



HAL
open science

Study of the interactions between proline catabolism and nitrogen metabolism in seed development of *Arabidopsis thaliana*

Corentin Dourmap

► **To cite this version:**

Corentin Dourmap. Study of the interactions between proline catabolism and nitrogen metabolism in seed development of *Arabidopsis thaliana*. *Vegetal Biology*. Sorbonne Université, 2022. English. NNT : 2022SORUS312 . tel-04735086

HAL Id: tel-04735086

<https://theses.hal.science/tel-04735086v1>

Submitted on 14 Oct 2024

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.

Sorbonne Université

École doctorale 515 – Complexité du Vivant

Institut d'Écologie et des Sciences de l'Environnement de Paris (iEES-Paris)

Équipe Adaptations des Plantes aux Contraintes Environnementales (APCE)

Étude des interactions entre le catabolisme de la proline et le métabolisme de l'azote dans le développement de la graine chez *Arabidopsis thaliana*

Par **Corentin DOURMAP**

Thèse de doctorat de Biologie

Spécialité Physiologie Moléculaire Végétale

Dirigée par Anne GUIVARC'H et Arnould SAVOURÉ

Présentée et soutenue publiquement le 11 octobre 2022

Devant un jury composé de :

M. Christophe BAILLY	Pr Sorbonne Université	Président
Mme Gwyneth INGRAM	DR ENS Lyon	Rapporteuse
Mme Annie MARION-POLL	DR INRAE (Versailles)	Rapporteuse
M. Graham NOCTOR	Pr Université Paris-Saclay	Examineur
M. Younes DELLERO	CR INRAE (Rennes)	Examineur
Mme Anne GUIVARC'H	MC HDR Sorbonne Université	Directrice de Thèse
M. Arnould SAVOURÉ	Pr Sorbonne Université	Directeur de Thèse

*« A un moment donné, tout va partir en vrille ; absolument tout.
Et vous vous direz, ça y est : c'est la fin.
Vous pouvez l'accepter, ou vous pouvez vous mettre au travail.
Vous commencez par résoudre un problème. Puis le problème suivant. Puis le suivant.
Et quand vous aurez résolu assez de problèmes, vous pourrez rentrer à la maison »*

(Mark Watney, Seul sur Mars, 2015)

Remerciements

Je souhaiterais remercier tout d'abord **Gwyneth INGRAM** et **Annie MARION-POLL**, rapporteuses ainsi que **Graham NOCTOR**, **Younes DELLERO** et **Christophe BAILLY**, examinateurs d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Je vous souhaite de trouver autant de plaisir dans la lecture de ce manuscrit que j'en ai pris à y travailler durant ces trois années.

Car oui, ce furent certes trois ans d'un travail dense et de longue haleine ; trois ans qui sont passés à une vitesse folle mais trois ans que je qualifierai volontiers d'heureux et que je ne regrette pas d'avoir choisi de passer ici, sur ce sujet, dans ce laboratoire, avec cet entourage. En effet, ce choix n'était pas une évidence quand le 8 juillet 2019, les résultats du concours de l'école doctorale sont tombés. J'ai pris 36h pour jauger ma situation, peser le pour, le contre et évaluer ce qu'une thèse pourrait m'apporter. Au moment d'en faire le bilan, cette thèse aura humainement rempli son contrat. Il y a en effet quelque chose de délectant de sentir que l'on évolue, que l'on mature, et que l'on se sent de nouveau avancer ; que les voyants auparavant rouges repassent un à un au vert. Et je me dois de remercier beaucoup de monde pour avoir pris part à ce travail et à cette réussite.

En premier lieu, je remercie mes directeurs de thèse **Anne GUIVARC'H** et **Arnould SAVOURE**. Vous m'aviez encadré au cours de mon stage M2, je ne m'engageai donc pas dans l'inconnu avec de tels directeurs de thèse en qui j'avais foi. J'ai plusieurs fois entendu avant de m'engager « tu verras, à la fin de ta thèse, tu ne pourras plus supporter tes directeurs ». Il se trouve que l'on approche dangereusement de la fin et que ce n'est toujours pas le cas. Vous formez un tandem d'une complémentarité rare tant en termes d'expertise scientifique qu'humainement. Vos réflexions constructives ont fait avancer le projet. J'ai pu avoir avec vous une certaine liberté de parole et vous avez également su composer avec mon côté très planificateur.

Merci à toi Anne d'avoir toujours été présente, d'avoir eu cette disponibilité pour répondre à mes questions, clarifier encore et encore les notions d'anatomie, de vocabulaire ou de développement, d'avoir cette franchise qui est tellement plus efficace et appréciable qu'une communication bourrée d'implicites. Merci également d'avoir assuré parfois ce que j'appellerai le « SAV » c'est-à-dire discuter pour apaiser des frustrations, des inquiétudes ou même revenir au labo en toute fin de rédaction pour ré-injecter un peu de sang-froid. J'ai également apprécié la possibilité de parler de beaucoup d'autres choses que de la thèse.

Merci à toi Arnould d'avoir également été présent tout au long du projet, d'avoir cet optimisme qui rend enthousiaste et donne un surplus d'énergie. Merci également pour ta disponibilité qui permet de venir frapper à la porte du bureau à peu près n'importe quand pour tout type de question ; pour ce calme parfois surprenant mais aussi d'avoir compris mon logiciel en ne s'arc-boutant pas sur certaines idées ou certains projets mais simplement en laissant infuser davantage. Ce fut le cas pour évaluer la pertinence de certaines manip ou pour aller en Allemagne.

Je souhaite également remercier tous les autres membres de l'équipe Adaptations des Plantes aux Contraintes Environnementales (APCE) pour leur gentillesse et l'ambiance chaleureuse qui règne dans cette équipe bien sûr mais aussi pour leur aide. Merci à **Régis MALDINEY** présent pendant le M2 qui m'a notamment initié aux expériences réussies sur des ARN, mais également à **Séverine**

PLANCHAIS qui a pris le relais avec pleins de conseils sur les analyses de transcrits et la ddPCR mais aussi pour manier des bases de données bioinformatiques. Merci à **Cécile CABASSA** que j'ai pu déranger pour trouver des protocoles de dosage ou reprendre leurs calculs. Merci à **Emilie CRILAT** sans qui mes compétences en matière de clonage, golden gate et transformations seraient restées près du niveau de la mer. Merci également à **Sandrine LANFRANCHI**, **Marianne BORDENAVE-JACQUEMIN** et **Pierre CAROL** pour leur disponibilité à répondre à mes questions diverses et pour leurs réflexions et idées lors de discussions et de réunions. Je n'oublie pas les anciens membres temporaires de l'équipe APCE à commencer par **Yao ZHENG**, collègue doctorant parti un an avant moi et voisin de bureau pendant 2 ans et demi ; **Ahmed EL MOUKHTARI** et **Mariam KSIAA** présents par intermittence du fait de leur co-tutelle mais d'une gentillesse infaillible. Merci enfin aux différents stagiaires qui ont fait partie de l'équipe, je n'en nommerai que deux : **Nina DURAND** qui prend la relève des doctorants APCE et **Ludvine BRAJON**, forçat de l'été pour rédiger un rapport de stage mais également future doctorante iEES. Je leur souhaite toute la réussite possible.

Je me dois de remercier également toutes les personnes qui m'ont accueillis, aidés et formés dans les différents laboratoires où j'ai pu me rendre.

Sébastien BAUD tout d'abord à l'Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB) de Versailles pour toute la partie dissection de graines et analyse de lipides. Merci pour ton accueil, ta gentillesse, toutes tes réflexions et pour ta très grande efficacité. Je n'aurai pas pensé être capable de disséquer des graines de 0.5 mm mais contre toute attente, j'y suis parvenu grâce à toi.

Merci également à **Céline MASCLAUX-DAUBRESSE** et **Anne MARMAGNE** pour leur accueil également à l'INRAE de Versailles où j'ai pu découvrir les analyses élémentaires et faire des dosages de nitrates, nitrites et ammonium mais aussi et surtout d'avoir été à l'origine de ce projet. Céline a pris de son temps pour m'aider et pour discuter du projet et des stratégies mises en œuvre, notamment en matière de publications et pour l'analyse de données de protéomique. Merci également pour cela.

Merci à **Solenne BERARDOCCO** et **Nathalie MARNET** qui m'ont également accueilli à l'Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes (IGEPP) et à la Plateforme de Profilage Métabolique et de Métabolomique (P2M2) au Rheu (35). Vous avez pris le temps de m'expliquer et de me former à la métabolomique, de l'extraction des composés à leur analyse en GC et UPLC puis pour toute l'exploitation des résultats bruts. Merci également à **Alain BOUCHEREAU** qui a coordonné cela au début.

Merci à **Holger EUBEL** et **Nils RUGEN** pour tout leur accompagnement au cours de l'analyse protéomique. Nils m'a particulièrement aidé pour toute la partie expérimentale et Holger pour toute la théorie sur la spectrométrie de masse et le fonctionnement du TIMS-TOF. Merci également à **Hans-Peter BRAUN** (et toute son équipe) de m'avoir accueilli dans son Abteilung Pflanzenproteomik de l'Institut für Pflanzengenetik à Hanovre (Allemagne). Vielen Dank für Ihre Hilfe und Ihre Nettigkeit wenn ich in Hannover war (Ja ich habe deutsch gelernt aber ich habe lange kein deutsch gesprochen und ich habe nicht deutsch zu sprechen getraut).

Au sein de mon laboratoire, l'Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement (iEES-Paris) je souhaite également remercier **Matthieu DACHER** que j'ai pu consulter lors de l'analyse statistique des données de métabolomique. J'y ajouterai **Samuel CHARBERET** pour son assistance dans l'utilisation de R pour analyser les jeux de données de métabolomique et de protéomique.

Je voudrais également remercier les membres de mon comité de suivi de thèse pour leurs réflexions très intéressantes qui ont fait avancer le projet et pour leur bienveillance : de nouveau **Sébastien BAUD, Olivier LEPRINCE** et **Marianne JAUBERT**.

Au sein du campus de Jussieu, je voudrais également remercier **Stéphanie AGYS, Patrick DUMONT, Emilie DAVEAU** et **Carina RODRIGUES-MENDES**, techniciens dans les serres ou les chambres de culture pour l'entretien des plantes. Votre travail efficace fait économiser beaucoup de temps, je m'en suis particulièrement rendu compte pendant le premier confinement dû au Covid quand il a fallu faire nous même l'arrosage, le tuteurage, la récolte, le battage...

Au sein des instances de l'école doctorale Complexité du Vivant (ED 515), je voudrais remercier **Frédéric DEVAUX**, directeur et interlocuteur régulier pour sa disponibilité. Merci également à **Samira ERRAJI**, gestionnaire de l'ED qui, début octobre 2019, au tout début de la thèse, alors que je venais dans son bureau pour des démarches administratives et que je naviguais encore à vue m'a dit : « si vous communiquez tout se passera bien, toutes les thèses qui se passent mal, c'est un problème de communication ». Ce n'est sans doute rien dit comme ça, mais je m'en souviens et m'en souviendrai pendant longtemps.

Au cours de cette thèse, j'ai également été Chargé de Mission d'Enseignement (CME). Je remercie donc **Anne-Sophie LEPRINCE** et **Jean-Pierre BOULY** pour leur accompagnement en première année ce qui m'a permis de commencer en douceur cette activité d'enseignement. Merci aussi aux étudiants que j'ai pu avoir en TD et TP. Cette activité d'enseignement n'a pas révolutionné mon projet professionnel mais elle a confirmé mon goût pour la communication. J'ai pris du plaisir à vous faire cours, avec une aisance que je n'aurais moi-même pas forcément soupçonné.

Merci à **Claudine PRIEUR** au collège doctoral et à **Alexandra DE KAENEL** pour l'organisation et la formation au concours Ma Thèse en 180 Secondes (MT180). C'est une chance d'avoir pu y participer, j'en garde un très très bon souvenir, une petite fierté aussi, et surtout beaucoup d'outils qui me servent encore aujourd'hui pour parfaire ma communication orale.

Au sein de l'iEES, je voudrais aussi dire merci aux gestionnaires **Carole BOUSQUET, Johana AZZI** et **Véronique MARCIAT**, à la secrétaire générale **Paola PARADISI** qui ne sont pas sur les publications et qui pourtant nous rendent la vie plus facile en traduisant en démarches simple, le langage et les méandres (tous plus obscurs les uns que les autres) de l'administration publique (commandes, marchés, ordres de missions, autorisations diverses, ...). Merci également à **Martine MAIBECHE**, directrice de l'iEES pour sa gentillesse et son soutien pour l'organisation des Journées de Rencontre des Jeunes Chercheurs (JRJC).

J'ajouterai un petit mot aussi pour toutes ces petites mains que l'on ne regarde presque pas et qui pourtant assurent des tâches essentielles au sein de ce campus : le personnel de ménage, le personnel de restauration, de sécurité. Je ne connais pas vos noms mais je tiens à vous mentionner ici en guise de reconnaissance de votre travail.

Enfin, que serait ce laboratoire et les bons souvenirs créés au cours de ce doctorat sans les jeunes chercheurs (JC) ? A midi, à la pause, au pot du vendredi ou en dehors du labo pour des films, des soirées ou des JRJC, la communauté des jeunes chercheurs d'iEES apporte entraide, soutien, convivialité, décompression, amitié, ouverture d'esprit... La thèse aurait été tout autre sans vous ! J'en cite quelques-uns : **Samuel Charberet, Basile Finand, Antoine Taupenot, Vincent Zaninotto, Arthur Fauviau, Léna Klay, Fatima Garcia Ibarra, Aurélie Jeantet, Théo Bodineau, Marie Gressler, Chloé Chabaud, Paul Chatelain, Souleyman Bakker, Alice Ardichvili, Hajar Ben Moussa, Fatima El Mekdad, Thomas Cortier, Damien Gergonne**. Je pense aussi aux « vieux » JC, ceux qui sont partis au fur et à mesure de ma thèse : **Youssef Yacine, Lauren Jacquier, Jérôme Eschenbrenner, Adam Khalife, Romain Honorio, Iry Andrianjara, Alexis Dollion**. J'ai passé de très bons moments et appris énormément de choses au contact de tous ces gens de valeurs. C'est sans doute avec un petit pincement que je les abandonnerai pour d'autres aventures.

Merci aussi à **Alain D'Harlingue** et **Baptiste Vancostenoble** qui sont venus vers moi à Jussieu au début et avec qui j'ai également partagé de bons moments.

Je finirais ces remerciements de thèse par ma famille : mon père **Jean-Luc DOURMAP** et ma mère **Christine BAUBIN** qui, par leur éducation et leur soutien m'ont en partie permis d'arriver jusqu'ici et d'être ce que je suis. Merci pour ce rôle de soupape de décompression : depuis 8 ans, je peux revenir quand je veux dans ce QG nord-finistérien, parfois fatigué, usé, en proie au doute ou à la morosité. Le temps pour moi de lâcher ce qui ne va pas, de discuter, de voir la mer et de respirer les embruns pour repartir rechargé à bloc. Un grand merci également à mes trois grandes sœurs **Marion DOURMAP** (et Guillaume et Loeiz et Oana), **Morgane DOURMAP** et **Coline DOURMAP**, soutien et conseillères de l'ombre. Je ne crois pas avoir pris beaucoup de décisions vraiment importantes sans en avoir discuté avec vous, jusqu'ici je n'ai jamais regretté mes choix donc merci.

Je voudrais aussi remercier mes amis et proches, que je ne vais/peux pas tous citer. Mention spéciale tout de même à **Catherine KLEIN** qui n'est jamais très loin depuis la classe de 2^{nde} et qui, à Paris, m'a motivé à l'ESC XV puis avec Adidas Runners entre autres. Ces années parisiennes seraient plus compliquées à supporter si tu n'avais pas été là. Je crois qu'il faut également que je remercie **Maryline LEON** avec qui j'ai partagé quelques années et qui a sans doute eu une lucidité un peu supérieure à la mienne au sortir des résultats du concours de l'ED. Il a fallu faire quelques choix un peu compliqués au cours de cette thèse mais je ne les regrette pas.

Enfin, cette thèse étant l'étape finale d'un long cursus, je souhaite remercier 5 personnes pour leur contribution très éloignée mais néanmoins importante : **Annick LEHINGUE, Evelyne CARVAL** et **Hervé KEMPF**, professeurs de SVT respectivement en classe de 3^e, 1^{ère} S et Terminale S ; car c'est avec eux qu'ont grandi mon intérêt préexistant et ma curiosité pour la biologie. Je voudrais également remercier **Marie DUFRESNE** et **Miriam GATTI** qui m'ont encadré lors de mon stage de licence à l'IPSE à Orsay, véritable révélateur de mon projet de faire une thèse. Merci à Miriam pour m'avoir montré

que la science pouvait être fun et merci à Marie de m'avoir montré que j'avais les moyens d'avoir de l'ambition.

J'ajoute une petite dédicace au Covid-19 qui en arrêtant tout au printemps 2020, m'a fait faire un bond en avant en termes de réflexion et de prise de recul. Je fais également une autre petite dédicace aux personnes qui ces 25 dernières années ont à un moment douté de moi. Cette thèse est une réponse : vous aviez tort.

Sommaire

Liste des Abréviations	9
Contexte général.....	13
Chapitre 1 : Introduction générale.....	15
I. Métabolisme de l'azote	17
1. Importance de l'azote chez les plantes.....	17
2. Métabolisme de l'azote au cours de la vie végétative.....	19
2.1. Les différentes formes d'azote assimilables par les plantes	19
2.1.1. Nitrates	19
2.1.2. Ammonium	20
2.1.3. Molécules organiques.....	20
2.2. Mécanismes d'absorption des nitrates	21
2.2.1. Réduction des nitrates en ammonium.....	23
2.3. Mécanismes d'assimilation de l'ammonium	23
3. Métabolisme de l'azote au cours de la phase reproductrice	26
3.1. La remobilisation de l'azote	26
4. Balance C/N.....	27
4.1. Evidences de l'influence réciproque des métabolismes carboné et azoté.....	27
II. Développement reproducteur des Angiospermes.....	31
1. Mise en place des organes reproducteurs et gamétogenèse.....	31
1.1. Organe reproducteur femelle et gamétogenèse.....	31
1.2. Développement du gamétophyte mâle.....	33
2. Pollinisation et fécondation	35
2.1. Pollinisation	35
2.2. Fécondation.....	36
3. Embryogenèse.....	37
3.1. Organogenèse	37
4. Développement de l'albumen.....	39
4.1. Importance de l'albumen	39
4.2. Phase syncytiale	39
4.3. Cellularisation.....	41
5. Signalisation et régulations du développement précoce de la graine.....	43

5.1. Régulations épigénétiques et empreintes parentales	43
5.2. Communications embryon-albumen.....	44
5.3. Signalisation métabolique et hormonale	45
6. Phase de maturation de la graine	48
6.1. Transition embryogenèse-maturation.....	48
6.2. Verdissement et photosynthèse	49
6.2.1. Le triple rôle de la photosynthèse embryonnaire	51
6.3. Croissance de l'embryon et régression de l'albumen	55
6.4. Formation des réserves lors de la phase de maturation	57
6.4.1. Remobilisation du Carbone	57
6.4.2. Les réserves lipidiques	61
6.4.2.1. Synthèse des acides gras	61
6.4.2.2. Synthèse des Triacylglycérols et stockage des lipides de réserve	63
6.4.3. Réserves protéiques.....	65
6.4.3.1. Protéines associées aux oléosomes : oléosines, caléosines et stéroléosines	65
6.4.3.2. Protéines de réserve : Cruciférines et Napines	66
6.5. Lipides et protéines de réserve : deux processus liés et régulés par des acteurs moléculaires communs	67
7. Dernière phase du développement de la graine : la déshydratation contrôlée.....	68
7.1. HSP et LEA : protéines incontournables de la déshydratation	71
7.1.1. Les Heat Shock Protein (HSP).....	71
7.1.2. Les Late Embryogenesis Abundant proteins (LEA)	72
7.2. Accumulation de métabolites libres	72
7.2.1. Sucres.....	73
7.2.1. Acides aminés	74
III. La proline : un acide aminé aux fonctions multiples et aux implications métaboliques encore nombreuses à découvrir	75
1. La proline et son métabolisme	75
1.1. Synthèse de proline	75
1.2. Dégradation de la proline	77
1.3. Liens du métabolisme de la proline avec d'autres processus moléculaires	78
1.3.1. Le cycle P5C-proline.....	78
1.3.2. La voie de l'OAT	79
1.3.3. Le métabolisme azoté.....	81
1.4. Rôles de la proline et de son métabolisme	81
2. Importance du métabolisme de la proline dans la reproduction chez Arabidopsis	83

3. Rôle du métabolisme de la proline dans la sénescence et le métabolisme énergétique	84
3.1. Mise en évidence chez l'Homme	84
3.2. L'importance des co-facteurs liés au métabolisme de la proline	85
Contexte de l'étude et objectifs.....	88
Chapitre 2 : Etude des capacités de remobilisation du mutant <i>p5cdh</i>	89
Abstract	94
Introduction.....	95
Materials and Methods	96
Results.....	99
Discussion	107
References.....	111
Supplementary figures.....	115
Chapitre 3 : Étude du rôle de <i>P5CDH</i> dans le développement de la graine	117
Abstract	120
Introduction.....	121
Materials and methods	123
Results.....	129
Discussion	145
References	152
Supplementary figures.....	156
II. Résultats et discussion supplémentaires.....	173
1. Étude de la division cellulaire	173
2. Étude de la signalisation hormonale	173
3. Étude de l'influence de la forme moléculaire d'azote dans le phénotype	175
4. Étude de l'origine spatiale du phénotype par complémentation fonctionnelle ...	176
Chapitre 4 : Impact de la mutation <i>p5cdh</i> sur le gamétophyte mâle : une nouvelle histoire ?	179
I. Le phénotype <i>p5cdh</i> n'est que partiellement lié à l'embryon.....	183
II. La mutation <i>p5cdh</i> induit une répartition non mendélienne des allèles	187
III. La mutation <i>p5cdh</i> entraîne une perte de la viabilité du pollen.	189
Discussion générale et perspectives	195
I. Discussion générale	197

1.	L'absence de P5CDH induit de grandes perturbations de la balance Carbone/Azote	197
1.1.	10mM de nitrates est une concentration non-limitante en azote	197
1.2.	Les fortes teneurs en ammonium sont le reflet d'une perturbation Carbone/Azote	199
1.3.	Le recyclage de l'azote est perturbé chez les mutants <i>p5cdh</i>	200
2.	Analyse de la toxicité du P5C et de l'existence d'un cycle P5C-Proline	201
2.1.	Les niveaux de P5C ne présentent pas de toxicité dans les graines des mutants <i>p5cdh</i>	201
2.2.	La mutation <i>p5cdh</i> n'induit pas de cycle P5C-Proline	202
3.	Impact du catabolisme de la proline dans l'équilibre redox et la production d'énergie	203
3.1.	Liens entre le catabolisme de la proline et l'état redox des cellules	203
3.2.	Quels liens entre le catabolisme de la proline et la production d'énergie au cours de la maturation ?	204
4.	Quelle origine tissulaire pour le phénotype <i>p5cdh</i> ?	205
4.1.	Les parties végétatives de la plante ne sont pas à l'origine du phénotype <i>p5cdh</i>	205
4.2.	L'environnement tissulaire de l'embryon influe sur son développement	205
4.3.	Il n'y a pas de désorganisation spatiale de la mise en réserve des lipides chez <i>p5cdh</i>	206
5.	Comment expliquer les fortes teneurs en acides aminés libres au cours de la maturation des graines chez le mutant <i>p5cdh</i> ?	207
6.	Les fortes teneurs en proline peuvent-elles avoir des effets osmotiques ?	208
7.	Impacts des niveaux de proline sur la signalisation hormonale régulant la maturation	209
II.	Perspectives	211
1.	Le déficit énergétique et le déséquilibre redox sont-ils à l'origine du phénotype des graines du mutant <i>p5cdh</i> ?	211
2.	Quels sont les rôles des différents compartiments de la graine dans le phénotype <i>p5cdh</i> ?	212
3.	Le rôle de l'impact de la mutation <i>p5cdh</i> sur le développement du pollen	213
4.	L'intérêt de P5CDH dans une perspective agronomique	213
	Matériels et Méthodes	215
I.	Matériel	217
1.	Matériel Végétal	217
1.2.	Lignées sauvage et mutantes d'Arabidopsis	217
1.3.	Créations de lignées rapportrices mutantes	217

1.4.	Construction de lignées traductionnelles.....	217
2.	Souches Bactériennes utilisées lors de la construction de lignées transgéniques	218
2.1.	<i>Escherichia coli</i>	218
2.2.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	218
II.	Méthodes.....	219
1.	Construction de lignées transgéniques.....	219
1.1.	Plasmides utilisés pour les clonages.....	219
1.2.	Clonage des promoteurs <i>RGP3</i> et <i>At5G16460</i> dans le plasmide d'entrée pICH41295	220
1.3.	Transformation de bactéries <i>E. coli</i> DH5α avec le plasmide d'entrée pICH41295 cloné et sélection des transformants	220
1.4.	Purification de plasmides et vérification de l'intégrité de l'insert par séquençage	221
1.5.	Clonage des promoteurs <i>RGP3</i> ou <i>At5G16460</i> , de la séquence codante de P5CDH, GFP et du 3'UTR dans le plasmide de destination pICH86966 par la technique du Golden Gate.....	221
1.6.	Transformation de bactéries <i>E. coli</i> XL1-Blue avec le plasmide d'entrée pICH86966 cloné, sélection des transformants, purification de plasmides et vérification de l'intégrité de la séquence.	222
1.7.	Transformation de bactéries <i>A. tumefaciens</i> avec le plasmide Golden Gate par électroporation	222
1.8.	Transformation des plantes d' <i>A. thaliana</i> par la technique du « floral dip ».....	223
1.9.	Sélection des transformants.....	223
2.	Conditions de culture des différentes lignées d' <i>Arabidopsis</i>	224
2.1.	Culture sur sable.....	224
2.1.1.	Composition des solutions nutritives nitrates	224
2.2.	Culture sur terreau	225
2.3.	Cultures de hampes florales isolées	225
3.	Teneur relative en eau	226
4.	Techniques d'imagerie	226
4.1.	Microscopie optique	226
4.1.1.	Technique d'éclaircissement des siliques et graines en cours de développement.....	226
4.1.2.	Activités GUS.....	227
4.2.	Mise en évidence des ROS.....	227
4.3.	Microscopie à fluorescence	227
4.4.	Microscopie électronique à Balayage.....	228
5.	Visualisation des composés de réserves dans les graines	228
5.1.	Mise en évidence des lipides dans la graine.....	228
5.2.	Mise en évidence de l'amidon dans la graine	228
6.	Tests de germination.....	228

7.	Tests de viabilité.....	229
7.1.	Test de viabilité du pollen	229
7.2.	Test de viabilité de l'embryon	229
8.	Détermination de la cinétique de développement des siliques et des graines.....	230
9.	Techniques de biologie moléculaire	231
9.1.	Génotypage	231
9.1.1.	Extraction d'ADN génomique au bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB).....	231
9.1.2.	Extraction alternative d'ADN génomique	231
9.1.3.	PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne	231
9.1.4.	Migration des acides nucléiques par électrophorèse sur gel d'agarose.....	232
9.2.	Analyses de transcrits.....	232
9.2.1.	Extraction des ARN totaux par précipitation au chlorure de lithium	232
9.2.2.	Extraction des ARN totaux avec le RNeasy Plant Minikit (QIAGEN)	233
9.2.3.	Dosage des ARN	233
9.2.4.	Rétro-transcription	234
9.2.5.	ddPCR : PCR Digitale en Gouttelettes	234
10.	Techniques de biochimie des protéines.....	235
10.1.	Extraction de protéines totales	235
10.1.1.	Méthode 1 :.....	235
10.1.2.	Méthode 2 :.....	235
10.2.	Dosage de protéine au réactif de Bradford	236
10.3.	Séparation de protéines sur gel SDS-PAGE.....	236
10.4.	Western Blot.....	237
11.	Évaluations individuelles de teneurs en métabolites libres, ions et composés de réserves	237
11.1.	Dosage de proline.....	237
11.2.	Dosage de P5C.....	238
11.3.	Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	238
11.4.	Dosage de l'amidon	239
11.5.	Dosage de nitrates, nitrites et ammonium.....	240
11.5.1.	Extraction de nitrates, nitrites et ammonium.....	240
11.5.2.	Dosage de nitrates et de nitrites.....	240
11.5.3.	Dosage de l'ammonium	241
12.	Analyses élémentaires.....	241
13.	Analyses Omiques	242
13.1.	Métabolomique.....	242

13.1.1.	Extraction d'acides aminés, acides organiques et sucres	242
13.1.2.	Dérivation des acides aminés et analyse UPLC	242
13.1.3.	Dérivation des acides organiques et sucres et analyse GC	243
13.1.4.	Analyse métabolomique par GC-MS	244
13.1.5.	Extraction et Analyse d'acides gras GC sur graines sèches	244
13.2.	Protéomique	246
13.2.1.	Principe	246
13.2.2.	Extraction de protéines totale et digestion	246
13.2.3.	Purification, dessalement de peptides et préparation des échantillons	247
13.2.4.	Analyse UPLC-MS/MS	247
14.	Bioinformatique	248
14.1.	SnapGene	248
14.2.	Perseus	248
14.3.	R-Studio	248
14.4.	Virtual Plant, Kegg et MapMan	248
14.5.	MeV	249
14.6.	Bases de données utilisées	249
14.6.1.	Tair	249
14.6.2.	Uniprot	249
	Références Bibliographiques	251
	Annexes	277
	Annexe 1 : Amorces utilisées au cours de l'étude	279
	Amorces de géotypage	279
	Amorces de clonage	279
	Amorces de ddPCR	279
	Annexe 2 : Composition des solutions nutritives utilisées dans le cadre du gradient de nitrates 0-2mM	281

Liste des Abréviations

°C	degrés Celcius	CAT1	CATALASE 1
¹⁴ C	isotope 14 du carbone	CDS	séquence codante
¹⁵ N	isotope lourd de l'azote	CLC	CHLORIDE CHANNEL
2S	Napine	CLE	CLAVATA 3
A	Adénine	CLO	CALEOSINE
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CO	CONSTANS
aa	acide aminé	CoA	Coenzyme A
AAP	AMINO ACID PERMEASE	Col-0	Columbia-0
ABA	Acide Abscissique	CRA1	Cruciférine
ABI	ABA INSENSITIVE	CRB	Cruciférine
ABRE	élément de réponse à l'ABA	CRC	Cruciférine
Abs	Absorbance	CRU2	Cruciférine
ACP	Acyl Carrier Protein	CTAB	Cétyltriméthylammonium
ADH1	ALCOOL DESHYDROGENASE 1	CTP	Cytosine Tri Phosphate
ADN	Acide Désoxyribonucléique	CycB1	Cycline B1
ADN-T	ADN de transfert	DAG	diacylglycérol
AG	acide gras	DAB	tetrahydrochloride de diaminobenzidine
AGL62	AGAMOUS-LIKE 62	DAPI	4,6-diamino-2-phénylindole
ALE1	ABNORMAL LEAF SHAPE	DAS	Jours après semis
α-CG / α-KG	Alpha-cétoglutarate	dATP	désoxyAdénosine Tri Phosphate
AMG	AMYLOGLUCOSIDASE	DCMU	3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl-urée
AMT1	AMMONIUM TRANSPORTER 1	dCTP	désoxy Cytosine Tri Phosphate
ANT	ADENINE NUCLEOTIDE TRANSLOCASE	ddPCR	PCR digitale en Gouttelettes
AOX	Alternative Oxidase	DEPC	diéthyl pyrocarbonate
ARN	Acide Ribonucléique	dGTP	désoxy Guanosine Tri Phosphate
ARNm	ARN messenger	DIC	Contraste Interférentiel Différentiel
ARR-A	ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR de type A	DIS	Sénescence induite par l'obscurité
AS	Asparagine Synthétase	dNTP	désoxynucléotide phosphate
Asn	Asparagine	DO	Densité Optique
ASN	ASPARAGINE SYNTETHASE	DTT	Dithiothréitol
ATP	Adénosine TriPhosphate	dTTP	désoxy Thymosine Tri Phosphate
BABA	Acide beta-aminobutyrique	DW	Matière sèche
BCAA	Acide aminé à chaine branchée	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
bp	paire de base	EDTA	acide éthylène diamine triacétique
BSA	Bovine Serum Albumine	eGFP	enhanced GFP
C	Carbone	ESR	Zone entourant l'embryon
C4:0	acide butyrique	ε	Coefficient d'extinction molaire
C16:0	acide palmitique	F6P	Fructose-6-phosphate
C16:1	acide palmitoléique	FAA	Formaldéhyde-Acide Acétique-Ethanol
C17:0	Acide margarique	FAD ⁺	Flavine adénine dinucléotide oxydée
C18:0	acide stéarique	FAD2	FATTY ACID DESATURASE 2
C18:1	acide oléique	FAD3	FATTY ACID DESATURASE 3
C18:2	acide linoléique	FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide réduite
C18:3	acide linoléinique	FAO	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
C20:1	acide gadoléique		

Fd	Ferredoxine	LAFI	gènes LEC2, ABI3, FUSCA3, LEC1
FIE	FERTILIZATION INDEPENDANT ENDOSPERM	LB	Lysogeny Broth
FIS	FERTILIZATION INDEPENDANT SEED	LEA	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT
fmol	femtomole	LEC1	LEAFY COTYLEDON
FRK	FRUCTOKINASE	LHT	Lysine Histidine Transporter
FTSH4	FTSH PROTEASE 4	Log2	Logarithme de base 2
FUS3	FUSCA3	LPB	Low Binding Protein
FW	Matière Fraiche	Lys	Lysine
g	gramme	M	Molaire
G	guanine	m	masse
G6P	Glucose-6-phosphate	m ²	mètre carré
GA	Gibberellines	MDA	Malondialdéhyde
GABA	acide gamma amino butyrique	MEA	MEDEA
GC	Chromatographie en phase gazeuse	MES	acide 2-(N-morpholino)ethylenesulfonique
GDH	GLUTAMATE DESHYDROGENASE	mETC	Chaîne de transfert des électrons mitochondriale
GFP	Green Fluorescent Protein	MF	Masse Fraiche
GLN	GLUTAMINE SYNTHETASE	mg	milligramme
glycérol-3P	glycérol-3-phosphate	mGFP	monster GFP
GOGAT	Glutamine-Oxoglutarate Aminotransférase (Glutamate Synthase)	MINI3	MINISEED3
GS	Glutamine Synthétase	IAA	Acide Indole Acétique
GSA	Glutamate Semi-aldéhyde	mM	millimolaire
GUS	BETA-GLUCURONIDASE	MM	Masse Moléculaire
h	heure	mMDH	MALATE DESHYDROGENASE mitochondriale
H ⁺	proton	MS	Spectrométrie de Masse
ha	Hectare	MS/2	Milieu de Murashige et Skoog dilué au 1/2
He	Hétérozygote	MSTFA	N-trimethylsilyl-N-methyl trifluoroacetamide
HRP	Peroxydase de Raifort	Mt	Millions de Tonnes
HSD	STEROLEOSINE	N	Azote
HSF	HEAT SHOCK PROTEIN	NAD(P) ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) oxydé
HSP	HEAT SHOCK FACTOR	NAD(P)H,	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit
<i>i.e</i>	<i>Id est</i> : c'est-à-dire	H+	
IDH	ISOCITRATE DESHYDROGENASE	NAE	Efficiency d'Assimilation de l'Azote
IgG	Immunoglobuline G	NBT	NitroBlue Tetrazolium
IKU	HAIKU	ng	nanogramme
IPTG	isopropyl-beta-D-1-thiogalactopyranoside	NHI	Indice de Récolte de l'azote
KASI	KETOACYL-ACP PROTEIN SYNTHASE	NiR	NITRITE REDUCTASE
kb	kilobase	nm	nanomètre
KCS	KETOACYL-COA SYNTHASE	nmol	nanomol
kDa	kilodalton	NNED	N-1-naphtylethylenediamine
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes	NO	Oxide Nitrique
kg	kilogramme	NR	NITRATE REDUCTASE
KO	mutation Knock-Out	NRE	Efficiency de Remobilisation de l'azote
L	Litre	NRT	NITRATE TRANSPORTER
lacZ	β -galactosidase	NSA	Nomalized Sample Amount
		NUE	Efficiency d'utilisation de l'azote

Nupe	Efficienc e d'Absorption de l'Azote	rpm	rotation par minute
OA	Oxaloacétate	RuBisCO	RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE OXYGENASE
OAT	ORNITHINE AMINOTRANSFERASE	S	seconde
OD	Densité Optique	SD	écart-type
OLEO	OLEOSINE	SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
ORF	Cadre de Lecture Ouvert	SDS-PAGE	Gel de Polyacrylamide en condition dénaturante via Sodium Dodécyl Sulfate
P2M2	Plateau de Profilage Métabolique et de Métabolomique	SDT	SDS-DTT-Tris
P5C	Pyrroline-5-carboxylate	SEM	Microscope électronique à Balayage
P5CDH	PYRROLINE-5-CARBOYLATE DESHYDROGENASE	SLAC1	SLOW ANION CHANNEL ASSOCIATED 1
P5CR	PYRROLINE-5-CARBOXYLATE REDUCTASE	SLAH	SLAC HOMOLOGUE
P5CS	PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHETASE	SUC	SUCROSE PROTON SYMPORTER
PCD	Mort Cellulaire Programmée (Programmed Cell Death)	SUS	SUCROSE SYNTHASE
PCR	Réaction de Polymérase en Chaîne	SUT	SUCROSE TRANSPORTER
PDC	PYRUVATE DECARBOXYLASE	SWEET	SUGAR WILL EVENTUALLY be EXPORTED TRANSPORTER
PDH	PYRUVATE DESHYDROGENASE	T	thymine
Pfu	ADN polymérase thermostable issue de <i>Pyrococcus furiosus</i>	T-DNA	ADN de transfert
pg	picogramme	t.test	test de Student
PMI	Mitose Pollinique 1	T6P	Tréhalose-6-phosphate
PMII	Mitose Pollinique 2	TAE	Tris Acétate EDTA
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyle	TAG	Triacylglycérol
ppm	partie par million	Taq	ADN polymérase thermostable issue de <i>Thermus aquaticus</i>
PRC2	POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2	TBS	Tris Buffered Saline
PRE	élément de réponse à la proline	TBS-T	TBS + Tween
pRGP3	promoteur RGP3	TCA	acide tri-carboxylique
ProDH	PROLINE DEHYDROGENASE	TCSn	Two component signaling sensor
ProT	PROLINE TRANSPORTER	TEMED	tétraméthyléthylènediamine
PSII	photosystème II	tGFP	turbo GFP
PSV	Vacuole de Stockage Protéique	TIMS-TOF	Trapped Ion Mobility Spectrometry - Time of Flight
PTR	PEPTIDE TRANSPORTER	Tm	melting temperature
PUFA	acide gras polyinsaturé	TRE	Teneur relative en eau
PVP	Poly Vinyl Pyrrolidone	TWS1	TWISTED SEED 1
PYCR1	P5CR humaine	U	Unité enzymatique
qPCR	PCR quantitative	UE	Union Européenne
qsp	quantité suffisante pour	UPLC	Chromatographie liquide ultra-haute performance
Qtx	Quintaux	UTR	Région non-traduite
R	Rendement	UV	Ultra-Violet
RE	réticulum endoplasmique	V	Volt
RER	Réticulum Endoplasmique Rugueux	v	volume
RF	Rapport de surface	VLCFA	acide gras à très longue chaîne
RFO	Oligosaccharides de la famille du raffinose	VPE	VACUOLAR PROCESSING ENZYME
RGP3	REVERSIBLY GLYCOSYLATED PEPTIDE 3	WT	Sauvage (Wild-Type)
ROS	espèce réactive de l'oxygène		

X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl-beta-D-galactopyranoside
X-gluc	acide 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-beta-D-Glucuronique
z	charge
ZOU	ZHOUP
μL	microlitre
μm	micromètre
μmol	micromol

Contexte général

Dans son rapport 2021 sur l'état de sécurité alimentaire mondiale, l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) indique qu'un tiers de la population mondiale connaît des difficultés pour se nourrir. Pour 928 millions de personnes, cette insécurité alimentaire est sévère et ce chiffre est en augmentation (FAO, 2021). Avec une population mondiale qui va atteindre 9,73 milliards d'habitants dès 2065, l'agriculture doit trouver des solutions durables pour produire plus et surtout mieux.

Depuis la seconde moitié du XXe siècle, les rendements agricoles des grandes cultures ont fortement progressé avec pour le blé un rendement multiplié par 4,6 entre 1945 et 1995 passant ainsi de 15 qtx/ha à 70qtx/ha en France (Académie d'agriculture de France, 2021). Cette hausse peut s'expliquer par des améliorations variétales mais également par l'usage de produits phytosanitaires et d'engrais, notamment des engrais azotés. Ces derniers connaissent une demande croissante qui dépassera les 240 millions de tonnes en 2050 (Tilman, 1999). Or l'usage intensif de ces intrants pose des problèmes de pollution des sols et des eaux (Chardon *et al.*, 2010). L'excès d'azote provoque par exemple l'apparition de marées vertes dû au développement anormal d'ulves sur les côtes (Morand & Briand, 1996). L'usage immodéré d'intrants peut également conduire à une stérilisation des sols par la contrainte saline. En effet, les intrants solubilisés sous forme d'ions dans le sol se concentrent lorsque l'eau se raréfie. L'osmolarité du sol devient alors très élevée empêchant les plantes d'y puiser de l'eau. Ce phénomène concerne déjà 800 millions d'hectares à travers le monde ce qui constitue une grande menace pour la productivité mondiale (Iqbal *et al.*, 2015). De plus, l'agriculture représentant à elle-seule 19% des émissions de gaz à effet de serre en France en 2019, soit 83 Mt d'équivalent CO₂ (Haut Conseil pour le Climat, 2021), elle doit donc produire maintenant de façon plus raisonnée.

Enfin, le changement climatique en cours prévoit des bouleversements drastiques avec une augmentation de la température moyenne sur Terre de 2,6°C à 4,8°C à l'horizon 2100. Cette augmentation de température sera accompagnée d'épisodes de sécheresse plus longs et intenses couplées avec des épisodes de précipitations intenses (GIEC, 2014). Ces changements sont autant de contraintes auxquelles devront faire face les plantes cultivées.

Afin de garantir une alimentation saine, en quantité suffisante et produite de manière respectueuse de l'environnement et du climat, il est donc essentiel d'agir sur le développement des plantes cultivées et sur leurs capacités d'adaptation aux contraintes environnementales. Il est donc indispensable de comprendre les mécanismes qui régissent ces processus d'adaptation, notamment au niveau des semences qui sont à la base de notre alimentation. Cela représente également un intérêt économique majeur puisque le marché mondial des semences est estimé à 80 milliards de dollars en 2022 (Mordor Intelligence, 2019)

Ces nouveaux enjeux agricoles, environnementaux et sociétaux ont une résonance sur la recherche en physiologie végétale. En effet, l'étude des composantes génétiques et moléculaires du rendement ou des mécanismes physiologiques impliqués chez les plantes dans la tolérance et l'adaptation aux contraintes environnementales a connu de grandes avancées ces dernières décennies. Par exemple, l'étude de l'acide aminé proline et de son métabolisme a permis d'établir de nombreux rôles dans l'acquisition de la tolérance aux contraintes salines et à la sécheresse (Szabados & Saviouré, 2010). Son métabolisme apparaît également de plus en plus impliqué dans de nombreux processus développementaux notamment le développement reproductif (Mattioli *et al.*, 2009). De plus, des perturbations induites dans le catabolisme de la proline semblent impacter le métabolisme de l'azote (Deuschle *et al.*, 2004), nutriment essentiel pour les plantes et directement relié aux questions de productivité en agriculture (Good *et al.*, 2004). Ainsi, étudier le rôle précis du catabolisme de la proline dans le développement de la graine dans un contexte de nutrition azotée contrastée devient indispensable afin d'apporter des réponses et des solutions aux enjeux précédemment cités.

Chapitre 1 : Introduction générale

I. Métabolisme de l'azote

1. Importance de l'azote chez les plantes

L'azote (N) est un élément chimique essentiel du vivant. C'est un constituant de nombreuses molécules organiques tels que les acides aminés qui entrent dans la composition des protéines et des nucléotides de l'ADN et l'ARN (Nunes-Nesi *et al.*, 2010). Chez les plantes, cet élément est d'autant plus crucial qu'il entre également dans la composition du noyau tétrapyrol de la chlorophylle, pigment essentiel à la photosynthèse (Senge *et al.*, 2007). C'est également un élément présent dans des hormones végétales majeures telles que l'auxine ou les cytokinines (Andrews *et al.*, 2013).

Parmi les macro-éléments indispensables au bon développement des plantes, l'azote occupe également la première place car les besoins en cet élément sont largement supérieurs à ceux des autres éléments minéraux. Il faut ainsi 20-50g d'azote pour produire 1 kg de grain chez le blé, le riz ou le maïs (Kong *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2020), quand il n'en faut que 15 g pour le phosphore ou le potassium (Li *et al.*, 2020).

Cependant, l'azote est peu disponible pour les plantes. En effet, malgré une atmosphère composée à 78% de diazote gazeux (Sheoran *et al.*, 2021), cette forme moléculaire n'est pas directement assimilable par les plantes hormis chez certaines espèces de la famille des Fabacées et les espèces du genre *Parasponia* (famille des Cannabacées), capables de procéder à sa fixation grâce à l'établissement d'une relation symbiotique avec des bactéries du genre *Rhizobia* (Mus *et al.*, 2016 ; Soltis *et al.*, 1995). L'azote est donc un des principaux éléments limitants pour le développement et la productivité de la plante (Soumare *et al.*, 2020).

On définit la capacité des plantes à extraire l'azote du sol et à utiliser efficacement l'azote par la NUE (Nitrogen Use Efficiency) qui correspond au rendement obtenu par unité d'azote disponible (Chardon *et al.*, 2010). Ce NUE est divisé en plusieurs composantes (**Fig 1**) : l'efficacité d'absorption de l'azote (notée Nupe) et son efficacité d'utilisation (notée NUte). L'efficacité d'utilisation de l'azote étant elle-même dépendante de l'efficacité d'assimilation (NAE) et de l'efficacité de remobilisation (NRE) de l'azote. L'absorption est alors définie par le transfert de l'azote du milieu extérieur vers l'intérieur de la plante ; l'assimilation par l'intégration de l'azote inorganique à des molécules organiques et la remobilisation comme son transport inter-organes au sein de la plante. *In fine*, le NUE est donc défini par la relation

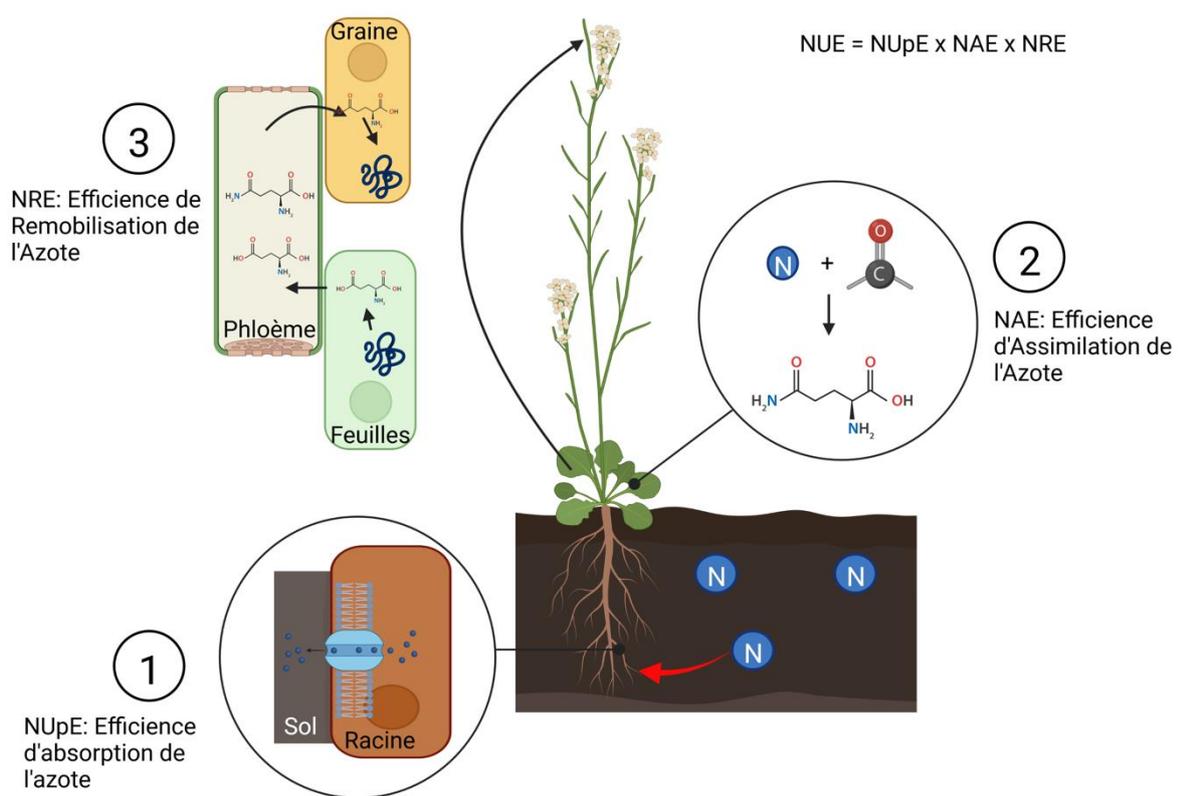


Figure 1 : Composantes du NUE (Nitrogen Use Efficiency) et processus moléculaires associés. Le NUE est régi par l'efficacité d'absorption de l'azote (NUpE), l'efficacité d'assimilation de l'azote (NAE) et l'efficacité de remobilisation de l'azote (NRE). Le NupE dépend notamment des transporteurs de nitrates dans les racines. Le NAE dépend des enzymes permettant d'intégrer de l'azote à des squelettes carbonés. Le NRE correspond aux capacités à dégrader les protéines des parties végétatives au cours la sénescence, du chargement du phloème en acides aminés et de son déchargement au niveau de la graine. Créé avec Biorender.

NUE = Nupe x NAE x NRE (Chardon *et al.*, 2010). Il est intéressant de noter que les meilleurs NRE et NUE sont obtenus lorsque l'alimentation en azote est limitante (Lemaître *et al.*, 2008; Masclaux-Daubresse & Chardon, 2011a). Cependant la disponibilité en azote n'aura pas les mêmes effets au cours du développement de la plante. En effet, un apport en azote limitant induit une meilleure efficacité de remobilisation vers les graines, alors qu'un apport non limitant en azote bénéficiera prioritairement aux organes végétatifs (Masclaux-Daubresse & Chardon, 2011a). Améliorer la NUE revient donc à réduire le coût économique et environnemental des fertilisants, d'autant plus que 50-70% de l'azote appliqué aujourd'hui est perdu par lessivage ou volatilisation et est donc non-assimilable par le système racinaire (Peoples *et al.*, 1995). L'urgence est d'autant plus grande que la sélection végétale ne s'est faite jusqu'ici qu'en condition non-limitante en termes de fertilisation, alors même qu'une corrélation négative entre le rendement et l'indice de récolte de l'azote (Nitrogen Harvest Index ou NHI = N dans la graine / N dans la plante entière) a été établie (Lemaître *et al.*, 2008). L'amélioration du NUE repose donc d'abord sur une connaissance fine des mécanismes moléculaires à l'œuvre dans le métabolisme azoté tout au long de la vie de la plante.

