

Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., Ohsumi, Y., 2002. Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene. *Plant Physiol* 129, 1181–1193. doi:10.1104/pp.011024

Han, S., Yu, B., Wang, Y., Liu, Y., 2011. Role of plant autophagy in stress response. *Prot Cell* 2, 784–791. doi:10.1007/s13238-011-1104-4

Hara-Nishimura, I., Inoue, K., Nishimura, M., 1991. A unique vacuolar processing enzyme responsible for conversion of several proprotein precursors into the mature forms. *FEBS Lett* 294, 89–93.

Hara-Nishimura, I., Shimada, T., Hiraiwa, N., Nishimura, M., 1995. Vacuolar processing enzyme responsible for maturation of seed proteins. *J Plant Physiol* 145, 632–640. doi:10.1016/S0176-1617(11)81275-7

Haughn, G., Chaudhury, A., 2005. Genetic analysis of seed coat development in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 10, 472–477. doi:10.1016/j.tplants.2005.08.005

Hayward, A.P., Dinesh-Kumar, S.P., 2011. What can plant autophagy do for an innate immune response? *Annu Rev Phytopathol* 49, 557–576. doi:10.1146/annurev-phyto-072910-095333

Hillwig, M.S., Contento, A.L., Meyer, A., Ebany, D., Bassham, D.C., MacIntosh, G.C., 2011. RNS2, a conserved member of the RNase T2 family, is necessary for ribosomal RNA decay in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 1093–1098. doi:10.1073/pnas.1009809108

Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Buitink, J., 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci* 6, 431–438. doi:10.1016/S1360-1385(01)02052-0

Holdsworth, M.J., Bentsink, L., Soppe, W.J.J., 2008. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol* 179, 33–54. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02437.x

Huang, W.-P., Klionsky, D.J., 2002. Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Struct. Funct.* 27, 409–420.

Hundertmark, M., Hinch, D.K., 2008. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9, 118. doi:10.1186/1471-2164-9-118

Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., Ohsumi, Y., 2000. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408, 488–492. doi:10.1038/35044114

Inoue, Y., Suzuki, T., Hattori, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Moriyasu, Y., 2006. *AtATG* genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in *Arabidopsis* root tip cells. *Plant Cell Physiol* 47, 1641–1652. doi:10.1093/pcp/pcl031

Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M.R., Mae, T., 2008. Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol* 148, 142–155. doi:10.1104/pp.108.122770

Jolivet, P., Boulard, C., Bellamy, A., Valot, B., d' Andréa, S., Zivy, M., Nesi, N., Chardot, T., 2011. Oil body proteins sequentially accumulate throughout seed development in *Brassica napus*. *J Plant Physiol* 168, 2015–2020. doi:10.1016/j.jplph.2011.06.007

Jolivet, P., Deruyffelaere, C., Boulard, C., Quinsac, A., Savoie, R., Nesi, N., Chardot, T., 2013. Deciphering the structural organization of the oil bodies in the *Brassica napus* seed as a mean to improve the oil extraction yield. *Indust Crops Prod* 44, 549–557. doi:10.1016/j.indcrop.2012.09.024

Jolivet, P., Roux, E., d' Andrea, S., Davanture, M., Negroni, L., Zivy, M., Chardot, T., 2004. Protein composition of oil bodies in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiol Biochem* 42, 501–509. doi:10.1016/j.plaphy.2004.04.006

Kametaka, S., Okano, T., Ohsumi, M., Ohsumi, Y., 1998. Apg14p and Apg6/Vps30p form a protein complex essential for autophagy in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 22284–22291.

Kaushik, S., Cuervo, A.M., 2012. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol* 22, 407–417. doi:10.1016/j.tcb.2012.05.006

Khalfan, W.A., Klionsky, D.J., 2002. Molecular machinery required for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting (Cvt) pathway in *S. cerevisiae*. *Curr Opin Cell Biol* 14, 468–475. doi:10.1016/S0955-0674(02)00343-5

Kim, S.-H., Kwon, C., Lee, J.-H., Chung, T., 2012. Genes for plant autophagy: functions and interactions. *Mol Cells* 34, 413–423. doi:10.1007/s10059-012-0098-y

Kimura, M., Nambara, E., 2010. Stored and neosynthesized mRNA in Arabidopsis seeds: effects of cycloheximide and controlled deterioration treatment on the resumption of transcription during imbibition. *Plant Mol Biol* 73, 119–129. doi:10.1007/s11103-010-9603-x

Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., Ohsumi, Y., 1999. Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol* 147, 435–446. doi:10.1083/jcb.147.2.435

Klionsky, D.J., 2008. Autophagy revisited: A conversation with Christian de Duve. *Autophagy* 4, 740–743.

Klionsky, et al., 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445–544. doi:10.4161/auto.19496

Klionsky, D.J., Schulman, B.A., 2014. Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nat Struct Mol Biol* 21, 336–345. doi:10.1038/nsmb.2787

Koncz, C., Kreuzaler, F., Kálmán, Z., and Schell, J., 1984 A simple method to transfer, integrate and study expression of foreign genes, such as chicken ovalbumin and alpha-actin in plant tumours. *EMBO J.* 3, 1929-1937

Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., Momoi, T., 2006. ER stress (PERK/eIF2 $\alpha$  phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ* 14, 230–239. doi:10.1038/sj.cdd.4401984

Kou, X., Watkins, C.B., Gan, S.-S., 2012. Arabidopsis AtNAP regulates fruit senescence. *J Exp Bot* 63, 2661–2671. doi:10.1093/jxb/ers266

Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., Peter, M., 2008. Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat Cell Biol* 10, 602–610. doi:10.1038/ncb1723

Kranner, I., Minibayeva, F.V., Beckett, R.P., Seal, C.E., 2010. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytol* 188, 655–673. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03461.x

Krebbers, E., Herdies, L., Clercq, A.D., Seurinck, J., Leemans, J., Damme, J.V., Segura, M., Gheysen, G., Montagu, M.V., Vandekerckhove, J., 1988. Determination of the processing sites of an *Arabidopsis* 2S albumin and characterization of the complete gene family. *Plant Physiol* 87, 859–866. doi:10.1104/pp.87.4.859

Kwon, S.I., Cho, H.J., Jung, J.H., Yoshimoto, K., Shirasu, K., Park, O.K., 2010. The Rab GTPase RabG3b functions in autophagy and contributes to tracheary element differentiation in *Arabidopsis*. *Plant J* 64, 151–164. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04315.x

Lalonde, S., Wipf, D., Frommer, W.B., 2004. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol* 55, 341–372. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141758

Lam, H.-M., Coschigano, K.T., Oliveira, I.C., Melo-Oliveira, R., Coruzzi, G.M., 1996. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47, 569–593. doi:10.1146/annurev.arplant.47.1.569

Le Bars, R., Marion, J., Le Borgne, R., Satiat-Jeunemaitre, B., Bianchi, M.W., 2014. ATG5 defines a phagophore domain connected to the endoplasmic reticulum during autophagosome formation in plants. *Nat Commun* 5, 4121. doi:10.1038/ncomms5121

Lee, T.A., Vande Wetering, S.W., Brusslan, J.A., 2013. Stromal protein degradation is incomplete in *Arabidopsis thaliana* autophagy mutants undergoing natural senescence. *BMC Res Notes* 6, 17. doi:10.1186/1756-0500-6-17

Lemaître, T., Gaufichon, L., Boutet-Mercey, S., Christ, A., Masclaux-Daubresse, C., 2008. Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassileskija accession. *Plant Cell Physiol* 49, 1056–1065. doi:10.1093/pcp/pcn081

Leubner-Metzger, G., 2005. beta-1,3-Glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. *Plant J* 41, 133–145. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02284.x