2. Métabolisme de l'azote au cours de la vie végétative

2.1. Les différentes formes d'azote assimilables par les plantes

2.1.1. Nitrates

Dans les sols travaillés et aérés, la nitrification (passage d'ammonium NH_4^+ en nitrates NO_3^-) par les micro-organismes du sol est très rapide. La forme préférentielle d'alimentation en azote des plantes cultivées est donc le nitrate (Kronzucker *et al.*, 1997). Les teneurs en nitrates dans le sol varient selon les sources, d'une gamme de 1 à 20 mM dans les sols cultivés (Andrews *et al.*, 2013), cette teneur pouvant monter jusqu'à 70 mM dans les sols agricoles fertilisés (Reisenauer, 1966). On retiendra une moyenne de 6 mM ce qui constitue 8 fois plus de nitrates que d'ammonium dans les sols (Crawford & Glass, 1998). Il faut 10 électrons pour permettre l'assimilation des nitrates, il a d'ailleurs été observé une augmentation rapide de la respiration après l'ajout de nitrates dans un milieu carencé en azote (Bloom *et al.*, 1992). Il est intéressant de noter que l'alternative oxydase (AOX) est réprimée par les nitrates chez

Arabidopsis (Escobar *et al.*, 2006), forçant ainsi le pompage de protons le long de l'intégralité de la chaîne respiratoire pour la production d'ATP. L'assimilation des nitrates demande plus d'eau et d'énergie que celle de l'ammonium et représente ainsi un coût énergétique non négligeable pour la plante (Andrews *et al.*, 2013).

2.1.2. Ammonium

Bien que présent à plus faibles concentrations que les nitrates dans les sols (0,77 mM en moyenne), l'ammonium est une source d'azote importante pour les plantes dans les sols non travaillés (Crawford & Glass, 1998). Son assimilation requiert moins d'énergie que les nitrates avec seulement 2 électrons nécessaires par atome d'azote. Cependant, cela nécessite une dissipation continue du pouvoir réducteur résiduel et induit un stress oxydatif que l'activation de l'alternative oxydase (AOX) aide à contenir (Escobar *et al.*, 2006). En effet, un fort apport en ammonium induit des nécroses sur les feuilles, une croissance réduite ainsi que d'autres désordres tels qu'une perturbation du pH, un découplage de la photophosphorylation et une consommation accrue de squelettes carbonés (Li *et al.*, 2014, 2021).

2.1.3. Molécules organiques

Des acides aminés et petits peptides peuvent également servir de sources d'azote pour les plantes. Les acides aminés sont retrouvés en plus forte concentration dans les sols ayant reçu une fertilisation organique par rapport à une fertilisation inorganique conventionnelle (Li *et al.*, 2021). Ces acides aminés tels que la glutamine, l'alanine, le glutamate et l'aspartate sont directement absorbables et utilisables par la plante comme source d'azote grâce à la présence de transporteurs d'acides aminés de type LHT (Lysine Histidine Transporter) localisés au niveau des racines (Li *et al.*, 2021). L'urée est également une molécule organique fortement utilisée comme fertilisant bien que faiblement utilisée par les plantes (Beier & Kojima, 2021). En effet, même si l'on retrouve des transporteurs à forte affinité pour l'urée dans les racines, cette molécule est rapidement dégradée en ammonium puis en nitrates par les bactéries du sol (Watson *et al.*, 1994).

2.2. Mécanismes d'absorption des nitrates

Les nitrates entrent dans la plante par les racines puis sont transportés sur de longues distances principalement par le xylème pour être assimilés dans les parties aériennes (Krapp *et al.*, 2014; Karmann *et al.*, 2018). Des transporteurs de nitrates *NRT1.9* permettant le passage du xylème vers le phloème ont également été mis au jour et assurent la régulation de l'homéostasie des nitrates à l'échelle de la plante (Wang & Tsay, 2011). Il existe ainsi une grande palette de transporteurs de spécificité et d'affinité différentes pour distribuer et ajuster le niveau de nitrates au niveau cellulaire (Krapp *et al.*, 2014). La famille *NRT2* comprend 7 transporteurs de haute affinité aux nitrates (Good *et al.*, 2004; Krapp *et al.*, 2014). Les gènes *NRT2* sont exprimés en cas de carence transitoire (pour *NRT2.1* et *NRT2.2*) ou à long-terme (pour *NRT2.4*) en présence d'azote (Kiba *et al.*, 2012). Ces transporteurs interagissent avec des partenaires moléculaires *NAR2* pour former un complexe *NAR2/NRT2* (Kotur *et al.*, 2012). Leur mode d'action est un symport nitrate/H⁺ (Meharg & Blatt, 1995). La famille *NRT1/PTR* représente des transporteurs de faible affinité et comporte 53 membres. Ces transporteurs sont également des symports nitrates/H⁺ mais ont un Km inférieur à la famille *NRT2* (Léran *et al.*, 2014). Ils peuvent également transporter des acides aminés, peptides, glucosinolates, auxines et l'acide abscissique (ABA) (Léran *et al.*, 2014), et sont impliqués dans la détection et la signalisation des nitrates (Ho & Tsay, 2010). Parmi eux, *NRT1.7* permet le transport de nitrates au cours du développement végétatif lors de la remobilisation d'une feuille âgée vers une jeune feuille (Fan *et al.*, 2009). D'autres transporteurs de natures différentes existent aussi : les *SLAC1/SLAH* qui sont des canaux anioniques, ou les *CLC* (Chloride Channel) qui sont des antiports nitrates/H⁺ situés au niveau de la membrane du tonoplaste et dont la sélectivité est assurée par la présence d'un résidu proline dans le site actif (Geelen *et al.*, 2000; Bergsdorf *et al.*, 2009). Ainsi la quantité de nitrates retrouvée dans la plante est divisée par deux chez les mutants *clc* du fait d'une impossibilité de les stocker dans la vacuole avant qu'ils ne soient réduits en ammonium (Geelen *et al.*, 2000).

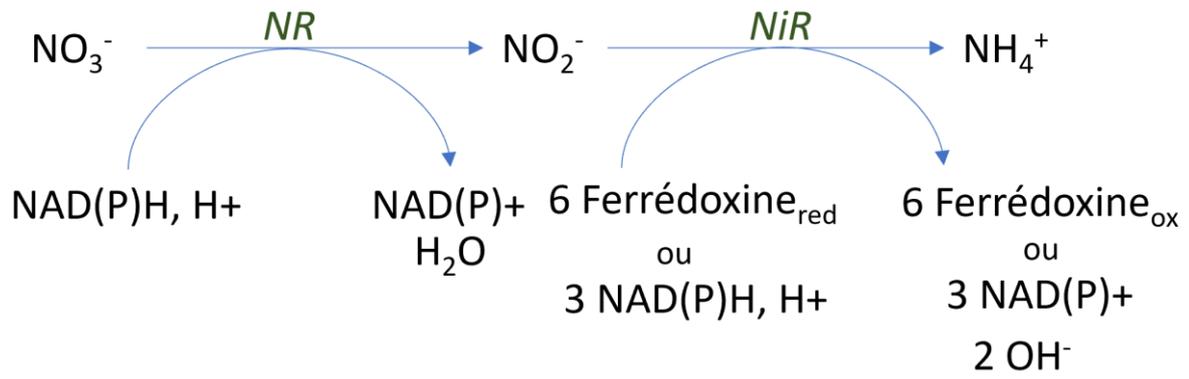


Figure 2 : Schéma bilan de la réduction du nitrate en ammonium.

Abbréviations: NO_3^- , Nitrate ; NO_2^- , Nitrites ; NH_4^+ , Ammonium ; NR, Nitrate reductase ; NiR, Nitrite Réductase.

2.2.1. Réduction des nitrates en ammonium

Afin de pouvoir intégrer l'azote à des molécules organiques, les nitrates subissent deux réductions successives (**Fig 2**). La première est catalysée par la Nitrate Réductase (NR) qui réduit le nitrate (NO_3^-) en nitrite (NO_2^-) (Oostindiër-Braaksma & Feenstra, 1973). Cette étape de réduction consomme du pouvoir réducteur $\text{NADPH}+\text{H}^+$ ou $\text{NADH}+\text{H}^+$ et produit de l'eau (Streit *et al.*, 1987). La NR est une enzyme cytosolique dont l'expression est influencée par les facteurs environnementaux (présence ou absence de nitrates) et endogène (besoin en nitrates) (Meyer & Stitt, 2001; Sharon *et al.*, 2015). Elle est fortement régulée aux niveaux transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel (Meyer & Stitt, 2001).

La seconde étape de réduction des nitrites en ammonium est catalysée par la Nitrite Réductase (NiR). Cette étape ne se déroule plus dans le cytosol mais dans le stroma du chloroplaste et permet la production d'ammonium NH_4^+ à partir de nitrites (Siegal & Wilkerson, 1989). Cette nouvelle réduction consomme également du pouvoir réducteur sous forme de ferredoxine générée par la phase photochimique de la photosynthèse à la lumière ou sous forme de $\text{NADPH}+\text{H}^+$ généré par le cycle des pentoses phosphates à l'obscurité par le biais d'une oxidoréductase Fd-NADP^+ (Jin *et al.*, 1998). La réduction du nitrite peut également produire de l'oxyde nitrique (NO) en condition d'anoxie ou d'hypoxie (Castello *et al.*, 2006). Ce NO a notamment un rôle majeur dans les processus de signalisation intracellulaires (Bailly, 2004). Il est à noter qu'une déficience en NAD(P)H Déshydrogénase dans la mitochondrie affecte la réponse de la plante aux nitrates chez *Arabidopsis* avec notamment l'apparition d'un stress oxydant (Podgorska *et al.*, 2015).

2.3. Mécanismes d'assimilation de l'ammonium

Après réduction des nitrates en ammonium, ce dernier est assimilé, c'est à dire intégré à une molécule organique (Sanz-Luque *et al.*, 2015). Les squelettes carbonés permettant l'assimilation de l'azote proviennent du cycle de Krebs notamment via l' α -cétoglutarate (α -CG) (Morcuende *et al.*, 1998; Schwender *et al.*, 2006). L'intégration d'ammonium à une molécule d' α -CG donne alors du glutamate qui sera ultérieurement transformé en glutamine par ajout d'un groupe amine. Ces deux acides aminés seront ensuite utilisés comme donneurs de NH_4^+ pour la synthèse de tous les autres acides aminés par désamination et transamination

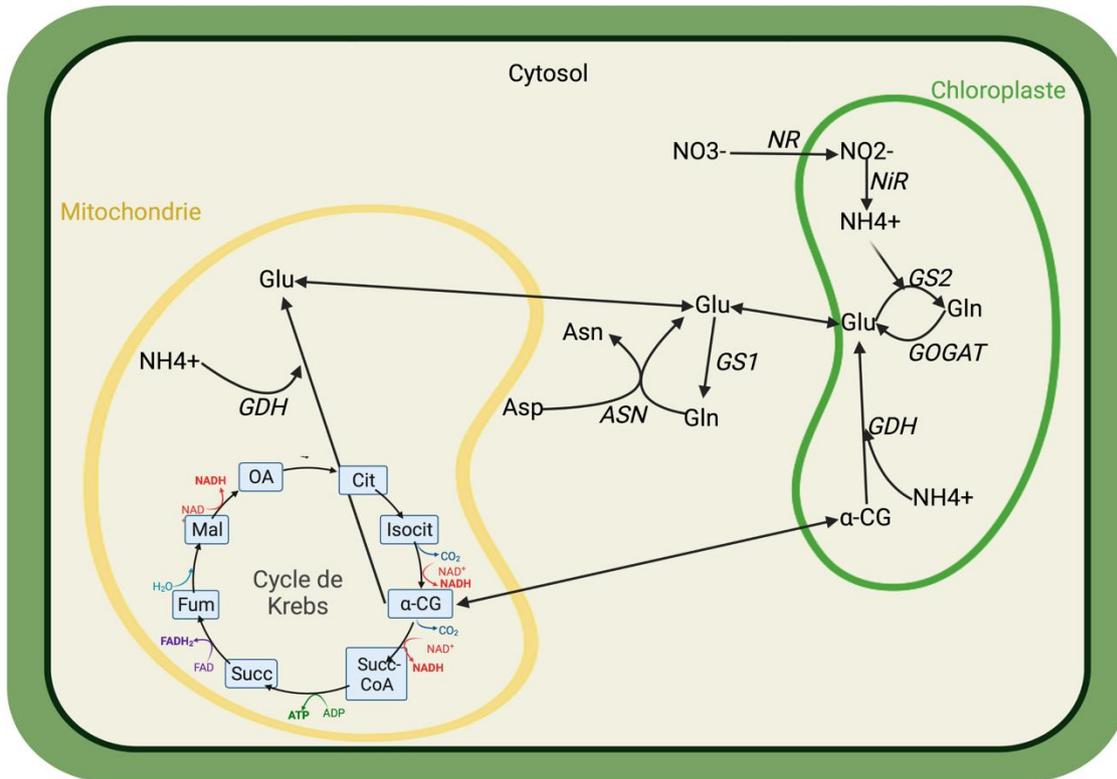


Figure 3: Représentation schématique des principales voies d'assimilation de l'azote.

L'azote sous forme d'ammonium issu de la réduction des nitrates est pris en charge dans le chloroplaste par le cycle GS-GOGAT pour générer du glutamate ou de la glutamine qui seront ensuite convertis en d'autres acides aminés. La GDH peut également produire du glutamate à partir d' α -CG en cas de forte teneur en ammonium. Dans le cytosol, l'ASN permet également de produire de l'asparagine qui est un acide aminé riche en azote. Créé avec Biorender.

Abbreviations : NO_3^- : Nitrate ; NO_2^- : Nitrites ; NH_4^+ : Ammonium ; Glu : Glutamate ; α -CG : α -céto-glutarate ; Succ-CoA: Succinyl-CoA ; Succ: Succinate ; Fum: Fumarate ; Mal: malate ; OA: Oxaloacétate ; cit: citrate ; iso: isocitrate ; Asn : Asparagine ; Asp : Aspartate ; Gln : Glutamine ; GDH : Glutamate déshydrogénase ; ASN : Asparagine synthétase ; GS1 : Glutamine Synthétase 1 ; GS2 : Glutamine Synthétase 2 ; NR : Nitrate Réductase ; NiR : Nitrite Réductase ; GOGAT : Glutamate Synthase.

(Lemaître *et al.*, 2008; Zheng, 2009). En tant que pourvoyeur d'acides organiques précurseurs de glutamate, la mitochondrie joue donc un rôle important dans l'assimilation de l'azote. Les acides aminés générés par l'assimilation de l'azote permettront ensuite la synthèse de protéines mais servent également à transporter et à stocker l'azote de manière moins toxique que l'ammonium (Funck *et al.*, 2008).

Le glutamate peut être synthétisée par deux voies (**Fig 3**) : le cycle Glutamine Synthétase/Glutamine-Oxoglutarate Amino-transférase (ou Glutamate Synthase) (GS/GOGAT) qui constitue la voie prépondérante et la voie de la Glutamate Déshydrogénase (GDH) qui est impliquée surtout en condition de fortes concentrations en ammonium du fait de la faible affinité de la GDH pour l'ammonium (da Rocha *et al.*, 2012). La GOGAT produisant du glutamate par désamination de la glutamine est présente sous deux isoformes dépendant respectivement de la ferrédoxine et du NADH en tant que co-facteur. La première isoforme constitue la forme prédominante et joue également un rôle important dans la photorespiration tandis que l'on retrouve la seconde essentiellement dans les tissus non-photosynthétiques (Sakakibara *et al.*, 1991; Gregerson *et al.*, 1993). Il existe également deux Glutamine Synthétase (GS) différentes permettant la synthèse de glutamine à partir de glutamate : GS1 et GS2. La GS2 est chloroplastique et permet une forte synthèse de glutamine dans les jeunes feuilles (Masclaux *et al.*, 2000) tandis que la GS1 est cytosolique et soumise à régulation post-transcriptionnelle (Oliveira *et al.*, 2002).

En dehors du système GS/GOGAT, d'autres enzymes sont également impliquées dans l'assimilation de l'azote. C'est le cas de la GDH qui produit du glutamate à partir d' α -CG et d'ammonium (Miyashita & Good, 2008). Enfin, en tant qu'acide aminé riche en azote, l'asparagine est également une forme majeure d'assimilation de l'azote. Elle est produite par l'Asparagine Synthétase (AS) à partir de glutamine et d'aspartate et produit également du glutamate. En cas de perte d'activité de la GS, on constate un maintien de l'assimilation de l'ammonium par une augmentation de l'activité de l'AS (Carvalho *et al.*, 2003).

A la suite de l'assimilation de l'ammonium sous forme d'acides aminés, ces derniers peuvent être utilisés pour la synthèse protéique. Ainsi, la RubisCO, par son abondance, constitue la principale forme de stockage de l'azote dans les feuilles (Diaz *et al.*, 2008). De plus, certains acides aminés non-protéinogènes tels que l'ornithine ou la citrulline peuvent également constituer des puits alternatifs d'azote (Blume *et al.*, 2019).

3. Métabolisme de l'azote au cours de la phase reproductive

3.1. La remobilisation de l'azote

Lors de l'avènement de la phase reproductive, la floraison déclenche un phénomène de sénescence dans les parties végétatives. Ce phénomène aboutit notamment à un démantèlement du chloroplaste et une protéolyse massive qui libère de nombreux acides aminés (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008). Ces changements métaboliques majeurs donnent lieu à une réorganisation métabolique de la cellule, la mitochondrie et le peroxisome acquérant de nouvelles fonctions afin de pallier l'absence de chloroplastes (Chrobok *et al.*, 2016). L'ensemble de ces processus sont nécessaires pour recycler les ressources azotées des parties végétatives vers les graines en formation.

L'apport de nutriments au niveau de la graine est déterminée par 3 facteurs : la force d'appel du puits exercée par la graine, les transferts à travers les différents tissus depuis les feuilles source vers les parties reproductives, et l'efficacité phloémienne dont le chargement est crucial pour l'efficacité de remobilisation (Diaz *et al.*, 2008; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008). Ces processus de remobilisation sont donc fortement dépendants de transporteurs d'acides aminés permettant leur mobilité afin de franchir les barrières cellulaires et tissulaires. Plusieurs types de transporteurs d'acides aminés sont donc impliqués dans la remobilisation : il s'agit notamment des AAP (Amino Acid Permease), transporteurs non spécifiques, des LHT (Lysine Histidine Transporter), transporteurs de haute affinité, et des ANT (Adénine Nucleotide Translocase), transporteurs à affinité modérée pour les acides aminés aromatiques (Sanders *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Chrobok *et al.*, 2016). Ainsi, l'absence de transporteurs d'acides aminés tels que AAP8 entraîne la mort de l'embryon et induit une baisse du nombre de graines produites (Schmidt *et al.*, 2007). Ces différents transporteurs permettent donc de mobiliser une large palette d'acides aminés, l'azote étant remobilisé principalement sous la forme d'acides aminés libres et de peptides (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008; Havé *et al.*, 2017). Les acides aminés sont présents à fortes concentrations dans le phloème mais sont également présents en faibles concentrations dans le xylème (Zhang *et al.*, 2010). Leur concentration dans la sève élaborée se situe autour de 50-200 mM voire 650 mM chez les Brassicacées (Tilsner *et al.*, 2005). Les acides aminés les plus abondants retrouvés

dans la sève élaborée sont la glutamine, la sérine, l'asparagine, le glutamate et l'aspartate (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006). La glutamine et l'asparagine sont les formes préférentielles d'export de l'azote car ces acides aminés contiennent 2 atomes d'azote par molécule (Good *et al.*, 2004; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008; Havé *et al.*, 2017). On retrouve donc logiquement les enzymes associées à leur synthèse comme éléments clés et limitants de cette remobilisation de l'azote, à savoir l'AS, la GS1 et la GDH.

La remobilisation de formes inorganiques d'azote telles que l'ammonium ou les nitrates peut également avoir lieu (van der Graaff *et al.*, 2006). En effet, des nitrates reçus en excès par la plante peuvent être stockés dans la vacuole avant d'être remobilisés (Fan *et al.*, 2009). On retrouve ainsi des transporteurs d'ammonium AMT1 et de nitrates NRT2.5 de forte affinité, et NRT1.6 de faible affinité dans la membrane plasmique des cellules composant les tissus vasculaires des siliques et le funicule des graines, permettant ainsi l'apport de nitrates aux graines en développement (van der Graaff *et al.*, 2006 ; Almagro *et al.*, 2009). Le mutant *nrt1.6* présente d'ailleurs un avortement des graines du fait d'une dégénérescence du suspenseur, prouvant ainsi l'importance des nitrates pour les premières phases d'embryogenèse (Almagro *et al.*, 2009). On retrouve également des transporteurs NRT2.7 de haute affinité dans le tonoplaste des cellules dans les graines sèches (Chopin *et al.*, 2007a).

La remobilisation de l'azote vers les graines en développement se fait simultanément avec l'apport de ressources carbonées. Ces ressources permettront à la graine de synthétiser ses réserves. L'équilibre entre allocations de ressources carbonées et azotées doit donc être maintenu pour éviter un déséquilibre.

4. Balance C/N

4.1. Evidences de l'influence réciproque des métabolismes carboné et azoté

Le métabolisme azoté est donc fortement associé au métabolisme carboné (**Fig 4**). En effet, le cycle de Krebs est pourvoyeur de squelettes carbonés pour l'assimilation de l'azote (Zheng, 2009). Ce cycle est modulé par la régulation de certaines de ses enzymes comme la Pyruvate Déshydrogénase (PDH) ou l'Isocitrate Déshydrogénase (IDH) qui produit de l' α -CG

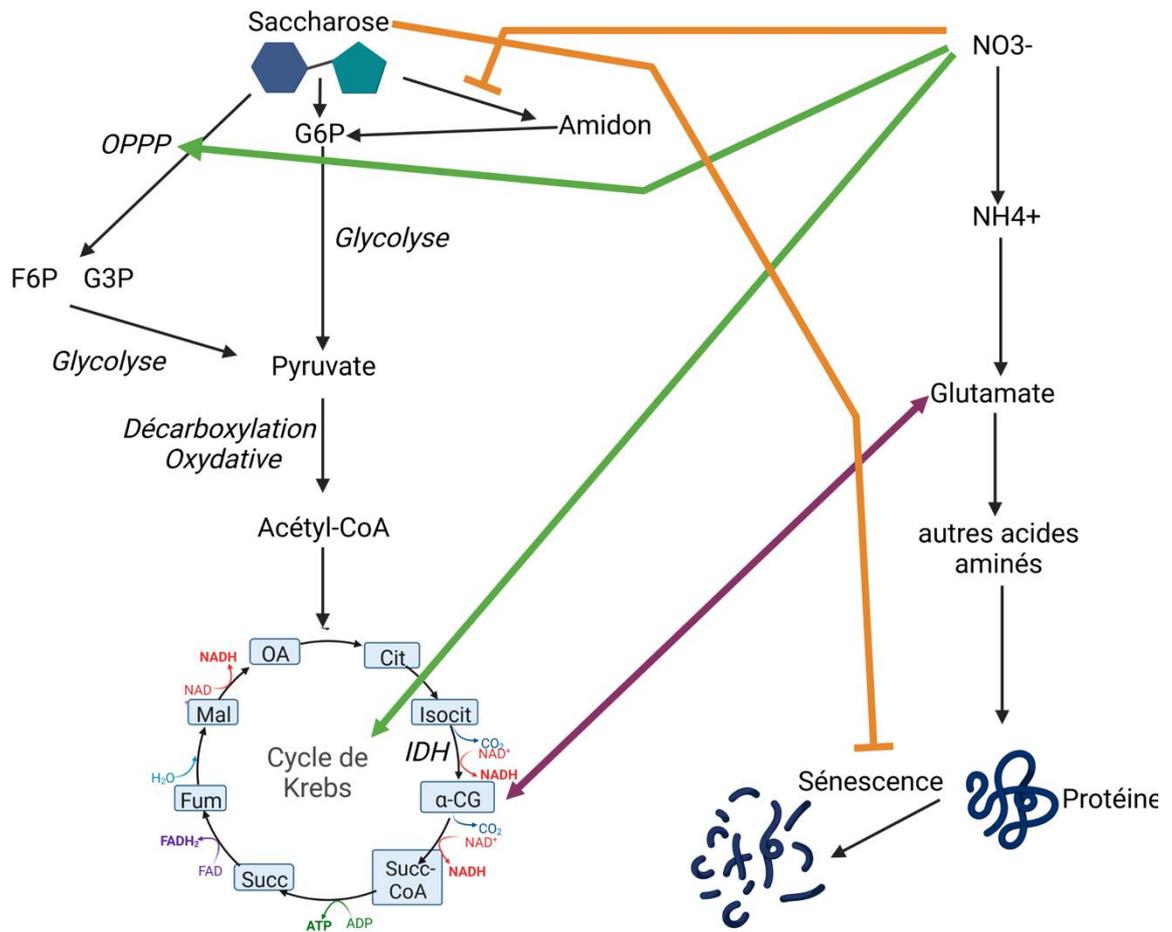


Figure 4 : Connexions des métabolismes carbonés et azotés.

La présence de nitrate dans le milieu active la voie des pentoses phosphates et le cycle de Krebs. Ces voies métaboliques vont fournir du pouvoir réducteur pour la réduction des nitrates et des squelettes carbonés pour l'assimilation des de l'azote. La présence de nitrates inhibe également la mise en réserve de sucres sous forme d'amidon. Une augmentation de la teneur en saccharose inhibe la sénescence et le recyclage de l'azote. Créé avec Biorender.

Abbreviations: OPPP : Voie des pentoses phosphates ; F6P : Fructose-6-phosphate ; G3P : Glycéraldéhyde-3-phosphate ; G6P : Glucose-6-phosphate ; NO₃⁻ : Nitrates ; NH₄⁺ : Ammonium ; OA : Oxaloacétate ; Cit : citrate ; isocit : isocitrate ; α-CG : α-cétoglutarate ; Succ-CoA : Succinyl-CoA ; Fum : Fumarate ; Mal : Malate ; IDH : Isocitrate déshydrogénase.

qui pourra être réduit dans la mitochondrie lors des étapes suivantes du cycle de Krebs ou être exporté dans les plastes pour l'assimilation de l'azote via la GDH et le système GS/GOGAT (Lemaitre *et al.*, 2007). Ainsi les mutants *idh* n'ont aucun phénotype végétatif mais présentent de fortes perturbations des métabolismes azoté et carboné : baisse des niveaux de sucres et des acides aminés libres (Lemaitre *et al.*, 2007).

De plus, il a été observé qu'en plus des gènes directement impliqués dans l'absorption et l'assimilation de l'azote, la présence de nitrates induisait l'expression de gènes impliqués dans le cycle de Krebs et la voie des pentoses phosphates afin de permettre la production de squelettes carbonés et du pouvoir réducteur pour l'assimilation des nitrates (Scheible *et al.*, 2004). Enfin, les nitrates induisent également une répression des gènes impliqués dans la synthèse de saccharose (Scheible *et al.*, 2004), ce qui peut s'expliquer par la nécessité d'utiliser du glucose pour la production de squelettes carbonés.

Par ailleurs, le saccharose peut réprimer le recyclage de l'azote en retardant la sénescence (Shi & Xie, 2014). La répression du recyclage de l'azote tout comme la perturbation du métabolisme azoté peut donc entraîner des répercussions délétères sur le développement de la plante, en particulier lors de la phase reproductrice. En effet les graines vont devoir accumuler des composés de réserves mis en place à partir des ressources carbonées et azotées remobilisées, réserves qui seront utilisées ultérieurement lors de la germination et de la croissance de la jeune plantule.

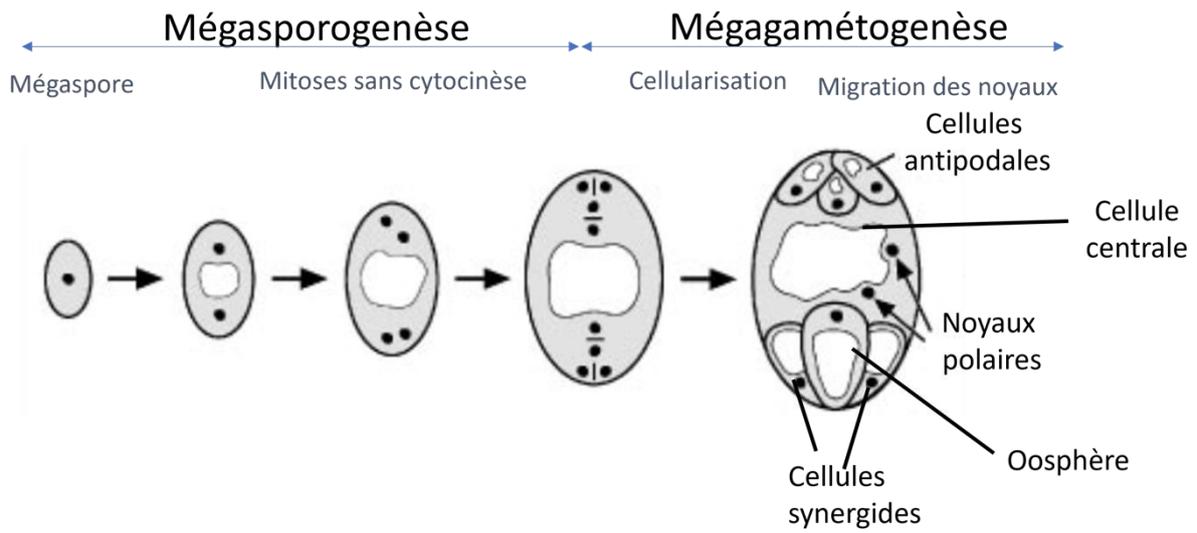


Figure 5 : Principales étapes de la gamétogénèse femelle chez Arabidopsis
(adapté de Drews and Yadegari, 2002).

II. Développement reproducteur des Angiospermes

1. Mise en place des organes reproducteurs et gamétogenèse

1.1. Organe reproducteur femelle et gamétogenèse

L'organe reproducteur femelle est le carpelle, composé à sa base d'une partie renflée, l'ovaire, qui se prolonge par le style et se termine par le stigmate. Les ovules sont mis en place au niveau de l'ovaire. Chez *Arabidopsis*, les ovules dérivent du placenta qui se divise jusqu'à former une excroissance dans laquelle on peut distinguer une structure interne, le nucelle (Dahlgren, 1927; Hill & Lord, 1994). Le nucelle est entouré de deux assises formant les téguments de l'ovule qui sont interrompus au niveau du micropyle. L'ovule est lié au placenta par une structure de connexion, le funicule. A l'intérieur du nucelle, proche du micropyle, se met en place une mégaspore qui sera à l'origine du gamétophyte femelle : le sac embryonnaire (Schneitz *et al.*, 1995).

On peut distinguer deux grandes étapes dans la gamétogenèse femelle (**Fig 5**) : la mégasporogenèse et la mégagamétogenèse (Drews & Yadegari, 2002). La mégasporogenèse conduit la mégaspore diploïde se trouvant dans le nucelle à subir une méiose qui produit 4 mégaspores. Par la suite, trois des quatre mégaspores haploïdes subissent une mort cellulaire programmée (PCD) et seule la mégaspore du côté chalazal survit (Webb & Gunning, 1990). Chez *Arabidopsis* la mégaspore haploïde survivante se multiplie ensuite par mitose sans cytokinèse pendant 3 cycles et produit une cellule avec 8 noyaux (Christensen *et al.*, 1997). C'est alors le début de la mégagamétogenèse qui va durer 3 à 4 jours (Drews & Yadegari, 2002). La cellule octo-nucléée se cellularise ensuite pour donner le sac embryonnaire qui constitue le gamétophyte femelle (Christensen *et al.*, 1997). Les noyaux sont alors regroupés au niveau des deux pôles de la cellule. Deux noyaux haploïdes issus de chaque pôle migrent au centre de la cellule centrale (Schneitz *et al.*, 1995). Au pôle supérieur on trouve 3 cellules antipodiales qui mourront par mort cellulaire programmée après la fécondation (Murgia *et al.*, 1993) et au pôle inférieur, proche du micropyle, un gamète femelle, l'oosphère, entourée de deux cellules synergides.

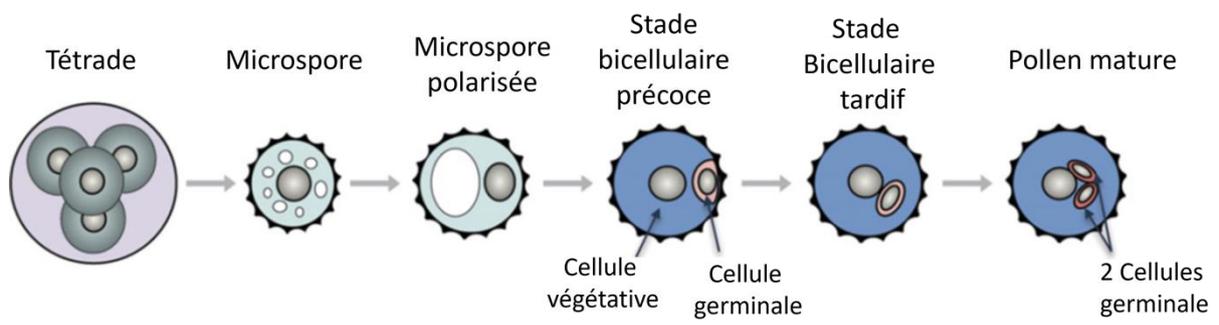


Figure 6 : Principales étapes de la gamétogenèse mâle chez Arabidopsis (Borg et al., 2009)

1.2. Développement du gamétophyte mâle

Les organes reproducteurs mâles, les étamines, comprennent deux parties : une partie effilée, le filament, composé majoritairement de tissus conducteurs, et l'anthère formée de deux loges comportant chacune 2 sacs polliniques à l'intérieur desquels se développe le pollen (Feng & Dickinson, 2007).

Les 4 sacs polliniques de l'anthère, les microsporangies, se développent à partir d'une cellule archésporiale située dans la couche sous-épidermique de la paroi de l'anthère (L2). Chaque cellule archésporiale subit une première division péricleine pour donner naissance en interne à une cellule sporogène primaire et en position externe à une cellule pariétale primaire. Ces cellules se redivisent pour permettre ensuite la mise en place de différentes assises : l'endothécium (la plus externe) et le tapis pollinique délimitant le sac pollinique à l'intérieur duquel sont mises en place les cellules sporogènes, futures cellules mères des grains de pollen (Feng & Dickinson, 2007). Comme pour la gamétogenèse femelle, on distingue également deux phases à la gamétogenèse mâle (**Fig 6**) : la microsporogénèse et la microgamétogénèse. Au cours de la microsporogénèse, la cellule mère du pollen diploïde entre en méiose et produit une tétrade de microspores haploïdes entourées d'une paroi de callose (Borg *et al.*, 2009). Les microspores haploïdes sont ensuite libérées de la tétrade grâce à de la callase sécrétée par le tapis pollinique, couche cellulaire délimitant le sac pollinique (Scott *et al.*, 2004). Au cours de la microgamétogénèse, les 4 spores haploïdes libérées grandissent notamment par une augmentation de volume de leur vacuole (Yamamoto *et al.*, 2003). Ces microspores subissent ensuite une division cellulaire asymétrique appelée mitose pollinique I (PMI) qui conduit à la formation d'une petite cellule germinale contenue dans une grande cellule végétative (Borg *et al.*, 2009). La petite cellule germinale subit ensuite une nouvelle mitose appelée mitose pollinique II (PMII). Il en résulte finalement un grain de pollen tricellulé, le gamétophyte mâle, avec deux petites cellules germinales identiques, les gamètes mâles, dans une grande cellule végétative (Borg *et al.*, 2009).

Le grain de pollen entre ensuite en phase de maturation au cours laquelle il accumule des sucres, lipides, transcrits et protéines qui, lors de la pollinisation, permettront une élongation très rapide du tube pollinique (Pacini, 1996). Ainsi le grain de pollen double de volume entre la PMI et la maturité, ses niveaux d'ARN sont également multipliés par 7



Figure 7 : Mise en évidence de la croissance des tubes polliniques au cours de la pollinisation d'une fleur d'*Arabidopsis*. *Olympus Image of the Year Award 2021. Jan Martinek.*
Après éclaircissement de la fleur, l'échantillon a été coloré avec du bleu d'aniline afin de mettre en évidence la callose. L'observation a été faite en microscopie à fluorescence.

(Schrauwen *et al.*, 1990). La synthèse d'amidon est notamment cruciale pour la maturation du pollen car l'amidon constitue une réserve d'énergie pour la germination et l'élongation du tube pollinique. Au cours de la maturation du pollen, un basculement métabolique a lieu au niveau de la glycolyse : la glycolyse plastidiale devient plus importante que la glycolyse cytosolique. Ainsi la plupart des mutants ayant des problèmes de développement du pollen concernent des gènes exprimés dans les plastes notamment impliqués dans la glycolyse plastidiale (Selinski & Scheibe, 2014). En fin de maturation, le pollen sera finalement soumis à une phase de déshydratation contrôlée (Buitink *et al.*, 1996). Pour s'y préparer, la cellule végétative accumule alors des osmoprotectants comme des disaccharides, de la proline, de la glycine-bétaïne et des protéines pour protéger l'intégrité du grain de pollen (Schwacke *et al.*, 1999).

A l'état mature, le grain de pollen a une structure particulière : sa paroi est constituée de plusieurs couches avec l'intine au niveau interne qui est une paroi pecto-cellulosique synthétisée par la microspore et l'exine au niveau externe. L'exine est elle-même composée d'une paroi externe ornementée (la sexine) et d'une paroi interne (la nexine). L'exine est composée de sporopollénine qui est un polymère aliphatique composé d'acides gras et de phénylpropanoïdes synthétisés par le tapis pollinique (Piffanelli *et al.*, 1998). A maturité du pollen, les grains de pollen sont libérés vers l'extérieur par ouverture de la paroi de l'anthere déclenchée par un programme de mort cellulaire programmée (Wu & Cheung, 2000).

2. Pollinisation et fécondation

2.1. Pollinisation

Lors de la pollinisation, les grains de pollen sont déposés sur le stigmate. Les grains de pollen sont largement excédentaires par rapport au nombre d'ovules à féconder, il y a donc une compétition entre grains de pollen au niveau de la croissance du tube pollinique (Selinski & Scheibe, 2014). Dès que le grain de pollen touche les papilles stigmatiques il se réhydrate ce qui entraîne une réactivation métabolique aboutissant à sa germination (Firon *et al.*, 2012).

La germination du grain de pollen correspond à la mise en place du tube pollinique à partir de la cellule végétative. De toutes les cellules végétales, le tube pollinique est celle qui a la croissance la plus rapide (**Fig 7**) (Stone *et al.*, 2004; Selinski & Scheibe, 2014). C'est par

conséquent un processus très énergivore. Ainsi il a été montré chez le tabac et le maïs que le pollen contient 20 fois plus de mitochondries et respire 10 fois plus que les cellules des tissus végétatifs (Lee and Warmke, 1979; Tadege and Kuhlemeier, 1997). Toutes les enzymes liées à la chaîne respiratoire sont donc activées au cours de ce processus et on constate un avortement du pollen lorsque l'Alternative Oxydase (AOX) est réprimée (Kitashiba *et al.*, 1999). Cependant, la phosphorylation oxydative n'est pas la seule voie responsable de la forte synthèse d'énergie au cours de la germination du pollen puisque l'oligomycine qui a la capacité de bloquer la phosphorylation oxydative n'a que peu d'effet sur ce processus. Par ailleurs il a été montré une forte production d'éthanol lors de la croissance du tube pollinique chez le tabac et le pétunia (Bucher *et al.*, 1995). Et la Pyruvate Décarboxylase (PDC) impliquée dans la fermentation apparaît critique pour une croissance efficace du tube pollinique. En effet chez le mutant *pd2*, la croissance du tube pollinique est réduite et la mutation est faiblement transmise à la descendance chez un mutant hétérozygote *PDC2/pd2*, ce qui implique une fréquence d'événements de fécondation plus faible des grains de pollen mutants par rapport aux grains de pollen sauvage (Gass *et al.*, 2005). Il semblerait donc que la fermentation soit également primordiale au cours de la germination du grain de pollen, de concert avec les voies aérobies de production d'énergie.

2.2. Fécondation

Des peptides tels que des arabinogalactanes mais aussi du GABA sont sécrétés par l'ovule et orientent la croissance du tube pollinique jusqu'à ce que celui-ci atteigne le sac embryonnaire, toujours du côté micropylaire (Bouché *et al.*, 2003 ; Hafidh *et al.*, 2016). Le tube pollinique traverse alors les cellules synergiques pour parvenir aux noyaux de l'oosphère et de la cellule centrale (Drews & Yadegari, 2002). La traversée des cellules synergides par le tube pollinique va induire leur mort du fait de la contrainte mécanique induite (Russell, 1992). Cette mort permet de faciliter la migration des noyaux reproducteurs délivrés par le tube pollinique. L'un des deux noyaux reproducteurs délivrés par le tube pollinique fusionne alors avec l'oosphère pour donner le zygote qui deviendra un embryon diploïde, et le deuxième noyau fusionne avec la cellule centrale homodiploïde pour donner un albumen triploïde. Il s'agit donc d'une double fécondation, caractéristique unique des Angiospermes. L'albumen et

l'embryon se développeront donc sous le contrôle des deux génomes parentaux. Cependant, les ratios de génomes maternel/paternel seront différents entre les deux compartiments : 2 :1 dans l'albumen et 1 :1 dans l'embryon (**Fig 8**) (Li & Berger, 2012). Les téguments de la graine seront intégralement dérivés des téguments de l'ovule. Ils sont donc diploïdes et d'origine maternelle (Hehenberger *et al.*, 2012; Doll *et al.*, 2020)

3. Embryogenèse

3.1. Organogenèse

Après la fécondation, l'embryon et l'albumen se développent de manière coordonnée. Au sens strict, la phase d'embryogenèse est une phase de divisions cellulaires qui suit la fécondation et qui aboutit à la formation des différents organes (radicule, hypocotyle, cotylédons) et la mise en place des deux méristèmes primaires, le méristème caulinaire et le méristème racinaire. Cette phase d'embryogenèse est cruciale pour la suite du développement de la graine, par exemple chez *Arabidopsis* 1% des graines vont ainsi avorter spontanément chez un individu sauvage (Mattioli *et al.*, 2012).

La fécondation de l'oosphère par l'un des noyaux du grain de pollen donne un zygote qui va se diviser une première fois de manière asymétrique (**Fig 9**). Il donnera alors une petite cellule apicale qui sera à l'origine de la majeure partie de l'embryon et une grande cellule basale qui donnera le suspenseur et l'hypophyse (Lafon-Placette & Köhler, 2014). Ces deux cellules diffèrent également par leur composition. La cellule apicale possède un cytoplasme dense avec une très forte activité de synthèse protéique tandis que la cellule basale possède une volumineuse vacuole (Capron *et al.*, 2009). Cette cellule basale va peu se diviser mais va produire le suspenseur qui est une assise unicellulaire fondamentale reliant l'embryon à la plante mère (Goldberg *et al.*, 1994). La cellule la plus apicale de ce suspenseur, l'hypophyse, sera par la suite à l'origine du méristème racinaire (Goldberg *et al.*, 1994). La cellule apicale, elle, va se diviser de façon symétrique et anticline jusqu'au stade octant (8 cellules). A partir du stade octant, des divisions périclines vont permettre de mettre en place le premier tissu de l'embryon : le protoderme. On aboutit alors au stade globulaire avec un embryon

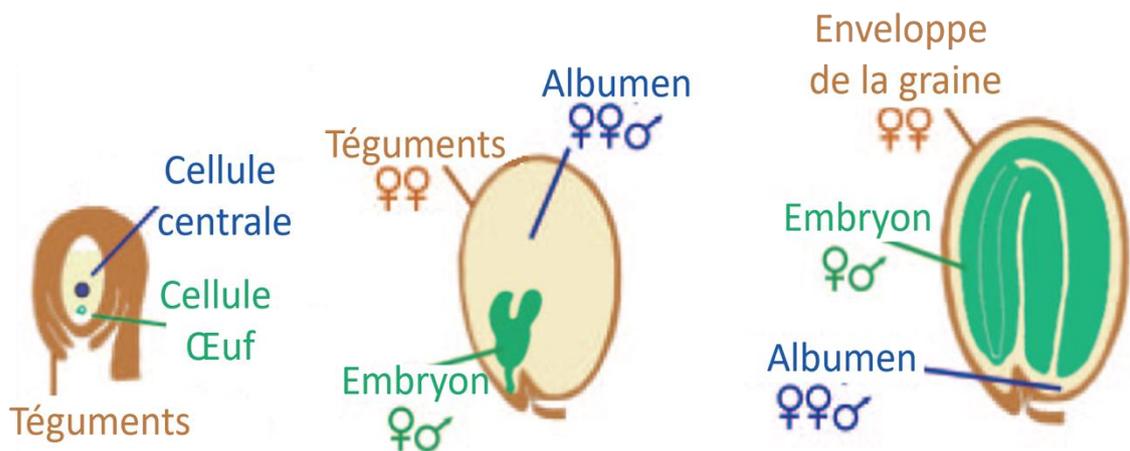


Figure 8 : Répartition des ratios de génomes parentaux au sein des différents compartiments de la graine. (Sundaesan, 2005).

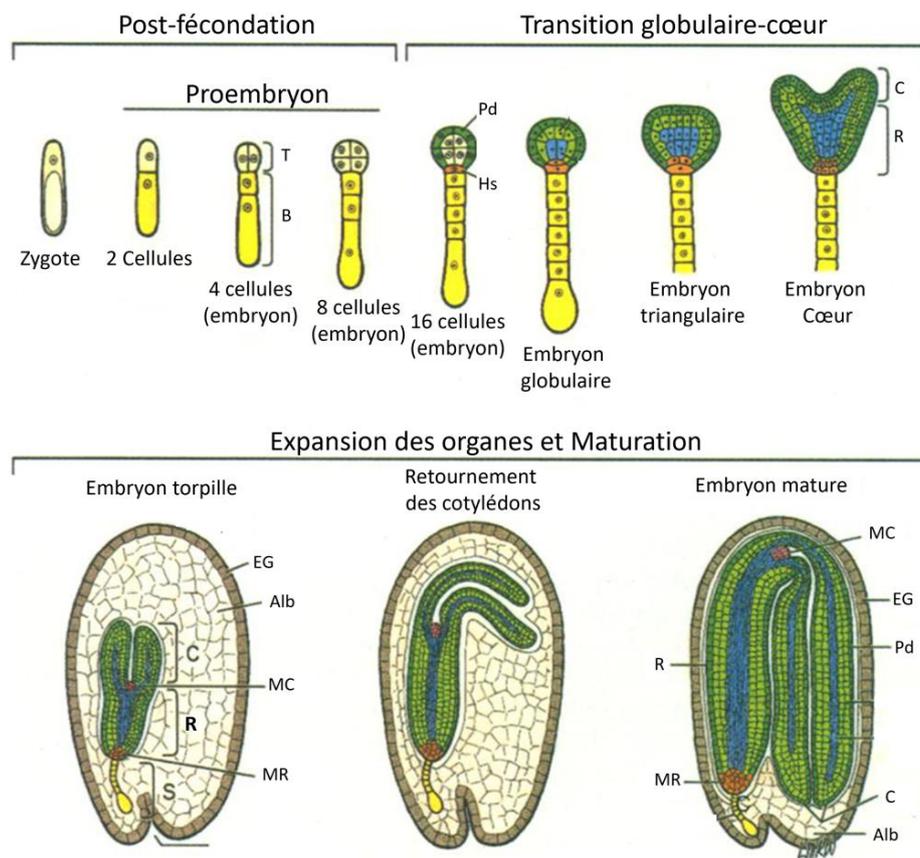


Figure 9 : Principales étapes du développement de l'embryon d'Arabidopsis (Goldberg et al., 1994).

Abbréviations : T: cellule terminale ; B: Cellule basale ; Pd: Protoderme ; Hs: Hypophyse ; C: Cotylédons ; R: Radicule ; EG: Enveloppe de la graine ; Alb: Albumen ; MC: Méristème caulinaire ; MR: Méristème racinaire ; S: Suspenseur

sphérique (Capron *et al.*, 2009). A partir de ce stade, les divisions cellulaires conduisent à la mise en place d'un axe apico-basal qui aboutit à un aplatissement de la partie supérieure de l'embryon : c'est le stade triangulaire. L'embryon a alors plus de 100 cellules et croît particulièrement au niveau des deux angles opposés de la région apicale, les futurs cotylédons. Le stade cœur qui en découle permet ainsi de distinguer les cotylédons, l'hypocotyle, la radicule, le protoderme ainsi que les premiers tissus provasculaires (Jurgens *et al.*, 1995). Les méristèmes racinaires et caulinaires se mettent également en place à ce stade. Au cours des stades suivants nommés stades torpille et retournement des cotylédons, le développement des organes formés continue essentiellement par un processus d'élongation cellulaire (**Fig 9**). L'embryogenèse au sens strict, c'est-à-dire la morphogénèse s'arrête donc au stade cœur. Chez *Arabidopsis*, à la fin de son développement, l'embryon occupe la majeure partie du volume de la graine, et une couche résiduelle d'albumen persiste entre l'embryon et les téguments de la graine.

4. Développement de l'albumen

4.1. Importance de l'albumen

Chez les Angiospermes, l'albumen, mis en place grâce à la double fécondation, est un tissu environnant l'embryon qui soutient sa croissance en transférant des nutriments issus de la plante mère (Yang *et al.*, 2008; Hehenberger *et al.*, 2012). Son développement comprend une phase syncytiale et une phase de cellularisation (**Fig 10**).

4.2. Phase syncytiale

Chez *Arabidopsis*, après la fécondation, la cellule centrale du sac embryonnaire devenue triploïde subit 8 cycles de division cellulaire sans cytokinèse qui donnent 200 noyaux localisés en périphérie de l'albumen avec une large vacuole au centre (**Fig 10**) (Brown *et al.*, 1999; Hehenberger *et al.*, 2012). A partir du stade 16 noyaux, ce syncytium se divise en 3 zones : micropylaire, centrale et chalazale (**Fig 10**) (Hehenberger *et al.*, 2012). Le pôle chalazal est une zone de transit des nutriments entre la plante mère et l'embryon (Hehenberger *et al.*, 2012; Li & Berger, 2012). La vacuole centrale est quant à elle un compartiment de stockage

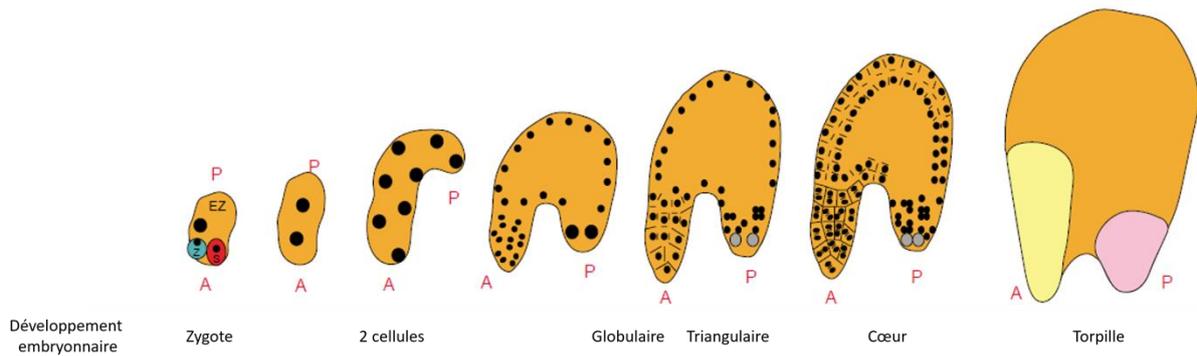


Figure 10 : Développement de l'albumen (Berger, 2003)

Après fécondation, l'albumen va se développer d'abord par des divisions cellulaires sans cytokinèse pour aboutir à un syncytium. Puis l'albumen va se cellulariser en commençant par le côté micropylaire. Lorsque l'albumen termine sa cellularisation, l'embryon est au stade torpille.

Abréviations : A: Pôle antérieur (micropylaire) ; P: Pôle Postérieur (Chalazal) ; EZ: Cellule centrale fécondée ; Z: Zygote ; S: Cellule synergides

des hexoses durant le développement précoce de la graine. Le saccharose y arrive via la zone chalazale pour être converti en hexoses par des invertases vacuolaires (Morley-Smith *et al.*, 2008). La taille de la vacuole centrale détermine donc la force d'appel du puits durant le développement précoce de la graine. Le volume qu'occupe l'albumen au moment de la cellularisation est donc déterminant pour la taille finale de la graine (Li & Berger, 2012).