Levine, B., 2005. Eating oneself and uninvited guests. *Cell* 120, 159–162. doi:10.1016/j.cell.2005.01.005

Li, F., Chung, T., Pennington, J.G., Federico, M.L., Kaeppler, H.F., Kaeppler, S.M., Otegui, M.S., Vierstra, R.D., 2015. Autophagic recycling plays a central role in maize nitrogen remobilization. *Plant Cell* 27, 1389–1408. doi:10.1105/tpc.15.00158

Li, F., Chung, T., Vierstra, R.D., 2014. AUTOPHAGY-RELATED11 plays a critical role in general autophagy- and senescence-induced mitophagy in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26, 788–807. doi:10.1105/tpc.113.120014

Li, L., Shimada, T., Takahashi, H., Ueda, H., Fukao, Y., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I., 2006. MAIGO2 is involved in exit of seed storage proteins from the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 18, 3535–3547. doi:10.1105/tpc.106.046151

Li, Q., Wang, B.-C., Xu, Y., Zhu, Y.-X., 2007. Systematic studies of 12S seed storage protein accumulation and degradation patterns during *Arabidopsis* seed maturation and early seedling germination stages. *J Biochem Mol Biol* 40, 373–381.

Liu, X., Mao, K., Yu, A.Y.H., Omairi-Nasser, A., Austin II, J., Glick, B.S., Yip, C.K., Klionsky, D.J., 2016. The Atg17-Atg31-Atg29 complex coordinates with Atg11 to recruit the Vam7 SNARE and mediate autophagosome-Vacuole fusion. *Curr Biol* 26, 150–160. doi:10.1016/j.cub.2015.11.054

Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Tallóczy, Z., Levine, B., Dinesh-Kumar, S.P., 2005. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* 121, 567–577. doi:10.1016/j.cell.2005.03.007

Lynch-Day, M.A., Klionsky, D.J., 2010. The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *FEBS Lett* 584, 1359–1366. doi:10.1016/j.febslet.2010.02.013

Macquet, A., Ralet, M.-C., Kronenberger, J., Marion-Poll, A., North, H.M., 2007. In situ, Chemical and Macromolecular Study of the Composition of *Arabidopsis thaliana* Seed Coat Mucilage. *Plant Cell Physiol* 48, 984–999. doi:10.1093/pcp/pcm068

Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., Kroemer, G., 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 741–752. doi:10.1038/nrm2239

Manfre, A.J., LaHatte, G.A., Climer, C.R., Marcotte, W.R., 2009. Seed dehydration and the establishment of desiccation tolerance during seed maturation is altered in the *Arabidopsis thaliana* mutant *atem6-1*. *Plant Cell Physiol* 50, 243–253. doi:10.1093/pcp/pcn185

Mansilla Pareja, M.E., Colombo, M.I., 2013. Autophagic clearance of bacterial pathogens: molecular recognition of intracellular microorganisms. *Front Cell Infect Microbiol* 3. doi:10.3389/fcimb.2013.00054

Mao, K., Wang, K., Liu, X., Klionsky, D.J., 2013. The scaffold Pprotein Atg11 recruits fission machinery to drive selective mitochondria degradation by autophagy. *Develop Cell* 26, 9–18. doi:10.1016/j.devcel.2013.05.024

Martínez, D.E., Costa, M.L., Gomez, F.M., Otegui, M.S., Guamet, J.J., 2008. “Senescence-associated vacuoles” are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. *Plant J* 56, 196–206. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03585.x

Marty, F., 1978. Cytochemical studies on GERL, provacuoles, and vacuoles in root meristematic cells of *Euphorbia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 852–856.

Masclaux, C., Valadier, M.-H., Brugière, N., Morot-Gaudry, J.-F., Hirel, B., 2000. Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* 211, 510–518.

Masclaux-Daubresse, C., Chardon, F., 2011. Exploring nitrogen remobilization for seed filling using natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 62, 2131–2142. doi:10.1093/jxb/erq405

Masclaux-Daubresse, C., Reisdorf-Cren, M., Pageau, K., Lelandais, M., Grandjean, O., Kronenberger, J., Valadier, M.-H., Feraud, M., Jougllet, T., Suzuki, A., 2006. Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiol* 140, 444–456. doi:10.1104/pp.105.071910

Matile, P., Moor, H., 1968. Vacuolation: origin and development of the lysosomal apparatus in root-tip cells. *Planta* 80, 159–175.

Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y., Ohsumi, Y., 1997. Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 192, 245–250.

Meijer, A.J., Codogno, P., 2004. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int. J. Biochem Cell Biol* 36, 2445–2462. doi:10.1016/j.biocel.2004.02.002

Michaeli, S., Honig, A., Levanony, H., Peled-Zehavi, H., Galili, G., 2014. Arabidopsis ATG8-INTERACTING PROTEIN1 is involved in autophagy-dependent vesicular trafficking of plastid proteins to the vacuole. *Plant Cell tpc.114.129999*. doi:10.1105/tpc.114.129999

Mijaljica, D., Devenish, R.J., 2013. Nucleophagy at a glance. *J of Cell Sci* 126, 4325–4330. doi:10.1242/jcs.133090

Minina, E.A., Filonova, L.H., Fukada, K., Savenkov, E.I., Gogvadze, V., Clapham, D., Sanchez-Vera, V., Suarez, M.F., Zhivotovsky, B., Daniel, G., Smertenko, A., Bozhkov, P.V., 2013. Autophagy and metacaspase determine the mode of cell death in plants. *J Cell Biol* 203, 917–927. doi:10.1083/jcb.201307082

Miquel, M., Browse, J., 1998. Arabidopsis lipids: A fat chance. *Plant Physiol Biochem* 36, 187–197. doi:10.1016/S0981-9428(98)80103-4

Miquel, M., Trigui, G., d' Andréa, S., Kelemen, Z., Baud, S., Berger, A., Deruyffelaere, C., Trubuil, A., Lepiniec, L., Dubreucq, B., 2014. Specialization of oleosins in oil body dynamics during seed development in Arabidopsis seeds. *Plant Physiol* 164, 1866–1878. doi:10.1104/pp.113.233262

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J., 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069–1075. doi:10.1038/nature06639

Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., Ohsumi, Y., 1998. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395, 395–398. doi:10.1038/26506

Motley, A.M., Nuttall, J.M., Hetteema, E.H., 2012. Pex3-anchored Atg36 tags peroxisomes for degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 31, 2852–2868. doi:10.1038/emboj.2012.151

Müller, B., Fastner, A., Karmann, J., Mansch, V., Hoffmann, T., Schwab, W., Suter-Grotemeyer, M., Rentsch, D., Truernit, E., Ladwig, F., Bleckmann, A., Dresselhaus, T., Hammes, U.Z., 2015. Amino acid export in developing arabidopsis seeds depends on UmamiT facilitators. *Curr Biol* 25, 3126–3131. doi:10.1016/j.cub.2015.10.038

Müller, K., Carstens, A.C., Linkies, A., Torres, M.A., Leubner-Metzger, G., 2009. The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in Arabidopsis seed after-ripening. *New Phytol* 184, 885–897. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03005.x

Mummenhoff, K., Linder, P., Friesen, N., Bowman, J.L., Lee, J.-Y., Franzke, A., 2004. Molecular evidence for bicontinental hybridogenous genomic constitution in *Lepidium sensu stricto* (*Brassicaceae*) species from Australia and New Zealand. *Am J Bot* 91, 254–261. doi:10.3732/ajb.91.2.254



Müntz, K., Belozersky, M.A., Dunaevsky, Y.E., Schlereth, A., Tiedemann, J., 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J Exp Bot* 52, 1741–1752. doi:10.1093/jexbot/52.362.1741

Murphy, D.J., Vance, J., 1999. Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci* 24, 109–115.