Certains gènes sont clés dans la régulation de la phase syncytiale, c'est notamment le cas de la famille CLE et des gènes *CLE19* et *CLE8* codant des peptides régulant l'expression de facteurs de transcription *WOX* impliqués dans le développement précoce de l'embryon, notamment la mise en place de l'axe apico-basal. En effet, les mutants *cle19* et *cle8* montrent une prolifération nucléaire retardée, moins de noyaux, une désorganisation spatiale de l'albumen et au final une graine plus petite (Xu *et al.*, 2015).

4.3. Cellularisation

La cellularisation de l'albumen débute lorsque les divisions cellulaires cessent. Elle commence au niveau de la zone entourant l'embryon (Embryo Surrounding Zone, ESR), zone située au niveau micropylaire, puis se déploie par vagues jusqu'au domaine chalazal (**Fig 10**) (Yang *et al.*, 2008; Hehenberger *et al.*, 2012). Ce processus de cellularisation dépend des mêmes acteurs moléculaires que la cytokinèse des cellules végétatives (Sørensen *et al.*, 2002). La cellularisation entraîne une diminution de la taille de la vacuole. Le saccharose venant de la plante mère n'est alors plus dirigé vers la vacuole centrale mais vers l'embryon qui devient alors le puits majeur pour la graine. Ce changement de flux métabolique est primordial puisqu'en absence de cellularisation, l'embryon ne peut pas poursuivre sa croissance : c'est le cas des mutants *fis* (Fertilization Independent Seed) chez qui l'absence de cellularisation de l'albumen entraîne la mort de l'embryon (Hehenberger *et al.*, 2012). De nombreux autres gènes régulent la cellularisation de l'albumen, c'est le cas de *AGL62* codant un facteur de transcription exprimé exclusivement dans l'albumen, et qui est un répresseur de la cellularisation. Le mutant *agl62* subit ainsi une cellularisation précoce (Guo *et al.*, 2022). C'est également le cas de *IKI* et *MINI3* qui régulent la taille de l'albumen en contrôlant la cellularisation (Sundaresan, 2005). En fin de cellularisation, l'albumen est composé de 4 à 6 couches de cellules et subit un ralentissement métabolique qui marque également le début

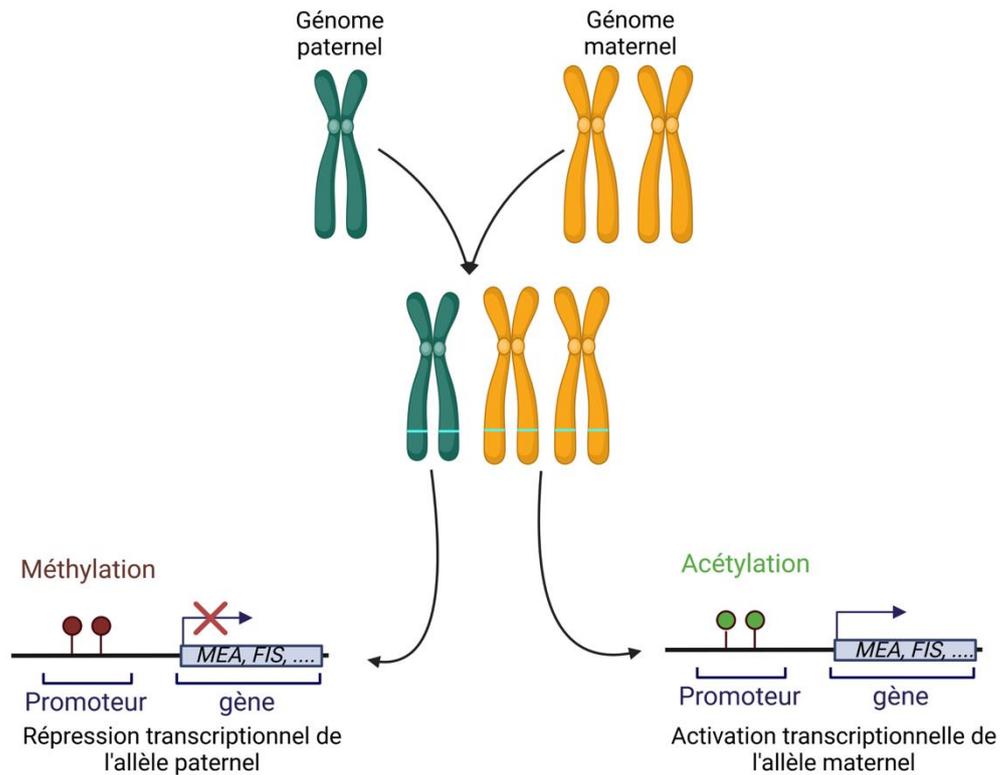


Figure 11 : Illustration de l'impact d'une empreinte parentale sur un gène donné dans l'albumen.

Dans le cadre de cet exemple, l'allèle paternel du gène sera réprimé par des modifications épigénétiques. Seule la version maternelle de ce gène, activée transcriptionnellement par des modifications épigénétiques s'exprimera. Les gènes *MEA* ou *FIS* régulant le développement précoce de la graine sont des exemples de gènes soumis à empreinte parentale (Huh *et al.*, 2007). Créé avec Biorender.

de l'accumulation des réserves dans la graine (Li & Berger, 2012).

Au cours de la cellularisation, l'albumen accumule de l'amidon tout en continuant à importer du saccharose converti en hexoses. Cela coïncide avec une forte augmentation du volume de l'albumen car cette hydrolyse du saccharose contribue à faire entrer de l'eau du fait de la diminution du potentiel hydrique. Cet import de saccharose du phloème vers l'albumen est possible grâce à des transporteurs spécifiques comme *SWEET11* et *SWEET15* qui s'expriment au niveau micropylaire (Chen *et al.*, 2015).

5. Signalisation et régulations du développement précoce de la graine

5.1. Régulations épigénétiques et empreintes parentales

Le développement précoce de la graine est régulé génétiquement et de manière différente selon l'origine parentale des allèles de certains gènes. Ainsi est née une théorie de conflits génomiques affectant un développement différencié en fonction de l'origine parentale de l'allèle ou du ratio génome paternel/génome maternel pour un locus donné (Grossniklaus *et al.*, 1998; Sundaresan, 2005). Cette notion d'excès de génome ne concerne que certains gènes et est reliée à la notion d'empreinte génétique qui est un phénomène épigénétique induisant une expression différenciée des allèles d'un gène en fonction de leur origine parentale (**Fig 11**) (Moreno-Romero *et al.*, 2019). L'empreinte parentale se caractérise le plus souvent donc par des modifications épigénétiques de l'ADN de l'albumen (méthylation, acétylation); en effet, jusqu'à présent aucun gène soumis à empreinte parentale n'a été détecté dans l'ADN de l'embryon (Hsieh *et al.*, 2011; Moreno-Romero *et al.*, 2019). Cependant bien que restreint à l'albumen, la perturbation de l'expression de gènes soumis à empreinte parentale dans l'albumen a des répercussions sur le développement de l'embryon. L'impact de l'empreinte parentale n'est toutefois pas systématique et généralement restreint aux stades très précoces du développement soit 3 à 5 jours après la fécondation (del Toro-De León *et al.*, 2014). Tous les gènes impliqués dans la mise en place de l'empreinte sont eux-mêmes soumis à empreinte parentale, donc régulés épigénétiquement (Huh *et al.*, 2007). C'est par exemple le cas de *MEA* qui contrôle la prolifération cellulaire et l'avancée de la morphogenèse embryonnaire (Grossniklaus *et al.*, 1998). En effet chez le mutant *mea*, l'embryon avorte au stade globulaire du fait d'une prolifération cellulaire anarchique et d'une absence de

cellularisation de l'albumen. Cela ne se produit que si le parent femelle est muté, le développement de la graine sera ainsi normal si la mutation se trouve sur l'allèle paternel (Grossniklaus *et al.*, 1998). Cependant les études transcriptomiques divergent quant à l'importance d'un parent dans le nombre de gènes soumis à empreinte parentale. Certaines études concluent à une équivalence entre l'influence paternelle et maternelle tandis que d'autres concluent à une dominance quasi systématique des allèles d'origine maternelles dans l'albumen (del Toro-De León *et al.*, 2014). Mais à ce jour, seuls 11 gènes ont été formellement identifiés comme étant soumis à empreinte parentale (Hsieh *et al.*, 2011). Certains d'entre eux contrôlent la croissance et la capacité de transfert de nutriments de l'albumen vers l'embryon (Hsieh *et al.*, 2011). On estime néanmoins que 30 à 50 gènes sont exprimés uniquement dans leur version paternelle, et 200 gènes uniquement exprimés dans leur version maternelle dans l'albumen (Hsieh *et al.*, 2011). De leur côté, Moreno-Romero *et al.*, (2019) indiquent que le nombre de gènes exprimés uniquement dans leur version paternelle est plus élevé que le nombre de gènes exprimés uniquement dans leur version maternelle, le biais précédant venant alors de la présence de l'enveloppe de la graine dans les analyses alors que celle-ci est 100% d'origine maternelle. La question de la dominance maternelle ou paternelle de l'empreinte n'est donc pas encore définitivement résolue.

5.2. Communications embryon-albumen

La présence d'albumen autour de l'embryon au cours des phases précoces du développement de la graine implique des communications entre ces deux compartiments. Ces communications sont à même d'exercer une influence réciproque sur le développement de l'embryon et de l'albumen (Doll & Ingram, 2022). Elles sont particulièrement denses dans l'ESR (Yang *et al.*, 2008). Cette zone est importante dans la délimitation de l'embryon et de l'albumen afin d'éviter la fusion d'organes. En effet, les gènes *ABNORMAL LEAF SHAPE 1* (*ALE1*) et *ZHOUP1* (*ZOU*) sont exprimés spécifiquement dans l'ESR et permettent une bonne séparation de l'embryon et de l'albumen. Ainsi, les mutants *ale1* et *zou* ont un albumen qui adhère fortement à l'embryon ce qui ralentit la croissance de ce dernier à partir du stade torpille (Yang *et al.*, 2008). Les graines de ces mutants produisent également des plantules très sensibles à la dessiccation. Un exemple d'interactions embryon-albumen a été décrit par

Doll *et al.* (2020). Les auteurs de cette étude ont ainsi montré que l'imperméabilisation de la cuticule de l'embryon se met en place par l'expression de *TWS1* dans l'embryon, et d'*ALE1* dans l'albumen. Les protéines codées par ces deux gènes activent de concert une voie de signalisation GASSGO1/SCHENGEN3 au niveau des vides dans la cuticule en formation, permettant ainsi de compléter la mise en place de la cuticule. Lorsque la cuticule est totalement installée, créant ainsi une barrière imperméable entre l'embryon et l'albumen, l'interaction de *TWS1* et *ALE1* ne peut plus avoir lieu. Par conséquent, la signalisation régulant la mise en place de la cuticule s'arrête (Doll *et al.*, 2020). L'activation constitutive et donc prématurée de cette voie de signalisation par une mauvaise séparation embryon-albumen induit un arrêt du développement au stade torpille. De plus, les embryons ne tolèrent pas la déshydratation et meurent, les graines de ces mutants étant en outre morphologiquement anormales (Doll *et al.*, 2020).

5.3. Signalisation métabolique et hormonale

Au cours de l'embryogenèse, l'auxine en particulier joue un rôle majeur dans le développement de l'embryon. En effet l'auxine est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (en synergie avec les cytokinines) et la croissance cellulaire (en synergie avec les gibbérellines), mais aussi dans l'établissement du plan d'organisation de l'embryon et la différenciation des premiers tissus conducteurs. Elle régule également, avec les cytokinines, la mise en place des méristèmes racinaires et caulinaires. C'est ainsi que des mutants déficients dans la biosynthèse, le transport ou la réponse à l'auxine sont des mutants présentant des anomalies lors de l'embryogenèse ou des mutants embryons-létaux (Robert *et al.*, 2018; Matilla, 2020).

Au cours des premiers stades de l'embryogenèse, l'auxine produite par le suspenseur est transportée dans le jeune embryon grâce au transporteur d'efflux *PIN7* (Robert *et al.*, 2013). Cette production d'auxine est induite par l'expression du gène *YUCCA10* impliqué dans la synthèse d'auxine, gène qui est inhibé avant fécondation par le gène *PRC2* dont le rôle est de réprimer le développement de la graine en absence de fécondation (Figueiredo *et al.*, 2015).

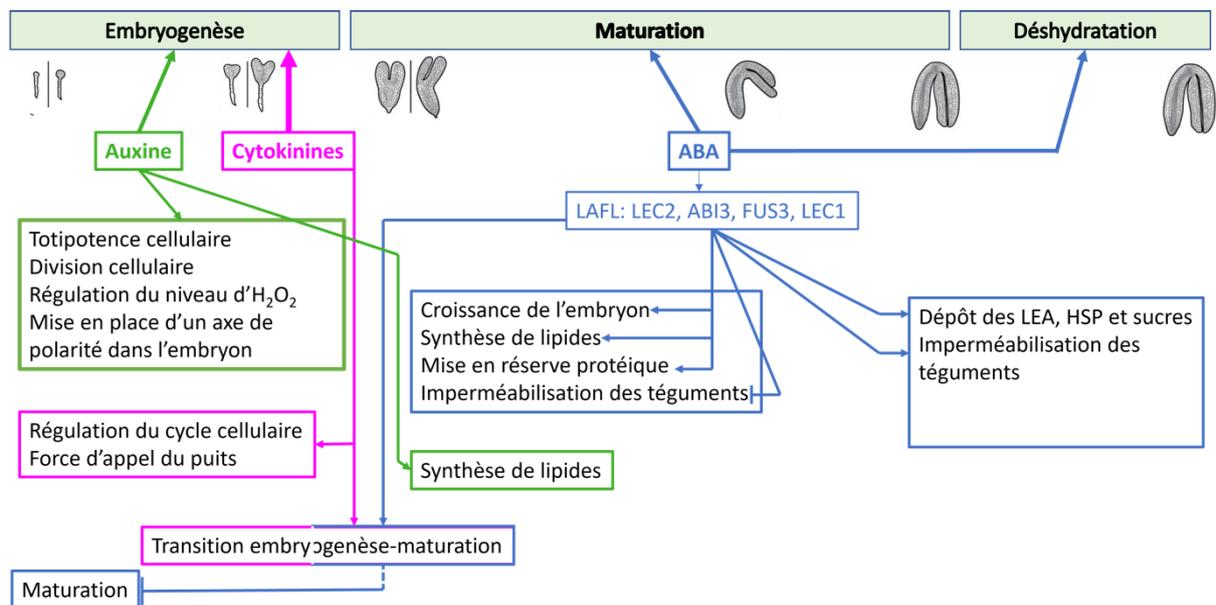


Figure 12: Régulations hormonales impliquées dans le développement de la graine

A la fin du stade globulaire, la distribution spatiale de l'auxine dans l'embryon va changer : il y a en effet mise en place d'un gradient d'auxine selon un axe apico-basal, gradient établi par les transporteurs d'efflux *PIN1*, *PIN3*, *PIN4* et *PIN7* (Friml *et al.*, 2003). Ce gradient d'auxine va ainsi permettre le passage au stade triangulaire en induisant la croissance des cotylédons et la formation des premiers tissus conducteurs, et donc l'acquisition de la symétrie bilatérale de l'embryon (**Fig 12**). La concentration de l'auxine à la base de l'embryon et de l'hypophyse du suspenseur est nécessaire à la mise en place du méristème racinaire et de sa niche de cellules souches (Friml *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter qu'au niveau de ce pôle radicaire, l'auxine va induire l'expression des gènes *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR* de type A (*ARR-A*)5 et 7, gènes impliqués dans la répression de la signalisation cytokinique (Müller & Sheen, 2008). Cette répression de la signalisation cytokinique au pôle basal de l'embryon est nécessaire pour la mise en place de cette niche de cellules souches (Müller & Sheen, 2008). Au pôle apical de l'embryon, la mise en place du méristème caulinaire et de sa niche de cellules souches est également régulée par la balance auxine/cytokinine (Zhang *et al.*, 2017). Par ailleurs, l'auxine module également l'activité des systèmes antioxydants notamment l'expression des gènes *CAT* codant des catalases (Guan & Scandalios, 2002). L'ensemble de ces processus permettraient ainsi de réguler le niveau d' H_2O_2 (**Fig 12**) qui est lié à l'intense l'activité respiratoire nécessaire au cours des premières phases de l'embryogenèse et qui entraîne une forte augmentation des ROS (Bailly, 2004). Chez le mutant du gène *FTSH PROTEASE 4*, d'*Arabidopsis*, de hauts niveaux de ROS ont été mesurés qui semblent avoir pour effet de perturber fortement le cycle cellulaire (Dolzblasz *et al.*, 2018). Les ROS doivent donc être maintenus à un niveau compatible avec la division cellulaire. Enfin l'auxine régule également le développement de l'albumen dont elle contrôle la prolifération et la cellularisation (Figueiredo *et al.*, 2016). Les cytokinines régulent également la prolifération de l'albumen au travers de la régulation des divisions cellulaires (Yang *et al.*, 2002). Les cytokinines régulent donc ainsi indirectement la force d'appel du puits exercée par la graine au travers de l'albumen (**Fig 12**). De plus, il a été montré que l'auxine synthétisée par l'albumen est aussi impliquée dans la régulation du développement des téguments de la graine (Figueiredo *et al.*, 2016).

Les hormones jouent donc un rôle signalétique fondamental dans le développement de la graine, mais ce ne sont pas les seules. En effet les sucres, en plus de leur rôle nourricier, ont également un rôle de signalisation. Ainsi il a été montré qu'une balance

hexose/saccharose faible promeut la cellularisation de l'albumen (Hehenberger *et al.*, 2012). De plus, le myo-inositol, précurseur de l'acide phytique et du phosphatidylinositol, est présent pour réguler la signalisation auxine en permettant la conjugaison de l'acide-indole-3-acétique (Ostrowski *et al.*, 2020). Le myo-inositol est également important pour la mise en place des parois. En effet, le myo-inositol est un précurseur d'acide galacturonique composant la pectine (Loewus, 2006). Un blocage de sa synthèse induit un avortement des graines en cours de développement due à la mort de l'embryon au stade globulaire (Sato *et al.*, 2011). Le tréhalose-6-phosphate (T6P) en tant que molécule signal est également important pour réguler la phase d'embryogenèse précoce et la transition embryogenèse-maturation (Meitzel *et al.*, 2021). De plus les mutants affectés dans la synthèse de ce sucre présentent une mort de l'embryon due à un défaut de synthèse de parois et des divisions cellulaires anormales. Le métabolisme du tréhalose est donc fortement lié au développement embryonnaire au-delà du stade torpille au travers de la régulation de la synthèse de pectine et de cellulose (Paul *et al.*, 2008). Ainsi chez le pois, une baisse de la teneur en T6P produit des graines plus petites et sans amidon (Meitzel *et al.*, 2021).

Le développement précoce de la graine est donc soumis à de nombreuses régulations métaboliques, nutritionnelles et hormonales. Ces régulations et leurs acteurs moléculaires vont ensuite varier au cours de la phase de maturation du fait d'importants changements métaboliques.

6. Phase de maturation de la graine

6.1. Transition embryogenèse-maturation

La maturation débute lorsque l'embryon passe du stade cœur au stade torpille (O'Neill *et al.*, 2019). Au cours de cette transition, des changements massifs dans le transcriptome de la graine sont observés (O'Neill *et al.*, 2019). L'embryon passe d'une croissance par divisions cellulaires à une croissance essentiellement due à de l'élongation cellulaire (Paul *et al.*, 2008). Il a été montré que Les sucres jouent un rôle signal dans l'entrée en maturation. En effet un ratio hexose/saccharose élevé stimule les divisions cellulaires de l'embryon tandis qu'un ratio faible promeut la maturation et l'accumulation de composés de réserve (Stein *et al.*, 2017;

O'Neill *et al.*, 2019). Le ratio hexose/saccharose dépend en outre du niveau de cellularisation de l'albumen bien que cette cellularisation ne soit pas un pré-requis à l'entrée en maturation puisque que les mutants *fis*, chez qui la cellularisation de l'albumen n'a pas lieu, débutent malgré tout leur phase de maturation, cette phase étant cependant anormale (O'Neill *et al.*, 2019). Par ailleurs le saccharose stimule l'expression de gènes associés à la mise en place des composés de réserve de la graine (Becerra *et al.*, 2006).

6.2. Verdissement et photosynthèse

Les proplastés présents dans l'embryon commencent à se différencier lentement en chloroplastes à partir du stade globulaire. Cela se traduit par un verdissement de l'embryon qui constitue le premier marqueur visible de l'entrée de la graine en phase de maturation (O'Neill *et al.*, 2019). Ce verdissement est transitoire, débute au stade cœur et perdure jusqu'à ce que l'embryon ait atteint sa taille finale. Chez *Arabidopsis*, ce verdissement est observé sur une période comprise entre 5 jours et 13 jours après la fécondation (Fait *et al.*, 2006; Allorent *et al.*, 2015). Il coïncide avec une plus forte activité métabolique de la graine et un apport élevé en nutriments de la part de la plante mère (Borisjuk & Rolletschek, 2009). Les chloroplastes dans les graines sont ainsi spécialisés dans la génération d'ATP et de pouvoir réducteur nécessaires à la biosynthèse de composés de réserve (Borisjuk & Rolletschek, 2009).

C'est la présence de chloroplastes fonctionnels qui constitue le véritable point de contrôle pour entrer en phase de maturation (Liu *et al.*, 2017; Hofmann *et al.*, 2019). En effet, dans une étude transcriptomique, Hofmann *et al.* (2019) ont trouvé 28 gènes associés à l'organisation du chloroplaste sur 44 gènes mutants létaux pour l'embryon. Sans forcément être létale, une mutation dans un gène lié à l'organisation du chloroplaste provoque souvent un développement embryonnaire anormal (Liu *et al.*, 2017). On observe d'ailleurs un pic de transcrits associés à des gènes impliqués dans la photosynthèse en début de phase de maturation puis ces transcrits décroissent progressivement tout au long de la phase de maturation (Fait *et al.*, 2006). Cette mise en place des chloroplastes a d'ailleurs des répercussions sur d'autres organites de la cellule ; il existe en effet une signalisation rétrograde entre le chloroplaste et la mitochondrie médiée par *ABI4* pour réguler la photosynthèse embryonnaire (Giraud *et al.*, 2009).

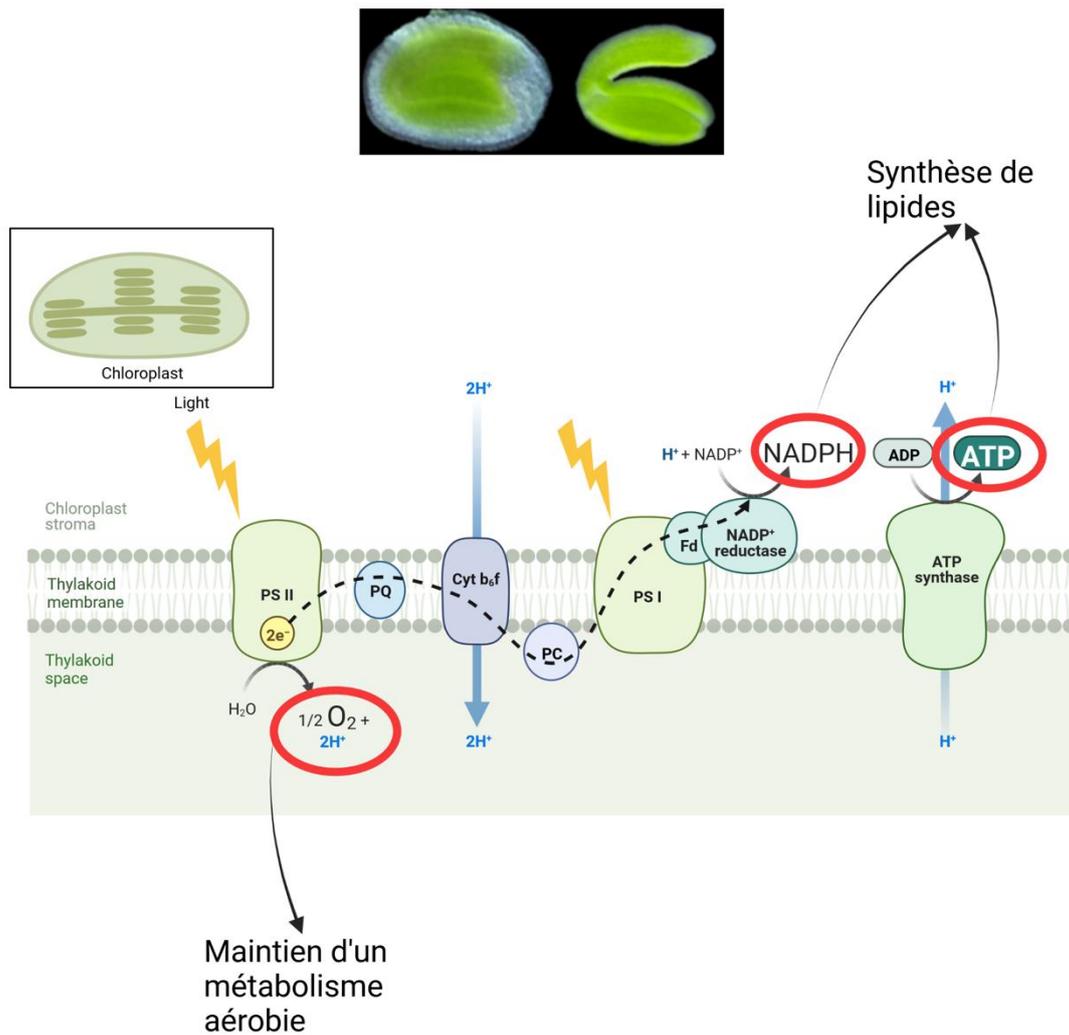


Figure 13 : Deux rôles du verdissement de l'embryon. D'après Raven *et al.*, (2005) ; Torzillo & Seibert, (2018) ; Singer *et al.*, (2020).

Au travers de la mise en place de chloroplastes fonctionnels, la phase photochimique de la photosynthèse permet de produire de l'oxygène pour éviter l'hypoxie et maintenir un métabolisme aérobie. Cela permet aussi une production d'ATP et de pouvoir réducteur dans les plastes, nécessaires à la synthèse des acides gras lors de la maturation. Créé avec Biorender.

Le spectre de la lumière incidente sur l'embryon étant différent de celui de la lumière blanche car enrichi en vert et rouge lointain, l'organisation des appareils photosynthétiques dans les embryons est différente de celle des feuilles : en effet d'après Allorement *et al.* (2015), les thylakoïdes forment moins de grana que dans les tissus photosynthétiques foliaires. La phase biochimique de la photosynthèse est également modifiée puisque le ratio RuBisCO/Chlorophylle est beaucoup plus faible que dans les tissus végétatifs du fait d'une faible teneur en RubisCO (Borisjuk & Rolletschek, 2009). La mise en place d'une machinerie photosynthétique est donc bien un aspect crucial pour la maturation de la graine puisqu'un embryon qui n'en est pas doté ne rentre pas en phase de maturation (Hofmann *et al.*, 2019). Et l'absence de lumière au niveau des siliques, si elle ne bloque pas le développement de l'embryon, altère tout de même la phase de la maturation de la graine. La graine est alors plus petite, ridée, avec une masse sèche divisée par deux (Liu *et al.*, 2017).

6.2.1. Le triple rôle de la photosynthèse embryonnaire

Le rôle attribué au verdissement de l'embryon est triple : prévenir l'hypoxie en générant de l'oxygène, générer de l'énergie et du pouvoir réducteur pour la synthèse de réserves, et limiter les pertes en carbone (**Fig13 ; Fig 14**). En effet, la concentration en oxygène dans la graine diminue de manière progressive de l'extérieur vers l'intérieur de la graine (Allorement *et al.*, 2015). La diffusion de l'oxygène vers la graine est ainsi limitée par l'absence de stomates fonctionnels et la présence d'assises subéreuses imperméables au niveau des téguments de la graine, par une limitation de la diffusion des gaz par la cuticule de l'embryon, et par la présence du péricarpe entourant les graines (Yim & Bradford, 1998). On retrouve d'ailleurs des espaces vides dans les graines qui, selon Allorement *et al.* (2015), permettraient de stocker de l'oxygène pour éviter l'hypoxie et les réactions anaérobies, tout en permettant une meilleure diffusion de la lumière. Chez le haricot, le pois et le soja, au cours de la phase photosynthétique, les niveaux d'oxygène les plus bas sont mesurés au niveau de l'albumen. Ils sont à l'inverse plus élevés au niveau de l'enveloppe et de l'embryon (Rolletschek *et al.*, 2003, 2005). Ce résultat laisse à penser que si les teneurs en oxygène sont plus élevées au niveau de l'embryon, c'est grâce à l'activité photosynthétique de l'embryon (**Fig 13**).

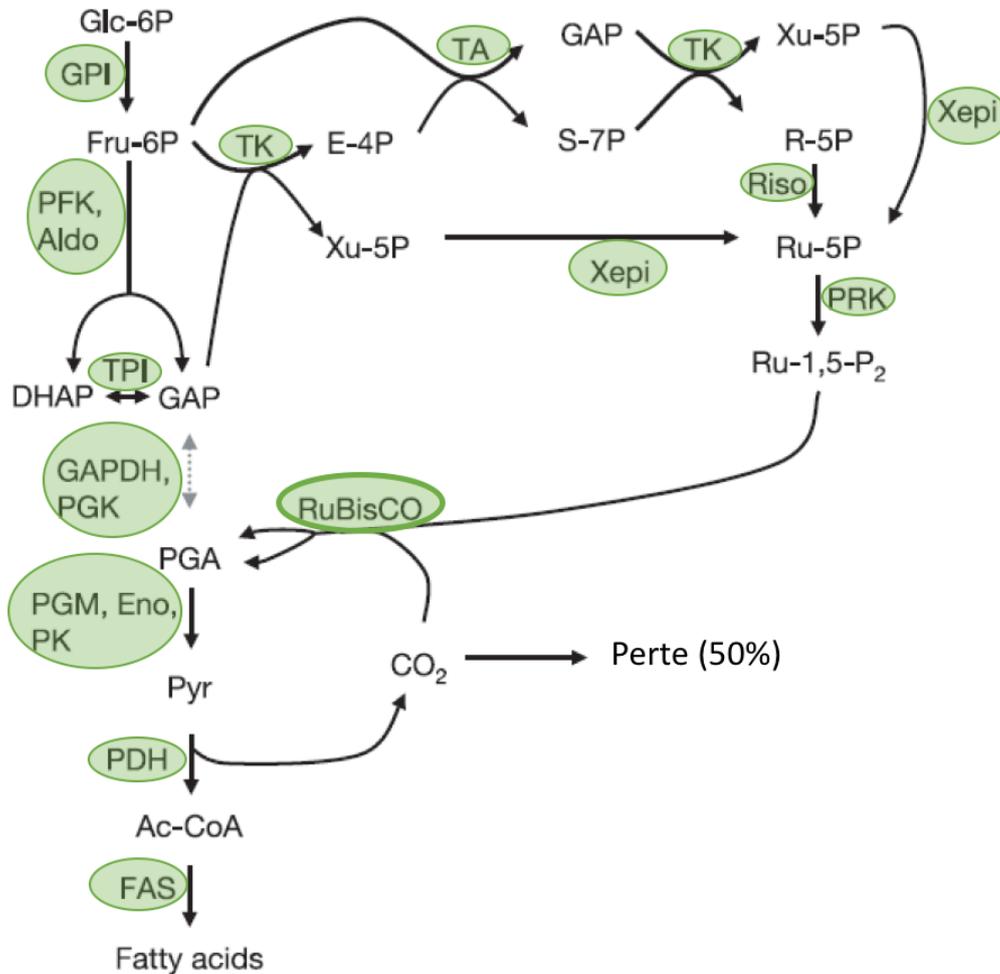


Figure 14 : Troisième rôle de la photosynthèse dans la graine : la réassimilation du Carbone (Schwender *et al.*, 2004).

« La conversion des hexoses phosphates en pentoses phosphates au cours des étapes non oxydatives de la voie des pentoses phosphates et la formation de 3-phosphoglycérate par la RubisCO en contournant la glycolyse permet de recycler la moitié du CO₂ relargué lors de la décarboxylation oxydative par la Pyruvate déshydrogénase. Le 3-phosphoglycérate est ensuite transformé en pyruvate, acétyl-CoA et acides gras. »

Abréviations : Métabolites : Ac-CoA, acétyl coenzyme-A; DHAP, dihydroxyacétone-3-phosphate; E4P, erythrose-4- phosphate; Fru-6P, fructose-6-phosphate; GAP, glyceraldehydes-3-phosphate; Glc-6P, glucose-6-phosphate; PGA, 3-phosphoglycérate; Pyr, pyruvate; R-5P, ribose-5- phosphate; Ru-1,5-P₂, ribulose-1,5-bisphosphate; Ru-5P, ribulose-5-phosphate; S-7P, sedoheptulose-7-phosphate; Xu-5P, xylulose-5-phosphate. Enzymes: Aldo, fructose bisphosphate aldolase; Eno, 2-phosphoglycerate enolase; Xepi, xylulose-5-phosphate épimérase; FAS, fatty-acid synthase, PGM, phosphoglycérémutase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase; GPI, phosphoglucose isomérase; Riso, ribose-5-phosphate isomérase; PDH, pyruvate déshydrogénase; PFK, phosphofructokinase; PK, pyruvate kinase, PGK, phosphoglycérate kinase; PRK, phosphoribulokinase; TA, transaldolase; TK, transketolase; TPI, triose phosphate isomérase.

Ainsi une hypoxie prolongée voire une anoxie perturbe la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire chez *Arabidopsis*, l'orge et le maïs, ce qui peut entraîner des répercussions en matière de métabolisme énergétique pouvant aller jusqu'à l'avortement de la graine (Borisjuk & Rolletschek, 2009). Une étude réalisée par Goffman *et al.*, (2005) sur le colza a également permis d'établir que la teneur de l'air en oxygène influençait la croissance et la conversion du carbone dans la graine. Ainsi, une teneur extérieure en oxygène de 1% bloque la croissance de l'embryon par rapport à une atmosphère naturelle. A l'inverse, lorsque la teneur en oxygène était augmentée et atteignait 64% des gaz de l'air ambiant, la croissance de l'embryon était augmentée. Cela a permis aux auteurs de conclure que la disponibilité en oxygène influence le développement de la graine. Cependant en condition naturelles, l'oxygène produit par le photosystème II en présence de lumière est non-limitant (Goffman *et al.*, 2005). Ce dégagement d'oxygène dépend également de l'éclairage. Ainsi, l'efficacité de conversion du carbone atteint son maximum à $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. La lumière naturelle apportant une énergie lumineuse d'environ $1000 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ dont seuls 20% (soit $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) passent à travers les siliques et atteignent les graines, la luminosité naturelle est donc suffisante pour assurer une conversion optimale du carbone par la mise en place de la photosynthèse au sein de la graine (Goffman *et al.*, 2005). Une absence de photosynthèse dans la graine peut donc induire une hypoxie menant à une perturbation du métabolisme carboné et un déficit énergétique.

Le second rôle attribué à la photosynthèse embryonnaire est d'ailleurs sa capacité à produire de l'ATP et du pouvoir réducteur pour la synthèse d'acides gras et d'acides aminés (**Fig 13**) (Allorent *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017). En effet, la chaîne respiratoire ne fournit que 22% des besoins en ATP pour la maturation de la graine (Schwender *et al.*, 2006). Lorsque des siliques sont traitées avec du DCMU (3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl-urée) qui inhibe le transfert des électrons au cours de la phase photochimique de la photosynthèse, l'absence de capacités photosynthétiques dans les graines induit un faible taux de germination et un retard de germination (Allorent *et al.*, 2015). Or au cours de la germination, la plantule puise ses ressources dans les composés de réserves accumulés au cours de la maturation de la graine. Ainsi, s'il y a moins de composés de réserves du fait d'un verdissement moindre et de capacités photosynthétiques absentes, ces derniers seront moins mobilisables lors de la germination (Allorent *et al.*, 2015).

Le troisième et dernier rôle de la photosynthèse dans la graine est de permettre la réassimilation du carbone perdu lors de la décarboxylation oxydative (**Fig 14**). En effet, lors de cette étape du pyruvate (molécule à 3 C) produit par la glycolyse est transformé en acétyl-CoA (molécule à 2C), précurseur d'acides gras et voie d'entrée dans le cycle de Krebs. Un atome de carbone est alors perdu sous forme de CO₂. Un tiers du carbone serait donc perdu s'il n'était pas refixé par la RuBisCO (Schwender *et al.*, 2004; Goffman *et al.*, 2005). Cependant l'organisation de la phase biochimique de la photosynthèse dans les graines est différente de celle des feuilles. En effet, les graines sont moins efficaces que les feuilles en matière d'assimilation du CO₂ du fait d'une RuBisCO fortement active mais partiellement déconnectée du cycle de Calvin. Cela induit un transfert des glucides vers la voie des pentoses phosphates (Schwender *et al.*, 2004; Allorent *et al.*, 2015). Concrètement, les hexoses phosphates sont transformés par les réactions non oxydatives de la voie des pentoses phosphates en ribulose-1,5-bisphosphate. Ce dernier est ensuite transformé en 3-phosphoglycérate par la RuBisCO qui lui adjoint un atome de carbone issu du CO₂ relargué par la décarboxylation oxydative. Le phosphoglycérate peut être ensuite de nouveau transformé en pyruvate pour subir une décarboxylation oxydative et produire l'acétyl-CoA (**Fig 14**). Si ces capacités photosynthétiques étaient absentes de la graine, la production d'acétyl-CoA serait 20% inférieure et les pertes de carbone sous forme de CO₂ 40% supérieures aux niveaux mesurés en présence de photosynthèse (Schwender *et al.* 2004). Un gain supplémentaire d'efficacité est également permis par l'absence de photorespiration dans les embryons du fait d'une teneur réduite en oxygène et accrue en CO₂ (Schwender *et al.* 2006).

Le verdissement de l'embryon au cours de la maturation de la graine permet ainsi la mise en place de capacités photosynthétiques adaptées aux conditions particulières de développement de la graine (faible lumière, hypoxie, peu de RubisCO), et de conserver des conditions optimales pour la synthèse de composés de réserves. Ainsi, on observe une corrélation entre la teneur en lipides de la graine et l'activité photosynthétique de la silique (O'Neill *et al.*, 2019). Chez les embryons privés de lumière, les corps lipidiques sont moins nombreux et plus petits. On observe également une baisse de protéines de réserves du fait d'une incapacité du chloroplaste à synthétiser les acides aminés essentiels à la synthèse protéique (Liu *et al.*, 2017).

6.3. Croissance de l'embryon et régression de l'albumen

Au cours de la phase de maturation, les réserves sont stockées dans l'embryon qui croît au détriment de l'albumen. Cette compartimentation des réserves est importante pour garantir la viabilité de la graine (Rolletschek *et al.*, 2020), et ce mécanisme est finement régulé. Ainsi, MYB118 est un facteur de transcription induit dans l'albumen au début de la phase de maturation. Il réprime la maturation de l'albumen afin de permettre l'accumulation des réserves dans l'embryon et non dans l'albumen (Barthole *et al.*, 2014). De 7 à 10 jours après la pollinisation, l'embryon continue sa croissance jusqu'à occuper environ 95 % du volume de graine (Goldberg *et al.*, 1994). Chez *Arabidopsis*, les graines sont dites exalbuminées, c'est-à-dire que l'albumen n'est que transitoire et il n'en subsiste à la fin du développement de l'embryon qu'une seule couche qui présente des caractéristiques proches de celles de la couche à aleurone chez les monocotylédones (Yang *et al.*, 2008). Cette dégradation de l'albumen est régulée, en outre, par le gène *ZOU* qui code un facteur de transcription promouvant l'expression de gènes impliqués dans la dégradation de l'albumen (Yang *et al.*, 2008). Lorsque l'embryon atteint sa taille définitive, l'accumulation de réserves débute. Les niveaux d'acides aminés, notamment de glutamine, d'asparagine et de lysine, de sucres, de polyols et d'acides organiques comme le citrate, le malate, le succinate et l' α -CG, chutent du fait de leur utilisation rapide pour la synthèse de composés de réserve (Fait *et al.*, 2006). Au cours de cette phase de transition, l'embryon contient des teneurs élevées en amidon. Cet amidon est synthétisé à partir de glucose-6-phosphate (G6P) transformé en glucose-1-phosphate par la Phosphoglucomutase puis en ADP-glucose par l'ADP-glucose pyrophosphorylase avant d'être intégré à un polymère d'amidon préexistant grâce à une Starch Synthase (da Silva *et al.*, 1997). Cet amidon est stocké dans des amyloplastes non photosynthétiques (Hsu *et al.*, 2010) et sera dégradé par des α -amylases, β -amylases et phosphorylases, et ne servira pas de source de carbone pour la synthèse de lipides ou de saccharose au cours de la suite de la maturation (Vigeolas *et al.*, 2004). Il est donc probable que sa destinée ne soit qu'énergétique.

Nature des composés de réserve chez Arabidopsis

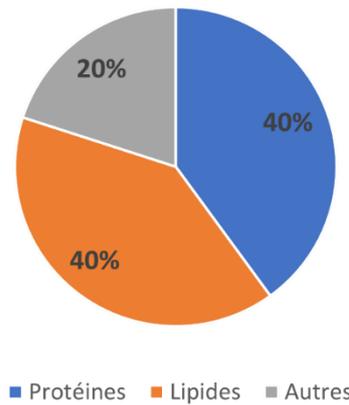


Figure 15 : Répartition de la nature des composés de réserve dans la graine *d'Arabidopsis thaliana* (d'après Baud et al., 2008).

Les valeurs indiquées ici sont des approximations moyennes pouvant varier légèrement en fonction de l'écotype *d'Arabidopsis thaliana* considéré.

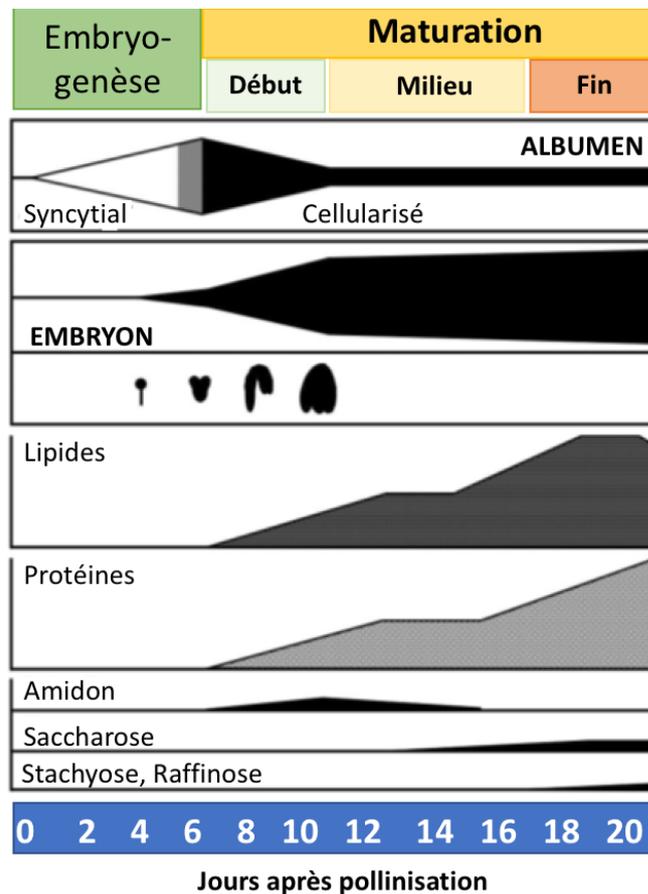


Figure 16 : Représentation schématique du développement de la graine chez Arabidopsis (d'après Baud et al., 2002 et 2008).

Le volume relatif de l'embryon et de l'albumen au cours du développement de la graine est présenté. Les embryons sont représentés au stade globulaire, torpille, cotylédons retournés et occupant la quasi-totalité du volume de la graine en fin de croissance. Une cinétique de l'accumulation des sucres, des lipides et des protéines de réserve est présentée en parallèle.

6.4. Formation des réserves lors de la phase de maturation

Les réserves représentent 90% du poids sec de la graine sèche chez *Arabidopsis* (**Fig 15**). Au cours de la période de maturation, les niveaux d'amidon accumulés précédemment baissent en même temps qu'augmentent les teneurs en triacylglycérols et protéines qui constituent les principaux composés de réserve et qui s'accumulent entre 11 et 16 jours après la fécondation (**Fig 16**) (Baud *et al.*, 2008). Le niveau de biosynthèse des acides gras excède cependant la production de lipides au cours de la maturation (Fait *et al.*, 2006). Il est donc probable que les lipides synthétisés n'aient pas pour unique fonction de constituer des réserves pour la germination future mais sont également utilisés au cours du développement de la graine à des fins énergétiques.

6.4.1. Remobilisation du Carbone

Pour mettre en place ses réserves, l'embryon doit importer des photoassimilats issus de la plante mère puisqu'il n'est pas autotrophe. La grande majorité du carbone est importé par la graine sous forme de saccharose (Baud *et al.*, 2008; Li & Berger, 2012; Stein *et al.*, 2017).

Chez les Eudicotylédones, l'albumen est un puits intermédiaire pour les nutriments d'origine maternelle (Chen *et al.*, 2015). L'alimentation de l'embryon en carbone est donc assurée par le transfert d'hexoses depuis l'albumen. Il est toutefois possible que le carbone arrive à l'embryon depuis l'albumen directement sous forme de saccharose puisque chez le pois, une augmentation de la concentration en saccharose est observée dans l'albumen avant un afflux de saccharose dans l'embryon (**Fig 17**) (Melkus *et al.*, 2009). L'albumen stocke également de fortes concentrations en acides aminés. De nombreuses perméases sont exprimées dans l'albumen permettant un transfert d'acides aminés vers l'embryon. Le saccharose est quant à lui importé vers l'embryon par des transporteurs SUT et SUC permettant un symport de saccharose et de protons au niveau des membranes plasmiques (Baud *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2015). Les transporteurs SWEET sont également impliqués dans ce transport de saccharose. Chen *et al.* (2015) ont ainsi pu déterminer que SWEET11, SWEET12 et SWEET15 permettaient le transfert du saccharose de l'enveloppe de la graine vers

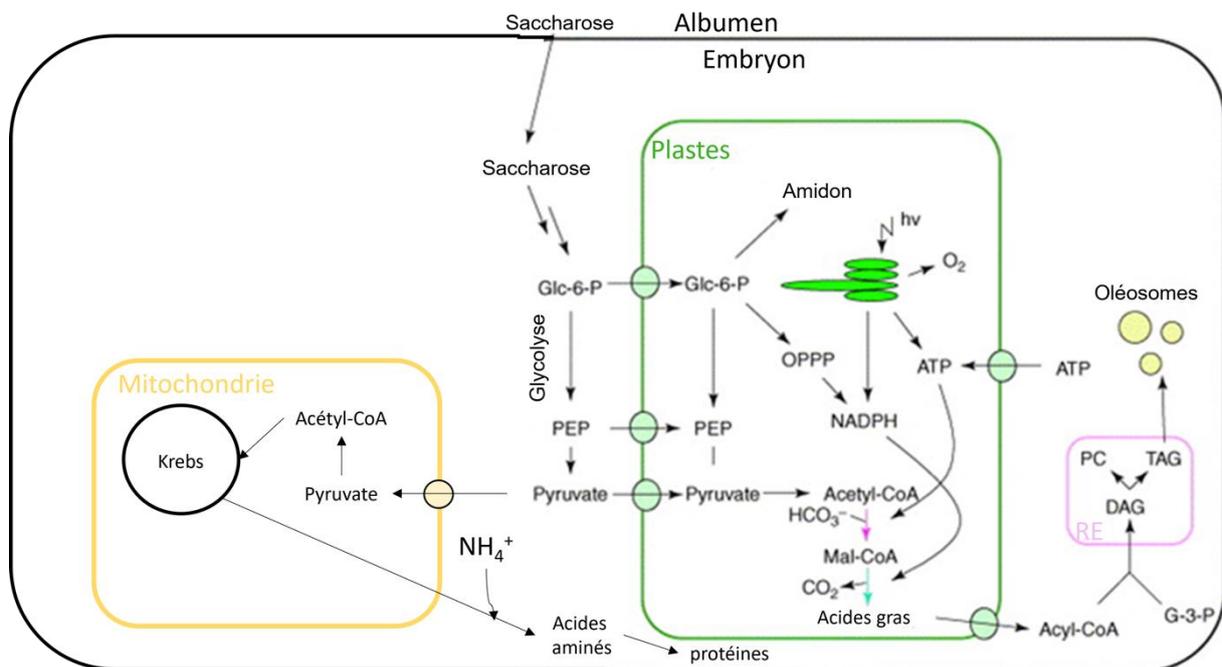


Figure 17 : Devenir du saccharose dans la graine. Adapté depuis Hills, (2004).

Au cours de la maturation, le saccharose transite par le suspenseur ou l'albumen avant d'atteindre l'embryon. Après son clivage, il peut alors être pris en charge par glycolyse dans le cytosol puis alimenter le cycle de Krebs après décarboxylation oxydative du pyruvate produisant de l'acétyl-CoA. Le glucose-6-phosphate généré peut aussi rejoindre les plastes pour alimenter la voie des pentoses phosphates et générer du pouvoir réducteur à destination de la synthèse de lipides de réserve ou servir à la synthèse d'amidon.

Abréviations : Glc-6-P, Glucose-6-Phosphate ; PEP, Phosphoenol-pyruvate ; OPPP : Voie des pentoses phosphates ; Mal-CoA, Malonyl-coA ; G-3-P, Glycérol-3-phosphate ; DAG, diacylglycérol ; TAG, triacylglycérol ; PC, phosphatidylcholine.

l'embryon. Ces gènes étant redondants, cela suggère un rôle crucial de ces transporteurs dans le transfert du saccharose à l'embryon.

La graine en développement est reliée à la plante mère par le funicule qui est essentiellement formé de tissus vasculaires. Les téguments externes reçoivent donc les nutriments via le phloème se terminant au niveau du funicule. Le déchargement du phloème se fait par voie symplastique (Stadler *et al.*, 2005) et les nutriments se déplacent ensuite via les plasmodesmes au sein d'une couche cellulaire. Par contre, au sein des téguments, les nutriments empruntent la voie apoplastique (Kim & Zambryski, 2005) puis pénètrent dans les cellules grâce à des transporteurs transmembranaires tels que SWEET pour le saccharose et UmamiT pour les acides aminés (Müller *et al.*, 2015). En fin de développement de la graine, de la lignine est déposée au niveau des parois cellulaires des téguments. Cela permet d'imperméabiliser ces derniers et de donc stopper progressivement la circulation des nutriments par voie apoplastique. Ainsi la circulation des nutriments via une voie symplastique devient prépondérante. Le contrôle du remplissage de la graine est alors plus finement contrôlé (Cochrane, 2000; Asthir *et al.*, 2002).

Une fois parvenu dans l'embryon, le saccharose est clivé par des Invertases et des Sucroses Synthases telles que SUS2 en début de maturation et SUS3 en milieu de maturation (Baud *et al.*, 2004). Il existe un basculement métabolique au cours du développement de la graine : en effet les Invertases clivant le saccharose en début d'embryogenèse sont remplacées par des Sucroses Synthase au cours de la maturation du fait de leur meilleure efficacité énergétique (Paul *et al.*, 2008). Cette activité SUS est donc un marqueur de stockage des composés de réserve (Stein *et al.*, 2017). Le clivage du saccharose génère des hexoses phosphate qui peuvent alimenter 3 voies métaboliques différentes : la synthèse transitoire d'amidon dans les plastes, la voie des pentoses phosphates et la glycolyse qui représente la voie principale de production d'acétyl-CoA (**Fig 17**) (Baud *et al.*, 2008). La génération d'hexoses phosphates est donc importante comme en attestent les mutants *frk6* et *frk7* codant des fructokinases fortement exprimées dans la graine au cours de la maturation. En effet, bien qu'ayant un développement végétatif normal, ces mutants produisent des graines plus petites, plus légères, ridées, avec un embryon déformé, un métabolisme central ralenti et moins de réserves lipidiques (Stein *et al.*, 2017). Le catabolisme du saccharose est donc essentiel à la maturation de la graine. La majeure partie du flux mitochondrial au cours de la

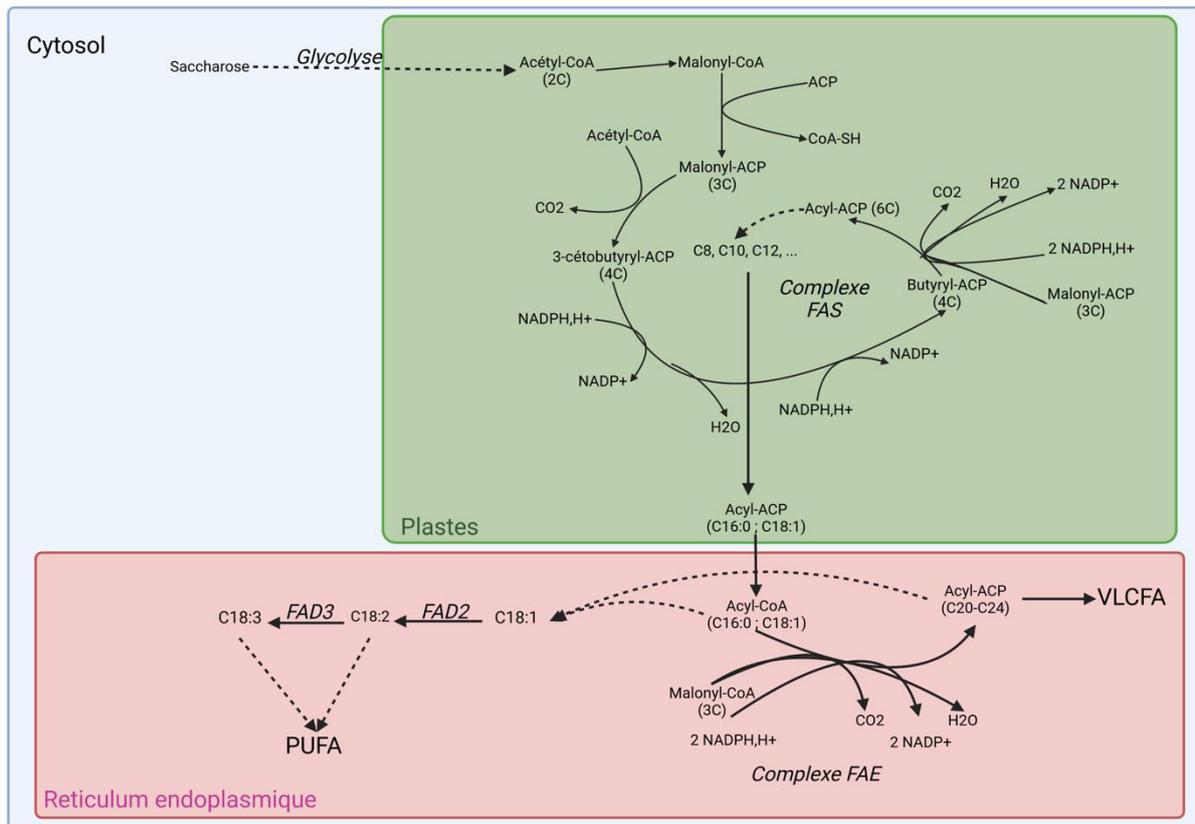


Figure 18 : Synthèse des acides gras

L'acétyl-CoA généré par le catabolisme du saccharose est un précurseur d'acides gras, il permet également la formation de malonyl-coA qui est l'unité d'élongation des acides gras. La synthèse d'acides gras se fait dans les plastes par le complexe FAS et comprend une répétition de 4 étapes : Condensation (ajout de 2 carbones), réduction, déshydratation, réduction. L'élongation des acides gras à très longue chaîne (VLCFA) ou l'ajout d'insaturations supplémentaires (PUFA) s'effectue dans le réticulum endoplasmique.

Abréviations : ACP, acyl-carrier protein ; CoA-SH, Co-enzyme A ; FAS, Fatty Acid Synthase ; FAE, Fatty Acid Elongase ; FAD, Fatty Acid Desaturase ; VLCFA, Very Long Chain Fatty Acids ; PUFA, Poly Unsaturated Fatty Acids. Créé avec Biorender.

maturation est ainsi dirigée vers la synthèse de composés de réserve. Par exemple, la quasi-totalité du citrate formé dans la mitochondrie est exporté dans le cytosol pour former de l'acétyl-CoA. De même la quasi-totalité de l'oxaloacétate est dirigée vers la synthèse d'aspartate et autres acides aminés (Schwender *et al.*, 2006).

6.4.2. Les réserves lipidiques

6.4.2.1. Synthèse des acides gras

La synthèse des acides gras (AG) a lieu dans les plastes et requiert de gros besoins en précurseurs et énergie (ATP et pouvoir réducteur). Le pouvoir réducteur nécessaire est apporté pour 22% par la voie des pentoses phosphates (Schwender *et al.*, 2003). La phase photochimique de la photosynthèse active grâce au verdissement de la graine constitue alors la source complémentaire principale de pouvoir réducteur (Goffman *et al.*, 2005).

En guise de précurseur, le saccharose constitue la principale source d'acétyl-CoA pour la synthèse de lipides (Schwender *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2015). La glycolyse cytosolique est la principale voie de production de phosphoenol-pyruvate qui sera ensuite transformé en pyruvate puis en acétyl-CoA, précurseur pour la synthèse de lipides (**Fig 18**) (Stein *et al.*, 2017).

Le malonyl-coA représente l'unité d'élongation de base des acides gras. Il est synthétisé par l'Acétyl-CoA Carboxylase (ACCase) essentiellement dans les plastes à partir d'acétyl-CoA, d'hydrogénocarbonate et d'ATP (Baud *et al.*, 2002). Chez les mutants *accase*, la morphogénèse des embryons est bloquée au stade globulaire. En fin de développement, les graines sont alors ridées, plus légères, avec une teneur réduite en lipides, une teneur plus élevée en amidon, une absence d'acides gras à très longue chaîne mais un enrichissement de leur précurseur C18 :1 (Baud *et al.*, 2002).

Après substitution du co-enzyme A par un groupe ACP (Acyl Carrier Protein) sur le malonyl-coA, la synthèse de novo des acides gras fait intervenir plusieurs enzymes : l'initiation est réalisée par la KAS III qui permet d'allonger de 2 atomes de C une molécule d'acétyl-CoA à partir de malonyl-coA. Le produit est alors un acyl-ACP saturé à 4 carbones (C4 :0). Les élongations successives se font toujours 2 carbones par 2 carbones et font intervenir une autre enzyme KAS I pour former des composés en C16 :0. Enfin, le passage de C16 :0 vers C18 :0 est catalysé par la KAS II (Browse & Somerville, 1991). Chaque réaction de condensation

permettant l'ajout de 2 atomes de carbone supplémentaires est suivie d'une étape de réduction du groupe carbonyle, d'une étape de déshydratation et d'une étape de réduction (Baud *et al.*, 2008). Certains C18 :0 sortent par la suite du cycle KAS pour être pris en charge dans le stroma par une stearoyl-ACP desaturase qui produit du C18 :1. Les principaux produits de cette synthèse sont donc du C16 :0 et du C18 :1 (**Fig 18**). Ces produits sont ensuite hydrolysés par une ACP-thioestérase pour former des AG libres associés à nouveau à du CoA au niveau de la membrane externe du chloroplaste par une Acetyl-CoA Synthetase avant d'être exportés dans le reticulum endoplasmique (RE) pour être insaturés ou dans le cytosol pour être allongés (Baud *et al.*, 2008).

L'élongation des AG consiste en la synthèse d'acides gras à très longue chaîne (VLCFA) comportant 20 à 24 Carbones. Ces VLCFA représentent 30% des AG totaux dans la graine d'*Arabidopsis* (Baud *et al.*, 2008). Cette élongation est effectuée par la Fatty Acid Elongase (FAE) qui est un complexe multi-enzymatique membranaire permettant la synthèse de VLCFA à partir de C16 :0 ou de C18 :1 dans le RE (**Fig 18**). La séquence d'étapes aboutissant à leur élongation est la même que celle impliquée dans la synthèse des AG plus courts, seule la localisation de cette synthèse et les acteurs enzymatiques changent. En effet, l'étape de condensation est réalisée par une KCS et non une KAS (von Wettstein-Knowles, 1982). Le malonyl-CoA utilisée pour la synthèse de VLCFA est synthétisé à partir d'acétyl-CoA issu du citrate et transformé par une ATP-Citrate Lyase (Fatland *et al.*, 2002).

L'insaturation des AG est un processus majeur dans la synthèse des acides gras. En effet, les acides gras polyinsaturés (PUFA) représentent 53 à 66% des AG totaux chez *Arabidopsis*. Les espèces principales de PUFA sont le C18 :2 et C18 :3 nommés respectivement acide linoléique et acide linoléique (Baud *et al.*, 2008). Ces insaturations sont réalisées dans le RE avec pour précurseur le C18 :1 issu des plastes (**Fig 18**). Une Oleate Désaturase (FAD2) permet de réaliser une seconde insaturation pour produire du C18 :2 tandis qu'une Fatty Acid Desaturase (FAD3) permet la réalisation d'une troisième insaturation et de produire du C18 :3 à partir de C18 :2 (McCartney *et al.*, 2004).

6.4.2.2. Synthèse des Triacylglycérols et stockage des lipides de réserve

Chez Arabidopsis, les réserves lipidiques se présentent sous la forme de triacylglycérols (TAG). Ces TAG sont produits à partir d'un squelette glycérol produit dans la graine à partir de dihydroxyacétone phosphate et de NADH+H⁺ grâce à la Glycérol-3-Phosphate (glycérol-3P) Déshydrogénase (Kirsch *et al.*, 1992). Cette étape conditionne la disponibilité en glycérol-3P qui est le facteur limitant de la synthèse de TAG (Gibon *et al.*, 2002). L'assemblage des TAG a lieu dans le RE selon deux voies d'assemblages différentes (Stymne & Stobart, 1987). La voie principale est la voie de Kennedy et consiste en un transfert des acyl-coA en position 1 et 2 du glycérol-3P par un processus de deux acylations successives pour donner de l'acide phosphatidique qui sera ensuite déphosphorylé pour donner un diacylglycérol (DAG). Ce DAG sera par la suite acylé en position 3 pour donner un TAG (Kennedy, 1961). La phosphatidylcholine (PC) synthétisée à partir de DAG peut également céder un groupe acyl pour former un TAG. Cette PC est un composant important des membranes en plus d'être un précurseur de TAG (Rolletschek *et al.*, 2020).

Les TAG sont ensuite stockés dans des oléosomes qui sont des gouttelettes lipidiques délimitées par une monocouche de phospholipides dont la chaîne aliphatique hydrophobe est orientée vers la lumière, alors que le groupement phosphate hydrophile est tourné vers le cytosol. Des protéines spécifiques permettant la stabilisation de l'oléosome s'insèrent dans la monocouche de phospholipides. Les oléosomes sont localisés en périphérie de la cellule et peuvent occuper jusqu'à 60% du volume cellulaire (Baud *et al.*, 2008). Leur taille est inversement proportionnelle à la concentration en protéines présentes à leur surface, notamment en oléosines. Ainsi une déplétion en oléosines induit des oléosomes de grande taille et de forme anormale (**Fig 19**). Les graines ont généralement de petits oléosomes sauf chez les graines oléagineuses où ils peuvent atteindre 7,5 µm de diamètre (Siloto *et al.*, 2006).

Si la majeure partie des réserves lipidiques est localisée dans l'embryon chez Arabidopsis, 10% des lipides se situent dans l'albumen. Ils sont de nature différente de ceux retrouvés dans l'embryon. En effet, il y a dans l'albumen un enrichissement en omega-7 (C16 :1, C18 :1 et C20 :1)(Troncoso-Ponce *et al.*, 2016).

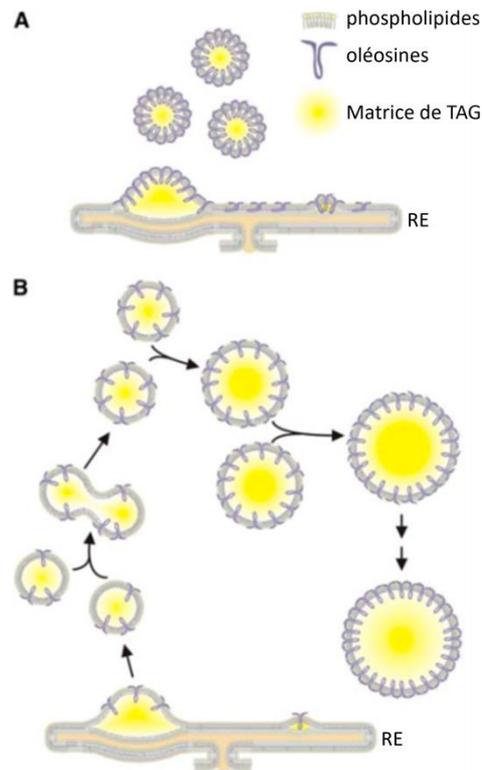


Figure 19: Modèle de formation des oléosomes et conséquences d'une déficience en oléosines. (Siloto et al., 2006).

« Les 3 composants majeurs des oléosomes sont la matrice de TAG entourée par une monocouche de phospholipides dans laquelle s'insère des oléosines. **A** : Situation chez un WT. Les oléosines saturent la surface de l'oléosome. **B** : Situation chez un mutant déficient en oléosines. Les oléosomes ne contenant pas assez d'oléosines ne se repoussent pas et subissent un phénomène de coalescence formant ainsi de grands corps lipidiques jusqu'à être recouverts d'oléosines. »

6.4.3. Réserves protéiques

Les protéines constituent avec les lipides, les principales réserves chez *Arabidopsis*. On retrouve plusieurs classes de protéines de réserve.

6.4.3.1. Protéines associées aux oléosomes : oléosines, caléosines et stéroléosines

Les oléosines représentent les principales protéines présentes à la surface des oléosomes. Elles permettent à ces derniers ne pas fusionner entre eux lors de la phase finale de déshydratation alors que la baisse du potentiel hydrique induit une compression des éléments du cytoplasme. Les oléosines créent alors une charge négative à la surface des corps lipidiques qui leur permettent de se repousser entre eux (**Fig 19**) (Tzen & Huang, 1992; Siloto *et al.*, 2006). Les oléosines permettent donc de maintenir des oléosomes de petite taille et ainsi de maintenir un fort ratio surface/volume pour optimiser l'accès aux lipases au moment de l'utilisation des réserves (Baud *et al.*, 2008). D'une masse variant de 15 à 50 kDa, ces protéines représentent 1 à 4% de la masse des oléosomes et sont synthétisées dans la membrane du RE (Rolletschek *et al.*, 2020). Elles possèdent un domaine N-terminal hydrophobe en feuillets beta qui leur permet de s'insérer dans l'oléosome et un domaine C-terminal hydrophile en hélice alpha qui leur permet d'être à la surface (Tzen & Huang, 1992). Le bon agencement des oléosines est permis par la présence d'un résidu proline dans leur séquence primaire permettant de lier deux feuillets beta entre eux et qui est responsable de la bonne localisation des corps lipidiques (Abell *et al.*, 1997). Seize isoformes d'oléosines sont présentes chez *Arabidopsis* dont 5 sont spécifiques de la graine : OLEO1 (65%), OLEO2 et OLEO4 (30%), OLEO3 (5%) et OLEO5 (Siloto *et al.*, 2006). Siloto *et al.* (2006) ont pu remarquer que chez le mutant *ole1*, les oléosomes sont plus volumineux que ceux du sauvage dans la graine en cours de maturation. Cette grande taille d'oléosome induit un retard de germination, mais peut être reversée par un ajout de saccharose, celui-ci pouvant être utilisé comme source d'énergie au cours de la germination. Il se substituerait alors aux lipides qui seraient moins accessibles dans ces gros oléosomes induisant ainsi une baisse de disponibilité en carbone lors de la germination.

Les caléosines sont complémentaires des oléosines. En effet, en cas de déplétion d'oléosines, la part de caléosines sur les oléosomes augmente (Jiang & Tzen, 2010). Les

caléosines ont également un rôle de messager secondaires. En effet, elles sont capables de lier le calcium. Elles sont ainsi impliquées dans de très nombreux processus tels que l'apoptose, la polarité cellulaire, la photosynthèse et la résistance aux stress. Leur structure est proche de celle des oléosines. On trouve 8 gènes codant des caléosines chez *Arabidopsis* nommés *CLO1* à *CLO8*. *CLO1* et *CLO2* qui sont exprimés spécifiquement dans les embryons en cours de développement et dans les graines en cours de maturation (Aubert *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2014).

Les stéroléosines sont également associées aux oléosomes et peuvent se lier aux stérols en ayant ainsi une activité stérol déshydrogénase. Elles sont codées par les gènes *HSD* fortement exprimés au niveau du pédicelle des siliques au cours de la maturation (Li *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2019). Leur surexpression stimule la croissance de la plante, augmente le rendement et diminue la dormance des graines (Li *et al.*, 2007).

6.4.3.2. Protéines de réserve : Cruciférines et Napines

Appelées également globulines 12S, les cruciférines sont des protéines de réserves de haut poids moléculaire. 4 gènes majeurs codent des précurseurs de cruciférines : *CRA1*, *CRB*, *CRC*, *CRU2* (Pang *et al.*, 1988; Sjobahl *et al.*, 1991).

Les napines ou albumines 2S (plus rarement Arabines) sont des protéines de réserve de faibles poids moléculaires (O'Neill *et al.*, 2019). Elles sont codées par 5 gènes : *2S1*, *2S2*, *2S3* ; *2S4* et *2S5*.

La mise en place des protéines de réserve débute au milieu de la phase de maturation, lorsque la silique encore verte atteint sa taille finale. Le profil protéique associé à cette phase est alors encore identique à celui d'un tissu végétatif avec une prédominance de la RuBisCO. Les premières protéines de réserves sont détectées au moment où les niveaux de RuBisCO diminuent commencent à décliner (Wehmeyer *et al.*, 1996) . Ces protéines sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) puis adressées par transport vésiculaire à des vacuoles de stockage de protéines (PSV). Elles sont ensuite transformées en protéines natives par clivage de la partie C-terminale (Shimada *et al.*, 2003). Les PSV sont localisées au centre de la cellule, près du noyau, et sont délimitées par une bicouche lipidique. Leur matrice contient des protéines de réserve solubles et des inclusions sphériques de phytates permettant de stocker du phosphore (Hubel & Beck, 1996; Gillespie *et al.*, 2004). La

maturation des protéines de réserve est réalisée grâce à des enzymes protéolytiques appelées Vacuolar Processing Enzymes (VPE). Il en existe 4 : α -VPE ; β -VPE ; δ -VPE ; γ -VPE (Shimada *et al.*, 2003). La β -VPE et la δ -VPE sont exprimées dans la graine et sont indispensables à la bonne mise en place des protéines de réserve tout au long de la maturation. Les mutants β -vpe et δ -vpe présentent une désorganisation des protéines de réserve mais ce phénomène n'altère pas le développement de l'embryon ni sa capacité germinative (Shimada *et al.*, 2003).

6.5. Lipides et protéines de réserve : deux processus liés et régulés par des acteurs moléculaires communs

La perturbation de la synthèse protéique peut affecter la synthèse de lipides et *vice versa*. En effet, une mutation d'un gène codant une cruciférine ou une napine induit de moindres teneurs en protéines de réserve mais également moins de lipides (Rolletschek *et al.*, 2020). A l'inverse, une perturbation de la synthèse de lipides induit une plus grande disponibilité du carbone pour la synthèse d'acides aminés (Stein *et al.*, 2017). Le lien le plus prégnant entre protéines et lipides de réserve se situe au niveau des protéines associées aux oléosomes. En effet, le mutant *ole1* produit moins de lipides (Siloto *et al.*, 2006). A l'inverse, la surexpression de 4 gènes codant des oléosines chez le Colza induit une augmentation de 13% de la teneur en C18 :2 et du poids de la graine. Cela indique que la synthèse de protéines a une influence sur les réserves lipidiques.

La mise en réserve des lipides et des protéines est sous le contrôle de l'ABA qui contrôle en grande partie la phase de maturation. Cependant, la maturation n'est pas déclenchée par l'ABA puisque le premier pic d'ABA mesuré dans la graine est postérieur à l'entrée en maturation (O'Neill *et al.*, 2019). Cette hormone agit de façon antagoniste avec les gibbérellines (GA). Ainsi un ratio ABA/GA élevé inhibe la croissance de l'embryon et la germination, et promeut la maturation (Baud *et al.*, 2008; Lepiniec *et al.*, 2018). L'action de l'ABA est essentiellement médiée par 4 facteurs de transcription considérés comme des régulateurs maitres de la maturation tant leur influence est grande au cours de cette phase : les gènes *LAFL* (*LEC1*, *ABI3*, *FUS3*, *LEC2*) (**Fig 12**) (Lepiniec *et al.*, 2018 ; O'Neill *et al.*, 2019). Ces facteurs de transcription sont conservés chez tous les Angiospermes et régulent la mise en place des réserves (O'Neill *et al.*, 2019). Ils reconnaissent des motifs 5'-CATG-3' présents dans les promoteurs de leurs gènes cibles et induisent leur expression. Ces derniers activent à leur

tour en cascade d'autres facteurs de transcription (*MYB*, *MADS*, *DOF*, *AP2*) régulant la maturation (Lepiniec *et al.*, 2018). L'activité de ces facteurs de transcription est soumise à des boucles de rétrocontrôle puisque les *LAFL* contrôlent l'accumulation d'ABA ou de GA tout en étant eux-mêmes contrôlés par ces hormones (Curaba *et al.*, 2004). Ainsi, l'ABA induit l'expression de *ABI3* alors que *FUS3* contrôle la balance ABA/GA en promouvant l'accumulation d'ABA, tout en étant réprimé par les GA (Lepiniec *et al.*, 2018). De plus les gènes *LAFL* sont redondants, les mutants multiples de plusieurs de ces gènes présentant toujours des phénotypes aggravés par rapport aux mutants simples (Lepiniec *et al.*, 2018). Une mutation des *LAFL* entraîne ainsi une réduction voire une absence de protéines et/ou de lipides de réserves, *FUS3* et *ABI3* induisant eux l'expression de gènes codant des précurseurs de protéines de réserves (**Fig 12**). De telles mutations entraînent également un arrêt de la croissance de l'embryon, perturbent son verdissement et induisent une intolérance à la dessiccation et (To *et al.*, 2006; O'Neill *et al.*, 2019). Malgré leur redondance, chacun de ces gènes possède des cibles spécifiques. Ainsi, *LEC1* et *FUS3* régulent des gènes de la photosynthèse (O'Neill *et al.*, 2019), *LEC2* contrôle directement les gènes codant les napines *2S1*, *2S2*, *2S3*, *2S4* et les cruciférines *CRA1* (Kroj *et al.*, 2003; Braybrook *et al.*, 2006). *LEC1* est également responsable de la régulation chronologique de la maturation de la graine. Ainsi chez le mutant *lec1* le développement de la graine est perturbé dès le stade globulaire de l'embryon puisque celui-ci débute sa phase de maturation trop précocement, avant même la fin de la phase de morphogénèse (Yamamoto *et al.*, 2014).

7. Dernière phase du développement de la graine : la déshydratation contrôlée

Chez les Angiospermes, il existe deux types de graines : les graines récalcitrantes et les graines orthodoxes. Les graines récalcitrantes conservent un métabolisme actif et une teneur en eau élevée. Elles ne supportent pas la déshydratation et ne peuvent pas être stockées longtemps (Roberts, 1973). En effet, les ROS provoquent rapidement des dommages oxydatifs dans ces graines (Bailly, 2004). Les graines orthodoxes quant à elles tolèrent la dessiccation et peuvent être stockées sur des périodes plus longues. *Arabidopsis* appartient à cette dernière catégorie (Roberts, 1973).

Chez *Arabidopsis*, la graine se déshydrate à la fin de la phase de maturation. Cela lui permet de survivre sur de longues périodes à l'état quiescent sans altération de sa capacité à germer. Pour cela, le processus de déshydratation est très contrôlé. Ce processus final du développement est par ailleurs fortement énergivore (Angelovici *et al.*, 2010). Cependant, les processus moléculaires précis à l'origine de cette demande énergétique restent en grande partie méconnus.

La tolérance à la dessiccation s'acquière lorsque la graine est encore chlorophyllienne (**Fig 20**) (Leprince *et al.*, 2017). Cependant, une maturation complète implique une perte des chlorophylles (Wehmeyer *et al.*, 1996). Ainsi, les chloroplastes se différencient au cours de la phase de déshydratation. Ils perdent leur chlorophylle, leur amidon et modifient leur structure interne pour devenir des éoplastes (Mansfield *et al.*, 1991; Ruppel *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2017).

La phase de déshydratation commence à partir de 17 jours après la pollinisation et donne lieu à un basculement métabolique se traduisant par des changements massifs dans l'expression de certains gènes (Fait *et al.*, 2006; Baud *et al.*, 2008; Angelovici *et al.*, 2010). En effet, 30% du génome d'*Arabidopsis* subit des changements d'expression. Une partie significative des gènes exprimés au cours de la phase de déshydratation est similaire aux gènes exprimés au cours de la germination (Fait *et al.*, 2006; Angelovici *et al.*, 2010). Cela suggère que la préparation de la germination a lieu au cours de cette dernière phase de déshydratation. Les gènes associés aux stress abiotiques sont également inhibés (Angelovici *et al.*, 2010).

La phase de déshydratation doit permettre à la graine de survivre pendant une très longue période de temps, l'état déshydraté permet ainsi d'éviter les dommages générés par les ROS (Bailly, 2004; Buitink & Leprince, 2008). Durant cette phase, la viscosité et la densité des molécules augmentent jusqu'à transformer le contenu cellulaire en matrice vitreuse qui ralentit grandement la diffusion des molécules et réduit la probabilité de réactions chimiques (Buitink *et al.*, 1999). Cet état vitreux est une caractéristique commune de tous les tissus subissant une déshydratation contrôlée. Au cours de cette phase, la quantité d'eau dans l'embryon passe de 0,8 g d'H₂O/g de masse sèche (DW) à 0,1 g H₂O/g DW en fin de

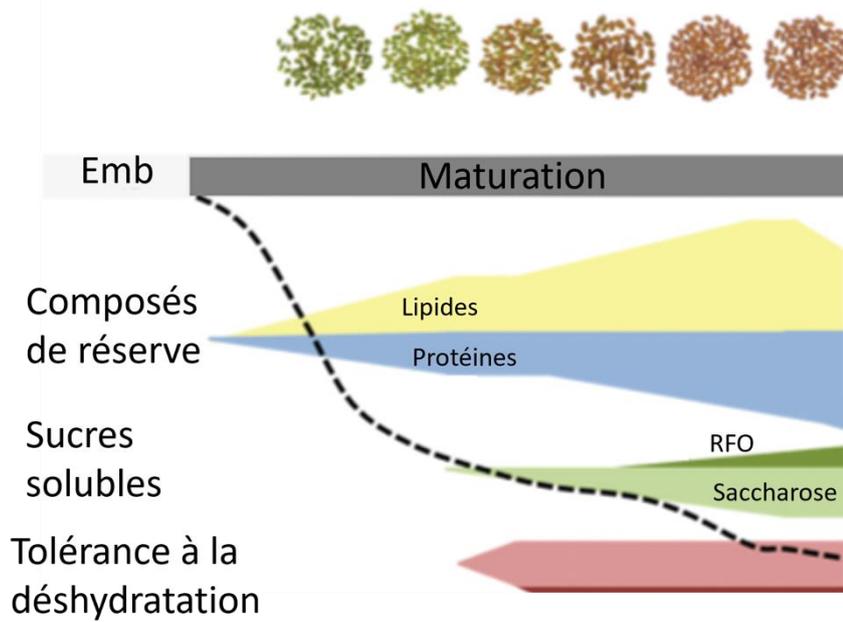


Figure 20 : Progression de la déshydratation au cours de la maturation de la graine (Leprince *et al.*, 2017 ; Righetti *et al.*, 2015)

La déshydratation s'accompagne d'une accumulation de sucres solubles tels que le saccharose et des oligosaccharides de la famille du raffinose. La ligne brisée représente la perte d'eau au cours de la fin du développement de la graine.

Abréviations : Emb, Embryogenèse, RFO, Raffinose Family Oligosaccharids

déshydratation (**Fig 20**) (Leprince & Walters-Vertucci, 1995; Buitink & Leprince, 2008). Ces 10% d'eau résiduels caractérisent un état vitrifié. Cependant, la formation de l'état vitreux ne confère pas à la graine une tolérance à la déshydratation mais est indispensable pour survivre à l'état sec (Buitink & Leprince, 2008). Ce processus doit être finement régulé. En effet, lors d'une déshydratation non contrôlée, les protéines perdent leur conformation et forment des agrégats, les membranes fusionnent tandis que les acides nucléiques subissent des réarrangements qui compromettent leur stabilité (Leprince *et al.*, 1995).

7.1. HSP et LEA : protéines incontournables de la déshydratation

Pour permettre de tolérer la déshydratation, la graine accumule deux classes de protéines particulières : les Heat Shock Protein (HSP) et les Late Embryogenesis Abundant proteins (LEA). 43% des gènes exprimés au cours de cette phase de déshydratation codent ainsi des HSP et LEA (Angelovici *et al.*, 2010). La mise en place des HSP et LEA est également sous le contrôle de l'ABA au travers de l'action de *ABI3* et *FUS3* notamment (Wehmeyer *et al.*, 1996; Bies-Ethève *et al.*, 2008; M Chen *et al.*, 2015)

7.1.1. Les Heat Shock Protein (HSP)

Au niveau tissulaire, des HSP sont retrouvées aussi bien dans les cotylédons que dans la radicule. Au niveau intracellulaire, on retrouvera ces protéines essentiellement au niveau du noyau (Wehmeyer *et al.*, 1996). Les HSP s'accumulent précisément au moment de l'acquisition de la tolérance à la déshydratation et de la dormance. On les retrouve également dans les graines sèches et jusqu'à 3 jours après la germination chez le pois et le tournesol (DeRocher & Vierling, 1994). Ces protéines ont donc deux rôles : tolérer la déshydratation et faciliter la réhydratation au cours de la germination. Cependant, il n'y a pas de relation linéaire entre une faible teneur en eau et l'expression des *HSP* (Wehmeyer *et al.*, 1996).

L'expression des *HSP* est induite par des Heat Shock Factor (HSF). Plusieurs HSF sont présents chez *Arabidopsis*. On notera notamment que *HSF9* est spécifique de la graine et est induit par l'auxine (Carranco *et al.*, 2010). Il existe plusieurs classes de HSP en fonction de leur localisation subcellulaire (Wehmeyer *et al.*, 1996). Ces classes ne sont que partiellement

redondantes. En effet, une classe de HSP ne peut pas à elle seule permettre la tolérance à la déshydratation. De la même manière, l'absence d'une classe de HSP ne compromet pas à elle seule cette tolérance (Wehmeyer *et al.*, 1996).

7.1.2. Les Late Embryogenesis Abundant proteins (LEA)

Les LEA s'accumulent en fin de maturation lorsque la teneur en eau diminue dans la graine. Cependant, les transcrits *LEA* sont présents dans la graine bien avant leur forme protéique, dès le début de la phase de maturation chez *Medicago truncatula* (Chatelain *et al.*, 2012; Verdier *et al.*, 2013). Les LEA diffèrent des HSP par leur manque de structuration en absence de déshydratation. En effet, ce sont des protéines fortement hydrophiles qui sont dépliées en présence d'eau et n'adoptent leur conformation que lorsque cette teneur en eau diminue (Tunnacliffe *et al.*, 2010). 51 gènes codent les LEA chez *Arabidopsis*, répartis dans 9 groupes différents (Hundertmark & Hinch, 2008). 12 protéines LEA sont spécifiques de la graine et sont localisées dans différents compartiments (cytosol, noyau, vacuole, RE ou mitochondrie) (Leprince *et al.*, 2017). On retrouve donc des LEA ailleurs que dans la graine, ces protéines sont en effet impliquées dans les réponses à certains stress notamment osmotiques et froid (Buitink & Leprince, 2008).

7.2. Accumulation de métabolites libres

La phase de déshydratation et la capacité de la graine à tolérer cette déshydratation ne reposent pas exclusivement sur les HSP et LEA. En effet, au cours de cette phase, la graine accumule de nombreux métabolites libres qui peuvent jouer un rôle dans l'ajustement osmotique. De plus, ces métabolites seront plus rapidement disponibles que les grands composés de réserve (lipides, protéines) lors de l'imbibition de la graine et de la réactivation du métabolisme au début de la germination (Fait *et al.*, 2006).

7.2.1. Sucres

Parmi ces métabolites, on trouve de nombreux sucres non réducteurs (**Fig 20**) (Tunnacliffe *et al.*, 2010). On observe ainsi une baisse de quasiment tous les intermédiaires du cycle de Krebs à l'exception du fumarate dont la teneur augmente (Fait *et al.*, 2006). Les auteurs de cette étude suggèrent en outre que l'augmentation de la teneur en fumarate pourrait indiquer le passage d'un métabolisme mitochondrial aérobie à un processus anaérobie. En effet, la chaîne mitochondriale de transfert des électrons serait fortement ralentie en absence de cycle de Krebs et le fumarate produit le serait à partir de succinate provenant du cycle du glyoxylate dans le glyoxysome (Fait *et al.*, 2006). La mise en place d'un métabolisme anaérobie est corroborée par l'induction de l'Alcool Déshydrogénase 1 (ADH1) impliquée dans la fermentation au cours de la phase de déshydratation (Fait *et al.*, 2006). L'activité de la glycolyse baisse également au cours de la déshydratation puisque les niveaux de fructose-6-phosphate (F6P) et de G6P diminuent également (Fait *et al.*, 2006). Les sucres accumulés permettent de maintenir l'intégrité des membranes en formant des liaisons hydrogène avec les têtes polaires des phospholipides membranaires (Tunnacliffe *et al.*, 2010). Les sucres, en interagissant avec les protéines, participent également à l'obtention d'un état vitreux (Buitink & Leprince, 2008).

Certains sucres sont des marqueurs de l'acquisition de la tolérance à la déshydratation : il s'agit du raffinose, du stachyose, du saccharose et du tréhalose (Fait *et al.*, 2006). Le tréhalose a par exemple un rôle de stabilisateur de protéines (Fait *et al.*, 2006). Le raffinose fait partie d'une large famille de sucres nommée RFO pour oligosaccharides de la famille du raffinose et accumulés sous le contrôle d'hormones telles que ABA et des GA. Ces RFO sont importants pour le maintien de l'intégrité cellulaire en détoxiquant les ROS (Nishizawa *et al.*, 2008). Il est à noter que les graines peuvent devenir tolérantes à la dessiccation sans accumulation de RFO. Cependant, il y a une tout de même chez certaines espèces végétales comme les impatiens ou le poivron, une corrélation entre le ratio saccharose:RFO et la tolérance à la déshydratation (Buitink *et al.*, 2000). Les RFO jouent donc un rôle dans cette acquisition de la tolérance à la déshydratation.

7.2.1. Acides aminés

De nombreux acides aminés libres sont également accumulés au cours de la phase de déshydratation. On trouve particulièrement des acides aminés aromatiques (tryptophane, phénylalanine, tyrosine), riches en azote (asparagine, lysine, arginine) ou impliqués dans l'osmoprotection (glycine, proline, GABA) (Fait *et al.*, 2006). Le GABA permet notamment de prévenir la mort cellulaire et est surtout accumulé lors de la transition entre phase de maturation et phase de déshydratation (Fait *et al.*, 2011). Cet acide aminé non protéinogène pourrait notamment constituer une réserve de carbone et d'azote rapidement mobilisable lors de la germination et donc être stocké en quantité raisonnablement importante sans compromettre la viabilité (Fait *et al.*, 2011). Ces acides aminés proviendraient d'une remobilisation depuis les tissus maternels. En effet, ce processus continue après la fin de la synthèse des protéines de réserve, les acides aminés remobilisés ne seraient alors pas intégrés à des protéines (Fait *et al.*, 2006).

Parmi ces acides aminés, l'accumulation de proline semble être caractéristique d'un organisme soumis à déshydratation et dont les processus développementaux sont fortement énergivores.

III. La proline : un acide aminé aux fonctions multiples et aux implications métaboliques encore nombreuses à découvrir

1. La proline et son métabolisme

La proline est un acide aminé protéinogène doté d'une rigidité exceptionnelle capable d'induire des coudes dans les chaînes protéiques (Szabados & Savouré, 2010). Son métabolisme chez les plantes est complexe. En effet, sa synthèse se déroule dans le cytosol tandis que sa dégradation se déroule dans la mitochondrie.

1.1. Synthèse de proline

La proline est synthétisée majoritairement dans des tissus photosynthétiquement actifs (Sharma *et al.*, 2011) à partir de glutamate (**Fig 21**). Ce glutamate peut provenir d'une dégradation du glucose par la glycolyse, la décarboxylation oxydative et le cycle de Krebs dont l' α -CG est pourvoyeur de squelette carboné pour la synthèse de glutamate. Il peut aussi venir d'une désamination de la glutamine (Hollinshead *et al.*, 2018). A partir de glutamate, la Pyrroline-5-Carboxylate Synthétase (P5CS) produit du glutamate-semialdehyde (GSA) très instable qui va s'équilibrer très rapidement et spontanément avec le pyrroline-5-carboxylate (P5C), forme plus stable (Savouré *et al.*, 1995). Cette étape est limitante pour la synthèse de proline. Ce P5C est ensuite réduit en proline par la Pyrroline-5-Carboxylate Réductase (P5CR) (Verbruggen *et al.*, 1993). Bien qu'initialement suspectée d'être synthétisée également dans les plastes lors de contraintes (Székely *et al.*, 2008; Lehmann *et al.*, 2010), de récentes études suggèrent que la synthèse de proline est strictement cytosolique (Funck *et al.*, 2012, 2020). Il existe deux gènes codant les P5CS : *P5CS1* et *P5CS2*. Ces isoformes ne sont pas redondantes car leurs mutants ne se complètent pas (Funck *et al.*, 2008; Székely *et al.*, 2008). En effet, la *P5CS2* est exprimée en condition physiologique normale notamment dans les zones de fortes divisions cellulaires. C'est également une cible de *CONSTANS* (CO) qui est un facteur de

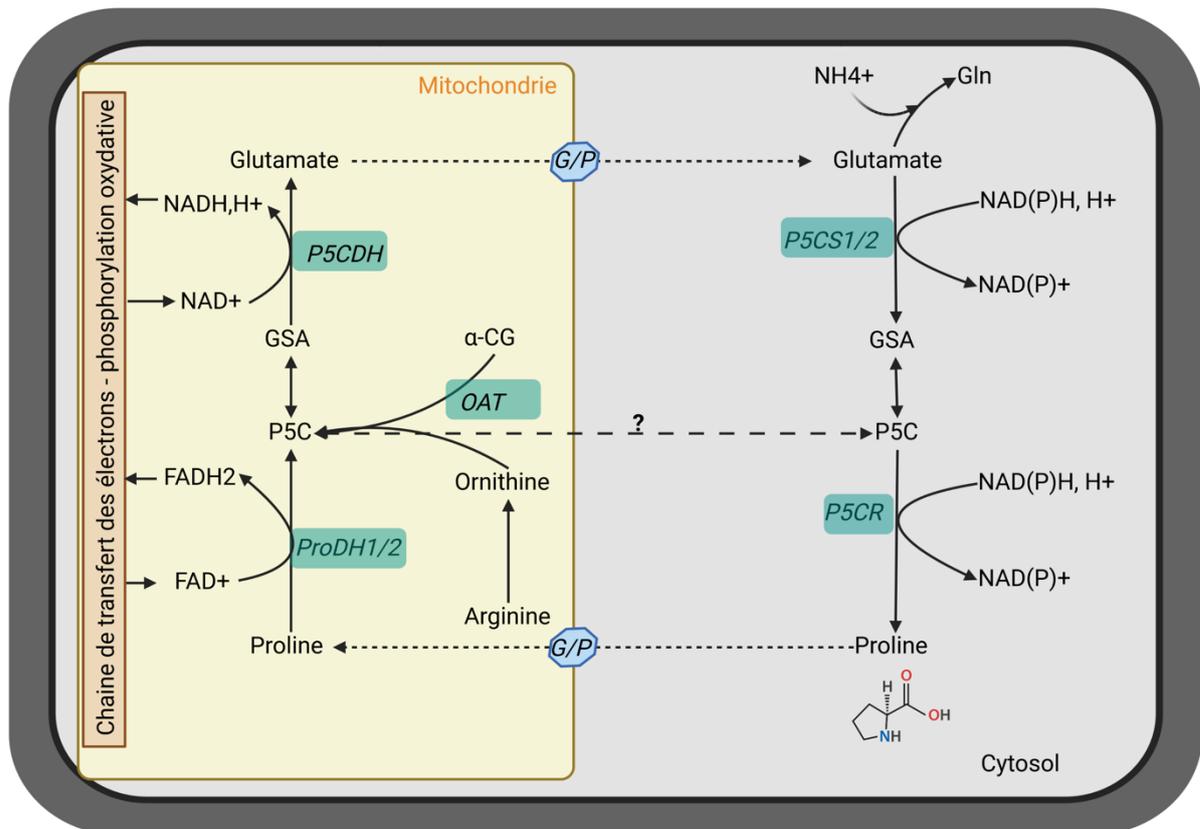


Figure 21 : Métabolisme de la proline (adapté de Szabados et Savouré, 2010).

Le glutamate est réduit dans le cytosol en GSA/P5C puis en proline par la P5CS et la P5CR respectivement. Cette synthèse de proline consomme du pouvoir réducteur. La proline est catabolisée dans la mitochondrie par la ProDH puis la P5CDH. La dégradation de la proline produit du pouvoir réducteur utilisable par la chaîne de transfert des électrons pour la production d'ATP. Du P5C peut également être produit par la voie de l'OAT qui conclut la dégradation de l'arginine liant ainsi le métabolisme de la proline au recyclage de l'azote. Le glutamate peut également être utilisé dans le cytosol pour produire de la glutamine.

Abréviations : GSA, Glutamate Semi-aldéhyde ; P5C, Pyrroline-5-carboxylate ; Gln, Glutamine ; G/P antiport glutamate/proline ; P5CS, Pyrroline-5-carboxylate synthétase ; P5CR, Pyrroline-5-carboxylate réductase ; ProDH, Proline déshydrogénase ; P5CDH, Pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase.

Les traits pleins indiquent une réaction, les traits pointillés fins indiquent un transport, les traits pointillés épais indiquent un transport hypothétique. Créé avec Biorender.

transcription promouvant la floraison en réponse aux jours longs (Samach *et al.*, 2000). On trouve également la P5CS2 dans les cellules embryonnaires et racinaires (Székely *et al.*, 2008). Elle est inhibée par la Phospholipase D et la proline dans le cadre d'un rétrocontrôle négatif. Elle est en revanche activée par l'ABA via *ABI1*, la Phospholipase C et le calcium (Parre *et al.*, 2007). La P5CS1 est responsable de l'accumulation de proline lors de contraintes hydriques (Funck *et al.*, 2008; Zhang & Becker, 2015).

La P5CR de son côté n'est codée que par un seul gène chez *Arabidopsis* mais produit tout de même deux isoformes différents du fait d'un épissage alternatif des ARNm produits (Hare & Cress, 1996)

Enfin, les P5CS et la P5CR utilisent le NADP(H)⁺ H⁺ comme co-facteur (Deuschle *et al.*, 2004) à raison de 2 moles de NAD(P)H oxydées par mole de proline produite. Chez l'humain, PYCR1 qui est l'homologue de P5CR a une plus grande affinité pour le NADH que pour le NADPH. Cependant le métabolisme de la proline n'est pas spatialisé chez l'humain puisqu'il se déroule exclusivement dans la mitochondrie (Hollinshead *et al.*, 2018).

1.2. Dégradation de la proline

Le catabolisme de la proline est inhibé lorsque la plante subit une contrainte environnementale (Verbruggen *et al.*, 1996). La proline est dégradée dans la mitochondrie, majoritairement dans les tissus non photosynthétiques (Sharma *et al.*, 2011). L'import de proline dans la mitochondrie est un phénomène actif bien qu'aucun transporteur intracellulaire n'ait encore été identifié à ce jour chez *Arabidopsis*. Cependant, cet import est permis par un antiport glutamate/proline chez le blé (di Martino *et al.*, 2006). La dégradation de la proline résulte de l'action séquentielle de deux enzymes : la Proline Déshydrogénase (ProDH) oxyde la proline en P5C puis la Pyrroline-5-Carboxylate Déshydrogénase (P5CDH) oxyde de nouveau le P5C pour former du glutamate (**Fig 21**) (Kiyosue *et al.*, 1996; Deuschle *et al.*, 2001). Chez *Arabidopsis*, deux gènes codent les ProDH : *ProDH1* et *ProDH2*. *ProDH1* est exprimée de manière ubiquitaire mais n'est activée que dans des conditions particulières : présence de salicylate, de saccharose, au cours d'une réhydratation après une contrainte, à l'obscurité (Deuschle *et al.*, 2004 ; Miller *et al.*, 2009 ; Szabados & Savouré, 2010 ; Zhang & Becker, 2015). En effet, ces conditions conduisent à une accumulation de proline et *ProDH1*

est induit par la proline. On retrouve d'ailleurs des éléments de réponse (PRE) à la proline dans la séquence du promoteur de *ProDH1* qui permettent son activation par un activateur transcriptionnel S1-bZIP (Sato *et al.*, 2002). De son côté, *ProDH2* est exprimé principalement dans les tissus conducteurs (Funck *et al.*, 2010). Les ProDH sont localisées au niveau de la membrane interne mitochondriale, site actif face à la matrice tandis que P5CDH est localisée dans la matrice mitochondriale (Cabassa-Hourton *et al.*, 2016 ; Deuschle *et al.*, 2004). De récents résultats semblent néanmoins indiquer que la localisation de ces deux enzymes peut varier en fonction de leur capacité à former des complexes notamment au cours de la sénescence (Zheng *et al.*, *en préparation*). Par opposition à sa synthèse, le catabolisme de la proline génère du pouvoir réducteur. Ainsi du FADH₂ est généré à partir de FAD et du NADH+H⁺ à partir de NAD⁺ par la ProDH et la P5CDH respectivement (**Fig 21**) (Bogges *et al.*, 1978; Rayapati & Stewart, 1991; Deuschle *et al.*, 2001). Un seul gène code la P5CDH chez *Arabidopsis* et s'exprime faiblement mais continuellement à un niveau basal (Deuschle *et al.*, 2001). La P5CDH est cependant induite par la présence de proline, d'arginine, de glutamate et d'ornithine. Elle est également fortement activée transcriptionnellement lors de la sénescence des feuilles, dans le pollen, le péricarpe des siliques, et les graines en cours de développement (Deuschle *et al.*, 2001, 2004).

1.3. Liens du métabolisme de la proline avec d'autres processus moléculaires

1.3.1. Le cycle P5C-proline

Szabados & Savouré (2010) proposent que l'induction de ProDH et P5CDH doit être coordonnée sous peine d'induire une accumulation de P5C et de ROS engendrant une PCD comme cela est constaté en cas d'apport exogène en proline supérieur à 50 mM (Deuschle *et al.*, 2001, 2004; Rizzi *et al.*, 2015). En 2002, Hare *et al.* ont pu constater que l'application d'une gamme croissante de proline de 5 mM à 20 mM sur des plantules sauvages d'*Arabidopsis* cultivées *in vitro* induisait une baisse de l'intégrité des thylakoïdes ainsi qu'une perturbation de la structure des mitochondries au niveau du mésophylle. Hellmann *et al.* (2000) ont quant à eux indiqué qu'à partir de 40 mM de proline, des nécroses apparaissaient sur tous les organes. Les auteurs ont alors conclu que cette toxicité ne venait pas de la proline elle-même mais d'une accumulation de P5C résultant d'une induction de ProDH sans induction de P5CDH.

Cependant, ces nécroses n'ont jamais été observées dans une situation d'accumulation endogène de proline. En absence de P5CDH ou en présence d'une activité P5CDH plus faible que l'activité ProDH, le P5C généré par la ProDH pourrait alors être transporté dans le cytosol pour y être réduit par la P5CR (**Fig 21**) (Miller *et al.*, 2009). C'est le principe du cycle P5C-proline. Son existence pourrait alors éventuellement expliquer le maintien des fortes teneurs en proline observée chez le mutant *p5cdh* après un stress alors que l'on pourrait s'attendre à une accumulation de P5C. Ce cycle permettrait également d'expliquer pourquoi les niveaux de glutamate ne varient pas chez le sauvage par rapport au mutant *p5cdh* alors même que la génération de glutamate par la dégradation de la proline est stoppée (Miller *et al.*, 2009). Cependant, le P5C étant un composé instable, il est hautement improbable qu'il puisse être exporté vers le cytosol pour contribuer à la synthèse de proline (Funck *et al.*, 2008). L'existence du cycle P5C-Proline reste donc encore à démontrer à ce jour.

1.3.2. La voie de l'OAT

Le métabolisme de la proline est également connecté à d'autres voies métaboliques. C'est par exemple le cas du catabolisme de l'arginine (Funck *et al.*, 2008). En effet, l'Arginase génère de l'urée et de l'ornithine à partir d'arginine. L'ornithine réagit alors avec l' α -CG et produit du P5C grâce à l'Ornithine Aminotransférase (OAT) (**Fig 21**). Ce P5C serait alors pris en charge par la P5CDH au cours de la seconde étape du catabolisme de la proline pour former du glutamate (Funck *et al.*, 2008). A partir d'une molécule d'arginine, 2 molécules de glutamate seraient alors produites. L'OAT étant une enzyme mitochondriale, la voie de l'OAT ne permettrait pas la synthèse de proline. C'est pourquoi aucune différence de teneur en proline n'est mesurée entre le simple mutant *oat* et une lignée sauvage d'*Arabidopsis* (Funck *et al.*, 2008). Les différentes expériences menées et conduisant à une accumulation de proline lors d'un apport exogène d'ornithine (da Rocha *et al.*, 2012) ou à une activation de l'OAT en cas de stress salin (Rizzi *et al.*, 2015) n'indiquent pas que l'OAT est impliquée dans la synthèse de proline. Elles peuvent en revanche indiquer que l'OAT est activée par la présence d'ornithine et lors de contraintes de manière conjointe mais indépendante à l'accumulation de proline.