Nair, U., Yen, W.-L., Mari, M., Cao, Y., Xie, Z., Baba, M., Reggiori, F., Klionsky, D.J., 2012. A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis. *Autophagy* 8, 780–793. doi:10.4161/auto.19385

Nakabayashi, K., Okamoto, M., Koshiba, T., Kamiya, Y., Nambara, E., 2005. Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant J.* 41, 697–709. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02337.x

Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., Kimura, T., 2007. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci and Bioeng* 104, 34–41. doi:10.1263/jbb.104.34

Nakatogawa, H., Mochida, K., 2015. Reticulophagy and nucleophagy: New findings and unsolved issues. *Autophagy* 11, 2377–2378. doi:10.1080/15548627.2015.1106665

Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., Ohsumi, Y., 2009. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 458–467. doi:10.1038/nrm2708

Nakaune, S., Yamada, K., Kondo, M., Kato, T., Tabata, S., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I., 2005. A Vacuolar Processing Enzyme,  $\delta$ VPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. *Plant Cell* 17, 876–887. doi:10.1105/tpc.104.026872

Nguyen, T.-P., Cueff, G., Hegedus, D.D., Rajjou, L., Bentsink, L., 2015. A role for seed storage proteins in *Arabidopsis* seed longevity. *J Exp Bot* 66, 6399–6413. doi:10.1093/jxb/erv348

Nonogaki, H., 2008. Seed germination and reserve mobilization, in: John Wiley & Sons, Ltd (Ed.), *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.

Ogé, L., Bourdais, G., Bove, J., Collet, B., Godin, B., Granier, F., Boutin, J.-P., Job, D., Jullien, M., Grappin, P., 2008. Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase 1 is involved in both seed longevity and germination vigor in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 3022–3037. doi:10.1105/tpc.108.058479

Okamoto, M., Tatematsu, K., Matsui, A., Morosawa, T., Ishida, J., Tanaka, M., Endo, T.A., Mochizuki, Y., Toyoda, T., Kamiya, Y., Shinozaki, K., Nambara, E., Seki, M., 2010. Genome-wide analysis of endogenous abscisic acid-mediated transcription in dry and imbibed seeds of *Arabidopsis* using tiling arrays. *Plant J* 62, 39–51. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04135.x

Oku, M., Sakai, Y., 2015. Pexophagy in yeasts. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Res.* doi:10.1016/j.bbamcr.2015.09.023

Olsen, O.-A., 2004. Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16, S214–S227. doi:10.1105/tpc.017111

Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Kranner, I., Bogatek, R., Corbineau, F., Bailly, C., 2009. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiol* 150, 494–505. doi:10.1104/pp.109.138107

Otegui, M.S., Herder, R., Schulze, J., Jung, R., Staehelin, L.A., 2006. The proteolytic processing of seed storage proteins in *Arabidopsis* embryo cells starts in the multivesicular bodies. *Plant Cell* 18, 2567–2581. doi:10.1105/tpc.106.040931

Otomo, C., Metlagel, Z., Takaesu, G., Otomo, T., 2013. Structure of the human ATG12~ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy. *Nat Struct Mol Biol* 20, 59–66. doi:10.1038/nsmb.2431

Pagnussat, G.C., Yu, H.-J., Ngo, Q.A., Rajani, S., Mayalagu, S., Johnson, C.S., Capron, A., Xie, L.-F., Ye, D., Sundaresan, V., 2005. Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development* 132, 603–614. doi:10.1242/dev.01595

Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5, 308–316. doi:10.1038/nchembio.164

Powell, A.A., Matthews, S., 1979. The Influence of Testa Condition on the Imbibition and Vigour of Pea Seeds. *J Exp Bot* 30, 193–197. doi:10.1093/jxb/30.1.193

Preston, J., Tatematsu, K., Kanno, Y., Hobo, T., Kimura, M., Jikumaru, Y., Yano, R., Kamiya, Y., Nambara, E., 2009. Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds: a comparative study on dormant and non-dormant accessions. *Plant Cell Physiol* 50, 1786–1800. doi:10.1093/pcp/pcp121

Puleston, D.J., Simon, A.K., 2014. Autophagy in the immune system. *Immunology* 141, 1–8. doi:10.1111/imm.12165

Qin, G., Ma, Z., Zhang, L., Xing, S., Hou, X., Deng, J., Liu, J., Chen, Z., Qu, L.-J., Gu, H., 2007. Arabidopsis AtBECLIN 1/AtAtg6/AtVps30 is essential for pollen germination and plant development. *Cell Res* 17, 249–263. doi:10.1038/cr.2007.7

Qu, X., Zou, Z., Sun, Q., Luby-Phelps, K., Cheng, P., Hogan, R.N., Gilpin, C., Levine, B., 2007. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* 128, 931–946. doi:10.1016/j.cell.2006.12.044

Rajjou, L., Gallardo, K., Debeaujon, I., Vandekerckhove, J., Job, C., Job, D., 2004. The effect of alpha-amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiol* 134, 1598–1613. doi:10.1104/pp.103.036293

Rajjou, L., Lovigny, Y., Groot, S.P.C., Belghazi, M., Job, C., Job, D., 2008. Proteome-wide characterization of seed aging in Arabidopsis: A comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiol* 148, 620–641. doi:10.1104/pp.108.123141

Reggiori, F., 2006. 1. Membrane origin for autophagy. *Curr Top Dev Biol* 74, 1–30. doi:10.1016/S0070-2153(06)74001-7

Reggiori, F., Klionsky, D.J., 2013. Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. *Genetics* 194, 341–361. doi:10.1534/genetics.112.149013

Reggiori, F., Tucker, K.A., Stromhaug, P.E., Klionsky, D.J., 2004. The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev Cell* 6, 79–90. doi:10.1016/S1534-5807(03)00402-7

Rentsch, D., Schmidt, S., Tegeder, M., 2007. Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Lett* 581, 2281–2289. doi:10.1016/j.febslet.2007.04.013

Roschzttardt, H., Conéjéro, G., Curie C., Mari, S. 2009. Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the Arabidopsis embryo. *Plant Physiol* 151, 1329-38

Rose, T.L., Bonneau, L., Der, C., Marty-Mazars, D., Marty, F., 2006. Starvation-induced expression of autophagy-related genes in Arabidopsis. *Biol Cell* 98, 53–67. doi:10.1042/BC20040516

Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., Elazar, Z., 2007. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* 26, 1749–1760. doi:10.1038/sj.emboj.7601623

Schreiber, A., Peter, M., 2014. Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin–proteasome system. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Res* 1843, 163–181. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.03.019

Seay, M.D., Dinesh-Kumar, S.P., 2005. Life after death: are autophagy genes involved in cell death and survival during plant innate immune responses? *Autophagy* 1, 185–186.