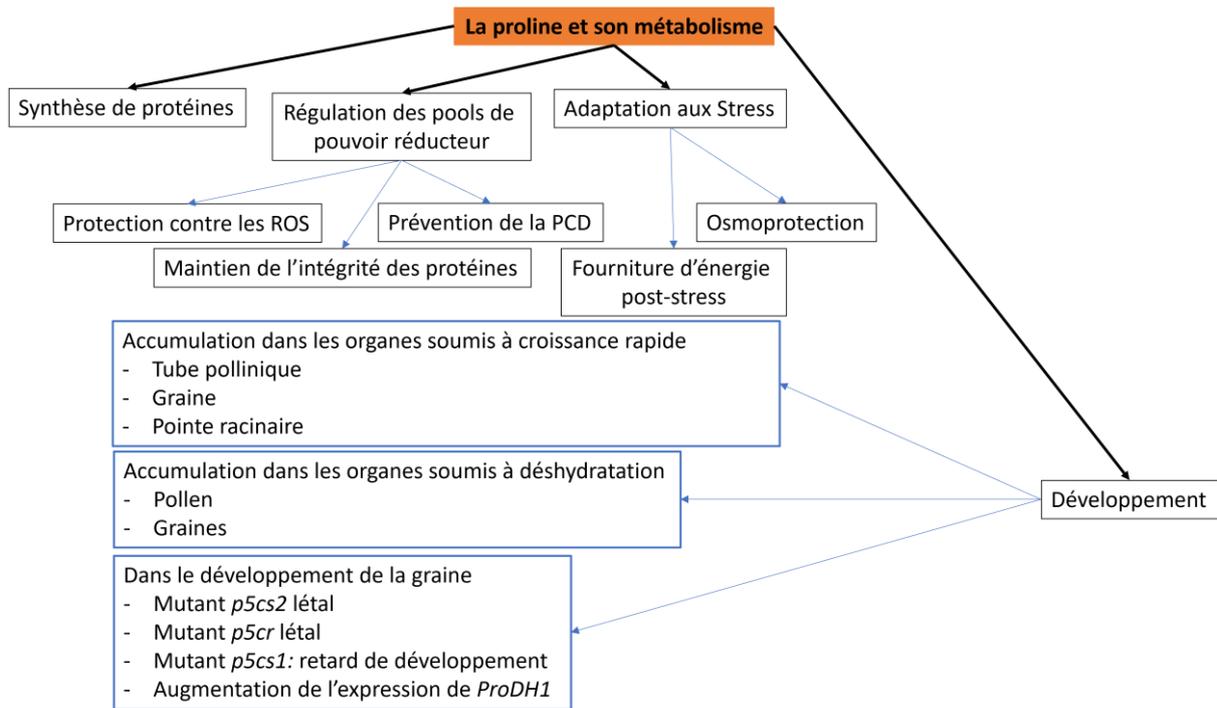


Figure 22 : Rôles divers de la proline et de son métabolisme.

1.3.3. Le métabolisme azoté

La voie de l'OAT établit un lien supplémentaire entre le métabolisme de la proline et le métabolisme de l'azote. Il s'agit en effet de la seule voie d'assimilation de l'azote à partir d'ornithine ou d'arginine (Funck *et al.*, 2008). Le premier lien entre ces deux métabolismes se fait à travers la présence de glutamate qui est un acteur majeur de l'assimilation et du recyclage de l'azote (**Fig 21**). Moduler des enzymes clés du métabolisme de l'azote a d'ailleurs des répercussions sur le métabolisme de la proline. Ainsi, la répression de la glutamine synthétase dans le phloème induit une baisse de la teneur en proline dans plusieurs organes (Brugière *et al.*, 1999). La proline peut être en elle-même une source d'azote. C'est le cas chez la microalgue *Chlorella autotrophica* où l'azote séquestré dans la proline représente 25% de l'azote total (Ahmad & Hellebust, 1988). Le métabolisme de la proline est donc lié au métabolisme de l'azote. Or ce dernier est intimement connecté au métabolisme du carbone. Ainsi, le métabolisme de la proline est également lié au métabolisme carboné. Des perturbations dans l'assimilation du carbone peuvent ainsi avoir des répercussions sur le métabolisme de la proline. Par exemple, Blume *et al.* (2019) ont observé une activation du catabolisme de la proline lorsque les plantes étaient soumises à une atmosphère pauvre en CO₂.

1.4. Rôles de la proline et de son métabolisme

En plus de son rôle dans la synthèse protéique, la proline libre et son métabolisme sont impliqués dans de très nombreux processus notamment le métabolisme énergétique, la reproduction et le développement de la graine.

La proline a un rôle de protection contre les ROS (**Fig 22**) (Fait *et al.*, 2005; Veerabagu *et al.*, 2014). Les dommages sur le Photosystème II (PS II) dus aux ROS sont ainsi réduits par la proline et semblent beaucoup plus importants chez le mutant *p5cs1* (Székely *et al.*, 2008). Le métabolisme de la proline semble de manière générale impliqué dans la signalisation ROS. En effet, l'activation de la ProDH en condition de stress contribue à l'accumulation de ROS du fait de son activité oxydase (Miller *et al.*, 2009). On observe ainsi une surexpression de *ProDH* dans les cellules cancéreuses qui ont un métabolisme dérégulé générant ainsi plus de ROS

(Pandhare *et al.*, 2009). A l'inverse, induire la synthèse de proline et réprimer sa dégradation permettrait de pouvoir piéger du pouvoir réducteur et de limiter ainsi la saturation de la chaîne mitochondriale de transfert des électrons afin de prévenir la formation de ROS (Zheng *et al.*, 2021). *In fine*, cela permettrait de prévenir également la mort cellulaire ou la perte d'intégrité des protéines.

Une très grande partie des travaux sur les implications de la proline et de son métabolisme chez les plantes ont eu pour rôle d'étudier son rôle dans la tolérance et l'acclimatation des plantes aux contraintes abiotiques (**Fig 22**). En effet dans une grande variété de contraintes, notamment salines et sécheresse, une accumulation de proline est observée, résultat de sa néosynthèse, de la diminution de sa dégradation et d'un transport intercellulaire accru de proline (Funck *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2009; Lehmann *et al.*, 2010; da Rocha *et al.*, 2012; Blume *et al.*, 2019). Cette accumulation de proline est principalement cytosolique (Ahmad & Hellebust, 1988). Si chez les halophytes, les teneurs en proline accumulées sont telles qu'elles peuvent avoir un rôle dans l'ajustement osmotique des cellules, cela ne semble pas le cas chez *Arabidopsis* où la proline constituerait surtout une réserve de pouvoir réducteur, d'énergie et d'azote pour permettre une reprise de croissance lors de la levée de la contrainte (Hellmann *et al.*, 2000; Deuschle *et al.*, 2004; Szabados & Savouré, 2010).

La proline et son métabolisme jouent également des rôles développementaux (Mattioli *et al.*, 2020). La proline synthétisée dans les parties aériennes peut être exportée dans les racines pour leur croissance, y compris lorsque les conditions sont défavorables (**Fig 22**) (Rizzi *et al.*, 2015). Ueda *et al.* (2007) rapportent d'ailleurs que l'expression du transporteur de proline ProT au niveau des pointes racinaires chez l'orge entraîne une plus forte teneur en proline dans ce tissu par rapport au reste de la racine, permettant ainsi un usage de la proline comme substrat énergétique, cela stimulerait l'élongation racinaire.

2. Importance du métabolisme de la proline dans la reproduction chez *Arabidopsis*

De fortes teneurs en proline ont été mesurées dans les organes reproducteurs chez *Arabidopsis* (**Fig 22**). En effet, la proline peut représenter jusqu'à 26% des acides aminés totaux dans ces tissus contre 1 à 3% dans les tissus végétatifs (Mattioli *et al.*, 2009, 2012). Il y a ainsi 56 fois plus de proline dans les fleurs que dans les feuilles (Schwacke *et al.*, 1999). La proline semble avoir un rôle dans les processus de déshydratation contrôlée puisque ce sont dans ces organes subissant un tel phénomène que l'on retrouve les plus fortes teneurs en proline (Veerabagu *et al.*, 2014). Il n'y a cependant pas de corrélation totale entre accumulation de proline et baisse de la teneur en eau (Mattioli *et al.*, 2009). Par ailleurs, il a été proposé que l'accumulation de proline pourrait servir de source d'énergie notamment lors de la croissance du tube pollinique (Mattioli *et al.*, 2012). On retrouve d'ailleurs une teneur de 48 pg de proline par grain de pollen sauvage chez *Arabidopsis* quand elle n'est que de 15 pg chez un double-mutant *p5cs1p5cs2/P5CS2* (Mattioli *et al.*, 2012). Or ce double mutant produit des grains de pollen non viables, avec un aspect morphologiquement déformé. Cela met en évidence le rôle crucial de la synthèse de proline et de sa disponibilité dans la fertilité du gamétophyte mâle. De plus, le transporteur de proline *ProT1* est fortement exprimé dans le pollen mature, et dans le tube pollinique en croissance ce qui vient étayer la théorie selon laquelle la proline pourrait servir de source d'énergie au cours de l'élongation du tube pollinique (Mattioli *et al.*, 2012). Cependant, le mutant *prot1* n'a pas de phénotype au niveau du pollen, ce qui suggère que la synthèse de proline au sein du grain de pollen est plus importante que son transport depuis les parties végétatives jusqu'au pollen (Mattioli *et al.*, 2012).

Le métabolisme de la proline est également important dans le développement de la graine (**Fig 22**). En effet, une expression accrue des gènes de son métabolisme est observée au niveau de la graine (Verbruggen *et al.*, 1993; Fujita *et al.*, 1998; Armengaud *et al.*, 2004; Hur *et al.*, 2004). Au niveau de sa synthèse, les deux gènes *P5CS* sont actifs transcriptionnellement (Székely *et al.*, 2008), et l'absence de *P5CS2* est létale pour l'embryon. Les graines homozygotes pour une mutation *p5cs2* avortent dans les phases tardives du développement de la graine sauf en cas de complémentation par apport exogène de 10 mM de proline (Mattioli *et al.*, 2012). Chez ce mutant *p5cs2*, il a été aussi observé une absence de

verdissement des embryons (Székely *et al.*, 2008). Enfin, le mutant homozygote *p5cr* est également embryon léthal puisqu'il provoque un arrêt précoce de son développement (Mattioli *et al.*, 2012; Funck *et al.*, 2012).

En ce qui concerne le catabolisme de la proline, on observe une hausse de l'expression de *ProDH1* dans les graines en développement (Veerabagu *et al.*, 2014) bien que la dégradation de la proline soit inhibée au cours de la phase de déshydratation (Angelovici *et al.*, 2010). Il n'est donc pas établi si ces transcrits *ProDH1* sont traduits lors de cette phase du développement de la graine

3. Rôle du métabolisme de la proline dans la sénescence et le métabolisme énergétique

3.1. Mise en évidence chez l'Homme.

Chez l'Homme, la compartimentation du métabolisme de la proline est différente. En effet, sa synthèse à partir du glutamate et sa dégradation pour former du glutamate sont localisées exclusivement dans la mitochondrie. Mais de la proline peut également être synthétisée à partir de P5C obtenu via l'activité OAT en utilisant l'ornithine dans le cytosol (Geng *et al.*, 2021). Le gène *PYCR1*, homologue de *P5CR*, joue un rôle significatif dans la modulation de l'état redox des cellules (Hollinshead *et al.*, 2018). En effet dans de nombreux cancers, *PYCR1* est induite et son activité augmente du fait d'un ratio NADH :NAD⁺ élevé induisant ainsi un découplage entre la respiration et le cycle de Krebs. Cela permet alors la synthèse de précurseurs anaboliques indépendamment de la disponibilité en oxygène (Hollinshead *et al.*, 2018). En effet, le pouvoir réducteur produit par le cycle de Krebs est utilisé pour alimenter l'anabolisme de la proline et non la chaîne respiratoire. Cette augmentation de l'anabolisme de la proline permet également d'en exporter de plus grandes quantités en dehors de la mitochondrie, alimentant ainsi une navette de pouvoir réducteur entre la mitochondrie et le cytosol (Hollinshead *et al.*, 2018; Geng *et al.*, 2021). Le catabolisme de la proline a également de l'importance dans le métabolisme des cellules cancéreuses puisqu'il permet de générer du pouvoir réducteur utilisable par la chaîne mitochondriale de transfert d'électrons. Le blocage de la chaîne respiratoire par l'utilisation de cyanure, d'antimycine ou

de roténone induit ainsi une forte augmentation de la synthèse de proline et de sa teneur chez le riz et l'homme (Alia & Saradhi, 1993; Hollinshead *et al.*, 2018).

3.2. L'importance des co-facteurs liés au métabolisme de la proline

Les teneurs en nucléotides $\text{NADH}:\text{NAD}^+$ et $\text{NADPH}:\text{NADP}^+$ sont faibles dans la mitochondrie. De plus, ces teneurs varient peu. En effet, les membranes sont imperméables aux nucléotides. Ainsi, le NAD^+ est synthétisé exclusivement dans le cytosol et doit être importé dans les compartiments subcellulaires par un transport protéique (Selinski & Scheibe, 2014; Feitosa-Araujo *et al.*, 2020; Rasmusson *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2021). Le transport de pouvoir réducteur entre les différents compartiments cellulaires se fait donc via des valves malate-oxaloacétate (OA), malate-aspartate ou glycérol-3-phosphate (Zheng *et al.*, 2021; Dao *et al.*, 2022). Ces acides organiques pouvant eux, franchir les membranes des organites, leur import/export couplé à leur oxydo-réduction permet ainsi de réguler le statut redox des différents compartiments. Ainsi, la Malate Déshydrogénase (MDH), enzyme cytosolique et mitochondriale permet l'interconversion de malate en OA en utilisant du NAD^+ ou NADP^+ comme co-enzyme pour générer du NADH, H^+ ou du NADPH, H^+ (Sew *et al.*, 2016). Du fait de l'existence de ces valves, une perturbation de l'équilibre $\text{NAD}^+/\text{NADH}, \text{H}^+$ dans un organite peut impacter l'état redox de la cellule toute entière, et à plus grande échelle, le développement de la plante (Feitosa-Araujo *et al.*, 2020; Rasmusson *et al.*, 2020).

Le métabolisme de la proline peut également constituer une navette de pouvoir réducteur entre la mitochondrie et le cytosol (**Fig 23**). En effet, la synthèse de proline permet d'oxyder du NADPH afin de maintenir une présence d'accepteurs d'électrons et ainsi maintenir un faible ratio $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ (Alia & Saradhi, 1993; Hollinshead *et al.*, 2018). En effet, la présence d'un pool important de NADP^+ est nécessaire pour activer la voie des pentoses phosphates (Hare *et al.*, 2003). Du côté mitochondrial, le catabolisme de la proline permet la production de nucléotides réduits $\text{NADH}+\text{H}^+$ et FADH_2 qui pourront être utilisés par la chaîne de transfert des électrons pour la phosphorylation oxydative de l'ADP (Sharma *et al.*, 2011). Cela fait de la proline un substrat pour la fourniture d'énergie mais qui ne peut être que transitoire car la quantité d'ATP produite par le catabolisme de la proline est moins importante que celle obtenue à partir de la dégradation complète du glucose. En effet, selon

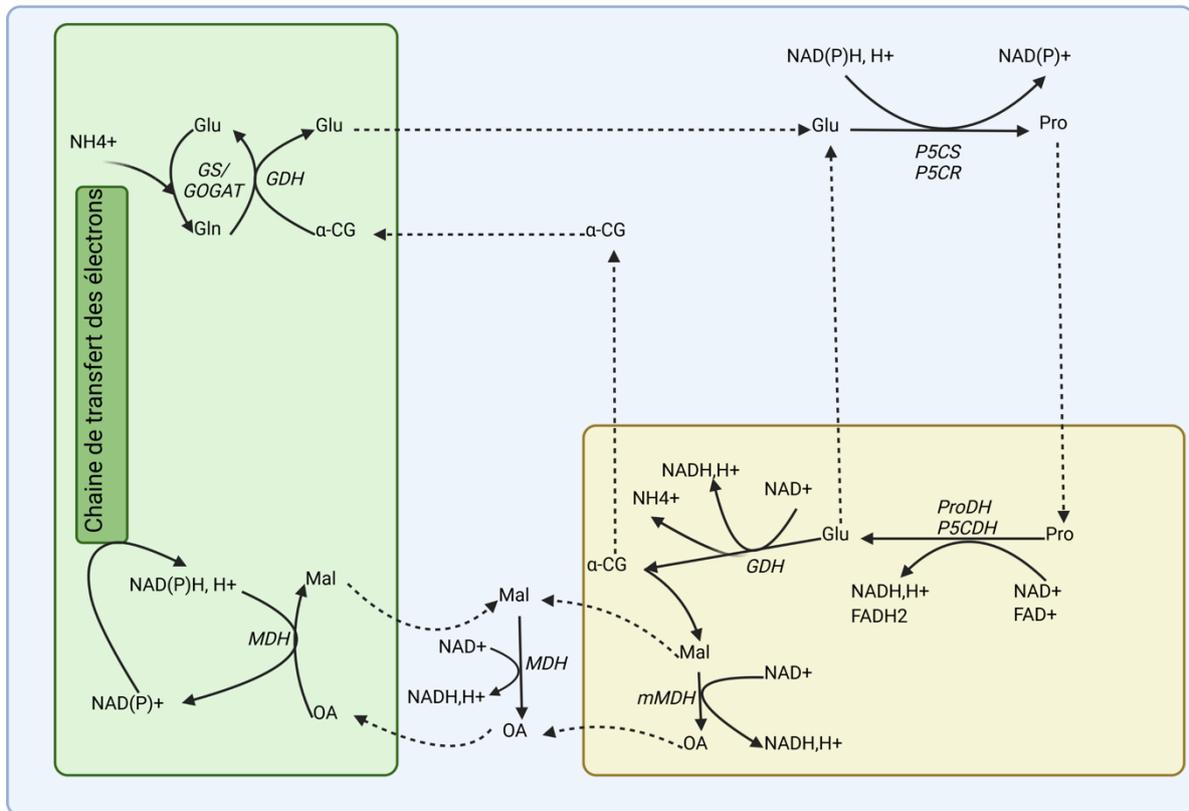


Figure 23 : Interconnexions du métabolisme de la proline avec d'autres voies permettant la navette de pouvoir réducteur entre plusieurs compartiments intracellulaires (Adapté de Dao et al., 2022).

Abréviations : Glu, Glutamate ; Gln, glutamine ; $\alpha\text{-CG}$: α -céto-glutarate ; Pro, Proline ; Mal, Malate ; OA, Oxaloacétate ; GS, Glutamine Synthétase ; GOGAT, Glutamate Synthase ; GDH, Glutamate déshydrogénase ; P5CS, Pyrroline-5-carboxylate synthétase ; P5CR, Pyrroline-5-carboxylate réductase ; ProDH, Proline déshydrogénase ; P5CDH, Pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase, (m)MDH, Malate déshydrogénase (mitochondriale). Créé avec Biorender.

les sources, l'oxydation complète de la proline en glutamate puis en α -CG qui entrera dans le cycle de Krebs génère entre 25,5 et 30 ATP (Mattioli *et al.*, 2009; Zhang & Becker, 2015; Hildebrandt *et al.*, 2015; Launay *et al.*, 2019) alors que 36 ATP sont générés par l'oxydation complète du glucose par la glycolyse, la décarboxylation oxydative et le cycle de Krebs. Chez *Arabidopsis* cette utilisation de la proline semble notamment être prédominante au cours de la sénescence durant laquelle ProDH1 et P5CDH s'accumulent tandis que les niveaux de proline diminuent, retardant ainsi la déplétion en ATP (Chrobok *et al.*, 2016; Launay *et al.*, 2019). La dégradation de la proline au cours de la sénescence permet également d'apporter du glutamate qui, pris en charge par la GDH, permettra la production de squelettes carbonés pour le métabolisme azoté et la remobilisation de l'azote vers les graines en cours de développement (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2005 ; Launay *et al.*, 2019).

Au cours du développement de la graine, les besoins en énergie sont immenses : en effet, la production d'ATP par la chaîne respiratoire alimentée par le cycle de Krebs est de 35 nmol/h/mg FW alors que les besoins sont de 159 nmol/h/mg FW au cours de la maturation pour la synthèse des composés de réserve (Schwender *et al.*, 2006) Le métabolisme central et la phosphorylation oxydative ne permettent donc de fournir que 22% des besoins en ATP au cours de la maturation de la graine. Si une part non-négligeable de l'ATP supplémentaire fourni provient des capacités photosynthétiques de la graine, des substrats alternatifs restent nécessaires pour la production d'énergie. Les acides aminés libres peuvent ainsi constituer de tels substrats (Heinemann & Hildebrandt, 2021).

Contexte de l'étude et objectifs

Le gène *P5CDH* chez *Arabidopsis* a été isolé et caractérisé par Deuschle *et al.* (2001, 2004). Le mutant *p5cdh* se caractérise par une absence d'altération visible à l'état végétatif mais une hypersensibilité à l'apport exogène de proline, d'ornithine et d'arginine (Deuschle *et al.*, 2004). Des expériences de marquage de proline avec du ^{14}C ont montré que 35 minutes après le marquage, de la glutamine et du glutamate marqués étaient détectés chez la plante sauvage contrairement aux mutants *p5cdh* (Deuschle *et al.*, 2004). La mutation *p5cdh* semble donc impacter le métabolisme azoté. Par ailleurs ces mêmes auteurs ont constaté que le mutant *p5cdh* produisait des graines qui germent très mal, mais sans en expliquer la cause.

Ainsi, afin d'approfondir les travaux préalablement menés sur *P5CDH*, plusieurs questions ont été posées :

- Quel est l'impact de la mutation *p5cdh* sur les capacités de remobilisation de l'azote au cours de la vie reproductive ?
- Quel est l'impact de la mutation *p5cdh* sur le développement reproducteur ?
- Quel est le rôle métabolique et/ou signalétique de *P5CDH* dans le développement de la graine ?

Pour répondre à ces questions, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre. Une évaluation des capacités de remobilisation de l'azote et du carbone a été conduite sur des mutants *p5cdh* soumis à différentes concentrations de nitrates. Puis le développement de la graine et notamment de l'embryon chez ces mutants *p5cdh* a été caractérisé. Cela a permis de mettre en évidence l'impact morphologique de la mutation *p5cdh* sur le développement de l'embryon et la chronologie des perturbations induites par la mutation *p5cdh*. Enfin, des études de transcrits, métaboliques et protéomiques ont été conduites afin d'identifier les processus moléculaires perturbés dans les graines de ce mutant. Ces travaux nous ont ainsi permis de proposer un modèle inédit expliquant le rôle de *P5CDH* au cours du développement de la graine.

Chapitre 2 : Etude des capacités de remobilisation du mutant *p5cdh*

Article 1 : The Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase is a key determinant for carbon and nitrogen remobilization during seed filling in *Arabidopsis thaliana*.

Soumis à Journal of Experimental Botany

La dégradation de la proline produit du glutamate qui constitue également une forme d'assimilation de l'azote. Le glutamate est également une forme de transport de l'azote au cours de la remobilisation des nutriments depuis les parties végétatives vers les graines en formation. De plus, le P5C généré par l'Ornithine Aminotransférase (OAT) au cours du recyclage de l'arginine peut être pris en charge par la P5CDH pour former du glutamate. Le catabolisme de la proline participe donc directement au métabolisme de l'azote et au recyclage de l'azote. Deuschle *et al.* (2004) ont ainsi logiquement montré que le métabolisme azoté était impacté chez les mutants *p5cdh*. De plus, Launay *et al.* (2019) ont également montré l'importance du catabolisme de la proline dans la sénescence notamment en fournissant du pouvoir réducteur à la chaîne de transfert des électrons mitochondriale. Cela permet de maintenir une production d'énergie nécessaire à la mise en place des nombreux processus cataboliques au cours de la sénescence.

Afin de déterminer si le catabolisme de la proline pouvait également être important dans le processus de remobilisation qui alimente la graine en développement en nutriments, une étude a été conduite sur des lignées d'*Arabidopsis* sauvage (Col-0) et des mutants du catabolisme de la proline (mutants *p5cdh* et *prodh1prodh2*) soumis à différents apports azotés.

Au cours de ces analyses, nous avons pu mettre en évidence que le mutant *p5cdh* produisait une masse plus faible de graines, et que la biomasse associée aux parties végétatives était à l'inverse plus élevée que chez Col-0. Nous avons pu également mettre en évidence que les graines *p5cdh* étaient particulièrement appauvries en carbone à cause d'un défaut de remobilisation du carbone mais aussi de l'azote. Enfin, nous avons montré que le mutant *p5cdh* produisait des graines morphologiquement anormales présentant un faible taux de germination. L'ensemble de ces observations est exacerbé en condition non limitante en azote par rapport à une condition de carence en azote.

Ces observations mettent en évidence le rôle crucial de P5CDH dans le processus de remobilisation de l'azote et de réallocation du carbone vers les graines en développement. La perturbation de la balance carbone/azote suggère également de fortes perturbations métaboliques.

The Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase is a key determinant for carbon and nitrogen remobilization during seed filling in *Arabidopsis thaliana*

Corentin DOURMAP¹, Anne MARMAGNE², Sandrine LEBRETON¹, Anne GUIVARCH¹, Arnould SAVOURE^{1,*} and Céline MASCLAUX-DAUBRESSE^{2,*}

¹: Sorbonne Université, UPEC, CNRS, IRD, INRAE, Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris (iEES), 75005 Paris, France

²: Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), 78000 Versailles, France.

* Correspondance :

arnould.savoure@sorbonne-universite.fr ; telephone: +33 (0)1 44272672

celine.masclaux-daubresse@inrae.fr ; telephone: +33 (0)130833088

email addresses: corentin.dourmap@sorbonne-universite.fr; anne.marmagne@inrae.fr;
sandrine.lanfranchi@sorbonne-universite.fr; anne.guivarch@sorbonne-universite.fr;
arnould.savoure@sorbonne-universite.fr; celine.masclaux-daubresse@inrae.fr

Running title : P5CDH and seed development in *Arabidopsis*

Date of submission: 08/26/2022

Number of table: 0

Number of figures: 7

Supplementary figures : 3

Word count: 3189

Highlight

This work highlights an essential contribution of the Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase in carbon and nitrogen remobilization for reserve accumulation during seed development in *Arabidopsis thaliana*.

Abstract

Proline is an amino acid which is degraded in the mitochondrion by the sequential action of Proline Dehydrogenase (ProDH) and Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase (P5CDH) to form glutamate. We investigated the phenotypes of *Arabidopsis* wildtype plants, knockout *prodh1prodh2* double mutant and knockout *p5cdh* allelic mutants grown at low and high nitrate supplies. Surprisingly, only *p5cdh* presented lower seed yield and produced lighter seeds. Elementary analyses in above ground organs revealed lower C concentrations in the *p5cdh* seeds. The computing of C, N, and dry matter partitioning between the above ground organs revealed a major defect in stem to seed resource allocations in *p5cdh*. Surprisingly defects in C, N and biomass allocation to seeds dramatically increased in high N conditions. ¹⁵N-labeling consistently confirmed the defect of N remobilization from rosette and stem to seeds in *p5cdh*. Consequently, *p5cdh* mutants produced morphologically abnormal C-depleted seeds that displayed very low germination rates. The most striking result is the strong amplification of the N remobilization defects in *p5cdh* by high nitrate supply. Interestingly, such phenotype was not observed in *prodh1prodh2* mutant irrespective of nitrate supply. This study reveals an essential role of *p5cdh* in carbon and nitrogen remobilization for reserve accumulation during seed development in *Arabidopsis*.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; carbon and nitrogen remobilization; Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase; proline catabolism; reserve accumulation; seed development.

Abbreviations: C: carbon ; N : nitrogen ; DAS: days after sowing; P5C: pyrroline-5-carboxylate; P5CDH: P5C Dehydrogenase; ProDH: Proline Dehydrogenase; P5C Synthetase : P5CS; P5C reductase: P5CR.

Introduction

Decreasing the use of fertilizers while maintaining yield production is one of the most crucial challenges for agriculture nowadays. Indeed, current crops are dependant of inorganic nitrogen (N) fertilizers whereas a large part of applied fertilizers is lost and not able to be assimilated by roots (Good *et al.*, 2004). Consequently, the use of large amounts of ammonium-nitrate fertilizers raises a lot of environmental concerns like eutrophication (Morand and Briand, 1996), greenhouse gas emission (Mrówczyńska-Kamińska *et al.*, 2021) with a high economical cost. This dependence to fertilizers can be explained by a good correlation between available nitrogen and yield. However, a negative correlation between yield and nitrogen harvest index (NHI) is observed when large amount of N fertiliser is provided to the plants. NHI is defined as the percentage of N in the seeds compared to the total N in the plant (Lemaître *et al.*, 2008). NHI depends on the post flowering N-uptake that usually decreases with senescence and after flowering, and on the capacities of the plant to remobilize organic nitrogen from macromolecules in source organs. Indeed, from the flowering and during the reproductive life of the plant, vegetative parts enter monocarpic senescence (Diaz *et al.*, 2006) during which progressive reduction of N and Carbon (C) anabolism occurs, and catabolism of carbohydrates, lipids and proteins increases (Havé *et al.*, 2017). Photosynthesis is particularly down-regulated during leaf senescence due to chloroplast dismantling and to very active proteolytic activities that generate large amounts of amino acids (Diaz *et al.*, 2006, 2008; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008; Chrobok *et al.*, 2016). Amino acids released from protein degradation are converted mostly into glutamine and asparagine (Havé *et al.*, 2017) and then transported to the developing seeds through the phloem which can also carry high amounts of sucrose as carbon nutrient (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008). Nutrients originating from old leaf catabolism are then used in developing seeds to build storage proteins, starch or lipids (Baud *et al.*, 2008). N-uptake is directly linked to the vegetative biomass production while N-remobilization is essential for seed yield production and grain protein content (Andrews *et al.*, 2013).

Protein degradation in source leaves during senescence is not only essential for N-remobilization but also provides amino acids whose further hydrolyses are essential to fuel mitochondrion energy metabolism (Araújo *et al.*, 2011). Recently, proline catabolism was shown to be involved in senescence and to fuel mitochondrial respiration (Launay *et al.*, 2019). Proline is also known to be involved in reproductive development (Mattioli *et al.*, 2012) and in tolerance to various abiotic stresses like drought or salt stress. Indeed, proline is particularly crucial as energy provider during stress recovery. Proline synthesis from glutamate occurs in

the cytosol by Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase (P5CS) and P5C reductase (P5CR) using two NAD(P)H (Szabados and Savouré, 2010). Then, when proline degradation occurs in the mitochondrion with the sequential action of Proline Dehydrogenase (ProDH) and Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase (P5CDH), it produces FADH₂ and NADH which constitute important reducing powers for the cell (Deuschle *et al.*, 2004; Szabados and Savouré, 2010). Consequently, proline catabolism is a supplier of reduced power for energy production and its whole metabolism constitutes a reduced power shuttle between cytosol and mitochondria (Zheng *et al.*, 2021). In addition, proline metabolism is involved in nitrogen recycling since the P5C produced by the Ornithine Aminotransferase (OAT) involved in arginine catabolism, can be used by P5CDH to generate glutamate (Funck *et al.*, 2008).

Nitrogen recycling and remobilization from organ to organ can be followed in plants using ¹⁵N-tracing experiments (Diaz *et al.*, 2008). In the present study, the phenotypes of mutants impaired in the master enzymes of proline catabolism grown under low and high nitrate supplies were investigated. Significantly lower seed yield and seed weight observed in *p5cdh* mutant were exacerbated under high N conditions. Moreover, a decrease in N allocation to the seeds as well as a defect of carbon storage in the seeds were noticed in *p5cdh* mutant. Together, this could explain the shriveled phenotype of the seeds. Indeed, defect in nitrogen fluxes was confirmed by ¹⁵N pulse-chase experiment. Interestingly a sharp decrease of N remobilization from the rosette and the stem to the seeds in *p5cdh* mutants was mainly observed under high nitrate condition. In addition *p5cdh* seeds displayed low germination rates. The present study shows the essential role of P5CDH in the regulation of sink strength and source activity to sink remobilization.

Materials and Methods

Plant materials and growth conditions

Arabidopsis thaliana Col-0 ecotype, allelic T-DNA insertion mutants *p5cdh-2* (SALK-018453) and *p5cdh-3* (SALK-021026) as well as double *prodh1prodh2* mutant were used in this study. *prodh1prodh2* was obtained by crossing *prodh1-4* (SALK_119334) and *prodh2-2* (GABI_328G05) as described in Cabassa-Hourton *et al.* (2016). Col-0, *p5cdh-2* and *prodh1prodh2* seeds were sown on middle size particle sand as described in Masclaux-Daubresse and Chardon (2011) and grown under short day light (8 h light) with 21°C day and 19 °C night temperature. At 56 days after sowing (DAS), plants were transferred to long day length (16 h light). Plants were cultivated on sand under low (2 mM) and high nitrate (10 mM)

nutrition. Pulse ^{15}N -labelling was performed according to Masclaux-Daubresse and Chardon (2011) at vegetative stage (40 DAS), a long time before flowering and harvest, which occurred about 2.5 month later. ^{15}N labeling was performed replacing the unlabeled watering solutions by a solution with the same nutrient compositions except that $^{14}\text{NO}_3^-$ was replaced by $^{15}\text{NO}_3^-$ 10 atom% excess. After labeling roots, sand was rinsed carefully several times with deionized water to discard remaining ^{15}N ; then unlabeled nutrient solutions were used for the rest of the culture cycle. At harvest, plants were separated as rosette, stem and seeds. The dry weight (DW) of these three compartments were measured. Four independent replicates (plants) per genotype were harvested for each analysis.

Developmental studies

After seed germination, development of seedlings and then plants were carefully followed by taking pictures every week. The total number of leaves was recorded during the vegetative phase as well as an adequate measurement of flowering time. Number of seeds per silique was determined after opening green maturing siliques longitudinally and counting the number of seeds under stereomicroscope.

Determination of N and C content and ^{15}N abundance

Elementary analysis and isotopic discrimination were measured with elemental analyser and isotope ratio mass spectrometer as described in Marmagne *et al.* (2020). C, N and ^{15}N concentrations were calculated as described in Marmagne *et al.* (2020). Partitioning of C, N and ^{15}N was calculated as % of the whole plant.

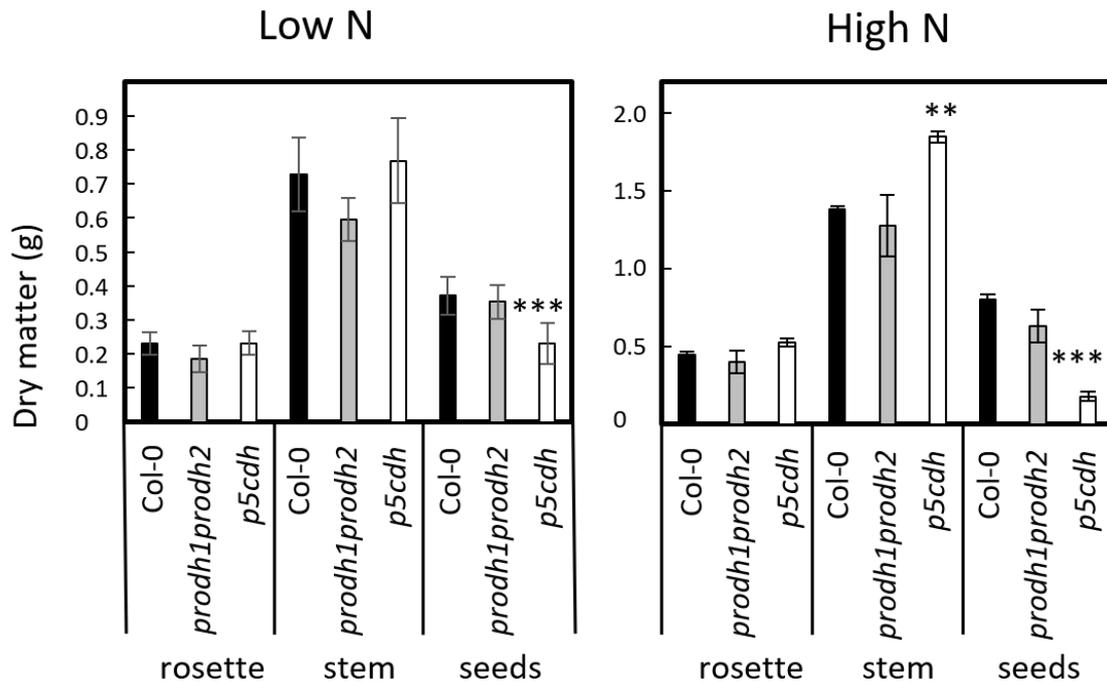


Figure 1: Dry matter in Col-0, *prodh1prodh2* and *p5cdh-2* mutant upon low and high nitrate supplies.

Dry matter of rosette, stem (flowering stem + cauline leaves + silique pericarp) and seeds of Col-0 (black bars), *prodh1prodh2* (grey bars) and *p5cdh* mutant (white bars) were measured on plants at seed maturity stage. Means and SD are shown (n=6). Significant differences between wild type and mutant are indicated (T-test; * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001).

Scanning electronic microscopy

Mature seeds were dried with liquid CO₂ using a CPD300 critical point dryer (Leica). Then samples were sputter-coated with platinum and observed with a GeminiSEM 500 scanning electron microscope (Zeiss) at the Electron Microscopy Facility (EMF) of the Institut de Biologie Paris-Seine (France).

Germination tests

Dry seeds of genotypes Col-0, *p5cdh-2*, *p5cdh-3* and *prodh1prodh2* were sown on agar media (0.12% MES ; 0.8% agar ; pH 7.5). Each Petri dish was divided in sectors corresponding to the several genotypes to avoid a box effect. After 24 h at 4°C in dark, Petri dishes were transferred to growth chamber (16 h light, 70 μmol.m⁻².s⁻¹, 22°C day, 20°C night). The emergence of the radicle was recorded after 16 h, 24 h, 48 h, 72 h and 7 days (168 h). Seeds from two different cultures were used as two independent biological replicates and two repeats for each genotype were considered.

Statistical analysis

Statistical tests were performed using R software. If conditions were achieved, comparison of means were performed through Student t test or through the non-parametric Mann-Whitney Wilcoxon if any.

Results

Partitioning of biomass, carbon and nitrogen is affected in p5cdh mutant

Arabidopsis thaliana ecotype Col-0, *p5cdh-2* mutant and *prodh1prodh2* double mutant were grown under either 2 mM or 10 mM nitrate to trigger a limiting N or non-limiting N growth conditions. No morphological traits or timing of flowering time could be observed between genotypes during their development whatever the nitrogen supply (**Fig. S1**). Rosette, floral stem and seed dry biomass were determined (**Fig. 1**). As expected, plant biomass was higher under high nitrogen than upon low nitrogen supply. No significant differences could be

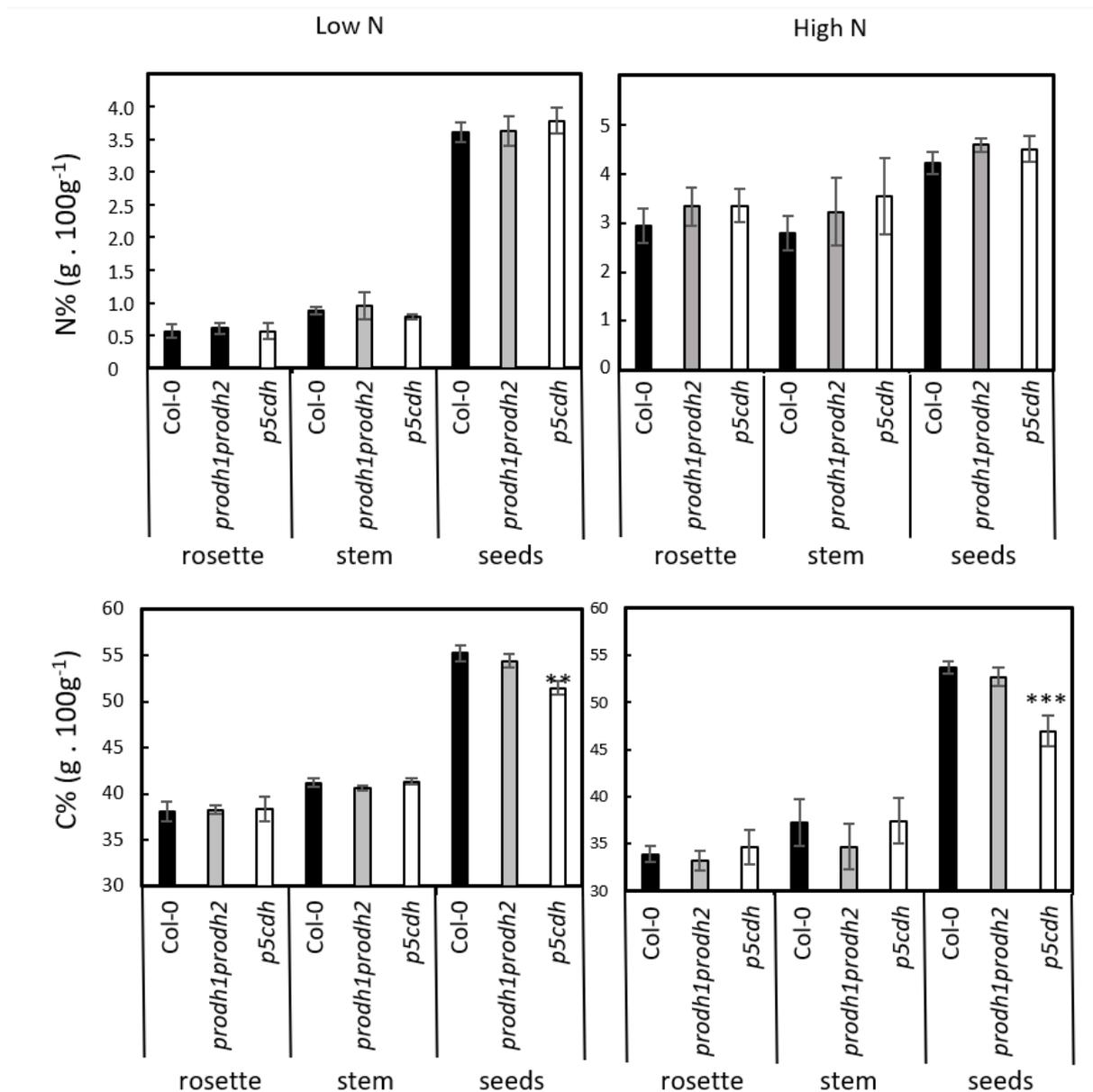


Figure 2: C concentration but not N concentration is decreased in seeds of *p5cdh-2* mutant irrespective of nitrate conditions.

C and N concentrations of rosette, stem (flowering stem + cauline leaves + silique pericarp) and seeds of wild type Col-0 (black bars), *prodh1prodh2* (grey bars) and *p5cdh* mutant (white bars) were measured using elemental analyser. Means and SD are shown (n=6). Significant differences between wild type and mutant are indicated (T-test; * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001).

observed in rosette biomass between genotypes whatever nitrogen supply. Interestingly, seed biomass was strongly lower in *p5cdh* mutant in comparison to WT and *prodh1prodh2* double mutant at both low and high nitrate supplies. Decrease of seed yield was more dramatic under high nitrate supply than at low nitrate. In addition upon high nitrogen supply, higher stem biomass was also measured in the *p5cdh* mutant.

Carbon and nitrogen amounts were determined in rosette, floral stem and seeds of studied genotypes (**Fig 2**). As expected, higher N concentrations were recorded from the plant organs grown with high nitrogen supply than with low nitrogen. Under low N supply, highest N concentrations were measured in seeds with approximately 3.6% of N (mg N per 100 mg DW) whereas only 0.5% and 0.8% of N was found in the rosette and floral stem respectively. Under high N, differences were reduced between rosette, stem and seeds, with 3% N in rosette and floral stem, and 4.2% in seeds. C concentrations in plant organs were lower upon high nitrate than upon low nitrate, which is consistent with literature (Lemaître *et al.*, 2008). In WT, irrespective of nitrate condition, C concentration in seeds was 54% (mg C per 100 mg DW) while rosette and floral stem contained between 33-41% of C.

There was no significant difference in N concentration between genotypes under either high or low nitrate conditions, whatever the plant organ considered. Interestingly, the *p5cdh* seeds exhibited a significantly lower C concentration compared to other genotypes under both nitrate conditions, and such phenotype was more pronounced in the high nitrate plants relative to the low nitrate ones. Both seed yield and C concentrations in *p5cdh* mutant indicated defects in seed setting and possibly in seed filling.

Therefore, partitioning of biomass, carbon and nitrogen were calculated computing the ratio of the values in the different organs to the whole-plant values (**Fig 3**). This revealed that the percentage of biomass associated to floral stem, was higher in *p5cdh* mutant than in any other genotypes, whatever nitrate supply. In contrast the percentage of seed biomass in comparison to the whole plant (harvest index) was significantly lower in *p5cdh* mutant compared to the other genotypes irrespective of nitrate supply. The same trend was observed for carbon. As such, in both low and high nitrate conditions, the partition of C in the floral stem of *p5cdh* was significantly higher than in WT, while the partition of C in the seeds of *p5cdh* mutants was significantly lower as in WT. The partitioning of C associated to the rosette was also higher in *p5cdh* mutant than in WT, but only under high nitrate condition. Surprisingly, N partitions did not show the same pattern as those of C and biomass. There were no differences between

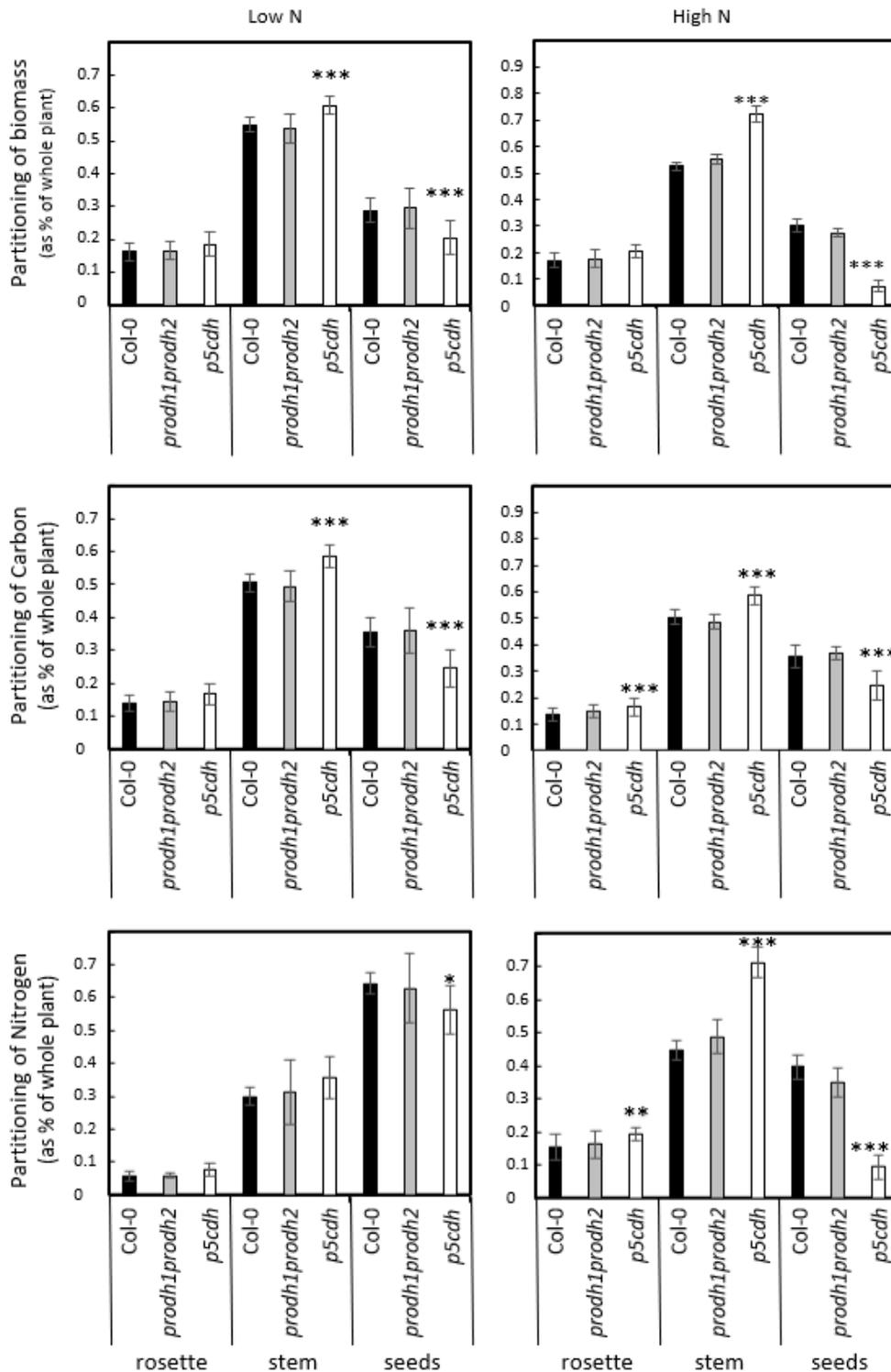


Figure 3: Partitioning of biomass, carbon and nitrogen is highly affected in *p5cdh-2* mutant, especially under high nitrate supply.

Partitionings of biomass, carbon and nitrogen in the rosette, stem (flowering stem + cauline leaves + silique pericarp) and seeds compartments of wild type Col-0 (black bars), *prodh1prodh2* (grey bars) and *p5cdh* mutant (white bars) were calculated from dry weights, C% and N%. Means and SD are shown (n=6). Significant differences between wild type and mutant are indicated (T-test; * p<0.05; ** p<0.01; *** p>0.001).

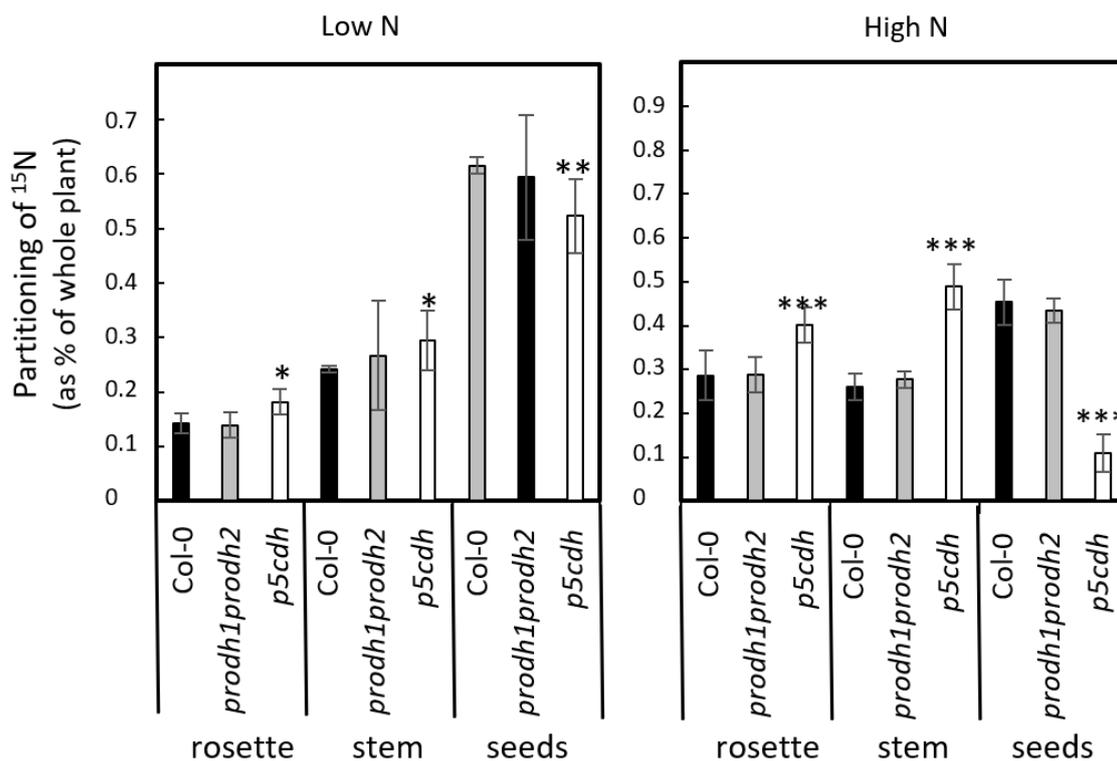


Figure 4: Partitioning of ¹⁵N reveals strong defects of N remobilization from rosette and stem to the seeds in *p5cdh-2* mutant, especially under high nitrate supply.

Partitionings of ¹⁵N in the rosette, stem (flowering stem + cauline leaves + silique preicarp) and seeds compartments of wild type Col-0 (black bars), *prodh1prodh2* (grey bars) and *p5cdh* mutant (white bars) were calculated from ¹⁵N contents in each compartment. Means and SD are shown (n=6). Significant differences between wild type and mutant are indicated (T-test; * p<0.05; ** p<0.01; *** p>0.001).