Seglen, P.O., Gordon, P.B., Poli, A., 1980. Amino acid inhibition of the autophagic/lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Gen Subj* 630, 103–118. doi:10.1016/0304-4165(80)90141-5

Shibata, M., Oikawa, K., Yoshimoto, K., Kondo, M., Mano, S., Yamada, K., Hayashi, M., Sakamoto, W., Ohsumi, Y., Nishimura, M., 2013. Highly oxidized peroxisomes are selectively degraded *via* autophagy in *Arabidopsis*. *Plant Cell tpc.113.116947*. doi:10.1105/tpc.113.116947

Shi, L., Katavic, V., Yu, Y., Kunst, L., Haughn, G., 2012. *Arabidopsis glabra2* mutant seeds deficient in mucilage biosynthesis produce more oil. *Plant J* 69, 37–46. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04768.x

Shimada, T., Yamada, K., Kataoka, M., Nakaune, S., Koumoto, Y., Kuroyanagi, M., Tabata, S., Kato, T., Shinozaki, K., Seki, M., Kobayashi, M., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I., 2003. Vacuolar Processing Enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 278, 32292–32299. doi:10.1074/jbc.M305740200

Shin, J.-H., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Jeon, J.-S., An, G., 2009. OsATG10b, an autophagosome component, is needed for cell survival against oxidative stresses in rice. *Mol Cells* 27, 67–74. doi:10.1007/s10059-009-0006-2

Siloto, R.M.P., Findlay, K., Lopez-Villalobos, A., Yeung, E.C., Nykiforuk, C.L., Moloney, M.M., 2006. The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1961–1974. doi:10.1105/tpc.106.041269

Sláviková, S., Shy, G., Yao, Y., Glozman, R., Levanony, H., Pietrokovski, S., Elazar, Z., Galili, G., 2005. The autophagy-associated *Atg8* gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in *Arabidopsis* plants. *J Exp Bot* 56, 2839–2849. doi:10.1093/jxb/eri276

Sláviková, S., Ufaz, S., Avin-Wittenberg, T., Levanony, H., Galili, G., 2008. An autophagy-associated Atg8 protein is involved in the responses of *Arabidopsis* seedlings to hormonal controls and abiotic stresses. *J Exp Bot* 59, 4029–4043. doi:10.1093/jxb/ern244

Sørensen, M.B., Mayer, U., Lukowitz, W., Robert, H., Chambrier, P., Jürgens, G., Somerville, C., Lepiniec, L., Berger, F., 2002. Cellularisation in the endosperm of *Arabidopsis thaliana* is coupled to mitosis and shares multiple components with cytokinesis. *Development* 129, 5567–5576. doi:10.1242/dev.00152

Stadler, R., Lauterbach, C., Sauer, N., 2005. Cell-to-cell movement of green fluorescent protein reveals post-phloem transport in the outer integument and identifies symplastic domains in *Arabidopsis* seeds and embryos. *Plant Physiol* 139, 701–712. doi:10.1104/pp.105.065607

Stafford, H.A., 1988. Proanthocyanidins and the lignin connection. *Phytochemistry* 27, 1–6. doi:10.1016/0031-9422(88)80583-1

Strømhaug, P.E., Berg, T.O., Fengsrud, M., Seglen, P.O., 1998. Purification and characterization of autophagosomes from rat hepatocytes. *Biochem J* 335, 217–224.

Sturm, A., Tang, GQ., 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci* 4, 401–407.

Sugawara, K., Suzuki, N.N., Fujioka, Y., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Inagaki, F., 2004. The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8. *Genes Cells* 9, 611–618. doi:10.1111/j.1356-9597.2004.00750.x

Suzuki, N.N., Yoshimoto, K., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., Inagaki, F., 2005. The crystal structure of plant ATG12 and its biological implication in autophagy. *Autophagy* 1, 119–126.

Svenning, S., Lamark, T., Krause, K., Johansen, T., 2011. Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1. *Autophagy* 7, 993–1010. doi:10.4161/auto.7.9.16389

Takehige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., Ohsumi, Y., 1992. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* 119, 301–311. doi:10.1083/jcb.119.2.301

Tanaka, A., Cleland, M.M., Xu, S., Narendra, D.P., Suen, D.-F., Karbowski, M., Youle, R.J., 2010. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J of Cell Biol* 191, 1367–1380. doi:10.1083/jcb.201007013

Tesnier, K., Strookman-Donkers, H.M., van Pijlen, J.G., van der Geest, A.I.H.M., Bino, R.J., Groot, S.P.C., 2002. A controlled deterioration test for *Arabidopsis thaliana* reveals genetic variation in seed quality. *Seed Sci Technol* 30, 149-165.

Thomas, H., 2013. Senescence, ageing and death of the whole plant. *New Phytol* 197, 696–711. doi:10.1111/nph.12047

Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M., Wolf, D.H., 1994. Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 349, 275–280. doi:10.1016/0014-5793(94)00672-5

Turner, S., Gallois, P., Brown, D., 2007. Tracheary Element Differentiation. *Ann Rev Plant Biol* 58, 407–433. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105236

Tzen, J.T., Huang, A.H., 1992. Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *J Cell Biol* 117, 327–335. doi:10.1083/jcb.117.2.327

Umekawa, M., Klionsky, D.J., 2012. The Cytoplasm-to-Vacuole Targeting pathway: a historical perspective. *Int J Cell Biol* 2012, e142634. doi:10.1155/2012/142634

Venerando, R., Miotto, G., Kadowaki, M., Siliprandi, N., Mortimore, G.E., 1994. Multiphasic control of proteolysis by leucine and alanine in the isolated rat hepatocyte. *Am. J. Physiol.* 266, C455–461.

Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Mae, T., Makino, A., 2009. Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol* 149, 885–893. doi:10.1104/pp.108.130013

Wagstaff, C., Yang, T.J.W., Stead, A.D., Buchanan-Wollaston, V., Roberts, J.A., 2009. A molecular and structural characterization of senescing *Arabidopsis* siliques and comparison of transcriptional profiles with senescing petals and leaves. *Plant J* 57, 690–705. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03722.x

Wang, K., Yang, Z., Liu, X., Mao, K., Nair, U., Klionsky, D.J., 2012. Phosphatidylinositol 4-kinases are required for autophagic membrane trafficking. *J Biol Chem* 287, 37964–37972. doi:10.1074/jbc.M112.371591

Weidberg, H., Shvets, E., Elazar, Z., 2011. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Ann Rev of Biochem* 80, 125–156. doi:10.1146/annurev-biochem-052709-094552

Weitbrecht, K., Müller, K., Leubner-Metzger, G., 2011. First off the mark: early seed germination. *J Exp Bot* doi:10.1093/jxb/err030

Western, T.L., Skinner, D.J., Haughn, G.W., 2000. Differentiation of mucilage secretory cells of the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Physiol* 122, 345–356. doi:10.1104/pp.122.2.345

White, E., Mehnert, J.M., Chan, C.S., 2015. Autophagy, metabolism, and cancer. *Clin Cancer Res* 21, 5037–5046. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0490

Withana-Gamage, T.S., Hegedus, D.D., Qiu, X., Yu, P., May, T., Lydiate, D., Wanasundara, J.P.D., 2013. Characterization of *Arabidopsis thaliana* Lines with altered seed storage protein profiles using synchrotron-powered FT-IR spectromicroscopy. *J Agric Food Chem* 61, 901–912. doi:10.1021/jf304328n

Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N., 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471–484. doi:10.1016/j.cell.2006.01.016

Xie, Q., Michaeli, S., Peled-Zehavi, H., Galili, G., 2015. Chloroplast degradation: one organelle, multiple degradation pathways. *Trends Plant Sci* 20, 264–265. doi:10.1016/j.tplants.2015.03.013

Xie, Z., Nair, U., Klionsky, D.J., 2008. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell* 19, 3290–3298. doi:10.1091/mbc.E07-12-1292

Xing, Q., Creff, A., Waters, A., Tanaka, H., Goodrich, J., Ingram, G.C., 2013. ZHOUP1 controls embryonic cuticle formation *via* a signalling pathway involving the subtilisin protease ABNORMAL LEAF-SHAPE1 and the receptor kinases GASSHO1 and GASSHO2. *Development* 140, 770–779. doi:10.1242/dev.088898

Xiong, Y., Contento, A.L., Bassham, D.C., 2005. AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 42, 535–546. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02397.x

Xu, G., Fan, X., Miller, A.J., 2012. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annu Rev Plant Biol* 63, 153–182. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105532

Yadav, U.P., Ayre, B.G., Bush, D.R., 2015. Transgenic approaches to altering carbon and nitrogen partitioning in whole plants: assessing the potential to improve crop yields and nutritional quality. *Front Plant Sci* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00275

Yang, S., Johnston, N., Talideh, E., Mitchell, S., Jeffree, C., Goodrich, J., Ingram, G., 2008. The endosperm-specific ZHOUP1 gene of *Arabidopsis thaliana* regulates endosperm breakdown and embryonic epidermal development. *Development* 135, 3501–3509. doi:10.1242/dev.026708

Yang, X., Dong, M., Huang, Z., 2010. Role of mucilage in the germination of *Artemisia sphaerocephala* (Asteraceae) achenes exposed to osmotic stress and salinity. *Plant Physiol Biochem* 48, 131–135. doi:10.1016/j.plaphy.2009.12.006

Yang, Z., Klionsky, D.J., 2009. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 335, 1–32. doi:10.1007/978-3-642-00302-8\_1

Yatsu, L.Y., Jacks, T.J., 1972. Spherosome membranes: half unit-membranes. *Plant Physiol* 49, 937–943.