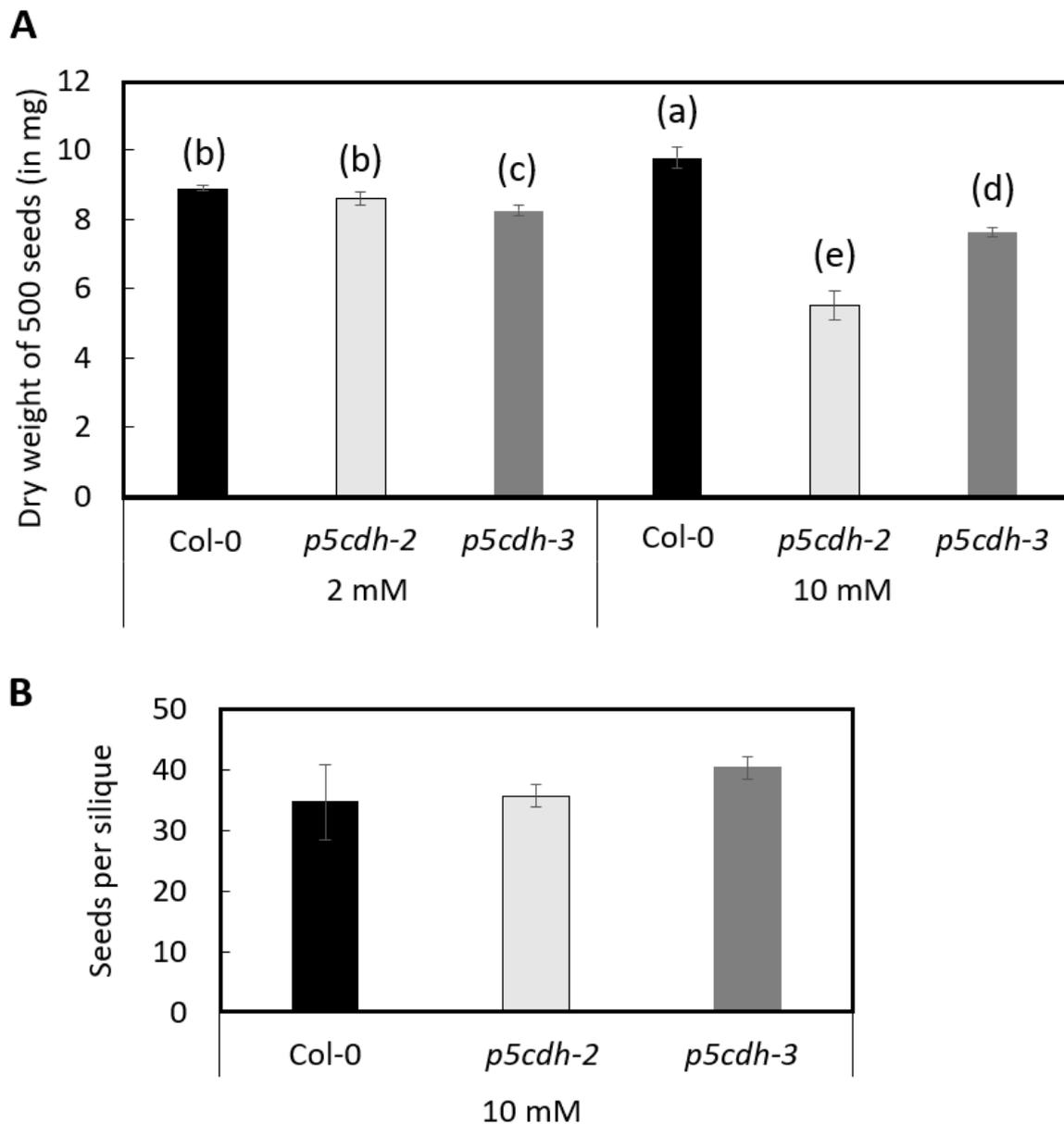


Figure 5: Seed weight and distribution in Col-0 and *p5cdh* mutants upon different nitrogen supplies.

(A) Dry mass of 500 seeds produced by Col-0 and *p5cdh-2*, *p5cdh-3* allelic mutants under either 2 mM or 10 mM nitrate supply. Mean \pm SD T.test $p < 0.05$, $n = 30$.

(B) Number of seeds per silique. 30 siliques from 24 plants were pooled. Three replicates were analysed. Mean \pm SD. No significant difference could be observed with T-test $p < 0.05$

genotypes under low nitrate for N partitioning except for *p5cdh* seeds. By contrast, N partitioning was sharply different in *p5cdh* compared to WT under high nitrate supply. Partitioning of N in the seeds of *p5cdh* was much lower than in WT, while N partitioning in floral stem was largely increased compared to WT. A slight increase in N partitioning in the rosette leaves of *p5cdh* compared to WT was also observed in high nitrate condition.

All together these results suggest that N and C fluxes from the stem to the seeds are strongly impaired in *p5cdh* mutant certainly due to defects in remobilization process from the seed. Defects in remobilization are consistent with the lower seed yield observed and with the lower seed filling hypothesis.

Therefore ^{15}N -labeling was performed to determine N fluxes at the whole plant level and to quantify N-remobilization to the seeds (**Fig 4**). The partitioning of ^{15}N was calculated and showed that the ^{15}N , absorbed by the plants at vegetative stage, has been further mainly allocated to the seeds. The values of ^{15}N partitioning in the seeds at harvest represent the N remobilization efficiency. These values were ca. 60% under low nitrate and ca. 40% under high nitrate, which is consistent with the fact that N-remobilization is stimulated when nitrate supply is limited (Masclaux-Daubresse and Chardon, 2011; Guiboileau *et al.*, 2012). Differences in ^{15}N partitioning between genotypes indicated a sharp decrease of N remobilisation essentially from the stem to the seeds and from the rosette to the seeds in *p5cdh* by comparison with the WT and *prodh1prodh2* mutant. The difference in N-remobilization between *p5cdh* and the two other genotypes, WT and *prodh1prodh2* mutant, was significant but weaker under low nitrate condition compared to high nitrate condition. However, the low N condition that triggers proteolysis and autophagy in rosette leaves of Arabidopsis usually exacerbates phenotype of mutants defective in N-remobilization (Guiboileau *et al.*, 2012). The different situation observed here is certainly due to the fact that the defect for N-remobilization in *p5cdh* occurs in the stem tissues, and not in rosette source leaves as in autophagy and protease mutants. It can be noticed that whatever nitrate supply and organs, *prodh1prodh2* mutant had a similar ^{15}N partitioning value as WT. The partitioning of ^{15}N shows that N remobilization is impaired only in *p5cdh*. Nevertheless, the most striking result is that such phenotype is exacerbated under high nitrate supply and weaker under low nitrate, which indicates that in *p5cdh* plants, post-flowering N-uptake cannot compensate defects in N-remobilization, unlike what was observed autophagy mutants for example (Guiboileau *et al.*, 2012).

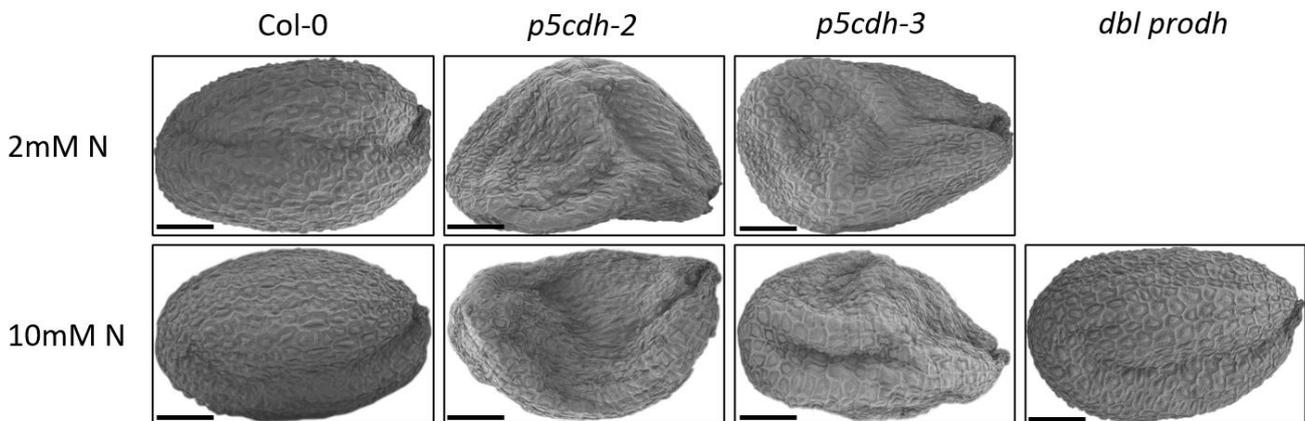


Figure 6: Dry seeds of Col-0, *prodh1prodh2*, *p5cdh-2*, *p5cdh-3* mutants from plants grown under either 2 mM or 10 mM nitrate observed by SEM.

Scale bar: 100 μ m

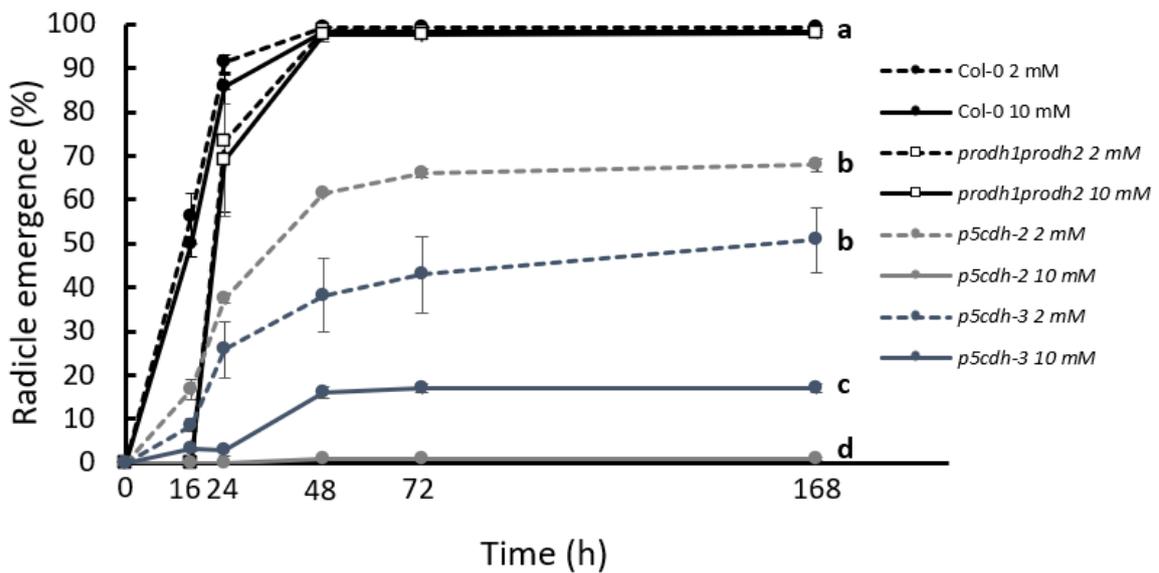


Figure 7: Germination rates of seeds from Col-0, *prodh1prodh2*, *p5cdh-2*, *p5cdh-3* mutants from plants grown with 2 mM or 10 mM nitrates.

Dry seeds were sown on MES and germination was followed during 7 days. Mean \pm SD. At 168 h, the letters a, b, c, d mean significant differences (Mann-Whitney test, $p < 0.05$, $n > 100$).

p5cdh mutant produces shrivelled seeds and a reduction in seed yield

Compared to WT, the *p5cdh* mutant presents a significantly lower seed weight under high nitrate conditions, which confirms that defect is dependent of plant N nutrition (**Fig 5A**). Both lower seed weight and lower seed number can explain lower seed yield observed in *p5cdh* mutant. As no differences were detected in the number of seeds per silique between Col-0 and *p5cdh* mutants, we hypothesized that defects of N mobilization to the seeds only affected seed filling (**Fig 5B**).

Close inspection of the seeds under scanning electron microscope revealed that the surfaces of *p5cdh-2* and *p5cdh-3* allelic mutants were shrivelled under low nitrate condition and even more under high nitrate condition (**Fig 6**). This suggests a reduced accumulation of storage compounds during seed maturation in *p5cdh* mutants. The fact that the surface of *p5cdh* seeds was shrivelled can explain why the weight of the seeds was reduced. In contrast seeds from WT and *prodh1prodh2* mutants appeared normal and fully filled whatever nitrate growth conditions (**Fig S2**).

The shrivelled phenotype questioned the ability of *p5cdh* seeds to germinate. Although the speed of germination was the same for all genotypes, the germination rates for *p5cdh* mutants were strongly impaired compared to WT (**Fig. 7**). After 48 hours sowing, seeds from WT and *prodh1prodh2* displayed 100% of germination whatever N supply. In contrast *p5cdh* mutants were impaired in their germination and this germination defect was even more pronounced with 10 mM nitrate.

Discussion

In this paper, we report new insight about P5CDH in remobilization and seed filling in relation to the level of nitrate supply. The phenotypes of *p5cdh* mutants were compared to that of the *prodh1prodh2* double mutant in addition to WT, as *prodh1prodh2* is known to be impaired in proline catabolism and to accumulate higher levels of proline than WT (Launay *et al.*, 2019). Surprisingly, the *p5cdh* mutant displays strong seed phenotypes while *prodh1prodh2* did not show any defect in seed yield and mass.

Interestingly *p5cdh* mutant produced a similar number of seeds per silique than WT but with a lower mass. Seeds produced by *p5cdh* mutants under high nitrate appeared misshaped and shrivelled showing that they are partially empty. This phenotype was consistent with the lower

C concentration of the *p5cdh* seeds. Whether smaller and shrived seeds is due to smaller embryo inside in addition to a lack of accumulation of storage compounds in seeds needs further characterization. To determine whether seed phenotype could be due to defects in seed filling, we analysed partitioning of C and N in the different above ground organs and measured N fluxes using ^{15}N isotope labelling. Biomass, N and C allocated to the seeds were decreased in *p5cdh* mutants, especially under high nitrate supply. Like biomass, C partitioning was increased in the stem of *p5cdh*, and decreased in the seeds of this mutant showing a defect of resource allocation to the seeds in the mutants. Defects in C allocation to the seeds could explain the shriven and lower C% phenotypes of the seeds. The defect in N remobilization was mainly observed under high nitrate condition and may explain the *p5cdh* yield phenotype (Baud *et al.*, 2008; Girondé *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2020). It is indeed known that N remobilization from vegetative tissues to the seeds is essential for yield as N-uptake usually decrease after flowering in plants (Rossato *et al.*, 2001; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Whether defect in N-remobilization to the seeds is due to the role of P5CDH in the stem as a bottleneck for N flux to the seeds or to the role of P5CDH in the seeds as a bottleneck in the transamination of amino acids and the influx of amino acids in the seed embryo remains to be explored. It is interesting to note that differences concerning C and N partition in *p5cdh* are not correlated. The C/N balance is consequently disturbed in *p5cdh* seeds to the advantage of nitrogen (**Fig S3**). An unbalanced C/N ratio is known to have large metabolic consequences. Indeed, Krebs cycle normally produce carbon skeletons for nitrogen assimilation (Zheng, 2009). The lower amount of C should lead to a lower supply of substrates able to accept N that inevitably leads to a lower nitrogen assimilation/reassimilation. The fact that the phenotype of *p5cdh* mutants is weak in low N and exacerbated in high N could be linked to nitrate assimilation in reproductive organs (Chopin *et al.*, 2007). The presence of nitrate enhances the production of organic acids, and the activation of the pentose phosphate pathway to produce carbon skeletons and reducing power for nitrate assimilation. In the same way, sucrose and starch synthesis are repressed (Scheible *et al.*, 2004). This may explain why the phenotype is exacerbated under high nitrate. In such nutrient condition, C is predominantly used for N assimilation together with a diminution of sucrose production. But sucrose represents the major form of transport for carbon through phloem from vegetative part to sink tissues such as developing seeds. Consequently, opposite molecular responses to simultaneous C and N deficiency make *p5cdh* phenotype worse. Finally, a disturbed C/N balance impacts the cell wall synthesis (Zheng, 2009). If morphologically abnormal seeds are caused by a smaller embryo, its growth could be inhibited by a cell wall elongation issue due to the disturbed C/N balance. A decrease of N flux to the

seeds of *Arabidopsis* could partially explain the lower C% in seeds of *p5cdh*. Amino acids as glutamine can be used to fuel Krebs cycle that produce precursor of very long chain fatty acid found in seeds (Baud and Lepiniec, 2010). Interestingly, proline metabolism and VLCFA biosynthesis were shown to be coordinated when cellular redox status is altered (Shinde *et al.*, 2016).

Storage compounds in seeds are made from remobilized nutrients that are reused to form the proteins and lipids accumulated during the maturation phase of seed development. These storage compounds are used during germination and first stages of development of the seedlings (Baud *et al.*, 2008; Sew *et al.*, 2016; Shao *et al.*, 2019). The highlighted defect of organic N remobilisation to the seeds may explain metabolic disorders concerning C/N ratio. The unbalanced C/N ratio in turn may explain the lower germination capacities of the *p5cdh* seeds. Indeed, a lower storage compound accumulation was described to trigger a slower germination (Allorent *et al.*, 2015). It seems however that seeds of *p5cdh* are not homogenous. Indeed, the *p5cdh* seeds did not display slower germination, but differences in germination rate due to ungerminated seeds even after 7 days. It is then likely that some seeds are strongly affected by the lack of storage lipids (lower C%) and cannot germinate. For the other, it is likely that they can germinate and develop radicles normally.

Metabolic role of proline catabolism in reproductive organs should explain *p5cdh* phenotype. Indeed, during senescence, proline catabolism is induced to furnish glutamate for carbon skeleton production to Krebs cycle (Launay *et al.*, 2019). These authors proposed that proline could serve as respiratory substrate as highlighted by the lower respiration capacity and the increased levels of TCA intermediates in *prodh1prodh2* mutant during senescence. Our hypothesis is that respiratory defects is enhanced in *p5cdh* mutant because the entire proline catabolism should be stopped in order to prevent accumulation of the toxic P5C intermediate (Hellmann *et al.*, 2000). In *prodh1prodh2*, only the first step of proline catabolism is blocked. P5CDH can still be fuelled by P5C originating from OAT to produce glutamate and reducing power (Funck *et al.*, 2008). Proline is the 3rd most abundant amino acid after glutamate and glutamine found in flowers. In rosette leaves, proline content was three-fold higher in plants grown under 10 mM nitrate than in plants exposed to 2 mM nitrate (Lemaître *et al.*, 2008). Consequently, proline is a key amino acid involved in senescence and remobilisation. Knocking out proline catabolism with *p5cdh* mutant prevents proline utilization to produce energy and TCA cycle intermediates. The situation is exacerbated under high N because of higher proline concentration. Thus, the impossibility to catabolize proline could lead to energetic deficit and lack of available C intermediates that could have consequences on seed development. This

leads to a low sink strength which reduced the remobilization from rosette leaves to seed filling. Although the role of proline metabolism has been previously demonstrated to be important for reproductive development (Mattioli et al., 2009, 2012, 2020; Funck et al., 2012), our work highlights the importance of proline catabolism mediated by *p5cdh* for C and N remobilization during seed development. Although we show that P5CDH is clearly involved in the control of C and N remobilization for seed filling, its role and the link with the abundance of nitrate available for plant growth remains to be determined.

Acknowledgments

We would like to thank Dr Régis Maldiney (CNRS, Sorbonne Université) for having done some preliminary germination assays.

Author contributions

Designed research: AS, CMD; conducted experiments: CD, AM, SL, AG; analyzed data: CD, AM, SL, AG, AS, CMD; wrote paper: CD, AG, AS, CMD with contributions from AM and SL.

Conflict of interest

No conflict of interest declared

Funding

This work was supported by Sorbonne University and has benefited from the support of IJPB's Plant Observatory technological platforms. The IJPB benefits from the support of Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007). C.D. received a PhD fellowship from the « Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche » (MESR).

References

- Allorent G, Osorio S, Ly Vu J, et al.** 2015. Adjustments of embryonic photosynthetic activity modulate seed fitness in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **205**, 707–719.
- Andrews M, Raven JA, Lea PJ.** 2013. Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants: Do plants need nitrate? *Annals of Applied Biology* **163**, 174–199.
- Araújo WL, Tohge T, Ishizaki K, Leaver CJ, Fernie AR.** 2011. Protein degradation – an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends in Plant Science*.
- Baud S, Dubreucq B, Miquel M, Rochat C, Lepiniec L.** 2008. Storage Reserve Accumulation in *Arabidopsis*: Metabolic and Developmental Control of Seed Filling. *The Arabidopsis Book* **6**, e0113.
- Baud S, Lepiniec L.** 2010. Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Progress in Lipid Research* **49**, 235–249.
- Cabassa-Hourton C, Schertl P, Marianne BJ, et al.** 2016. Proteomic and functional analysis of proline dehydrogenase 1 link proline catabolism to mitochondrial electron transport in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* **473**, 2623–2634.
- Chopin F, Orsel M, Dorbe M-F, Chardon F, Truong H-N, Miller AJ, Krapp A, Daniel-Vedele F.** 2007. The *Arabidopsis* ATNRT2.7 Nitrate Transporter Controls Nitrate Content in Seeds. *The Plant Cell* **19**, 1590–1602.
- Chrobok D, Law SR, Brouwer B, et al.** 2016. Dissecting the metabolic role of mitochondria during developmental leaf senescence. *Plant Physiology* **172**, 2132–2153.
- Deuschle K, Funck D, Forlani G, Stransky H, Biehl A, Leister D, van der Graaff E, Kunze R, Frommer WB.** 2004. The role of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. *Plant Cell* **16**, 3413–3425.
- Diaz C, Lemaître T, Christ A, Azzopardi M, Kato Y, Sato F, Morot-Gaudry JF, le Dily F, Masclaux-Daubresse C.** 2008. Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition. *Plant Physiology* **147**, 1437–1449.
- Diaz C, Saliba-Colombani V, Loudet O, Belluomo P, Moreau L, Daniel-Vedele F, Morot-Gaudry JF, Masclaux-Daubresse C.** 2006. Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **47**, 74–83.

- Fan T, Yang W, Zeng X, Xu X, Xu Y, Fan X, Luo M, Tian C, Xia K, Zhang M.** 2020. A Rice Autophagy Gene OsATG8b Is Involved in Nitrogen Remobilization and Control of Grain Quality. *Frontiers in Plant Science* **11**.
- Funck D, Stadelhofer B, Koch W.** 2008. Ornithine- δ -aminotransferase is essential for Arginine Catabolism but not for Proline Biosynthesis. *BMC Plant Biology* **8**.
- Funck D, Winter G, Baumgarten L, Forlani G.** 2012. Requirement of proline synthesis during Arabidopsis reproductive development. *BMC Plant Biology* **12**.
- Girondé A, Etienne P, Trouverie J, et al.** 2015. The contrasting N management of two oilseed rape genotypes reveals the mechanisms of proteolysis associated with leaf N remobilization and the respective contributions of leaves and stems to N storage and remobilization during seed filling. *BMC Plant Biology* **15**, 59.
- Good AG, Shrawat AK, Muench DG.** 2004. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends in Plant Science* **9**, 597–605.
- Guiboileau A, Yoshimoto K, Soulay F, Bataillé M, Avice J, Masclaux-Daubresse C.** 2012. Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in Arabidopsis. *New Phytologist* **194**, 732–740.
- Havé M, Marmagne A, Chardon F, Masclaux-Daubresse C.** 2017. Nitrogen remobilization during leaf senescence: Lessons from Arabidopsis to crops. *Journal of Experimental Botany* **68**, 2513–2529.
- Hellmann H, Funck D, Rentsch D, Frommer WB.** 2000. Hypersensitivity of an Arabidopsis Sugar Signaling Mutant toward Exogenous Proline Application 1. *Plant Physiology* **123**, 779–790
- Launay A, Cabassa-Hourton C, Eubel H, et al.** 2019. Proline oxidation fuels mitochondrial respiration during dark-induced leaf senescence in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany* **70**, 6203–6214.
- 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 and Cell Physiology* **49**, 1056–1065.
- Marmagne A, Jasinski S, Fagard M, Bill L, Guerche P, Masclaux-Daubresse C, Chardon F.** 2020. Post-flowering biotic and abiotic stresses impact nitrogen use efficiency and seed filling in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany* **71**, 4578–4590.

- Masclaux-Daubresse C, Chardon F.** 2011. Exploring nitrogen remobilization for seed filling using natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2131–2142.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A.** 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* **105**, 1141–1157.
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Orsel M.** 2008. Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology* **10**, 23–36.
- Mattioli R, Biancucci M, Lonoce C, Costantino P, Trovato M.** 2012. Proline is required for male gametophyte development in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* **12**:236
- Mattioli R, Costantino P, Trovato M.** 2009. Proline Accumulates, Under Non-Stressed Conditions, in Reproductive Organs and Tissues. *Plant Signaling & Behavior* **4:11**, 1016-1018
- Mattioli R, Palombi N, Funck D, Trovato M.** 2020. Proline Accumulation in Pollen Grains as Potential Target for Improved Yield Stability Under Salt Stress. *Frontiers in Plant Science* **11**.
- Morand P, Briand X.** 1996. Excessive Growth of Macroalgae: A Symptom of Environmental Disturbance. *Botanica Marina* **39**.
- Mrówczyńska-Kamińska A, Bajan B, Pawłowski KP, Genstwa N, Zmysłona J.** 2021. Greenhouse gas emissions intensity of food production systems and its determinants. *PLOS ONE* **16**, e0250995.
- Rossato L, Lainé P, Ourry A.** 2001. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1655–1663.
- Scheible WR, Morcuende R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N, Schindelasch D, Thimm O, Udvardi MK, Stitt M.** 2004. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiology* **136**, 2483–2499.
- Sew YS, Ströher E, Fenske R, Millar AH.** 2016. Loss of mitochondrial malate dehydrogenase activity alters seed metabolism impairing seed maturation and post-germination growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **171**, 849–863.
- Shao Q, Liu X, Su T, Ma C, Wang P.** 2019. New Insights Into the Role of Seed Oil Body Proteins in Metabolism and Plant Development. *Frontiers in Plant Science* **10**.

Shinde S, Villamor JG, Lin W, Sharma S, Verslues PE. 2016. Proline coordination with fatty acid synthesis and redox metabolism of chloroplast and mitochondria. *Plant Physiology* **172**, 1074–1088.

Szabados L, Saviouré A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* **15**, 89–97.

Zheng Z-L. 2009. Carbon and nitrogen nutrient balance signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 584–591.

Zheng Y, Cabassa-Hourton C, Planchais S, Lebreton S, Saviouré A. 2021. The proline cycle as an eukaryotic redox valve. *Journal of Experimental Botany* **72**, 6856–6866.

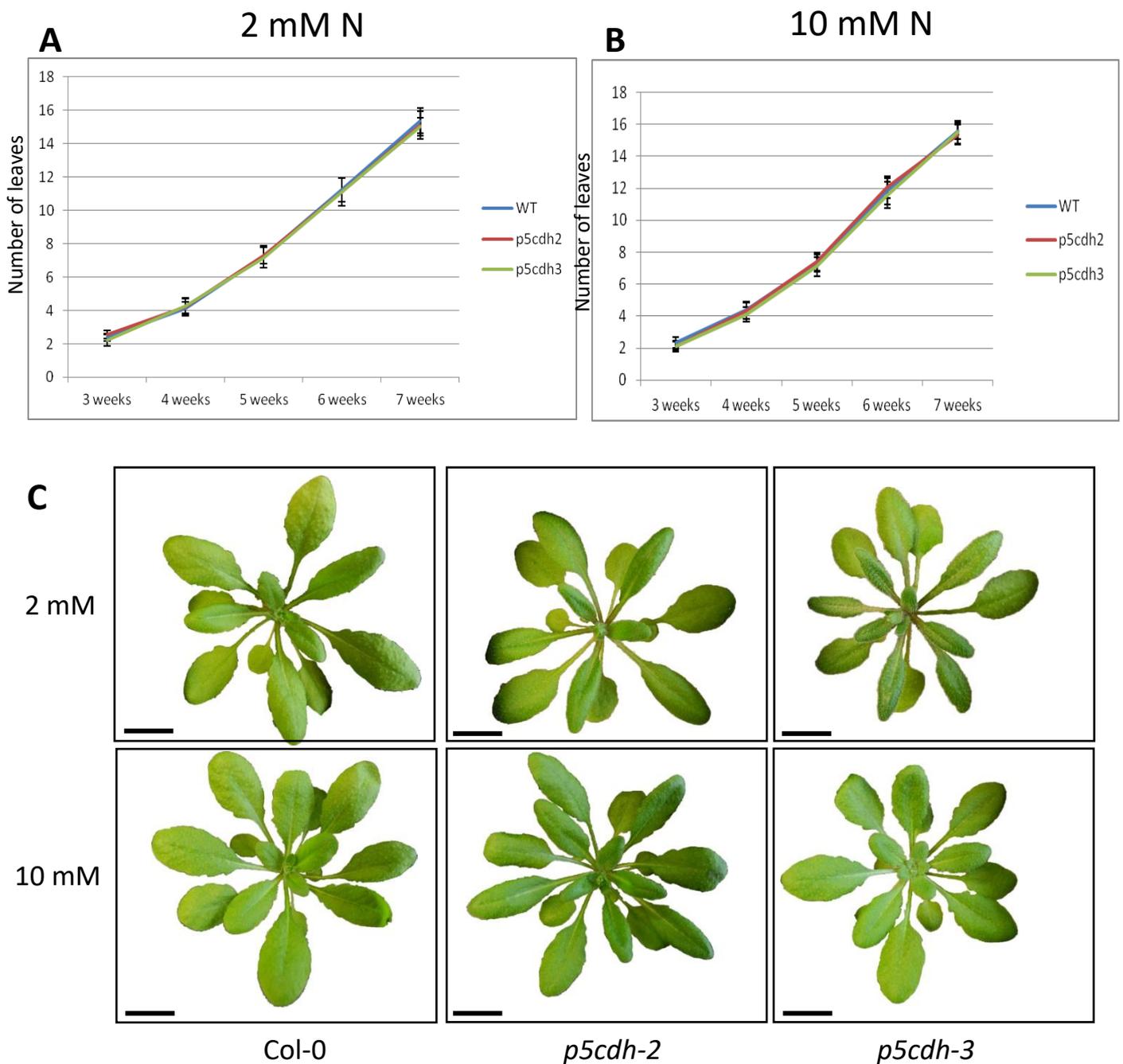


Figure S1: Vegetative phenotype of Col-0, *p5cdh-2*, *p5cdh-3* grown under 2 mM and 10 mM of nitrates. (A): kinetics of leaf appearance under 2 mM of nitrates. Error bar: SD (B): kinetics of leaf appearance under 10 mM of nitrates. Error bar: SD (C): Phenotypes of Col-0, *p5cdh-2*, *p5cdh-3* genotypes at the transition between vegetative and reproductive state at 10 mM nitrates. Scale bar = 1 cm.

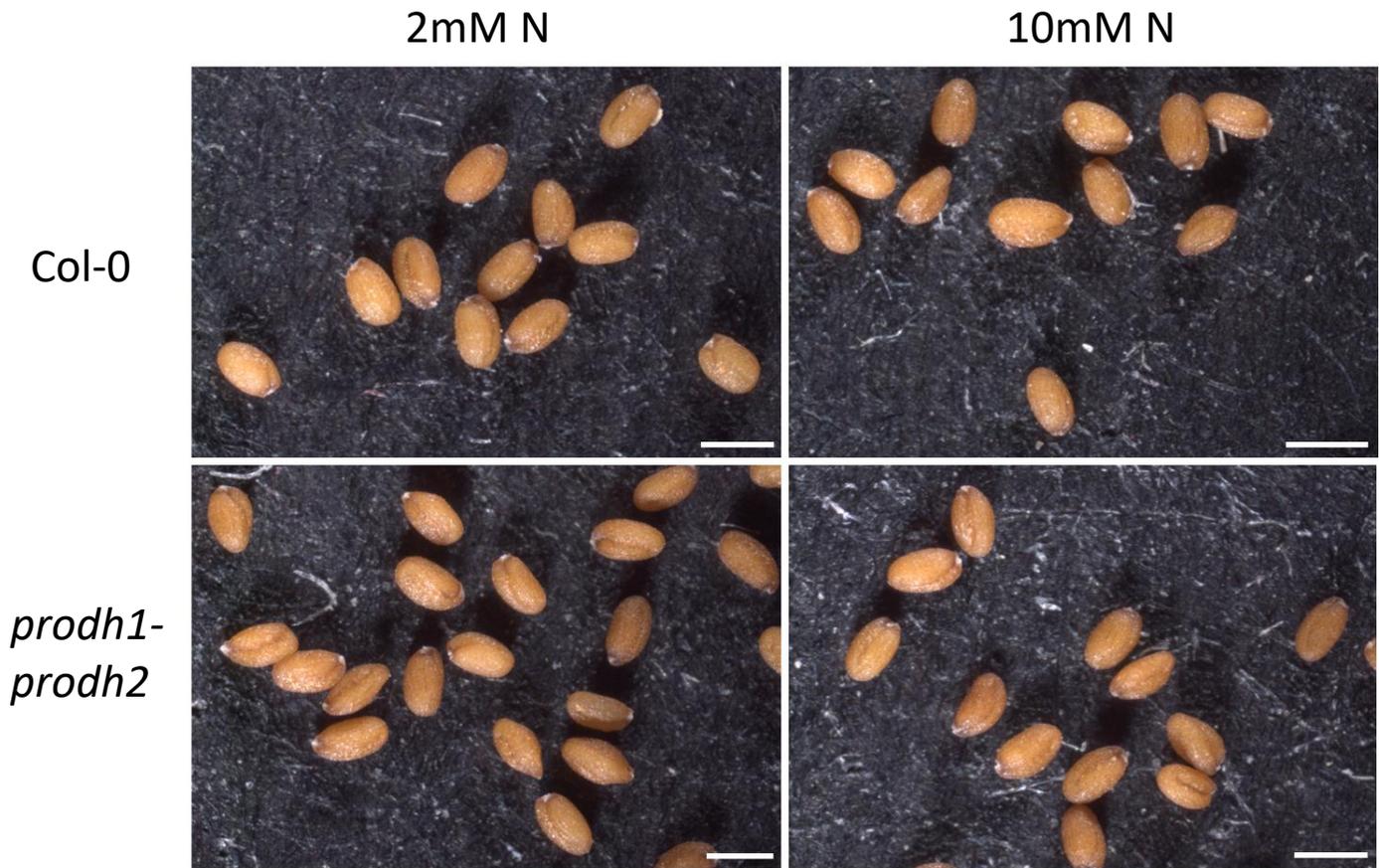


Figure S2: Morphology of dry seeds of Col-0 and *prodh1prodh2* double mutants. Scale bar= 500 μ m.

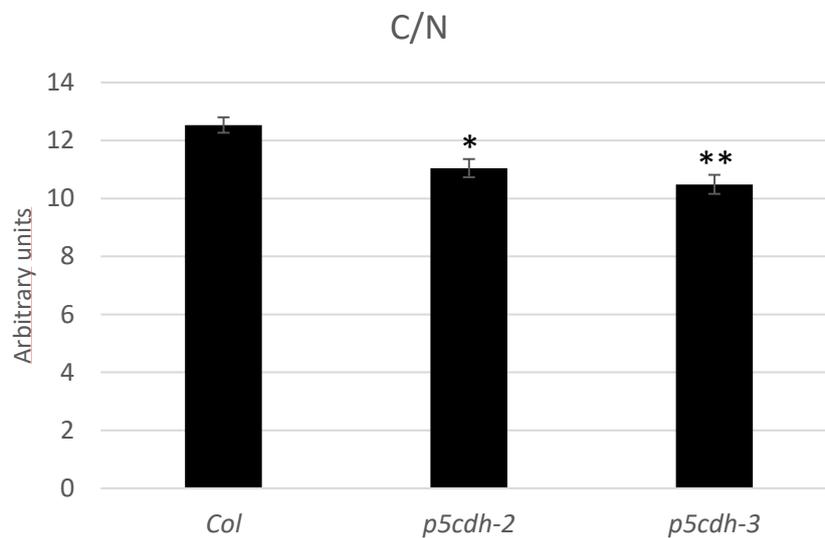


Figure S3: Carbon/Nitrogen ratio in dry seeds

C/N were calculated from proportion in C and N (in %) measured by elementary analyzer in dry seeds produced by Col-0, *p5cdh-2* and *p5cdh-3* grown under 10 mM of nitrates. Errors bars: standard error. Significant differences between Col-0 and mutant are indicated (T-test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p > 0.001$).

Chapitre 3 : Étude du rôle de *P5CDH* dans le développement de la graine

Article 2 : Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase is a key enzyme for
maturation phase during Arabidopsis seed development under high
nitrate supply

En préparation

Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase is a key enzyme for maturation phase during Arabidopsis seed development under high nitrate supply

Corentin Dourmap¹, Sébastien Baud³, Holger Eubel², Nils Rugen², Emilie Crilat¹, Solenne Berradocco⁴, Nathalie Marnet⁴, Séverine Planchais¹, Cécile Cabassa¹, Sandrine Lanfranchi¹, Gilles Clément³, Marianne Bordenave-Jacquemin¹, Régis Maldiney¹, Pierre Carol¹, Hans-Peter Braun², Céline Masclaux-Daubresse³, Alain Bouchereau⁴, Arnould Savoure^{1,*} and Anne Guivarch^{h1,*}

¹: Sorbonne Université, UPEC, CNRS, IRD, INRAE, Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris (iEES), Paris, France

²: Institute of Plant Genetics, Plant Proteomics Group, Leibniz University Hannover, Hannover, Germany.

³: Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR 1318, INRAE-AgroParisTech, Centre INRAE, Versailles, 78026 Versailles Cedex, France

⁴: INRA, UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes 1, Rennes, France.

* Corresponding authors

Correspondance:

arnould.savoure@sorbonne-universite.fr

anne.guivarch@sorbonne-universite.fr

Short title: P5CDH and seed development

Abstract

Free proline is an amino acid known to have numerous functions in plants especially in stress adaptations and development. Its metabolism is well known but its exact role in plant physiology remained enigmatic. Proline catabolism is ensured by the sequential action of Proline Dehydrogenase (ProDH) and Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase (P5CDH) enzymes. In this study, seed development was studied in *p5cdh* mutant under low and high nitrate supply. It revealed that embryo development was blocked at the transition between embryogenesis and maturation phase in *p5cdh* mutants. Consequently, the whole maturation phase was disturbed, beginning by an unexpected shorter photosynthetic phase followed by a lower amount of storage compounds accumulated, but a higher proline accumulation. Finally, at the end of seed development, the embryo seemed to be not prepared to tolerate dehydration and died during this last phase of its development. This phenotype was strongly marked under high nitrates. Thus, our work shows that proline catabolism is important for redox homeostasis and energy supply during the transiently photosynthetic phase of seed maturation. It highlights a novel role for proline metabolism as alternative energy supplier and reduced power furniture during maturation phase of seed development.

Key-words: proline, seed development, nitrogen, energy, *Arabidopsis thaliana*

Introduction

Seed development is a complex and fundamental process in the life cycle of Angiosperms. It begins with a double-fertilization event of female gametophyte with the two sperms cells of a pollen grain to result in a diploid embryo and a triploid endosperm, each of which follows distinct developmental patterns (reviewed in Doll and Ingram, 2022). Embryo development mainly consists in two major phases: the embryogenesis phase which starts immediately after fertilization with intense cell divisions resulting in the formation of an embryo going through several developmental stages until the heart stage that marks the end of the embryogenesis; then the maturation phase during which the embryo grows mostly by cell elongation and accumulates storage compounds (Goldberg *et al.*, 1994). Concomitant to the embryo development, endosperm development occurs through different phases: syncytial, cellularization, and differentiation followed by its dismantling and absorption by the embryo (Goldberg *et al.*, 1994; Baud *et al.*, 2008; Li & Berger, 2012). Seed development is thus a highly coordinated and a complex phenomenon that involves continuous interchanges of hormonal and metabolic signals between embryo, endosperm and maternal tissues. For example, embryogenesis is hormonally controlled by both auxins and cytokinins which control cell division and morphogenesis (Lepiniec *et al.*, 2018; Li & Berger, 2012; Veerabagu *et al.*, 2014), while maturation phase is mostly regulated by abscisic acid (ABA) that triggers major transcription factors regulating maturation phase (Baud *et al.*, 2008; Li & Berger, 2012; Lepiniec *et al.*, 2018; O'Neill *et al.*, 2019).

The first marker of the entry into maturation phase is the greening of the embryo that is supposed to bring oxygen, energy, reduced power and carbon refixation capacities through photochemical and modified biochemical phase of photosynthesis (Borisjuk & Rolletschek, 2009). Thus, embryo greening appears to be central to avoid hypoxia, energy lack and for efficient carbon fixation during maturation. The maturation phase is essentially characterized by the synthesis of storage compounds mainly composed by triacylglycerols (TAG) and proteins in *Arabidopsis*. Both of them represent 30 % of the dry weight of the seed and constitute a source of carbon, energy and nitrogen for the future seedling (Belmonte *et al.*, 2013). These storage compounds are made from remobilized sucrose and amino acids that come from vegetative parts (Baud *et al.*, 2008, Havé *et al.*, 2016).

The process of nitrogen remobilization has been reviewed in Havé *et al.* (2017). Briefly, nitrogen uptake occurs mostly under the form of nitrates which are reduced in ammonium and incorporated into carbon skeletons to form amino acids. Glutamine synthetase and glutamate

synthase are key enzymes for nitrogen assimilation (Good *et al.*, 2004). These enzymes are also involved in nitrogen remobilization from leaves to developing seeds during the reproductive phase because glutamine represents one of the major forms of transport for nitrogen during the remobilization process to feed seeds (Havé *et al.*, 2017). One must point out that the level of remobilization is improved under limiting nitrogen supply (Lemaître *et al.*, 2008). Finally, at the end of the maturation phase, seed acquires the ability to support dehydration by the accumulation of specialized proteins such as Late Embryogenesis Abundant proteins (LEA) and Heat Shock Proteins (HSP), soluble sugars such as sucrose and raffinose oligosaccharides family (RFO), and some amino acids like proline and gamma-aminobutyric acid (GABA) (Angelovici *et al.*, 2010 ; Leprince *et al.*, 2017).

Among all the amino acids accumulated during seed development, proline is one of those that is the most accumulated in *Arabidopsis* (Mattioli *et al.*, 2012). Proline is synthesized in the cytosol from glutamate by the sequential action of Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase (P5CS) and the P5C reductase (P5CR) (Szabados & Saviouré, 2010). P5CS is encoded by two genes *P5CS1* and *P5CS2*, which are stress-induced and constitutively expressed respectively (Szabados & Saviouré, 2010). Upon relief from stress, proline is degraded into mitochondria by Proline Dehydrogenase (ProDH) that produces P5C in equilibrium with Glutamate Semi-aldehyde (GSA). P5C is then converted into glutamate by the P5C dehydrogenase (P5CDH)(Szabados & Saviouré, 2010). Glutamate, a central component of the proline cycle, links proline metabolism with nitrogen metabolism since glutamate is a primary form of nitrogen assimilation(Good *et al.*, 2004; Lemaître *et al.*, 2008). Arginine catabolism also produces P5C via the Ornithine Aminotransferase (OAT) which can be further used by P5CDH (Funck *et al.*, 2008; Planchais *et al.*, 2014). The use of of alpha-ketoglutarate (α -KG) by OAT also connects proline metabolism to Krebs cycle and more widely to carbon and energy metabolism. Proline metabolism is known to be involved in various processes of adaptations to stress and development (Alvarez *et al.*, 2022). Proline is accumulated during water stress and its oxidation releases reducing power, energy, nitrogen and carbon skeletons during stress recovery (Hellmann *et al.*, 2000). The role of proline metabolism in energy and reduced power release has also been described during dark-induced senescence of leaf (Launay *et al.*, 2019). *P5CDH* has been reported to be highly expressed in developing seeds, and *p5cdh* mutant displayed weak germination capacities (Deuschle *et al.*, 2004). In this work, we investigated the role of P5CDH on seed development under high and low nitrogen nutrition at developmental and molecular levels. The use of two allelic *p5cdh* mutants revealed that seed development is impaired with an embryo blocked at the torpedo stage. This phenotype is exacerbated when

plants are grown with high nitrates supply. The transient green photosynthetic stage of the embryo is strongly reduced compared to the wild-type. Moreover, the maturation phase of *p5cdh* seeds is marked by strong metabolic disturbance as shown by multi-omics analysis. Moreover *p5cdh* embryo stays alive during the whole phase of seed maturation but dies during the dehydration phase. Our work demonstrates that P5CDH enzyme is crucial for the maintenance of photosynthetically active chloroplasts as well as energy supply during seed maturation, which reveals new roles for P5CDH during seed development.

Materials and methods

Plant materials and growth conditions

The ecotype Col-0 of *Arabidopsis thaliana* and the allelic T-DNA insertion mutants *p5cdh-2* (SALK-018453) and *p5cdh-3* (SALK-021026) as well as *oat-2* (SALK-010095) and *prodh1prodh2* were used in this study. *Prodh1prodh2* was obtained by crossing *prodh1-4* (SALK_119334) and *prodh2-2* (GABI_328G05) as described in Cabassa-Hourton *et al.* (2016). Plant growth was insured as previously described in (Masclaux-Daubresse & Chardon, 2011) with some minor differences. Plants were grown in growth chamber using middle size particle sand and watered with water only during the first two weeks of culture. Then plants were supplied with nutritive solution containing either 2 mM or 10 mM nitrates (**Table S1**). Plants were grown under short-day condition (8h light/16 h dark), $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, at 21°C/19°C day/night temperature during five weeks and then moved under long-day conditions (16 h light/8 h dark), $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ at 21°C/17°C day/night temperature.

In order to study ABA signalling in during seed development, *6xABRE:GFP* (Wu *et al.*, 2018) line was crossed with *p5cdh-2* mutant. For each cross, F1 plants were grown and seeds were produced by self-fertilization. After 3 generations, homozygous lines for both constructions were obtained.

Viability tests

Seeds were removed from green, yellow and dried siliques and were incubated in a solution of 1 % tetrazolium red during 1h30 at 28°C. Samples were then vacuum-infiltrated for 5 min and incubated again during 24h at 28°C. Embryos were then excised from the seeds in order to be observed under stereomicroscope (Zeiss SteREO Discovery).

Microscopic analysis

For optical microscopy, developing siliques were fixed with formaldehyde, ethanol, acetic acid fixative solution (2:17:1 v/v/v) during 24h, rinsed twice with 96% ethanol for one hour each and incubated during at least 2 weeks in clearing Hoyer's solution (50 g chloral hydrate, 2.5 mL glycerol, 3.2 g Arabic gum in 30 mL water). Cleared siliques were dissected and seed development was visualized using an optical microscope Apotome (Zeiss) in differential interference contrast (DIC).

For fluorescence analysis of GFP signal, developing seeds and embryos were observed in fluorescence stereomicroscopy at the microscopy facility of the Institut de Biologie Paris-Seine (France).

For lipids analysis, cleared seeds were incubated in saturated 70% ethanol Sudan black solution and then observed using optical microscope.

For starch analysis, starch was first visualized using Lugol's iodine staining reagent (1% potassium iodine-iodine solution) as described in Johansen, (1940). Dry seeds were incubated in the reagent for 5 min and observed in optical microscopy.

Starch content analysis

Starch content was measured using the Total Starch Assay kit (Megazyme) following manufacturer's instructions.

Fatty Acid Analysis

Fatty acid analysis was performed using 40 dry seeds and dissected embryo and endosperm fractions adapted from (Li *et al.*, 2006). Dry seeds were soaked in distilled water during 3 h before dissecting them in order to isolate 50 embryos and 50 endosperms/seed coats. Samples were put in glass tubes with Teflon cap containing 1.3 mL methanol:sulfuric acid:toluene mix (100:2.5:30, v/v/v) and C17:0 was then added to each tube. After centrifugation during 2 min at 850xg, tubes were placed in 94°C hot water bath during 90 minutes. Then tubes were cooled in ice and 450 µL of hexane was added. After adding 1.5 mL of NaCl 0.9% solution, tubes were shaken vigorously to extract lipids. Then, tubes were centrifugated 2 min at 850xg. Upper phase was concentrated under nitrogen gas flux and the remaining upper phase was transferred in GC vials to finish to dry under nitrogen gas flux. Fatty acids were analysed using a GC system 7890B (Agilent technologies).

Metabolite analysis

Young siliques, *i.e.* 3-5 days after fertilization, maturing siliques, *i.e.* 7-9 days after fertilization, and dry seeds were sampled, lyophilized and finely grinded. 20 mg of plant material was used to extract amino acids, sugars and organic acids as described in Renault *et al.* (2010). Amino acids were analysed by UPLC using AccQTag Ultra Derivatization Kit Protocol (Waters Corporation) and Acquity UPLC system (Waters Corporation) adapted from Renault *et al.* (2010). Organic acids and sugars were analysed by GC (Agilent Technologies) adapted from Renault *et al.*, (2010). Analyses were performed in the P2M2 facility at Institut de Génétique Environnement Protection des Plantes (Rennes, France). In addition, seeds were removed from maturing green siliques and metabolites were extracted and analysed through GC-MS as described in Launay *et al.* (2019). This last analysis was performed in the Observatoire du Végétal, Chimie-Métabolisme of the Institut Jean-Pierre Bourgin (Versailles, France).

Proline and P5C content quantification

Determination of proline free contents in rosette leaves, stems, flowers, siliques and dry seeds was carried out as described in (Bates *et al.*, 1973).

P5C content was measured using 400 μL of sulfosalicylic acid supernatant recovered during proline content analysis. 50 μL of O-aminobenzaldehyde 0.6% dissolved in 20% ethanol was added into each tube. OD at 440 nm was read after 30 min incubation at room temperature. Molar extinction coefficient of P5C at 440 nm is $2.58 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Miller *et al.*, 2009).

Nitrate, nitrite and ammonium quantification

Nitrate, nitrite and ammonium contents were measured from 30 mg maturing seeds, dehydrating seeds and dry seeds. Seeds were grinded in 120 μL 80% cold ethanol. The extract was incubated under agitation at 4°C during 1h30 and then centrifuged at $10621\times g$. Supernatant was recovered. The operation was repeated twice on the pellet with 90 μL 50% cold ethanol and 90 μL milliQ water. After each step, supernatants were pooled together.

Nitrates and nitrites were quantified as described in Miranda *et al.* (2001). For ammonium content quantification, 10 μL sample was mixed with 100 μL 0.33 M sodium phenolate, pH 13, 100 μL sodium nitroprussiate 0.01% (m/v) and 100 μL sodium hypochlorite 1.6%. Absorbance at 635 nm was measured after 40 min incubation at room temperature.

Transcript analysis

Rosette leaves, stem, flowers and young siliques were ground in liquid nitrogen. RNA were extracted from 30 mg powder as described in Ben Rejeb *et al.* (2015).

For maturing seeds, dehydrating seed and dry seeds, total RNAs were extracted using the Plant RNeasy Plant Mini kit (Qiagen). Samples were ground with a spoon tip of insoluble polyvinylpyrrolidone (PVP) and 450 μL of RLC buffer (Qiagen) until the obtaining of a homogenous liquid put in the first column. The following steps of RNA extraction were made following manufacturer's instructions.

RNA quantity and quality were controlled using a NP80 Nanophotometer® (Implen) and migration of RNA in agarose gel. Then Dnase treatment and reverse transcription were made using 200 ng of RNA in 8 μL of sterile water mixed with 2 μL of Dnase mix. After an incubation of 30 min at 37°C, 1 μL of 50 mM EDTA and 2 μL of oligo dT were added to the mixture. After an incubation of 10 min at 70°C, 4 μL of 5X RT buffer, 2 μL of dNTP and 200U of RT revert Aid (EP0441, life technologies) were added, and samples were incubated at 42°C for 1 h.

Transcript levels were quantified using QX200 ddPCR system (BioRad) following manufacturer's instructions. Results were analysed with QuantaSoft Analysis Pro software (BioRad). For each sample, normalized sample amount (NSA) was calculated as the ratio positive droplet concentration for interest gene / geometric mean of reference genes. *AT5G* and *APT1* were selected as reference genes (Launay *et al.*, 2019).