Yorimitsu, T., Klionsky, D.J., 2005. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12, 1542–1552. doi:10.1038/sj.cdd.4401765

Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., Klionsky, D.J., 2006. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem* 281, 30299–30304. doi:10.1074/jbc.M607007200

Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T., Ohsumi, Y., 2004. Processing of ATG8s, Ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* 16, 2967–2983. doi:10.1105/tpc.104.025395

Yoshimoto, K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Kusano, M., Consonni, C., Panstruga, R., Ohsumi, Y., Shirasu, K., 2009. Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 2914–2927. doi:10.1105/tpc.109.068635

Yoshimoto, K., Takano, Y., Sakai, Y., 2010. Autophagy in plants and phytopathogens. *Autophagy* 584, 1350–1358. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.007

Youle, R.J., Narendra, D.P., 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nat rev Mol cell biol* 12, 9–14.

Young, P.G., Bartel, B., 2015. Pexophagy and peroxisomal protein turnover in plants. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Res.* doi:10.1016/j.bbamcr.2015.09.005

Yuan, J., Doucette, C.D., Fowler, W.U., Feng, X.-J., Piazza, M., Rabitz, H.A., Wingreen, N.S., Rabinowitz, J.D., 2009. Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E. coli*. *Mol Syst Biol* 5, 302. doi:10.1038/msb.2009.60



Zaffagnini, G., Martens, S., 2016. Mechanisms of Selective Autophagy. *J Mol Biol.* doi:10.1016/j.jmb.2016.02.004

Zeeshan, H.M.A., Lee, G.H., Kim, H.-R., Chae, H.-J., 2016. Endoplasmic reticulum stress and associated ROS. *Int J Mol Sci* 17. doi:10.3390/ijms17030327

Zhang, W.-H., Zhou, Y., Dibley, K.E., Tyerman, S.D., Furbank, R.T., Patrick, J.W., 2007. Nutrient loading of developing seeds. *Funct Plant Biol* 34, 314–331.

Zheng, H., Staehelin, L.A., 2011. Protein storage vacuoles are transformed into lytic vacuoles in root meristematic cells of germinating seedlings by multiple, cell type-specific mechanisms. *Plant Physiol* 155, 2023–2035. doi:10.1104/pp.110.170159

Zhou, J., Wang, J., Cheng, Y., Chi, Y.-J., Fan, B., Yu, J.-Q., Chen, Z., 2013. NBR1-mediated selective autophagy targets insoluble ubiquitinated protein aggregates in plant stress responses. *PLoS Genetics* 9, e1003196. doi:10.1371/journal.pgen.1003196

Zientara-Rytter, K., Lukomska, J., Moniuszko, G., Gwozdecki, R., Surowiecki, P., Lewandowska, M., Liszewska, F., Wawrzyńska, A., Sirko, A., 2011. Identification and functional analysis of Joka2, a tobacco member of the family of selective autophagy cargo receptors. *Autophagy* 7, 1145–1158. doi:10.4161/auto.7.10.16617

Zvereva, A.S., Golyaev, V., Turco, S., Gubaeva, E.G., Rajeswaran, R., Schepetilnikov, M.V., Srour, O., Ryabova, L.A., Boller, T., Pooggin, M.M., 2016. Viral protein suppresses oxidative burst and salicylic acid-dependent autophagy and facilitates bacterial growth on virus-infected plants. *New Phytol* 221, 1020-1034. doi:10.1111/nph.13967

## VI. ANNEXES

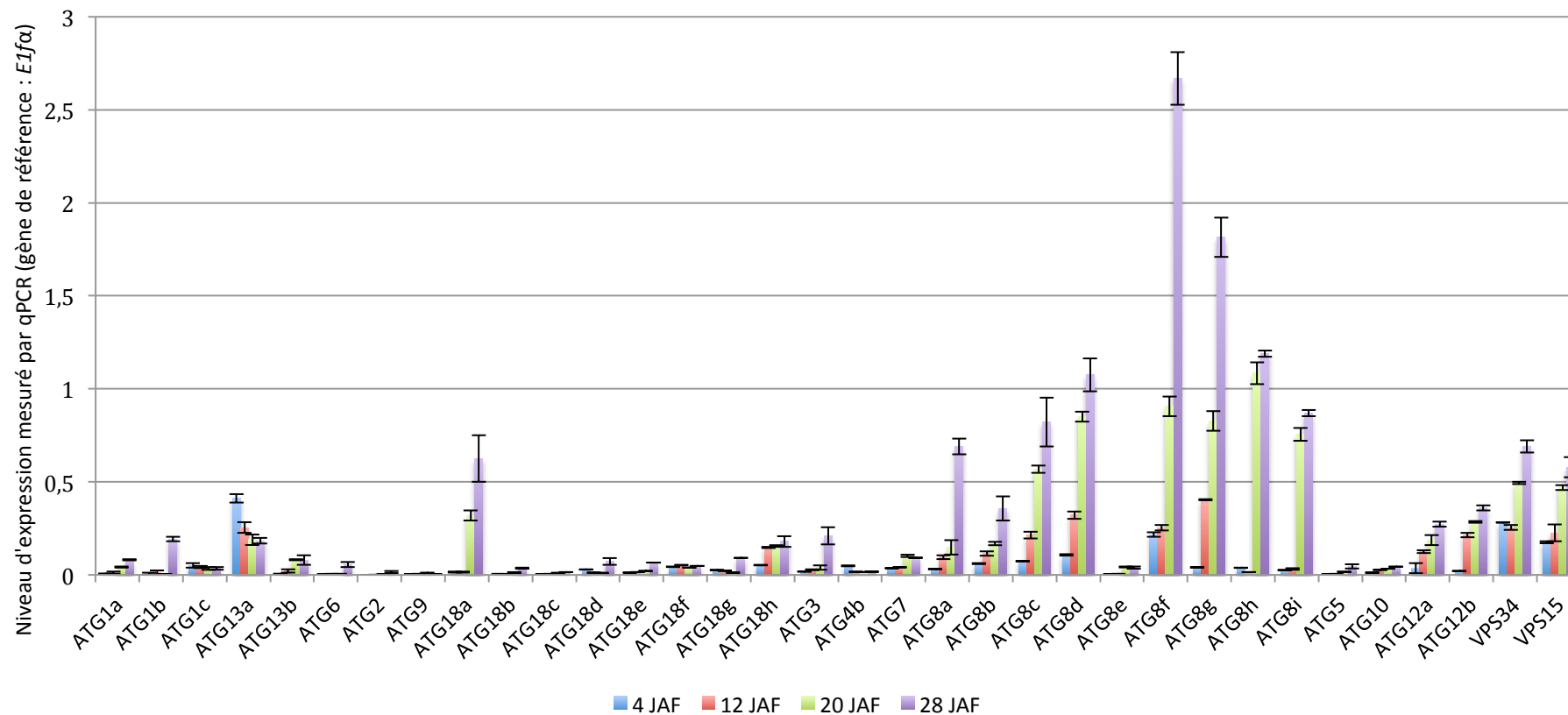
Nom du gène	AGI	Nom du gène	AGI
<b>Complexe de régulation ATG1</b>		<b>Système de conjugaison</b>	
ATG1a	At2g37840	ATG3	At5g61500
ATG1b	At3g53930	ATG4b	At3g59950
ATG1c	At3g61960	ATG7	At5g45900
ATG13a	At3g49590	ATG8a	At4g21980
ATG13b	At3g18770	ATG8b	At4g04620
<b>Complexe PI3K</b>		ATG8c	At1g62040
ATG6	At3g61710	ATG8d	At2g05630
VPS34	At1g60490	ATG8e	At2g45170
VPS15	At4g29380	ATG8f	At4g16520
<b>Complexe ATG9</b>		ATG8g	At3g60640
ATG2	At3g19190	ATG8h	At3g06420
ATG9	At2g31260	ATG8i	At3g15580
ATG18a	At3g62770	ATG5	At5g17290
ATG18b	At4g30510	ATG10	At3g07525
ATG18c	At2g40810	ATG12a	At1g54210
ATG18d	At3g56440	ATG12b	At3g13970
ATG18e	At5g05150		
ATG18f	At5g54730		
ATG18g	At1g03380		
ATG18h	At1g54710		

*Annexe 1. Liste des gènes ATG d'Arabidopsis thaliana étudiés répartis par complexes.*

Gène	AGI	Séquence des amorces 5'→3'	Gène	AGI	Séquence des amorces 5'→3'
ATG1a	At2g37840	F: GTCGATACGAGAATTGAGAGGAAG R: CGTTTTCCACTTTTTGGTTGAAA	ATG4b	At3g59950	F: CTTTCACGTTCCCTCAAAGC R: TTGCAATGGTAAGACGATGTG
ATG1b	At3g53930	F: CATCAGCTCAATTCGGATCT R: GATAACCCTCCGCTTCTCC	ATG7	At5g45900	F: TCGTGGTTTCGCTGACTTGA R: CGACAGCAGAAAACAGCCAAC
ATG1c	At3g61960	F: ACG CTC GTC GTT TTA GCT GT R: TGAGTGGCAGCACTTGTT TC	ATG8a	At4g21980	F: CAATTTGTATACGTGGTTCGT R: AGCAACGGTAAGAGATCCAA
ATG13a	At3g49590	F: GAGAAGGTTTCAGTGTACAGGT R: TTGATTTGGCTCAGTGGACG	ATG8b	At4g04620	F: AACTGCGGCATTGATGTCTG R: AGCAGTAGAAAAGATCCACAAA
ATG13b	At3g18770	F: ATTCTCACAAAGGGCACCAAC R: TCTCCGCGGATATCATTTC	ATG8c	At1g62040	F: ACTGCTGCAATGATGTCTGC R: TGGAAAGGCACACATTTAAACC
ATG6	At3g61710	F: ATGGGTCTGCCAAAACGTGC R: GAGGAATGCCCTGAGATTGA	ATG8d	At2g05630	F: ATGTTGTACGGAAGCGGATC R: GAAGAAGATCCCCGAACGTGT
VPS34	At1g60490	F: CAGAGCACCGAAGCATAACA R: AAGGAGGAGTTGTCCAGGT	ATG8e	At2g45170	F: TCTTTAAGATGGAACAACGATTC R: CTCAGCCTTTTCCACAATCA
ATG2	At3g19190	F: TGCAAAATCTGCGTCTATCG R: GTCGAGGACCAGCTTCAGAC	ATG8f	At4g16520	F: GCGCTCATGTCTTCTGTGTA R: TGAATATCCAGCAAGAGGTCTC
ATG9	At2g31260	F: TTGGTGGTCCAAAACACTCA R: GCAAACATGGCCTACACCTT	ATG8g	At3g60640	F: GGAGCGATGATGTCAACCA R: AGCAAGTTCACGGACAAGAA
ATG18a	At3g62770	F: AGGAACGGTCCATGTCTTTG R: AACGGTGTCTTTTGATGGC	ATG8h	At3g06420	F: AACACTTCTCTCAAACCGC R: ATTCAGAGTGCCTTCGATT
ATG18b	At4g30510	F: CTGCTATGAACGAGCTGCTG R: AACCCTGTTGTGCTTGAAC	ATG8i	At3g15580	F: TGCAACAACACTCTCCCTCA R: AACCAAAGGTTTTCTCACTGC
ATG18c	At2g40810	F: CTGTTTCAAATCCCAAGGA R: CCAGCTGCAAACAACCTTGA	ATG5	At5g17290	F: TAATCGCCTGTTGAGTTCC R: TCGACCATCTGCTTCTTCT
ATG18d	At3g56440	F: TGAGATCAAGCGACAAGG R: CTGGCTGGAGAAACAAGAGG	ATG10	At3g07525	F: TGGAGAACCTTTGCTTTGG R: ACTTTGGGAAAGCAGCTTGA
ATG18e	At5g05150	F: TGTGGTGGTCTGAAACAAA R: TGACGCAACACAGTCCTTTC	ATG12a	At1g54210	F: TGCTTGCTTTGTTGAAAGA R: CTTTTGTTTAGCCGACGGA
ATG18f	At5g54730	F: TGGAAGGGAGATGGAGATTG R: CGCTATGTACAGCACCGAGA	ATG12b	At3g13970	F: TGCTTGCTTTGTTGAAAGA R: CGAAGTTTTAACCCATGCC
ATG18g	At1g03380	F: CGAGGTGGTCCAGTTTCATT R: CAGCAACAACCAGCAAAAGA	VPS15	At4g29380	F: TAGCATGGACAACAGAGCAG R: GGTACCGACATGGAATGACC
ATG18h	At1g54710	F: CAATGGTATGGTTTACCCCG R: GACATGAGCGTCGTCGCTA	VPS34	At1g60490	F: CAGAGCACCGAAGCATAACA R: AAGGAGGAGTTGTCCAGGT
ATG3	At5g61500	F: TCATCCACACTTGCTGGTA R: CCGAGATCAAAGTCCATTGTG	NBR1	At4g24690	F: CCACTGGCGCTCATTCAAAG R: ACACGACGAGGATGCTTGT

*Annexe 2. Liste des amorces utilisées pour les analyses en qPCR (voir II.2.2.4).*