Proteomics

Total proteins of young siliques sampled 3-5 days after fertilization, dehydrating seeds removed from yellow siliques and dry seeds from plants grown with 10 mM nitrates were extracted and digested after grinding with bead grinder as described in Mikulášek *et al.* (2021). Then peptides were washed with SepPak kit (Waters Corporation) following manufacturer's instructions. Washed samples were put to dry in Speedvac overnight and peptides were quantified using the kit Pierce quantitative Colorimetric Peptide Assay (Thermo) following manufacturer's instructions. 10 μL of samples concentrated at 100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ of peptides were put into vials of LC-MS. Peptide analyses were performed using UPLC-MS/MS with TIMS-TOF (Bruker). Collected data were analysed with MaxQuant and Persues Softwares. Potential contaminants, inversed sequences, sequences only identified by sites and proteins not present in every replicate for each condition were removed from the dataset. Automatised t-test were performed to isolate statistically significant variations between Col-0 and *p5cdh*. Functional annotations were searched with Tair database. R software was used for data sorting. Analysis was made in

three biological replicates representing 24 individuals. Proteomics was performed in the Abteilung für Pflanzenproteomik of the Institut für Pflanzengenetik in Hannover (Germany).

Protein extraction, analysis and western Blots

10 mg dry seeds and 30 mg dehydrating and maturing seeds were grinded in 1.5 mL Eppendorf and 300 μ L of protein extraction buffer (50 mM Tris; 0.5 mM DTT ; 0.5 mM EDTA ; 0.5 mM $MgCl_2$; 1x protease inhibitors (Merck), 0.1mM PMSF; 1% Triton X-100 ; spoon tip of PVP30). After 10 min centrifugation at 20,000xg at 4°C, supernatant was recovered. Protein content was determined following Bradford method (Bradford, 1976).

150 μ g of protein extract was loaded and separated onto 12% SDS-PAGE. Then gel was fixed during 1h with acetic acid:ethanol:distilled water (1:4:5) and coloured with a Coomassie-colloidal coloration solution (2% ortho-phosphoric acid, 10% ammonium sulfate, 5% Serva-Blue G250, 20% ethanol). Gel was destained in water for 2 days. Western blot against ProDH1 was performed as described in Launay *et al.* (2019).

Alternatively, 30 mg of siliques were grinded with mortar in liquid nitrogen and 2 volumes of protein extraction buffer (8 M urea, 5% (w/v) SDS, 40 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1 mM EDTA, and 0.4 mg ml⁻¹ bromophenol blue, supplemented with 1x protease inhibitor cocktail (Merck)). 100 seeds were grinded in 150 μ L of protein extraction buffer with piston. Samples were vigorously agitated during 5 minutes and rested on ice during 5 minutes. The process was repeated 3 times. After centrifugation at 18000xg at 10°C, supernatant was recovered. 6 μ L of silique extract and 10 μ L of dry seed extract were loaded and separated on large 12% SDS-PAGE. Then gel was stained with Coomassie solution and observed.

MDA quantification and ROS visualization

For MDA quantification, samples were ground in liquid nitrogen. 1 mL of extraction solution (thiobarbituric acid 0.5%, trichloroacetic acid 20%) was added to 50 mg of fine powder. Then samples were incubated during 30 min at 95°C and centrifuged. MDA content was measured at 532 nm and 600 nm using a NP80 Nanophotometer® (Implen).

For H₂O₂ and O₂⁻ detection, developing siliques were immersed in DAB Buffer (10 mM MES, 0,5 mg/mL 3,3-diaminobenzidine, 0,05 % Tween 20, ; pH : 5,8) and NBT buffer (10 mM KPO₄, 10 mM NaN₃, 0,05 % Tween 20). Samples were vacuumed during 45 minutes and incubated at room temperature during 4 h before being observed in optical microscopy. These protocols for H₂O₂ and O₂⁻ detection are adapted from Daudi and O'Brien (2012) and Ramel *et al* (2009), respectively.

Floral stem isolation and culture

Secondary stem from plants grown on sand at 2 mM and 10 mM of nitrates were removed from mother plants. Siliques and open flowers already present on stems were carefully removed. Stems were then put in 50 mL nutritive solution containing either 2 mM or 10 mM nitrates. Nutritive solution was renewed twice a week until formation and complete dehydration of new siliques.

The same process has been followed to submit floral stems to a concentration range of nitrates from 0 to 2 mM. For this last experiment, floral stems were sampled from plants grown on soil and watered with water. Nutritive solutions used for nitrates gradient are detailed in **Table S1**.

Functional complementation

Specific promoter specifically expressed in embryo was selected from bioinformatic computational and transcriptomics studies previously published (Becerra *et al.*, 2006; Hundertmark & Hinch, 2008; Hofmann *et al.*, 2019). For each of the 118 identified genes, an extensive search for their function, spatial and temporal expression patterns (eFP browser ; bar.utoronto.ca ; Winter *et al.*, 2007) and images from GUS or GFP lines were made to select only those whose expression was spatially restricted to the embryo and temporally restricted between globular stage and end of the embryo development. 1500 bp promoter sequences of *P5CDH* and *AT5G16460*, which encodes an adipose regulatory protein (Jeong *et al.*, 2014), were selected using sequence viewer tool in Tair (Arabidopsis.org). Promoter free of BsaI restriction sites were amplified with Pfu from leaf DNA isolated from Col-0 plant. PCR products were purified using GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro kit (Thermo). Then 200 ng of PCR product and 400 ng of pICH41295 plasmid were digested with BsaI and were cloned in pICH41295 using Anza T4 Ligase master mix (Invitrogen) with a ratio vector:insert of 1:3 and 75ng of vector in 20µL of reaction volume. Cloning product were multiplied in *E. coli* DH5α after transformation by heat shock. Transformed bacteria were selected on LB media added with spectinomycin and PCR. Sequence integrity was checked by sequencing after plasmid extraction using GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher). Promoters were cloned in pICH41295, *P5CDH* CDS was cloned in pAGM1287, pICSL50016 was used as *tGFP* sequence conveyor and pICH44300 was used as 3'UTR conveyor. Final construct was built using Golden Gate to insert the four sequences of interest from entry plasmids into pICH86966 (Engler *et al.*, 2009). Golden Gate products were inserted in bacteria *E. coli* XL1 Blue by heat shock. White transformed bacteria were selected on LB media added with kanamycin, 80 mg/mL X-Gal and 100 µM IPTG and by PCR. Sequence integrity was

checked by sequencing after plasmid extraction using GeneJET Plasmid miniprep Kit (ThermoFisher). Final plasmid was inserted into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 by electroporation. Transformed bacteria were selected on LB with gentamycin and kanamycin for selection during 72 h at 28°C. *Arabidopsis p5cdh-2* lines were transformed by floral dip transformation during 10 s in bacterial solution, 5% sucrose and 0.05% Silwet (De Sangosse). Transformed seeds were selected on MS/2 media with kanamycin during 2 generations. Homozygous plants for each construct were selected by genotyping.

Statistics

All statistical analyses were performed using R software. Ade4 package were used to perform PCA analysis. One-way anova and TukeyHSD test were used to analyse Proline, MDA, P5C, metabolites and fatty acids data. Student t-test were used to analyse morphological data.

Results

p5cdh mutant presents abnormal shrivelled seeds

Whatever the treatment, Col-0 plants produced only 3% of morphologically abnormal seeds (**Fig S1**). However, under 2 mM nitrates, 22% and 27% of seeds from *p5cdh-2* and *p5cdh-3* mutants respectively were abnormal. And under 10 mM of nitrates, 76% and 88% of seeds from *p5cdh-2* and *p5cdh-3* mutants respectively were abnormal. For other mutant of proline metabolism such as *prodh1prodh2* and *oat-2* mutants, only 3% of abnormal seeds could be observed whatever the treatment. These results were consistent to previous work of *Dourmap et al.* (in prep) which showed that *p5cdh* plants produced morphologically abnormal seeds with very low germination rates, and that this phenotype was more pronounced with higher nitrate supply. Then, in order to determine the origin of the low germination capacity and the misshape morphology observed in *p5cdh* mutant seeds, kinetic of seed development was followed using microscopy.

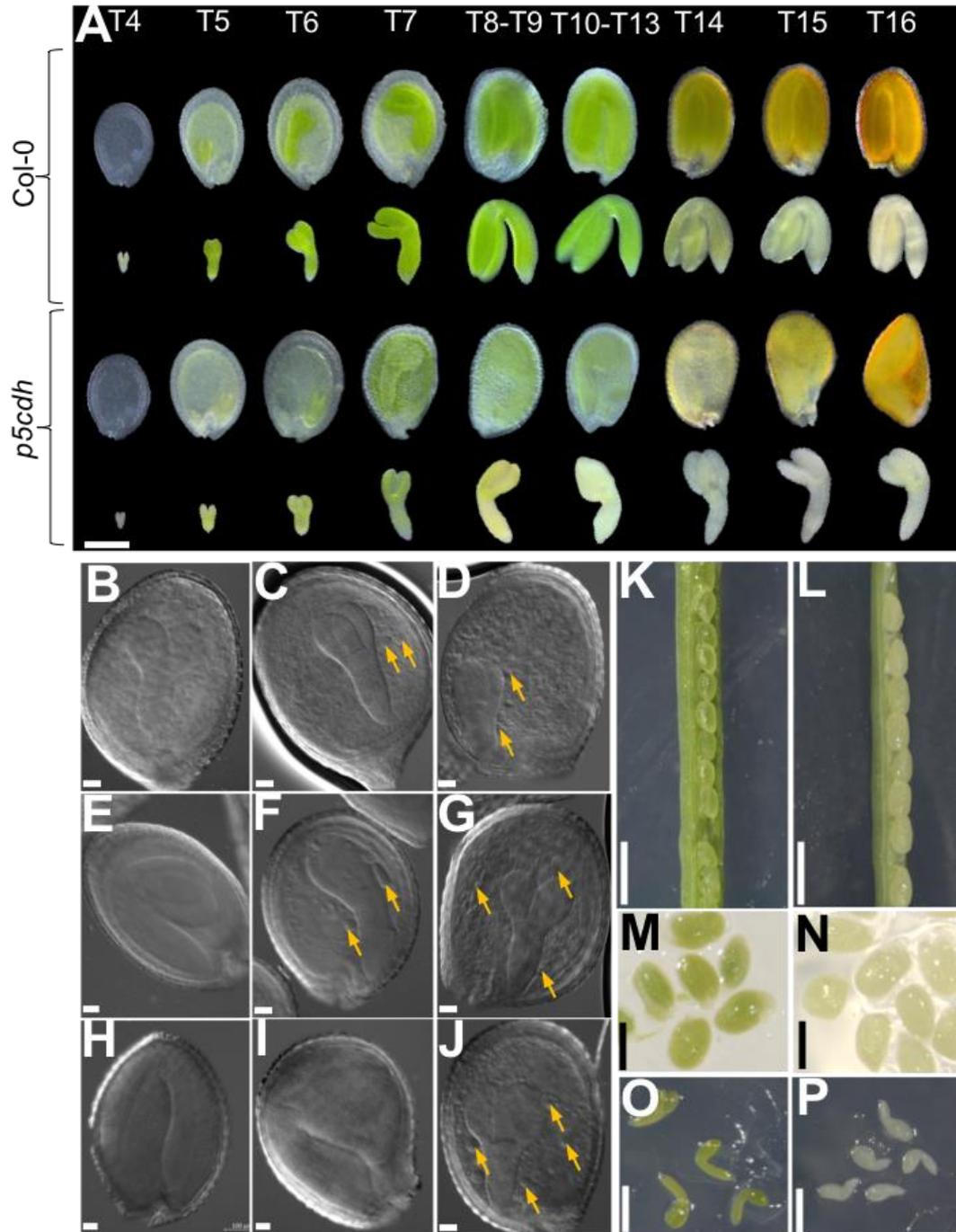


Figure 1 : Seed development in Col-0 and *p5cdh* mutants.

(A) kinetics of seed development of Col-0 and *p5cdh* mutant grown under 10mM of nitrates. T refers to the time in day after fertilization. Scale bar : 200 μ m

(B)-(J) Last phases of embryo development visualized in DIC microscopy after clearing samples with chloral hydrate. (B-D): Torpedo stage from Col-0 and *p5cdh* plants grown under 10 mM nitrates. (C) Torpedo embryo was also visualized from *p5cdh* plants grown with 2 mM nitrates, (E-G): Cotyledons bending from embryos isolated from Col-0 and *p5cdh* plants grown under 10 mM nitrates. (F) Cotyledons bending was also visualized from *p5cdh* plants grown with 2 mM nitrates. (H-J): Last stage of seed development from Col-0 and *p5cdh* plants grown under 10 mM nitrates. (I) Last stage of seed development was also visualized from *p5cdh* plants grown with 2 mM nitrates. Scale bar: 50 μ m. Yellow arrows indicate lipidic vesicles.

(K)-(Q) Greening of embryos at the beginning of maturation phase. Silique (K), seed (M), embryo (O) from Col-0 grown plants under 10 mM nitrates. Silique (L), seed (N), embryo (P) from *p5cdh-2* grown under 10 mM nitrates. Scale bar: 1mm

Under high nitrates, p5cdh embryo development is blocked in torpedo stage.

When either Col-0 or *p5cdh* plants were grown on 2 mM or 10 mM nitrates, kinetics of seed development and embryo morphology were identical until the embryo heart stage (**Fig1A**). Then in contrast to Col-0 seeds, *p5cdh* seeds from plants grown with 10 mM nitrates presented embryo blocked at the torpedo stage (**Fig 1 D, G, J**). Accumulation of large lipidic vesicles were also observed in endosperm of *p5cdh* mutants but not in Col-0 (**Fig 1B, E, H**). The lipidic nature of these vesicles observed in *p5cdh* mutant was confirmed by Sudan Black staining (**FigS2**). Under 2 mM nitrates, the *p5cdh* embryo continued its development beyond the torpedo stage but it appeared misshaped at the end of seed development (**Fig 1 C, F, I**). Thus, under 10 mM nitrates, seeds of *p5cdh* mutant were filled with very small embryos which represented only 50% of the volume of the seeds and were surrounded by a large endosperm, while in Col-0 seeds, embryos filled 93 % of seed volume surrounded only with one cell layer of endosperm. This phenotype explained the misshape of the dry seeds which is mainly determined by the volume of the embryo. However, from a morphological point of view, *p5cdh* embryos look absolutely normal with radicle, cotyledons, shoot and root meristem as shown by optical microscopy (**Fig 1J**).

p5cdh embryos died during the dehydration phase

Because *p5cdh* embryo is severely impaired in its development, embryo viability was determined. Viability tests on embryos revealed that *p5cdh* embryos remained alive after the blockage at the torpedo stage until part of the maturation phase, *i.e* 14 days after fertilization (**Fig 2A**). But, in contrast to Col-0 embryos which stayed alive during the whole maturation and dehydration process, *p5cdh* mutant embryos died during the dehydration phase. This phenotype is exacerbated under 10 mM nitrates (**Fig 2B, C**). Thus, these results explained the weak germination capacities of *p5cdh* mutants which was previously described (Deuschle *et al.*, 2004; Dourmap *et al.*, *in prep*).

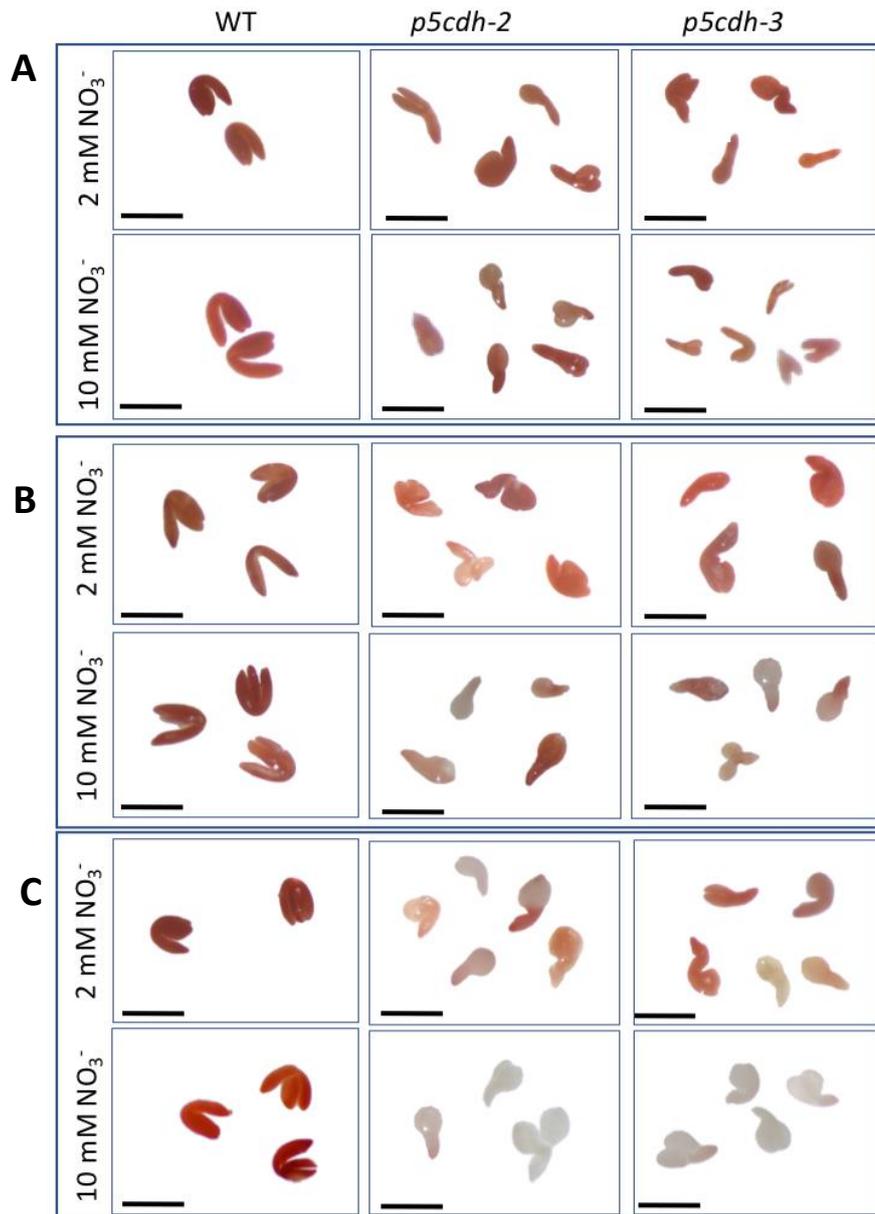


Figure 2: Viability tests performed with tetrazolium red on embryos removed from seeds from Col-0 *p5cdh-2* and *p5cdh-3* plants grown under 2 or 10 mM nitrates. A: Green maturing silique; B: Yellow dehydrating silique; C: Dried silique. Scale bar: 500 μ m

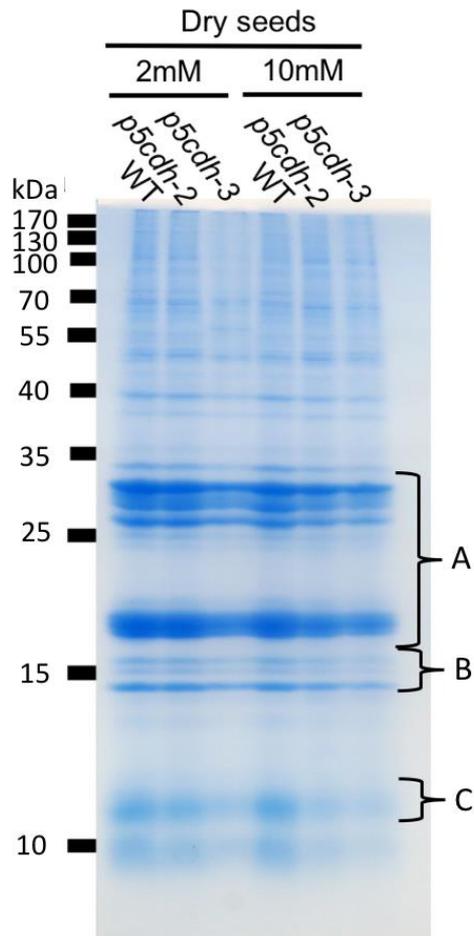


Figure 3: Protein patterns in dry seeds from Col-0, *p5cdh-2* and *p5cdh-3* mutants grown under either 2 or 10 mM nitrates. Gel was stained with Coomassie Blue G250. Each lane contains 100 seed protein extracts. A: Albumin 12S/Cruciferins ; B: Oleosins ; C: Albumin 2S/Napins.

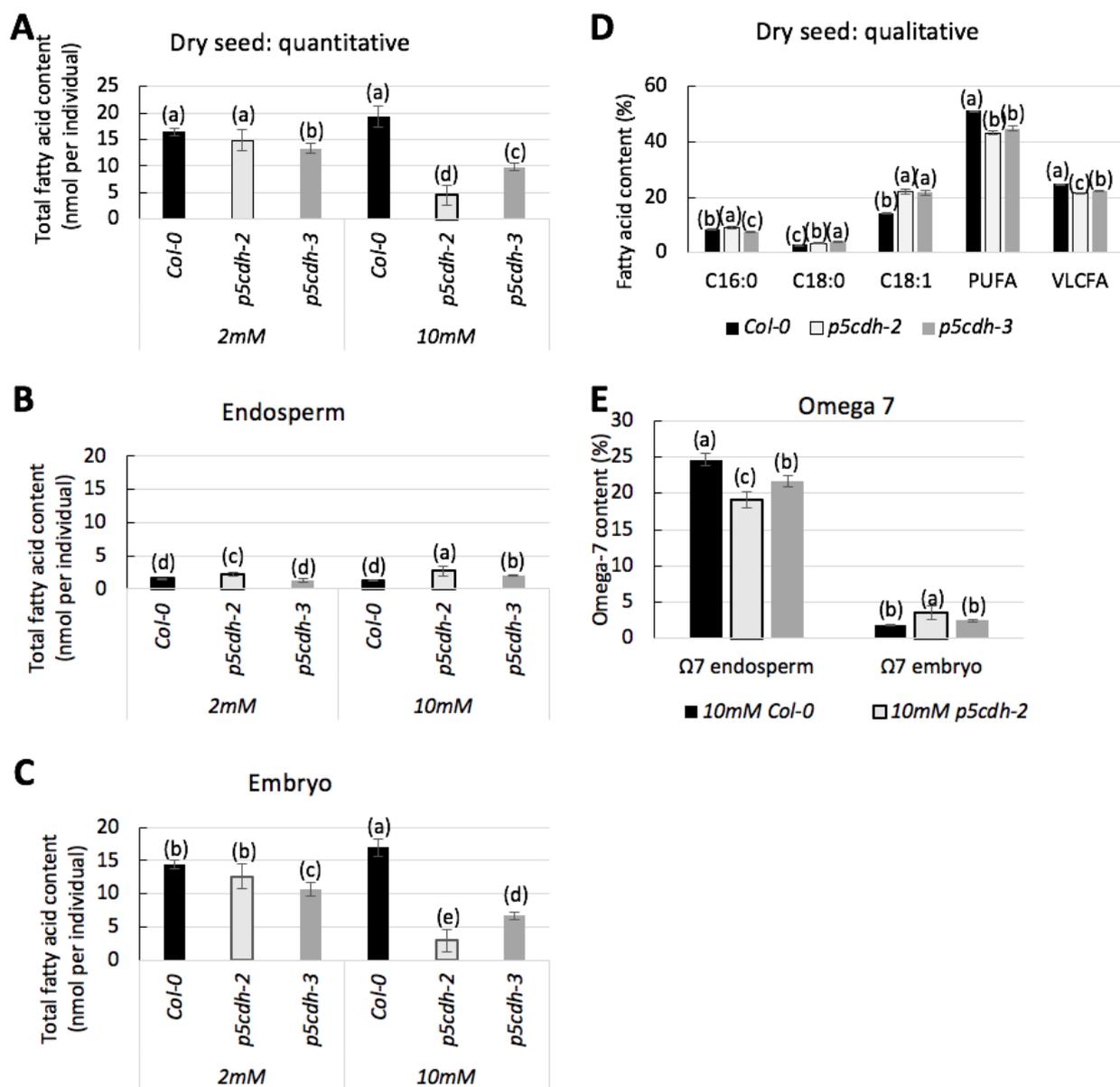


Figure 4: Fatty acid contents in dry seeds of Col-0 and *p5cdh* mutants grown under either 2 or 10 mM nitrates. (A): Total fatty acids content in the seed. (B): Total fatty acids content in the endosperm and seed coat fraction. (C): Total fatty acids content in the embryo fraction. (D): Qualitative representation of fatty acids in dry seeds. (E): Comparison of omega-7 fatty acids in endosperm and embryo. Errors bars: standard errors. Statistics: TukeyHSD, threshold p-value: 0.05.

Embryo disturbances start at the beginning of maturation phase.

Decoupling between developmental arrest and death of the embryo suggests a very strong disturbance of the maturation phase in *p5cdh* seeds. After the torpedo stage, embryo enters into the maturation phase in order to store reserve compounds made with remobilized nutrients that come from the mother plant. Maturation phase was then investigated into more details in *p5cdh* embryos.

The striking disruption in the maturation phase was a very short and weak transitory greening of *p5cdh* embryo grown under 10 mM of nitrates compared to Col-0 (**Fig 1A, K-P**). This observation suggests a weak photosynthesis activity which may lower available oxygen for the seed. The supposed lower oxygen content in *p5cdh* seeds could lead to a lack of final acceptor of electrons in the mETC. Thus, the hypothesis of an oxidative stress caused by the damage of free electron on molecules was raised. However, MDA measurements (**Fig S3**) and ROS detection with DAB and NBT did not reveal any oxidative stress in seeds of either *p5cdh* mutant or Col-0.

ABA signaling during seed maturation was also studied through *6xABRE:GFP* and *6xABRE:GFP/p5cdh-2* lines. Heterogeneity of GFP signals were observed between *p5cdh-2* and Col-0 during the maturation phase (**Fig S4**), suggesting that some cells of the embryo could be affected in ABA signaling.

Storage compound accumulation is impaired in p5cdh mutant seeds

To characterize the impact of *p5cdh* mutant on storage proteins during the maturation phase, total protein was extracted from green maturing siliques and dry seeds. No differences in protein patterns between genotypes and treatments could be detected in 7-9 days maturing siliques corresponding to cotyledons bending stage (**Fig S5**). However in dry seeds, the accumulation of some storage proteins was impaired in *p5cdh* mutant. Protein patterns corresponding to cruciferins, oleosins and napins appeared weaker in *p5cdh* mutants compared to Col-0 (**Fig 3, S6**). It was even more pronounced under 10 mM of nitrates.

As previously shown with Sudan black staining, in dry seeds lipid storage compounds appeared to be mostly localized in the embryo in very small vesicles in Col-0, whereas they were much larger and abundant in *p5cdh* embryo and endosperm (**Fig S2**). A fatty acid analysis on dry seeds revealed significantly lower amounts in fatty acid contents in *p5cdh* dry seeds in

comparison to Col-0 by 2-fold and 4-fold for *p5cdh-3* and *p5cdh-2* upon 10 mM of nitrates respectively (**Fig 4A**). Embryo and endosperm/seed coat were also analyzed separately. Significant variations between genotypes occurred for fatty acid profiles in endosperm/seed coat fraction. Endosperm of *p5cdh* seeds appeared to have higher amounts of fatty acids compared to Col-0 ones under 10 mM nitrates (**Fig 4B**). In the embryo fraction, these differences were inversed and exacerbated between Col-0 and *p5cdh* mutants since *p5cdh-3* and *p5cdh-2* embryos contained 2.5-fold and 5.6-fold lower fatty acid contents compared to Col-0, respectively. The latter had a total fatty acid content of 16.9 nmol per individual (**Fig 4C**). Difference was also qualitative because *p5cdh* mutant dry seeds had significantly enriched fractions in C18:1 and depletions in polyunsaturated (PUFA) and very long chain fatty-acids (VLCFA) under 10 mM of nitrates (**Fig 4D**). Most of the omega-7 fatty acids normally found in the endosperm in Col-0 are also present in *p5cdh* mutant endosperm but in lower proportion (**Fig 4E**). For minor carbon storage compounds such as starch, no difference in accumulation and localization of starch between seeds of Col-0 and *p5cdh* mutants could be detected (**Fig S7**).

p5cdh mutants displayed increasing metabolic disturbances

In order to go deeper in metabolic disruptions of *p5cdh* seeds, a metabolomic analysis of amino acids, sugars and organic acids was performed in 3-5 days siliques (young siliques, heart-torpedo stages) and 7-9 days maturing siliques, as well as in maturing and dried seeds. Amino acids and organic acids were associated to maturation phase whereas sugars like galactinol, raffinose, saccharose and cellobiose were linked to dry seeds (**Fig 5A, B**). The different developmental stages were also clearly separated along the first axis of PCA (**Fig 5B ; Table S2**). In young siliques, only few differences were noticed between genotypes but *p5cdh* mutants displayed higher amounts of glycine, proline, hydroxyproline and beta-alanine than Col-0 under 10 mM nitrate supply. In green maturing seeds, significant increase of hydroxyproline, arginine, glycine, lysine, proline, P5C, fumarate, pipercolate, trehalose-6-phosphate, kestose and sucrose were observed in *p5cdh* mutants under 10 mM of nitrates in comparison to Col-0. In contrast α -KG level was also lower by 20% to 40% in *p5cdh-2* and *p5cdh-3* maturing seeds respectively compared to Col-0. Surprisingly, no variation was detected for other TCA cycle metabolites. Finally, *p5cdh* dry seeds metabolic profile was strongly different from Col-0 dry seeds. Indeed,

in dry seeds, lower raffinose and sucrose levels were found in *p5cdh* mutants compared to the Col-0 whereas there was more significantly

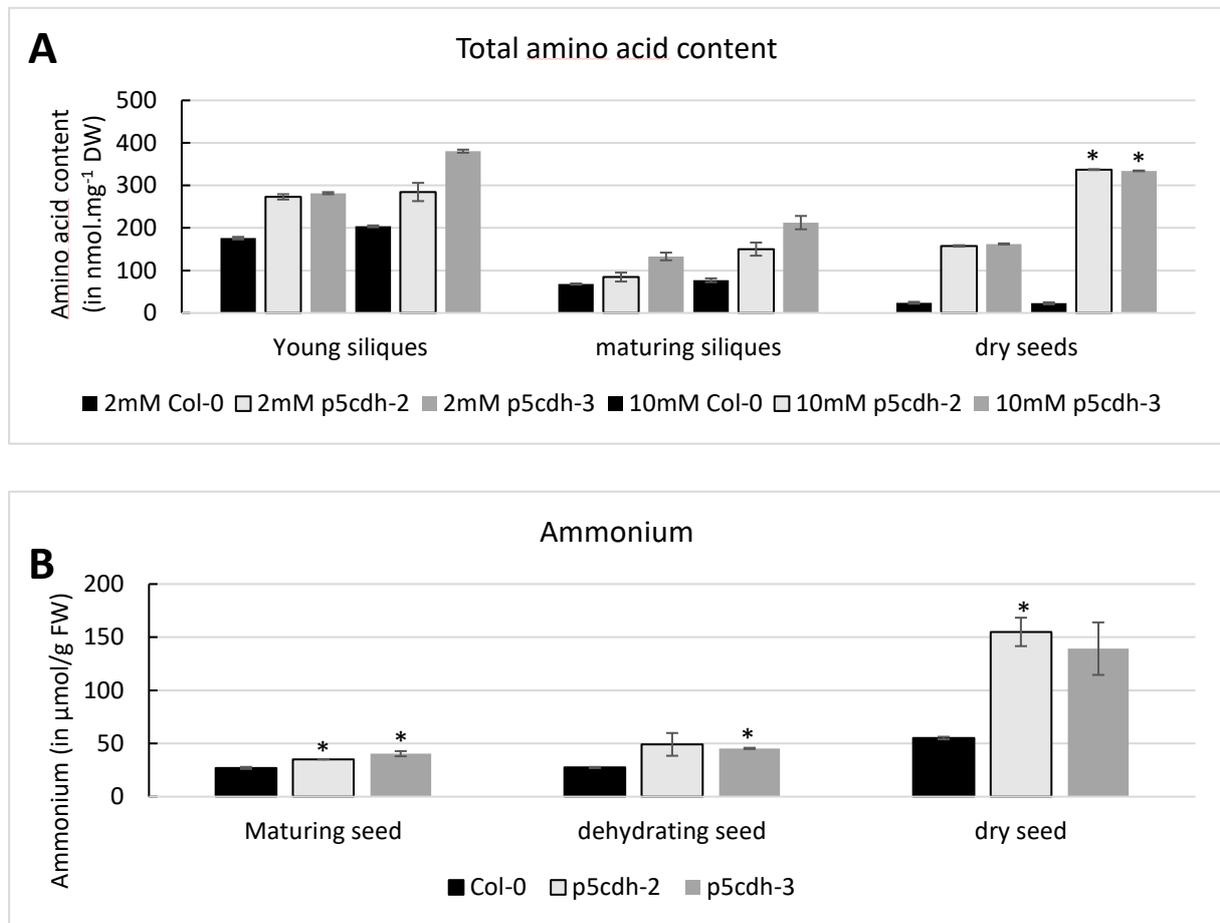


Figure 6: Amino acid and ammonium content of Col-0, *p5cdh-2* and *p5cdh-3* mutants at different developmental stages.

A: Total free amino acid content in siliques or seeds at different stages of seed maturation. Plants were grown under 2mM and 10mM of nitrates. Errors bars: standard error. Statistics: TukeyHSD, threshold p-value: 0.05.

B: Free ammonium content in maturing seed, dehydrating seeds and dry seeds removed from their siliques. Plants were grown under 10mM of nitrates. Errors bars: standard error. Statistics: t.test, threshold p-value: 0.05

higher levels of lysine, valine, proline, beta-alanine and histidine in *p5cdh* mutants (**Fig 5C**). Metabolic profiles of *p5cdh* dry seeds were finally similar to metabolic profile of maturing seed in Col-0, thus highlighting the developmental arrest of the maturation process in *p5cdh* mutant seeds. In addition, free amino acid amounts were systematically higher in *p5cdh* mutants compared to Col-0 (**Fig 6A**). It was particularly highlighted in dry seeds under 10 mM of nitrates where the amount of free amino acids was 14 -fold higher in *p5cdh* compared to Col-0. In addition, in *p5cdh* mutant, proline represented the main free amino acid representing 65%, 50% and 77% of total amino acid contents in 3-5 days siliques, 7-9 days siliques, and dry seeds respectively. However, the very high amount of proline was not sufficient to explain the higher amount of free amino acids in *p5cdh* mutants since free amino acids content remained higher in *p5cdh* seeds even if proline was excluded from the analysis.

In addition, nitrate, nitrite and ammonium contents were measured in green maturing, dehydrating and dry seeds. No differences of nitrate and nitrite contents were detected between Col-0 and *p5cdh* mutants grown under 10 mM of nitrates whatever the developmental stage (**Fig S8**). In the contrary, differences were measured between Col-0 and *p5cdh* mutants for free ammonium content (**Fig 6B**). Higher content ammonium ranging from 1.25-fold in *p5cdh-2* to 1.33-fold in *p5cdh-3* maturing seeds was observed compared to Col-0 under 10 mM N. Ammonium levels increased in *p5cdh* dehydrating seeds whereas it remains stable in Col-0 at 27 $\mu\text{mol/g}$ FW. Ammonium content was 1.89-fold higher in *p5cdh-2* and 1.64-fold higher in *p5cdh-3* compared to Col-0 under 10mM N. Finally in the dry seeds, ammonium content reached 139 to 154 $\mu\text{mol/g}$ FW in *p5cdh-3* and *p5cdh-2* mutants respectively whereas it was only 55.1 $\mu\text{mol/g}$ FW in Col-0 under 10 mM nitrates. These results suggest an arrest in seed maturation in *p5cdh* mutant together with strong metabolic changes for carbon and nitrogen metabolism.

High levels of proline were observed in p5cdh seeds whereas proline catabolism gene expression remained unchanged

To complete amino acid metabolic analysis results and discover the origin of the very high amount of proline accumulated in developing seeds, proline has been quantified in different plant organs (**Fig 7A, S9**). Proline appeared to be systematically more accumulated in *p5cdh* mutants whatever the organ considered compared to Col-0. Indeed, compared to Col-0, the amount of proline was 4.0-fold higher and 2.4-fold higher in *p5cdh-2* and *p5cdh-3* rosette

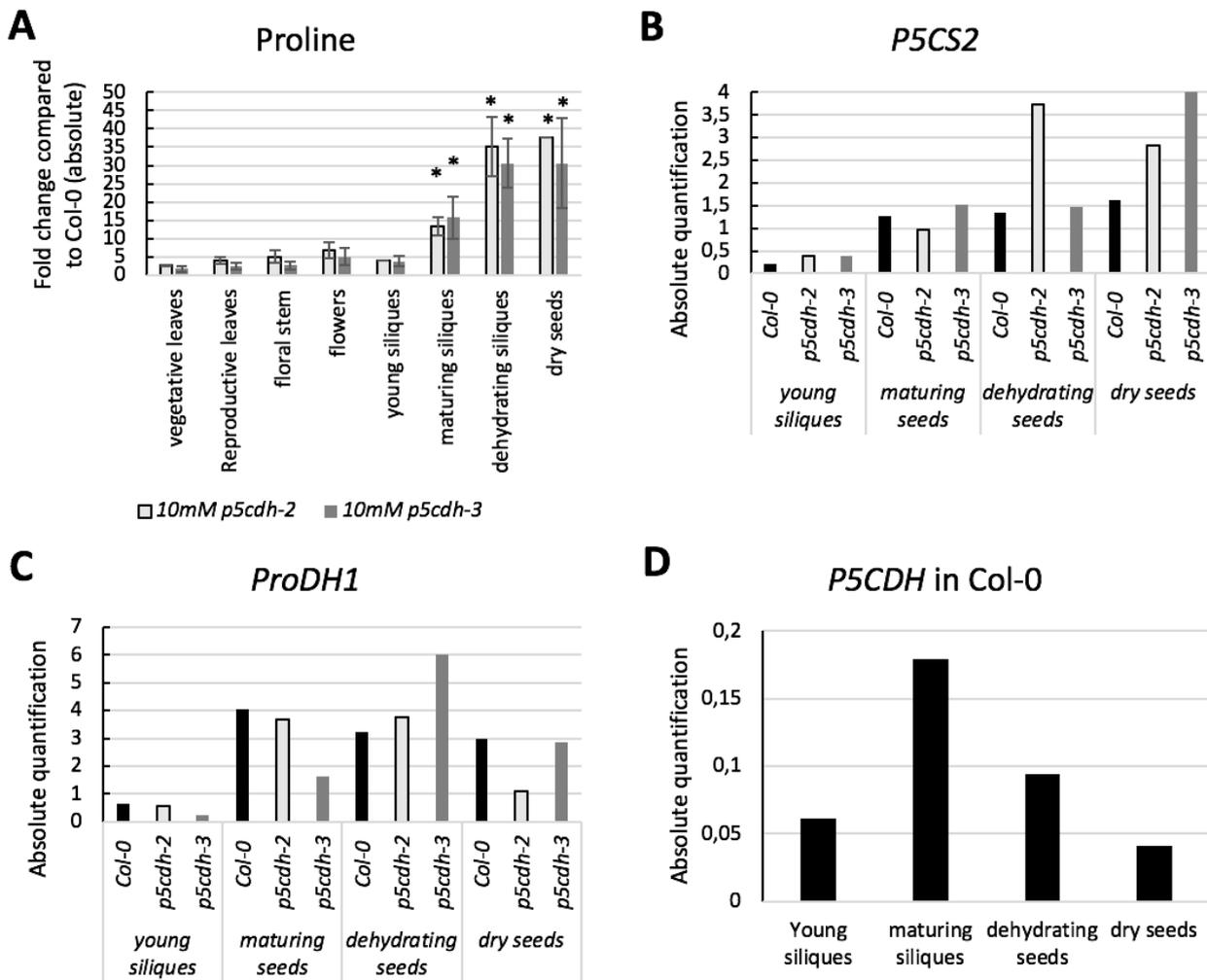


Figure 7: Proline contents and steady-state transcript levels of *P5CS2*, *ProDH1* and *P5CDH* during seed development in Col-0, *p5cdh-2* and *p5cdh-3* mutants grown under 10 mM nitrates.

A: Fold change of free proline content in *p5cdh* compared to Col-0. Proline content has been estimated with ninhydrine colorimetric measurements. Errors bars: standard error. Statistics: TukeyHSD, threshold p-value: 0.05

B-D: Transcripts analysis of proline metabolism related genes. (B) Absolute accumulation of mRNA of *P5CS2* in plants cultivated under 10mM nitrates. (C): Absolute accumulation of mRNA of *ProDH1* in plants cultivated under 10mM nitrates. (D): Absolute accumulation of mRNA of *P5CDH* in Col-0 plants cultivated under 10mM nitrates.

leaves during the reproductive life, respectively, and 5.0-fold to 2.7-fold higher in the floral stem of *p5cdh-2* and *p5cdh-3* respectively. In 7-9 days maturing siliques of *p5cdh* mutants, proline content strongly increased. Indeed, there was 2.5 $\mu\text{mol/g}$ FW proline in Col-0 maturing siliques and 13.3-fold to 15.7-fold higher proline content in *p5cdh-2* and *p5cdh-3* maturing siliques respectively compared to Col-0. In *p5cdh* mutants proline content continued to increase as maturation is proceeding: 35.1-fold higher in *p5cdh-2* and 30.6-fold higher in *p5cdh-3* dehydrating siliques respectively compared to Col-0 that stayed around 1 $\mu\text{mol/g}$ FW proline. Finally in dry seeds, proline content was 8.5 $\mu\text{mol/g}$ FW in Col-0 whereas it reached 320 $\mu\text{mol/g}$ FW and 260 $\mu\text{mol/g}$ FW for *p5cdh-2* and *p5cdh-3* respectively. To unravel the origin of these high levels of proline in the *p5cdh* mutants, transcript levels of genes involved in proline metabolism had been investigated during the whole plant development.

In Col-0, *P5CS1* transcript levels remained low in all aerial vegetative organs and very low in developing seeds (**Fig S10**). On the contrary, *P5CS2* transcripts display higher accumulation in all organs (**Fig 7B, S10**), highest *P5CS2* transcript levels being found in maturing seeds and dehydrating seeds under 10 mM nitrates. *P5CR* transcript levels remained stable in all vegetative organs but increased in maturing, dehydrating and dry seeds (**Fig S10**). In vegetative organs of *p5cdh* mutants transcripts levels of *P5CS1* were increased compared to Col-0. Indeed, compared to Col-0, *P5CS1* transcript levels were 11.8-fold higher in rosette leaves of *p5cdh-3* mutant during vegetative life; 3.75-fold and 2.26-fold higher in *p5cdh-2* and *p5cdh-3* rosette leaves in reproductive life respectively. *p5cdh* mutants displayed also higher *P5CS1* transcripts levels compared to Col-0 in stem with 2.13-fold and 4.15-fold higher transcripts levels in *p5cdh-2* and *p5cdh-3* respectively. The highest increase in *P5CS1* transcript levels were found in flowers where it reached 348-fold and 140-fold higher levels in *p5cdh-2* and *p5cdh-3* flowers respectively than in Col-0. For *P5CS2* only a slight increase in transcript levels were detected in reproductive organs of *p5cdh* mutants. Highest increase in *P5CS2* transcript levels were observed in dehydrating seeds of *p5cdh-2* and dry seeds of *p5cdh-3* (2.76-fold and 8.37-fold higher transcripts levels respectively compared to Col-0). Finally, for *P5CR*, no significant differences were detected in the level of transcripts between *p5cdh* mutant and Col-0 whatever the organ (**Fig S11**).

Concerning proline catabolism in Col-0, transcript of *ProDH1* (**Fig 7C**) were not detected in vegetative organs but their levels increased drastically in seeds upon the maturation phase while *ProDH2* transcript levels remained very low in all organs. In Col-0, *P5CDH* transcript levels were stable in all organs excepted for maturing seeds where their level increased (**Fig 7D**). No clear difference was noticed between proline catabolism transcript levels of *p5cdh* mutants and

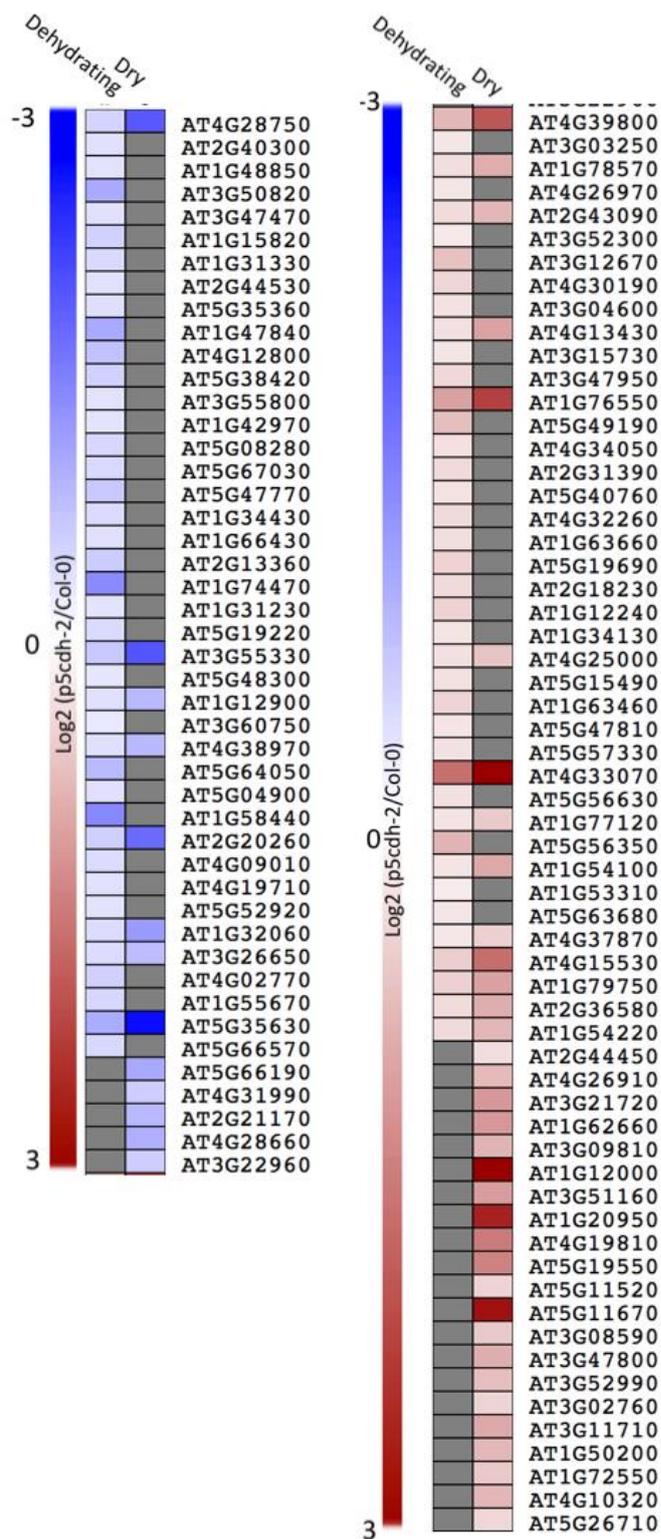


Figure 8: Heat map representing changes in proteomic analysis of dehydrating and dry seeds of *p5cdh* mutants grown under 10 mM nitrates and compared to Col-0.

Total protein were extracted digested and analyzed through UPLC-MS/MS. Significantly different protein between Col-0 and *p5cdh* were analyzed with the KEGG Biomaps tool of Virtual Plant 1.3. AGI sorted by the analysis are represented as average ratios of protein levels and are expressed as log₂ relative to WT: blue (low) to red (high) by the false color code as $-3 < 0 < 3$.

Col-0 in different organs (**Fig S11**). No significant difference was also detected in the level of transcripts of *OAT* between *p5cdh* mutant and Col-0 whatever the organ considered. Thus, high proline synthesis occurred in Col-0 reproductive organs through *P5CS2* and it was coupled with strong proline degradation. And in *p5cdh* mutants, proline synthesis was increased in vegetative organs through higher *P5CS1* expression and through a slight increase of *P5CS2* expression in developing seeds. But no change was detected for *ProDH1* transcripts levels in *p5cdh* mutants that remain high in reproductive parts. Surprisingly, although a slight increase in P5C was measured in *p5cdh* mutants maturing seeds through GC-MS analysis (**Fig S12, A**), colorimetric measurements of P5C did not reveal P5C accumulation in a similar order of magnitude to proline whatever the considered organ (**Fig S12, B**). Thus, proline catabolism seems to be entirely blocked in *p5cdh* mutant.

***p5cdh* developing seeds display a general and gradual proteomic changes**

To identify molecular actors and metabolic pathway impacted by *p5cdh* mutation, a shotgun proteomics analysis was performed on young siliques (3-5 days old after fertilization, embryos reaching heart-torpedo stages), seeds involved in dehydration process and dry seeds of Col-0 and *p5cdh-2*. Functional annotation of proteomics data revealed that categories related to chloroplast, intracellular traffic, protein degradation, protein synthesis, protein folding, and cell wall were those with the biggest difference in the number of annotations between Col-0 and *p5cdh-2*. Indeed, these categories were systematically over-represented in *p5cdh* mutant seeds. No clear difference was detected in young siliques between the two genotypes. MapMan analysis showed that very few differences could be observed at the beginning of the maturation phase in the young siliques, but more disturbances appear later and increased gradually as the dehydration process progress. KEGG analysis of significantly different proteins between Col-0 and *p5cdh* mutants in dehydrating and dry seeds revealed that a large majority of downregulated proteins were localized in plastids (92% of significantly different proteins in dehydrating seeds and 100% of significantly different proteins in dry seeds) (**Table S3**). These proteins were known to belong to restricted metabolic categories: energy metabolism, the two phases of photosynthesis especially proteins involved in photosynthetic electron transfer and carbon assimilation, and general metabolism including lipids synthesis and, nitrogen metabolism. Proteins present in significantly higher amounts in dehydrating and dry seeds of *p5cdh* mutants were mostly localized in the cytosol. They belong to carbohydrate metabolism,

especially glycolysis, sucrose degradation, fermentation, Krebs cycle (**Fig 8**). As an example, Phosphofructokinases were two to three-fold more abundant in *p5cdh* mutants than in Col-0. Surprisingly, no difference was noticed concerning enzymes involved in TCA cycle in *p5cdh* mutants except for Aconitase and Isocitrate Dehydrogenase that displayed contrasted behaviors; -31% and -34% for Aconitase in seeds upon dehydration and dry seeds respectively and +56% and +83% for Isocitrate Dehydrogenase in seeds upon dehydration and dry seeds respectively. But, highest differences between Col-0 and *p5cdh* were found for Pyruvate Decarboxylase 1 (PDC1) involved in fermentation whose level was 3.2-fold and 12.0-fold higher in dehydrating seeds and dry seeds of *p5cdh-2* compared to Col-0 respectively. Proteins involved in nitrogen remobilization, senescence, cell wall synthesis and mucilage synthesis were also highlighted as significantly upregulated proteins.

Concerning storage proteins and proteins accumulated during dehydration; oleosins, cruciferins and napins were present in lower amount in dry seeds of *p5cdh* mutants (**Fig S13**) compared to Col-0 as Vacuolar Processing Enzymes VPE β and VPE δ involved in their processing. It is also interesting to notice that the vast majority of Heat Shock Proteins (HSP) and Late Embryogenesis Abundant proteins (LEA) were down-regulated in *p5cdh* dry seeds compared to Col-0 (**Fig S13**).

The p5cdh seed phenotype is due to the reproductive part of the plant

Firstly, to confirm that the abnormal seed phenotype observed was only due to the absence of P5CDH activity, a transgenic line was constructed that expressed *P5CDH* under the control of its own promoter in a *p5cdh-2* mutant background. When grown in presence of 10 mM nitrates, this line produced 1% of morphologically abnormal seeds, thus showing a restoration of a wild-type phenotype.