### Expression des gènes *ATG* au cours du développement de la silique

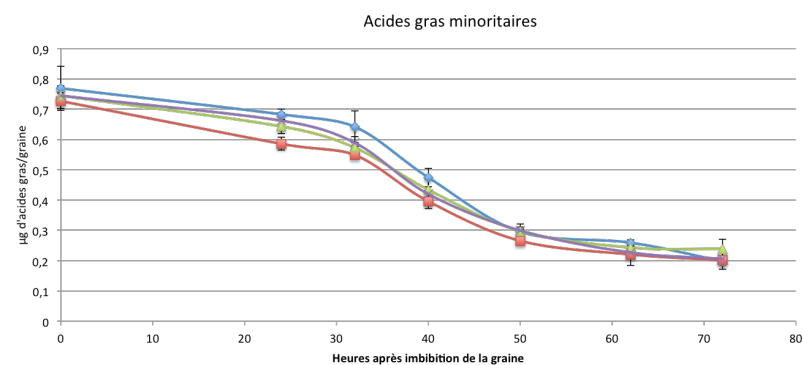
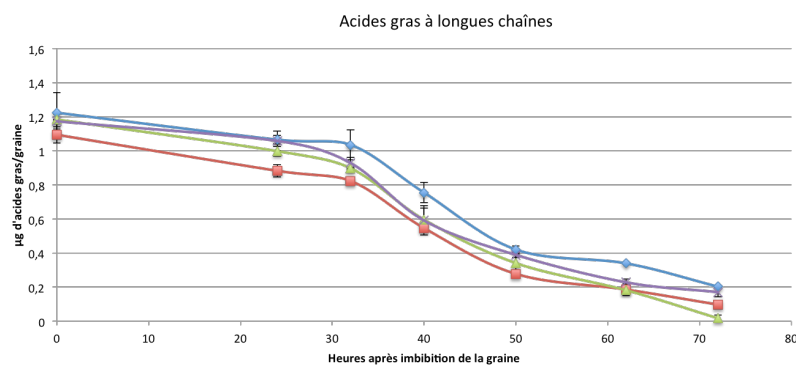
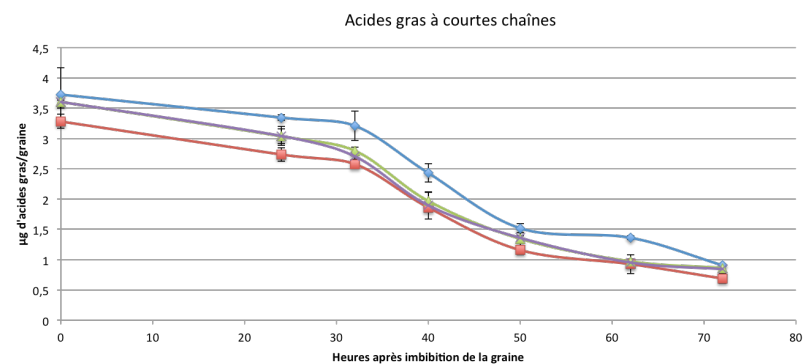
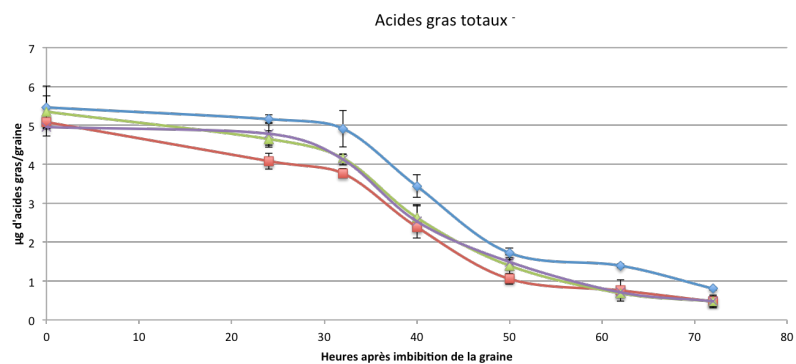


Annexe 3. Graphique présentant l'expression de 34 gènes d'autophagie mesurée par qPCR sur des ADNc issus de siliques de 4 à 28 JAF (Jours Après Fécondation de la fleur). Le gène de référence utilisé est *E1fa*. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés sur 3 réplicats techniques.

## Expression des gènes ATG au cours du développement de la graine

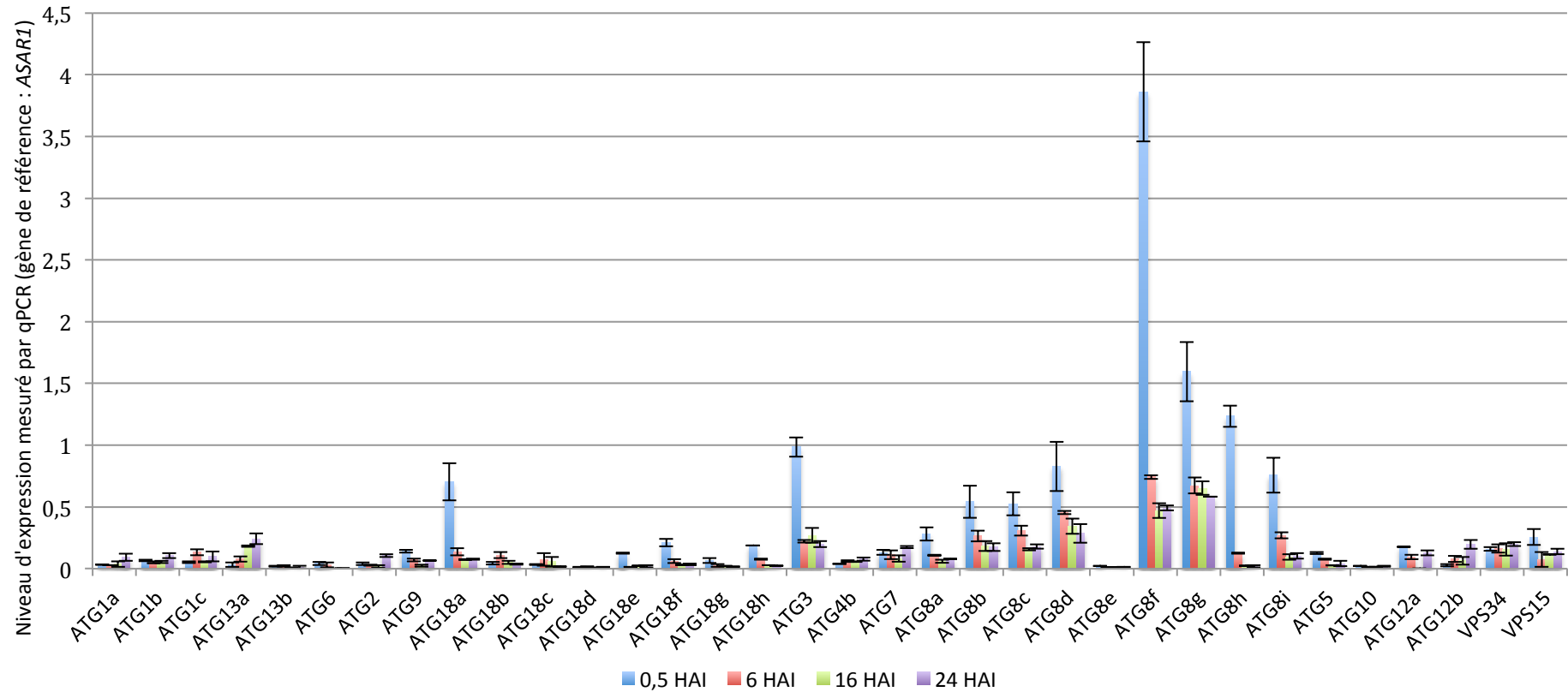


Annexe 4. Graphiques présentant l'expression normalisée par la valeur maximale d'expression individuelle de 34 gènes ATG au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis*. L'axe des abscisses est exprimé en jours après fécondation de l'ovule.



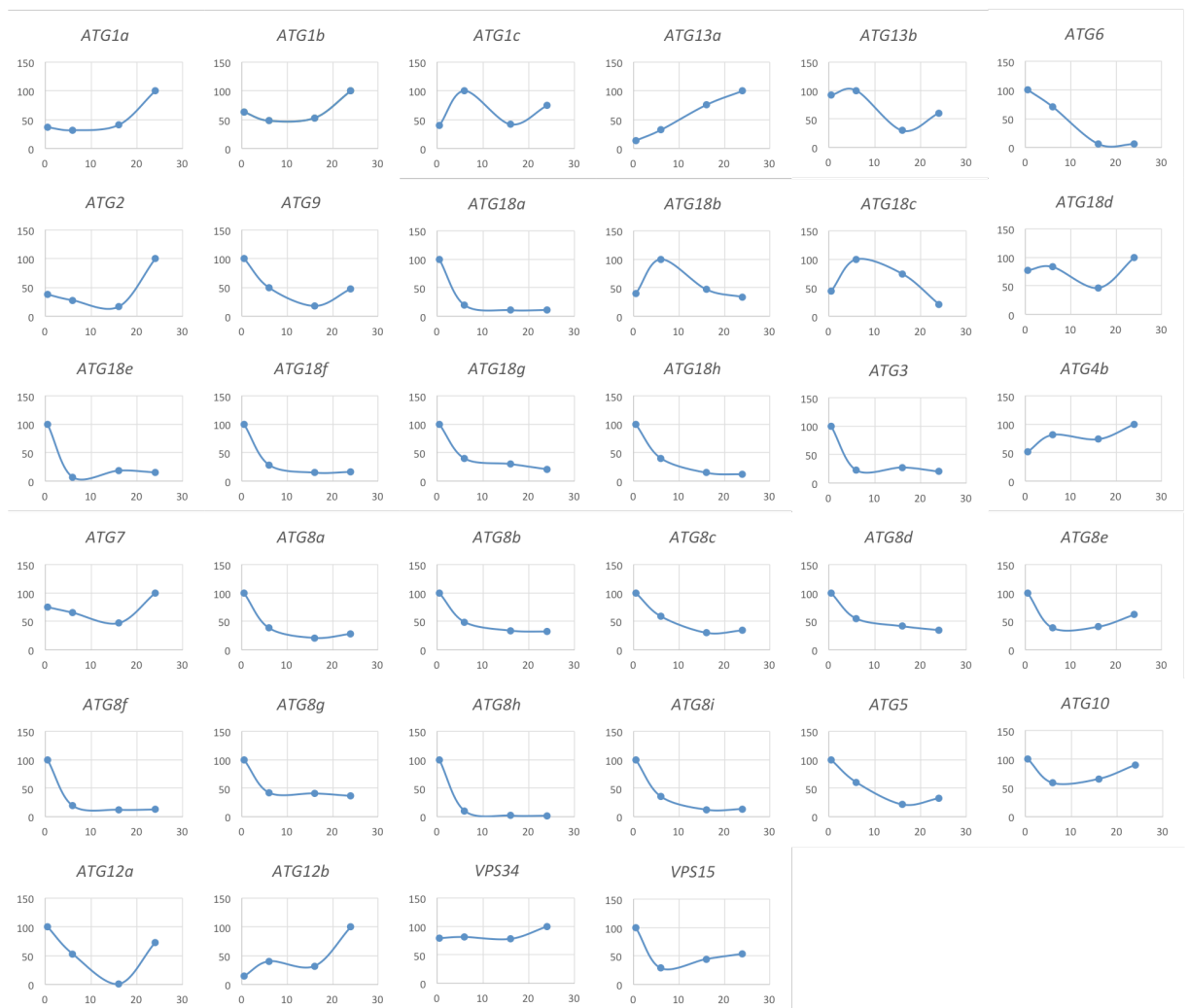
Annexe 5. Graphiques présentant les dosages d'acides gras totaux, à courtes chaînes (C18:1, C18:2, C18:3), à longues chaînes (C20:1, C22:1, C24:1) et minoritaires (C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0) au cours de la germination et du début du développement de la plantule jusqu'à 72h après imbibition de graines de génotypes Col, atg5.1, atg5.2 et atg2. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés sur 3 réplicats biologiques provenant d'une même culture.

## Expression des gènes *ATG* au cours de la germination de la graine



Annexe 6. Graphique présentant l'expression de 34 gènes d'autophagie mesurée par qPCR sur des ADNc issus de siliques de 0,5 à 24 HAI (Heures Après début d'Imbibition de graine). Le gène de référence utilisé est ASAR1. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types calculés sur 3 réplicats techniques.

## Expression des gènes ATG au cours de la germination de la graine



Annexe 7. Graphiques présentant l'expression normalisée par la valeur maximale d'expression individuelle de 34 gènes ATG au cours de la germination de la graine d'*Arabidopsis*. L'axe des abscisses est exprimé heures après début de l'imbibition de la graine.



**Titre :** Etude de l'autophagie au cours du développement et de la germination de la graine d'*Arabidopsis thaliana*

**Mots clés :** Autophagie, Remplissage de la graine, Remobilisation, Protéines de réserve, Développement de l'embryon

**Résumé :** L'autophagie est un processus vésiculaire des organismes eucaryotes permettant de véhiculer au sein d'autophagosomes des protéines dysfonctionnelles et/ou des organites défectueux qui sont apportés à la vacuole pour y être dégradés. Les acides aminés et les squelettes carbonés ainsi générés pourront ensuite être exportés vers le cytosol et recyclés. Ce travail de thèse a consisté à identifier les rôles que joue l'autophagie au cours du développement et de la germination de la graine d'*Arabidopsis thaliana*. Dans une première partie, les graines du mutant d'autophagie *atg5* ont été caractérisées d'un point de vue morphologique et leur remplissage en molécules de réserve a été étudié. Il a notamment été montré que la graine mutante présente une maturation accélérée et accumule plus de protéines que la graine sauvage. Dans une seconde partie, l'expression de gènes *ATG8* a été mise en évidence au cours du

développement de l'embryon, dans le phloème de la silique et du funicule, dans les téguments externes et internes, ainsi que dans l'endosperme de la graine. L'activité autophagique a été visualisée par l'observation en microscopie de structures autophagiques dans l'embryon en développement. Enfin, dans une dernière partie, les rôles de l'autophagie au cours de la germination ont été étudiés *via* le suivi de la mobilisation des molécules de réserve chez le mutant *atg5*, comparativement à des graines sauvages. Il a ainsi été montré que la graine mutante présente un défaut de mobilisation des protéines. Les résultats obtenus montrent donc que l'autophagie jouerait différents rôles dans la graine, notamment dans sa maturation et son vieillissement, dans l'apport des nutriments depuis la plante mère jusqu'à l'embryon, et encore dans la constitution des réserves au cours du développement, puis leur mobilisation après la germination.

**Title :** Study of autophagy during development and germination of *Arabidopsis thaliana* seed

**Keywords :** Autophagy, Seed filling, Remobilization, Storage proteins, Embryo development

**Abstract :** Autophagy is a vesicular process of eukaryotic organisms, which consists of the transport of dysfunctional proteins and/or defective organelles within autophagosomes toward the vacuole in order to be degraded. The generated amino acids and carbon skeletons are transported to the cytosol and recycled. The aim of this thesis work was to identify the roles of autophagy during seed development and germination in *Arabidopsis thaliana*. In the first part, seeds of the *atg5* autophagy mutant have been morphologically characterized in order to study the accumulation of storage molecules. We demonstrated that *atg5* mutant seeds are affected by an accelerated maturation and accumulate more proteins than wild type seeds. In a second part, the expression of *ATG8* genes has been exhibited during the

embryo development, into the phloem of silique and funiculus, in the outer and the inner integument, and in the seed endosperm. Autophagic activity has been visualized by microscopy observation of autophagic structures in the developing embryo. Finally, in the last part, the roles of autophagy during germination have been studied by monitoring the mobilization of storage molecules in the *atg5* mutant seeds and compared with the wild type. We thus established that mutant seeds are affected by a defect in protein mobilization. These results show that autophagy may play several roles in seeds, for instance in the ageing and maturation processes, in the transport of nutrients from the mother plant to the embryo, or in the constitution of storage compounds during seed development and their mobilization after germination.