Then, to exclude a responsibility of vegetative parts of the plant in the *p5cdh* phenotype, isolated floral stems were cultivated directly in nutritive solution and the proportion of morphologically abnormal seeds produced was estimated (**Fig S14**). It reveals that whatever the concentration of nitrates applied, the proportion of morphologically abnormal seeds was the same than the ones obtained when plants grew fully on sand on 10 mM. Thus, the origin of the *p5cdh* phenotype takes place in the reproductive part of the plants.

Finally, a functional complementation experiment was attempted by expressing *P5CDH* in *p5cdh-2* mutants under the control of specific embryo-promoter. In this case, the

complementation was only partial since only 42% of abnormal seeds produced when plants were grown under 10 mM of nitrates. This suggest that surrounding tissues of the embryo, *i.e.* endosperm and/or seed coat, are involved in the *p5cdh* phenotype.

Discussion

Developmental arrest and death of the embryo are two separated processes

Embryo development of *p5cdh* mutant was blocked in torpedo stage when plants were supplied with 10 mM nitrate nutritive solution. Torpedo stage corresponds to a developmental switch between the embryogenesis phase *sensu stricto*, which is characterized by cell divisions and setup of the organs, and the maturation phase during which the embryo continues its growth mainly by cell elongation and intense metabolic activity is triggered to synthesize storage compounds (Goldberg *et al.*, 1994). No morphological differences appeared between Col-0 and *p5cdh* mutant during the first phase of organogenesis suggesting that P5CDH impairment affects only the maturation phase of the seed development. Indeed, the beginning of the maturation phase is abnormal as shown by the accumulation of large lipidic vesicles in endosperm and the arrest of embryo growth. Nevertheless, viability tests have shown that *p5cdh* embryos are still alive at the torpedo stage. Indeed, they remained alive during the whole phase of maturation of the seed and died only during the final dehydration phase. This data suggests that *p5cdh* embryo are not able to support the dehydration phase. This could be partially explained by a lower accumulation of LEA and HSP proteins in dry seeds of *p5cdh* mutants compared to Col-0 (**Fig S13**). *LEA* genes have been shown to be regulated by ABA during the maturation phase (Leprince *et al.*, 2017). Yet, ABA is the major hormone regulating maturation phase (Lepiniec *et al.*, 2018), and ABA signalling is slightly modified at the beginning of the maturation phase in *p5cdh* mutant (**Fig S4**). Consequently, disturbances in ABA signaling could have affected LEA induction.

Another hypothesis to explain the death of the embryo could be the generation of an oxidative stress. But MDA measurements as well as ROS detection in seeds did not reveal any higher lipid peroxidation or ROS in *p5cdh* in comparison to Col-0. In addition, transcripts analysis of *CAT1* did not show any differences between Col-0 and *p5cdh* developing seeds at the beginning of the maturation phase. The absence of oxidative stress markers also eliminates the induction of a P5C-Proline cycle (Miller *et al.*, 2009 ; Zheng *et al.*, 2021). Indeed, the P5C-proline cycle was proposed to increase the exchanges of electrons by accelerating the production of reduced power through ProDH that could have an oxidase activity. Moreover, the oxidation of reduced

power produced by ProDH should also lead to ROS production to trigger oxidative stress. P5CDH is the second enzyme involved in proline oxidation, the absence of the enzyme should lead to an over-accumulation of P5C. However, P5C content remains at low level (2 $\mu\text{mol/g}$ FW maximum under 10 mM of nitrates). So, we postulate that P5CDH regulates ProDH1 level and when P5CDH is knockout, ProDH will be down regulated and limit the accumulation of P5C. In accordance with this hypothesis, ProDH1 was never detected in our proteomics data.

***p5cdh* embryo phenotype is dependent of the surrounding tissues**

Seed maturation is fuelled by nutrient remobilization process from vegetative organs. So, to complete the characterization of *p5cdh*, it is important to unravel the spatial origin of the phenotype. Glutamine was reported to be the preferential form of nitrogen transport during remobilization (Lemaître *et al.*, 2008). The metabolomic analysis indicates that glutamine represents a high proportion of total amino acid content. Moreover, proline content measurements in dry seeds produced by the system of isolated floral stem were also very high in *p5cdh* mutants compared to Col-0, but twice lower compared to *p5cdh* mutant that grew on sand with their vegetative parts. Thus, there might be no problem of remobilization mechanisms *stricto sensu* of nitrogen in *p5cdh*. The remobilization defect noticed in Dourmap *et al.* (*in prep*) could be due to the arrest of the embryo growth that impaired the strength of sink force. Moreover, isolated stem grown in nutritive solution established that suppressing leaves did not lead to WT phenotype restauration in *p5cdh* mutants. Thus, the origin of the *p5cdh* phenotype is restricted to reproductive parts of the plant. In the seed, since the endosperm is still present when the the embryo stops its development, we postulate that the endosperm may be at the origin of the phenotype. Embryo development was shown to be influenced by constant crossed communications between endosperm and embryo as described in Doll and Ingram (2022). Impairment of these communications could lead to a spatial disturbance of storage compounds setting. But differences in the amounts of fatty acids between *p5cdh* mutants and Col-0 measured in the endosperm are very low compared to differences of amounts of fatty acids between *p5cdh* mutants and Col-0 measured in the embryo. However, endosperm takes an important part of the total volume of the seed in *p5cdh* mutants dry seeds. Consequently, a more balanced repartition of fatty acids between endosperm and embryo might be expected in *p5cdh* mutants. Thus, since the large majority of the fatty acids are accumulating in the embryo, it might be assessed that there is no problem of spatial setting of storage compounds. Moreover,

omega-7 fatty acids are known to be specific of endosperm (Baud *et al.*, 2008) and a large majority of them are actually accumulated in the endosperm in *p5cdh* seeds. The lower proportion of omega-7 fatty acids measured in the endosperm might be due to a dilution effect, since there is more fatty acids in the endosperm even so. Therefore, in order to determine the influence of different compartments of the seed in the *p5cdh* phenotype, functional complementation was performed by expressing *P5CDH* in the embryo under the control of specific promoter of the embryo *At5G16460* in a *p5cdh* mutant background genotype (Jeong *et al.*, 2014). However, in this line, the functional complementation was partial since 42% of the seeds produced were morphologically abnormal. Consequently, it is believable that the expression of *P5CDH* in all parts of the seed is necessary to ensure the whole development of the seed. This assertion is confirmed by the Bar data (Winter *et al.*, 2007) indicating that *P5CDH* displays a low but uniform expression in seed during the different stages of development. Moreover, the transgenic *pP5CDH:P5CDH::GFP/p5cdh* line completely restored a wild-type phenotype

p5cdh embryos suffer a lack of energy

The first visible marker of the entry in the maturation phase is the greening of the embryo (Baud *et al.*, 2008). Different hypothetic roles of embryo greening were postulated such as an active photosynthesis activity to reassimilate carbon lost during oxidative decarboxylation, the production of ATP and reducing power for fatty acids synthesis, and the release of oxygen to avoid hypoxia in the embryo (Borisjuk & Rolletschek, 2009). The oxygen produced also allows to bring more energy to respiration. Indeed, the transition between embryogenesis and maturation phase is characterized by a short phase of fermentative metabolism (Fait *et al.*, 2006). The reduced greening in intensity and in time of *p5cdh* embryos could lead to hypoxia. But the non-greening of the *p5cdh* cannot explain all of the disturbances since DCMU treated siliques displayed also a non-green embryo and a disturbance of storage compound accumulation without damage to the viability of the seed and the ability of the embryo to finish its development (Allorent *et al.*, 2015). Interestingly, Launay *et al.* (2019) showed that proline catabolism is important to generate reduced power feeding energy metabolism during leaf dark-induced senescence. Transcript analysis in accordance with proline content measurements indicated that huge amounts of proline found in *p5cdh* seeds was partially due to an increased

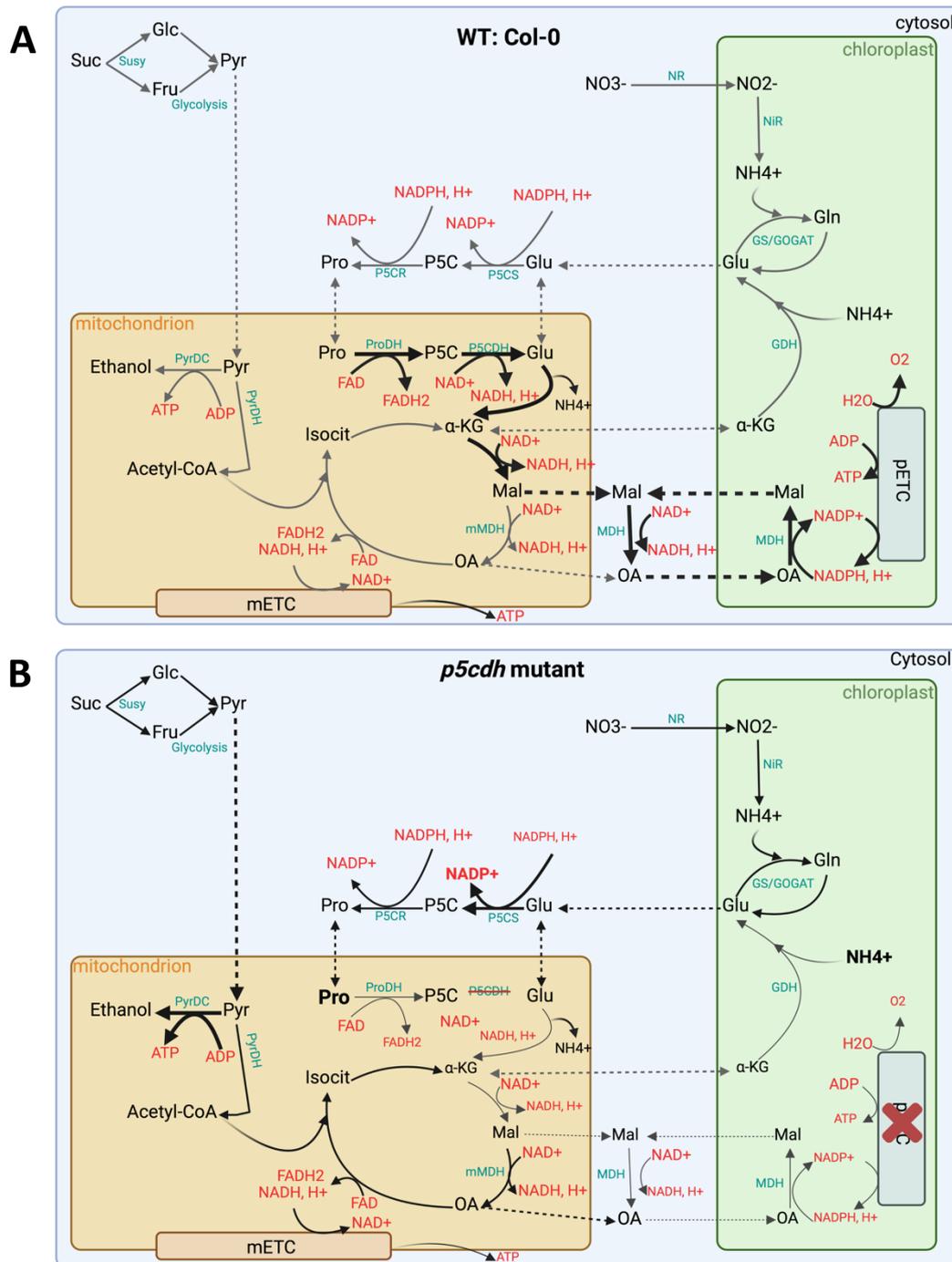


Figure 9: Proposed model for P5CDH implication in reduced power and energy production management during seed maturation. A, Wild-type seed. B, *p5cdh* mutant seed. Detailed description of this model is in the manuscript.

Abbreviations: Suc, Sucrose ; Glc, Glucose ; Fru, Fructose ; Pyr, Pyruvate ; Pro, Proline ; P5C, Pyrroline-5-carboxylate ; Glu, glutamate ; Isocit, isocitrate ; α -KG, α -ketoglutarate ; Mal, malate ; OA, Oxaloacetate, Gln, glutamine, NO₃⁻, nitrates ; NO₂⁻, nitrites ; NH₄⁺, ammonium, mETC, mitochondrial electron transfer chain ; pETC, plastidic electron transfer chain.

Enzymes: Susy, Sucrose synthase ; PyrDH, Pyruvate dehydrogenase ; PyrDC, Pyruvate decarboxylase ; P5CS, Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase ; P5CR, Pyrroline-5-carboxylate Reductase ; ProDH, Proline dehydrogenase ; P5CDH, Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, (m)MDH, (mitochondrial) Malate dehydrogenase, GDH, glutamate dehydrogenase ; GS, Glutamine synthetase ; GOGAT, Glutamate synthase, NR, nitrate reductase ; NiR, Nitrite reductase

proline synthesis in the seeds under the influence of *P5CS2* and in vegetative parts of the plant under the influence of *P5CS1*. At the same time, proline degradation seems to be completely blocked because proline content increased and P5C content remained low in *p5cdh* seeds. Consequently, in this configuration no reducing power is brought to the mETC through proline catabolism that could lead to a lack of energy. In addition, Zheng *et al.* (2021) suggested that proline cycle could serve as a shuttle for reducing power between cytosol, where proline is synthesized, and mitochondria where proline is oxidized. Thus, proline catabolism makes possible an equilibrium of reducing power between mitochondrion and cytosol in order to regulate the global oxidation status of the cell. A similar phenotype was found in *mitochondrial MALATE DEHYDROGENASE mMDH* mutants (Sew *et al.*, 2016). Consequently, when P5CDH function is impaired, the redox status of the cell could become more oxidized, the photosynthetic capacity of seed collapses which increases a lack of energy and reducing power. This issue will lead to hypoxia into the seed. In this case, energy furniture is based only on a fermentative metabolism. This assertion is supported by proteomic data which show that an enzyme involved in fermentation pathway, the Pyruvate Decarboxylase (PDC1), was strongly induced in dehydrating and dry seeds of *p5cdh* mutants. The lack of energy could be worse under 10 mM of nitrates compared to 2 mM of nitrates since carbon skeleton like α -KG are needed to assimilate nitrogen and avoid toxic accumulation of ammonia. Indeed, some enzymes of nitrogen assimilation such as NITRITE REDUCTASE (NiR), ASPARAGIN SYNTHETASE (ASN2), or GLUTAMINE SYNTHETASE1.5 (GLN1.5), are up-regulated in dehydrating seeds and dry seeds of *p5cdh* mutants. The lack of carbon skeleton is detrimental to reducing power production by TCA cycle (**Fig 9**).

Disturbances of the maturation process is a consequence of lack of energy

The lack of energy during maturation phase abruptly stops maturation process. Indeed, proteomics data shows some specific markers of a very active metabolic activity in *p5cdh* mutants during dehydration phase and dry seeds compared to Col-0. One of such markers are the higher amounts of enzymes associated to central metabolism. This data suggests that maturation process is stopped. Consequently, storage compound setting is not totally completed. Indeed, there is less lipid storage, and qualitative changes showed a decrease of polyunsaturated and very long chain fatty acids (PUFA and VLCFA) to the detriment of precursors C18:0 and C18:1. Yet, the process and unsaturation and elongation of fatty acids

occurs later to the synthesis of PUFA and VLCFA precursors during maturation (Baud *et al.*, 2002). Thus, the lack of energy compromises the fatty acid synthesis. The lower amount of fatty acids can also be explained by the high content in the non-proteinogenic amino acid β -alanine which is known to be a precursor of Coenzyme A (CoA) and Acyl Carrier Protein (ACP) (Parthasarathy *et al.*, 2019). An accumulation of this compound could indicate a lack of CoA and ACP that are crucial compounds for fatty acids synthesis. Moreover, another role of the greening of the embryo is to allow the RuBisCO to fix carbon lost under the form of CO₂ during the oxidative decarboxylation of pyruvate in acetyl-CoA (Schwender *et al.*, 2004; Goffman *et al.*, 2005; Baud *et al.*, 2008). *p5cdh* mutants remained white, we can postulate that there is no refixation of carbon that should lead to lower lipids content as observed by Allorent *et al.*, (2015). This carbon poverty in lipids was not replaced by other carbon compound since no starch has been found in *p5cdh* mutant dry seeds as well as in Col-0. Moreover, starch is not a source of C for lipids or sucrose synthesis during the maturation (Vigeolas *et al.*, 2004). Finally, since almost all significantly down-regulated proteins in *p5cdh* mutants dehydrating seeds and dry seeds were plastidic proteins, we can reasonably assess that chloroplasts are dismantled rapidly during the maturation phase in *p5cdh* to be potentially transformed in another form of plastids. Consequently, functions associated to plastids like lipid synthesis and a lot of process in amino acid metabolisms should be down-regulated, hence the lower fatty acids amount and a disturbance in amino acid metabolism.

Finally, the analysis of nitrogenous storage compounds reveals less storage proteins but more free amino acids. Consequently, it could be concluded that amino acids are present but not assimilated in storage proteins. This lower amount of storage protein can also explain the bigger oleosomes observed since the density in oleosins determine the size of the oleosomes (Siloto *et al.*, 2006; Baud *et al.*, 2008). Seeds unable to support dehydration have also massive oleosomes (Siloto *et al.*, 2006). This architecture could partially explain the inability of the *p5cdh* seed to support dehydration. But the non-integration of amino acids into proteins should also led to lower levels of Late Embryogenesis Abundant (LEA) and Heat Shock Protein (HSP) and could better explain the inability to support dehydration. Indeed, these categories of proteins accumulated in the seed during late maturation have crucial roles to protect cellular and molecular structures during the massive decrease of water content under 10% and the transition to a glassy state (Leprince *et al.*, 2017). The dehydration phase is also known to accumulate soluble sugars like raffinose and galactinol (Angelovici *et al.*, 2010; Fait *et al.*, 2011; Leprince *et al.*, 2017). Metabolic analysis showed that these metabolites were present in lower amount in dry seeds of *p5cdh* mutants under 10 mM of nitrates. This brings an additional

proof of the unprepared state of the seed to tolerate dehydration. Since proline represented the major part of the total amino acids content in the siliques and the dry seeds, it could also be explained by the osmoprotective and chaperoning roles of proline (Szabados & Savouré, 2010) that could offset the lack of LEA and HSP although proline is not reviewed as a major metabolite accumulated during dehydration.

To summarize we propose the following model to explain the *p5cdh* phenotype (**Fig 9**) : during seed maturation, proline catabolism makes able the equilibrium of reduced power between mitochondrion and cytosol ; then it influences the global oxidation status of the cell in association with the other reducing power shuttle in the cell. When P5CDH function is impaired, proline catabolism is repressed, and the cell become more oxidized and the photosynthetic capacity of the seed collapses. Consequently, it increases the lack of energy and reducing power, and provides hypoxia in the seed. This lack of energy leads to stop the maturation process and finally induces the death of the embryo during the dehydration phase. All these data show that P5CDH has now to be considered as a key molecular actor for energy and reduced power management during seed maturation.

Acknowledgments

We are grateful to the Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS) imaging core facility for help with electron microscopy. This work was supported by Sorbonne University, Leibniz University Hannover, and the PROCOPE program between Germany and France (grant number 46711VJ).

References

- Allorent, G., Osorio, S., Ly Vu, J., Falconet, D., Jouhet, J., Kuntz, M., Fernie, A.R., Lerbs-Mache, S., Macherel, D., Courtois, F., and Finazzi, G.** (2015). Adjustments of embryonic photosynthetic activity modulate seed fitness in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **205**: 707–719.
- Alvarez, M.E., Savouré, A., and Szabados, L.** (2022). Proline metabolism as regulatory hub. *Trends in Plant Science* **27**: 39–55.
- Angelovici, R., Galili, G., Fernie, A.R., and Fait, A.** (2010). Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in Plant Science* **15**: 211–218.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., and Teare, I.D.** (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* **39**: 205–207.
- Baud, S., Dubreucq, B., Miquel, M., Rochat, C., and Lepiniec, L.** (2008). Storage Reserve Accumulation in *Arabidopsis*: Metabolic and Developmental Control of Seed Filling. *The Arabidopsis Book* **6**: e0113.
- Baud, S., Guyon, V., Kronenberger, J., Wuille, S., Miquel, M., Caboche, M., Lepiniec, È., and Rochat, C.** (2002). Multifunctional acetyl-CoA carboxylase 1 is essential for very long chain fatty acid elongation and embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **33**:75-86
- Becerra, C., Puigdomenech, P., and Vicient, C.M.** (2006). Computational and experimental analysis identifies *Arabidopsis* genes specifically expressed during early seed development. *BMC Genomics* **7**.
- Belmonte, M.F. et al.** (2013). Comprehensive developmental profiles of gene activity in regions and subregions of the *Arabidopsis* seed. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**.
- Borisjuk, L. and Rolletschek, H.** (2009). The oxygen status of the developing seed. *New Phytologist* **182**: 17–30.
- Bradford, M.** (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- Cabassa-Hourton, C. et al.** (2016). Proteomic and functional analysis of proline dehydrogenase 1 link proline catabolism to mitochondrial electron transport in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* **473**: 2623–2634.
- Daudi, A. and O'Brien, J.A.** (2012). Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in *Arabidopsis* Leaves. *Bio Protoc* **2**.
- Deuschle, K., Funck, D., Forlani, G., Stransky, H., Biehl, A., Leister, D., van der Graaff, E., Kunze, R., and Frommer, W.B.** (2004). The role of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. *Plant Cell* **16**: 3413–3425.
- Doll, N.M. and Ingram, G.C.** (2022). Embryo–Endosperm Interactions. *Annual Review of Plant Biology* **73**: 293–321.

- Dourmap, C., Marmagne, A., Lebreton, S., Guivarc'h, A., Savouré, A., and Masclaux-Daubresse, C.** The Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase is a key determinant for carbon and nitrogen remobilization during seed filling in *Arabidopsis thaliana*. *in prep.*
- Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R., and Marillonnet, S.** (2009). Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type II Restriction Enzymes. *PLoS ONE* **4**: e5553.
- Fait, A., Angelovici, R., Less, H., Ohad, I., Urbanczyk-Wochniak, E., Fernie, A.R., and Galili, G.** (2006). *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology* **142**: 839–854.
- Fait, A., Nesi, A.N., Angelovici, R., Lehmann, M., Pham, P.A., Song, L., Haslam, R.P., Napier, J.A., Galili, G., and Fernie, A.R.** (2011). Targeted enhancement of glutamate-to- γ -aminobutyrate conversion in *Arabidopsis* seeds affects carbon-nitrogen balance and storage reserves in a development-dependent manner. *Plant Physiology* **157**: 1026–1042.
- Funck, D., Stadelhofer, B., and Koch, W.** (2008). Ornithine- δ -aminotransferase is essential for Arginine Catabolism but not for Proline Biosynthesis. *BMC Plant Biology* **8**.
- Goffman, F.D., Alonso, A.P., Schwender, J., Shachar-Hill, Y., and Ohlrogge, J.B.** (2005). Light enables a very high efficiency of carbon storage in developing embryos of rapeseed. *Plant Physiology* **138**: 2269–2279.
- Goldberg, R.B., de Paiva, G., and Yadegari, R.** (1994). *Plant Embryogenesis: Zygote to Seed*. *Science* **266**: 605–614
- Good, A.G., Shrawat, A.K., and Muench, D.G.** (2004). Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends in Plant Science* **9**: 597–605.
- Havé, M., Marmagne, A., Chardon, F., and Masclaux-Daubresse, C.** (2017). Nitrogen remobilization during leaf senescence: Lessons from *Arabidopsis* to crops. *Journal of Experimental Botany* **68**: 2513–2529.
- Hellmann, H., Funck, D., Rentsch, D., and Frommer, W.B.** (2000). Hypersensitivity of an *Arabidopsis* Sugar Signaling Mutant toward Exogenous Proline Application. *Plant Physiology* **122**: 357–367
- Hofmann, F., Schon, M.A., and Nodine, M.D.** (2019). The embryonic transcriptome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Reproduction* **32**: 77–91.
- Hundertmark, M. and Hinch, D.K.** (2008). LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* **9**.
- Jeong, H.J., Choi, J.Y., Shin, H.Y., Bae, J.M., and Shin, J.S.** (2014). Seed-specific expression of seven *Arabidopsis* promoters. *Gene* **553**: 17–23.
- Johansen, D.A.** (1940). *Plant microtechnique* Mc Graw Hill.
- Launay, A. et al.** (2019). Proline oxidation fuels mitochondrial respiration during dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **70**: 6203–6214.

- Lemaître, T., Gaufichon, L., Boutet-Mercey, S., Christ, A., and Masclaux-Daubresse, C.** (2008). Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassileskija accession. *Plant and Cell Physiology* **49**: 1056–1065.
- Lepiniec, L., Devic, M., Roscoe, T.J., Bouyer, D., Zhou, D.X., Boulard, C., Baud, S., and Dubreucq, B.** (2018). Molecular and epigenetic regulations and functions of the LAFL transcriptional regulators that control seed development. *Plant Reproduction* **31**: 291–307.
- Leprince, O., Pellizzaro, A., Berriri, S., and Buitink, J.** (2017). Late seed maturation: Drying without dying. *Journal of Experimental Botany* **68**: 827–841.
- Li, J. and Berger, F.** (2012). Endosperm: food for humankind and fodder for scientific discoveries. *New Phytologist* **195**: 290–305.
- Li, Y., Beisson, F., Pollard, M., and Ohlrogge, J.** (2006). Oil content of *Arabidopsis* seeds: The influence of seed anatomy, light and plant-to-plant variation. *Phytochemistry* **67**: 904–915.
- Masclaux-Daubresse, C. and Chardon, F.** (2011). Exploring nitrogen remobilization for seed filling using natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **62**: 2131–2142.
- Mattioli, R., Biancucci, M., Lonoce, C., Costantino, P., and Trovato, M.** (2012). Proline is required for male gametophyte development in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* **12**:236
- Mikulášek, K., Konečná, H., Potěšil, D., Holánková, R., Havliš, J., and Zdráhal, Z.** (2021). SP3 Protocol for Proteomic Plant Sample Preparation Prior LC-MS/MS. *Frontiers in Plant Science* **12**.
- Miller, G., Honig, A., Stein, H., Suzuki, N., Mittler, R., and Zilberstein, A.** (2009). Unraveling Δ 1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 26482–26492.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., and Wink, D.A.** (2001). A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *Nitric Oxide* **5**: 62–71.
- O’Neill, J.P., Colon, K.T., and Jenik, P.D.** (2019). The onset of embryo maturation in *Arabidopsis* is determined by its developmental stage and does not depend on endosperm cellularization. *Plant Journal* **99**: 286–301.
- Parthasarathy, A., Savka, M.A., and Hudson, A.O.** (2019). The synthesis and role of β -alanine in plants. *Frontiers in Plant Science* **10**.
- Planchais, S., Cabassa, C., Toka, I., Justin, A.-M., Renou, J.-P., Saviour, A., and Carol, P.** (2014). BASIC AMINO ACID CARRIER 2 gene expression modulates arginine and urea content and stress recovery in *Arabidopsis* leaves. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Ramel, F., Sulmon, C., Bogard, M., Couée, I., and Gouesbet, G.** (2009). Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biology* **9**: 28.
- ben Rejeb, K., Lefebvre-De Vos, D., le Disquet, I., Leprince, A.S., Bordenave, M., Maldiney, R., Jdey, A., Abdelly, C., and Saviour, A.** (2015). Hydrogen peroxide produced by NADPH

oxidases increases proline accumulation during salt or mannitol stress in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **208**: 1138–1148.

Renault, H., Roussel, V., el Amrani, A., Arzel, M., Renault, D., Bouchereau, A., and Deleu, C. (2010). The *Arabidopsis* pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC Plant Biology* **10**: 20.

Schwender, J., Goffman, F., Ohlrogge, J.B., and Shachar-Hill, Y. (2004). Rubisco without the Calvin cycle improves the carbon efficiency of developing green seeds. *Nature* **432**: 779–782.

Sew, Y.S., Ströher, E., Fenske, R., and Millar, A.H. (2016). Loss of mitochondrial malate dehydrogenase activity alters seed metabolism impairing seed maturation and post-germination growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **171**: 849–863.

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

Szabados, L. and Savouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* **15**: 89–97.

Vigeolas, H., Möhlmann, T., Martini, N., Neuhaus, H.E., and Geigenberger, P. (2004). Embryo-Specific Reduction of ADP-Glc Pyrophosphorylase Leads to an Inhibition of Starch Synthesis and a Delay in Oil Accumulation in Developing Seeds of Oilseed Rape. *Plant Physiology* **136**: 2676–2686.

Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. v., and Provart, N.J. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE* **2**: e718.

Wu, R., Duan, L., Pruneda-Paz, J.L., Oh, D., Pound, M., Kay, S., and Dinneny, J.R. (2018). The 6xABRE Synthetic Promoter Enables the Spatiotemporal Analysis of ABA-Mediated Transcriptional Regulation. *Plant Physiology* **177**: 1650–1665.

Zheng, Y., Cabassa-Hourton, C., Planchais, S., Lebreton, S., and Savouré, A. (2021). The proline cycle as an eukaryotic redox valve. *Journal of Experimental Botany* **72**: 6856–6866.

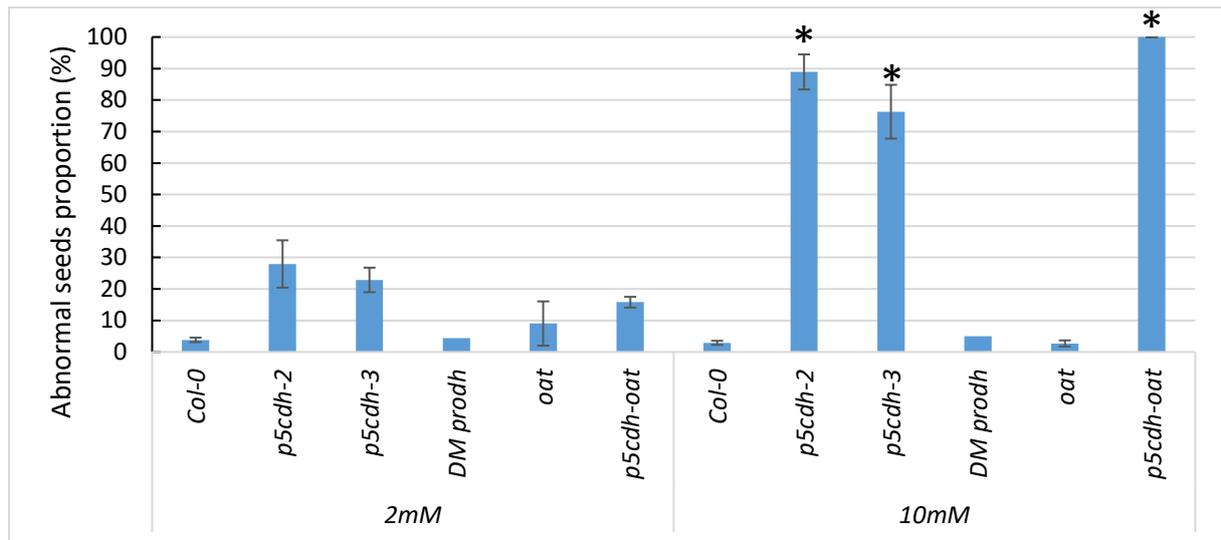


Figure S1: Proportions of morphologically abnormal seeds produced by Col-0 and *p5cdh* mutants grown with either 2 or 10 mM nitrates. Dry seeds from 24 plants from a single culture were pooled and observed under stereomicroscope (Zeiss SteREO Discovery). The software Fiji (Image J2) was used to analyse images and to count the proportions of morphologically abnormal dry seeds. Significant data were established with TukeyHSD test with a threshold p-value of 0.05. Three replicates were analysed.

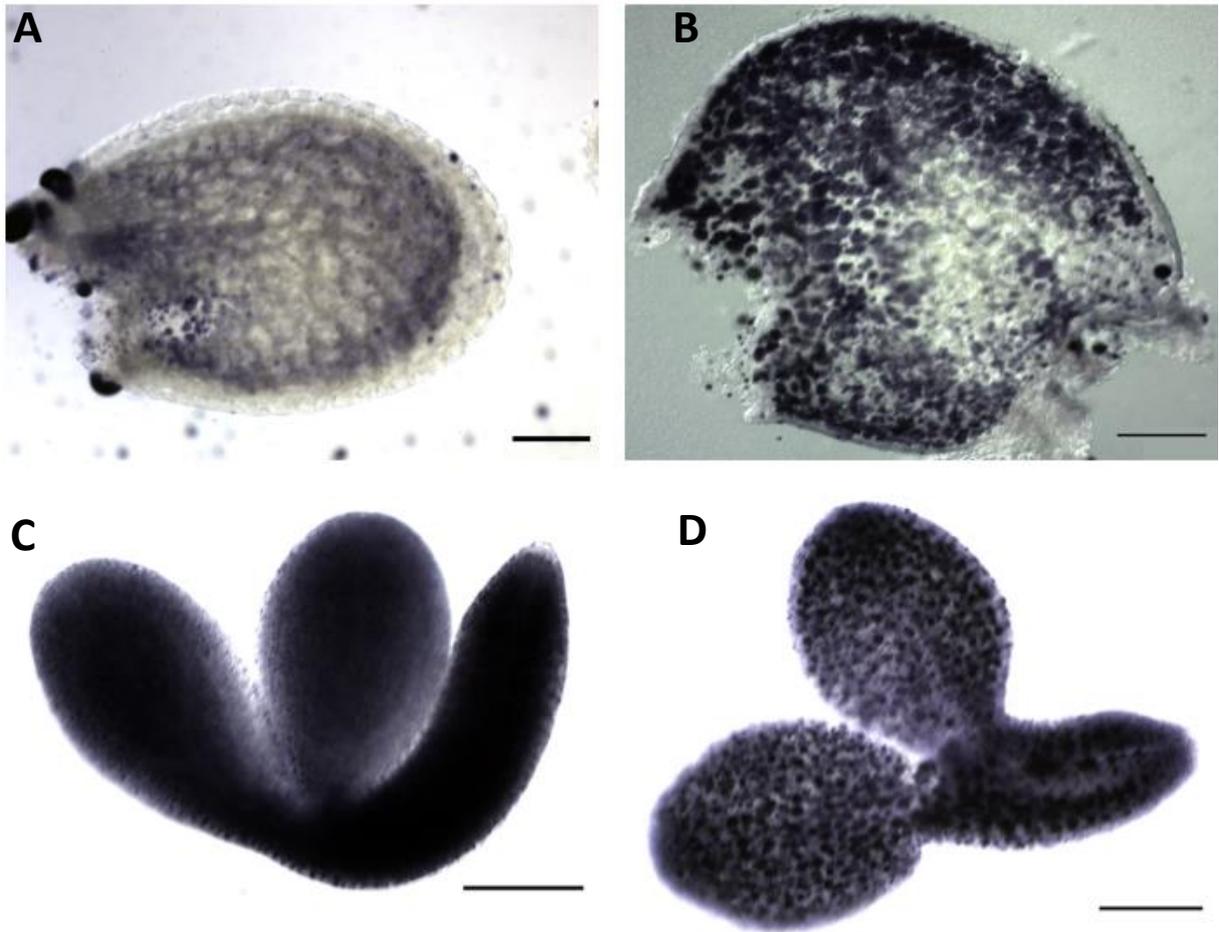


Figure S2: Visualization of lipids droplets with Sudan Black in embryos and dry seeds.

A-B: dry seeds of WT (Col-0) (A) and *p5cdh* mutant (B). C-D: WT (Col-0) (C) and *p5cdh* mutant embryo (D). Cleared seeds were incubated in Sudan Black solution and observed in optical microscopy. Scale bar = 100 μ m

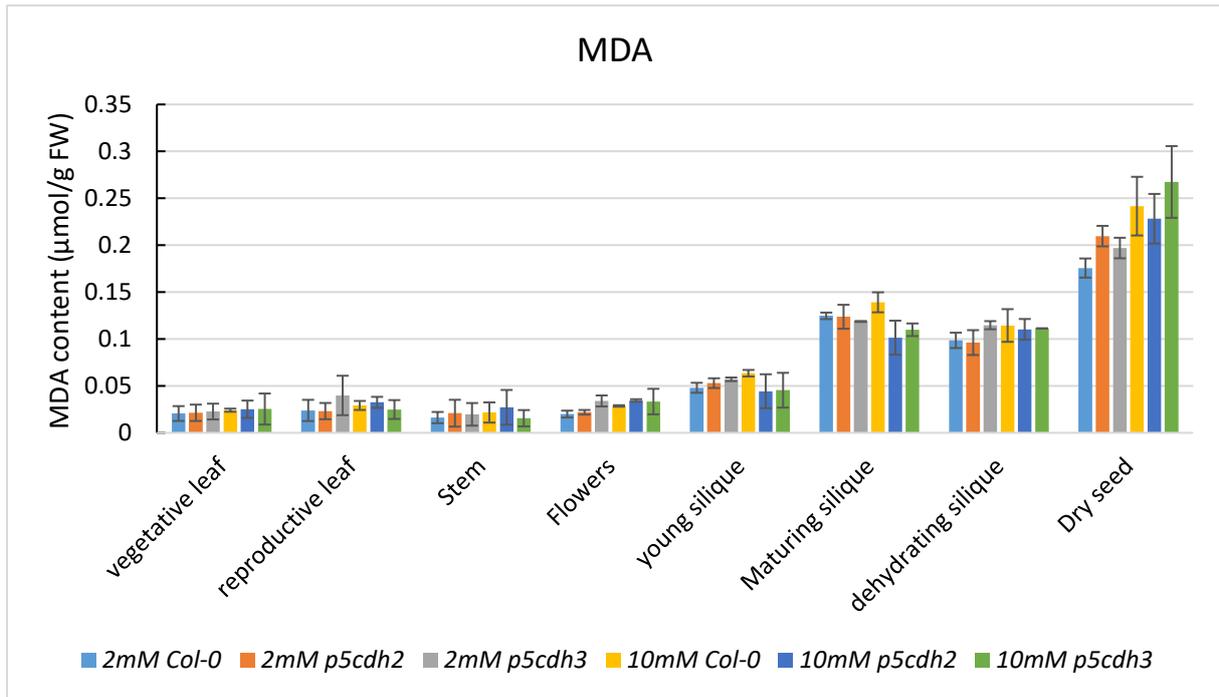


Figure S3: MDA content in various organs and dry seeds from Col-0, *p5cdh-2* and *p5cdh-3* mutants during vegetative and reproductive development.

Plants grown under 2 or 10mM nitrates. MDA content was estimated with trichloroacetic and thiobarbituric acid colorimetric measurements. Errors bars: standard error.

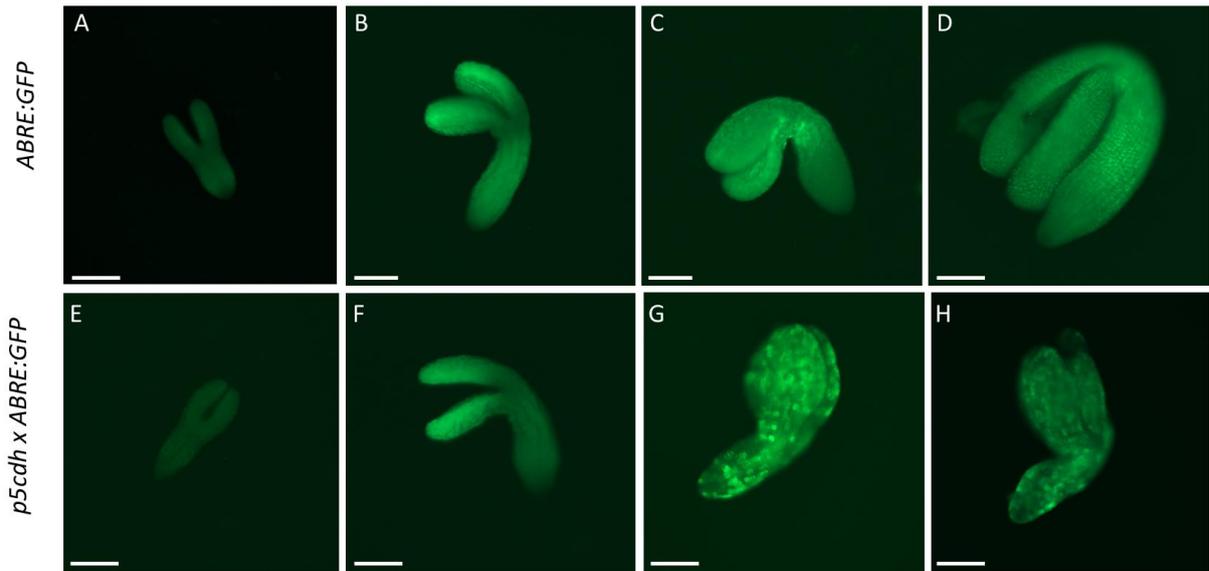


Figure S4 : ABA signaling in *6xABRE:GFP* (A-D) and *p5cdh-2/6xABRE:GFP* (E-H) mutant grown under 10mM of nitrates.

A and E : late heart stage ; B and F : late torpedo stage ; C and G: cotyledons bending stage ; D and H: fully developed embryo at the end of the maturation phase.

Scale bar : 100 μ m

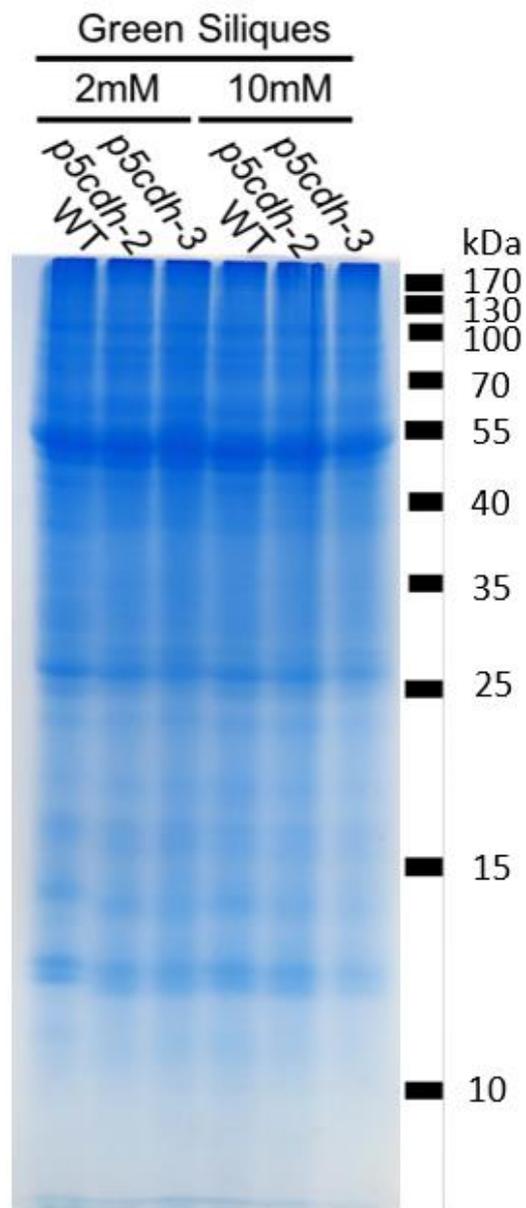


Figure S5: Protein content of Col-0 and *p5cdh* mutants dry seeds. Gel is stained with Coomassie Blue G250. Each line contains 10 μ L of protein extract from 30 mg of siliques.

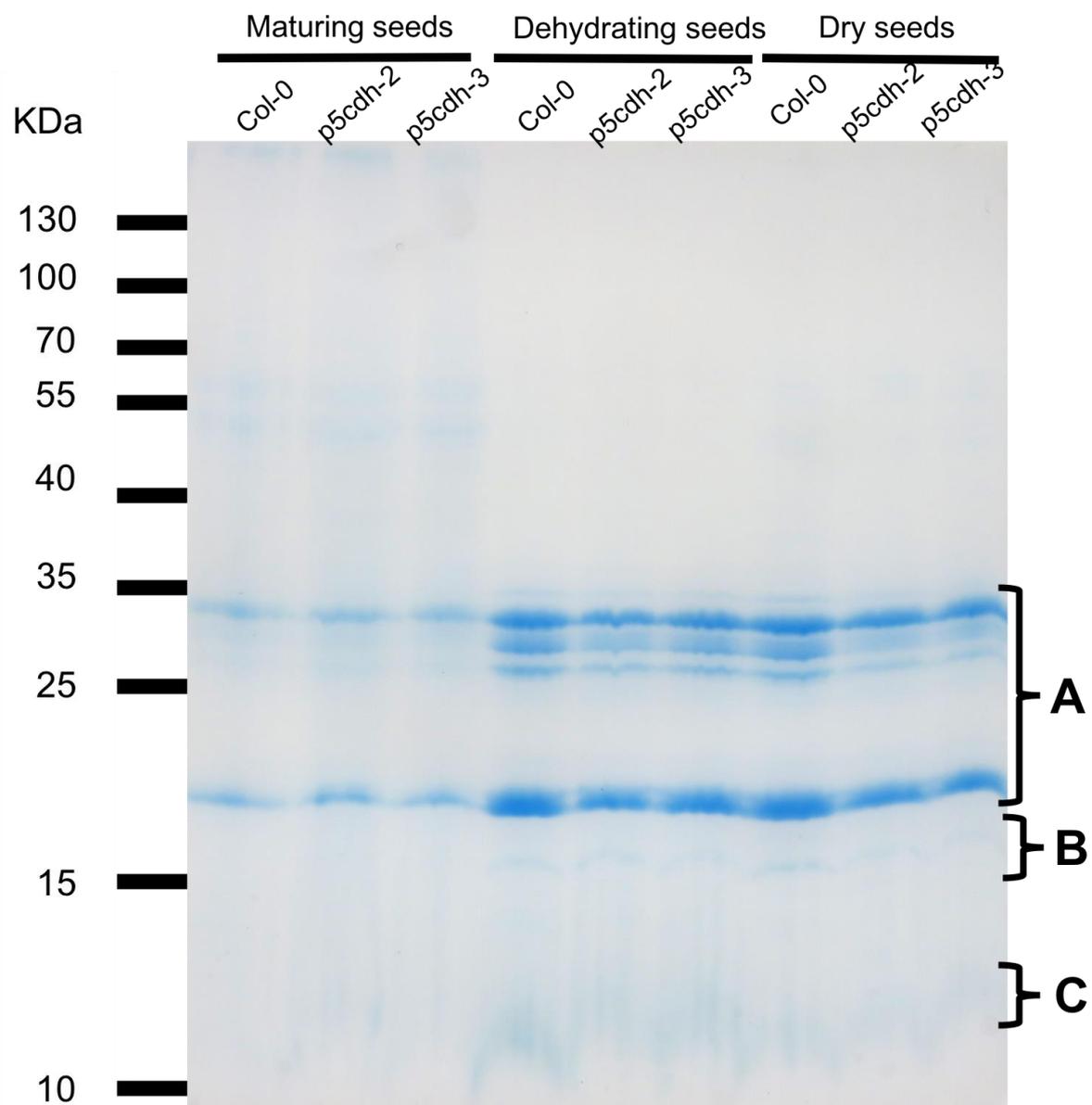


Figure S6: Protein content of Col-0 and *p5cdh* mutants in green maturing seeds, dehydrating seeds and dry seeds. Gel is stained with Coomassie Blue G250. Each line contains 150 μ g of total protein extract. A: Albumin 12S/Cruciferins ; B: Oleosins ; C: Albumin 2S/Napins.

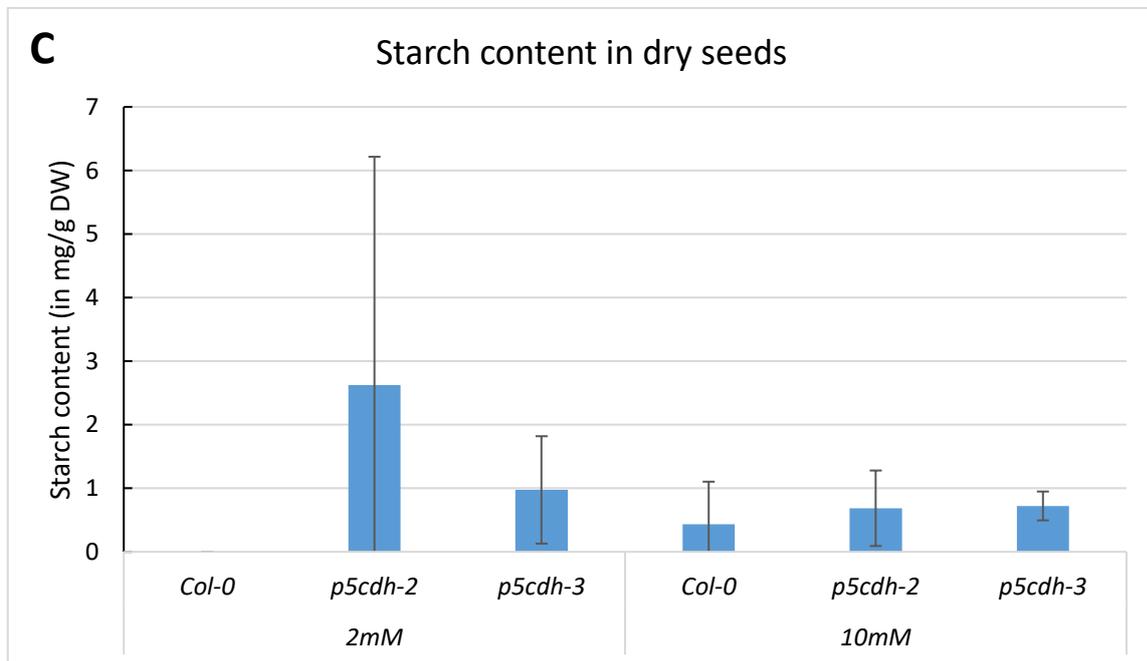
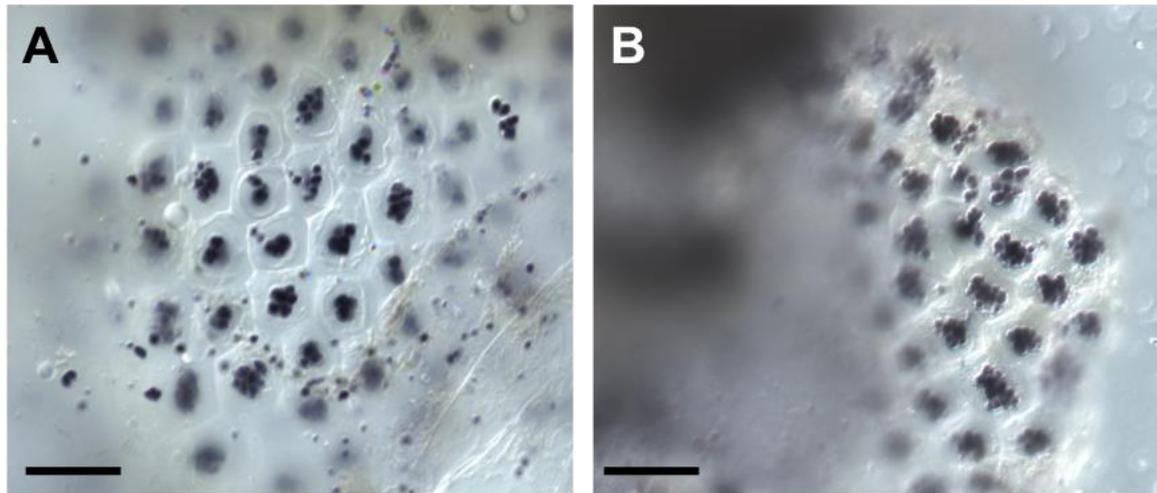


Figure S7: Starch visualization and starch measurements in Col-0 and *p5cdh* mutants dry seeds. (A) Starch visualization with lugol's iodine staining in Col-0 (A) and *p5cdh* (B) seed coat from seeds produced by plants cultivated under 10 mM of nitrates. Scale bar: 50 μ m (C): Starch content measured in dry seeds. Errors bars: standard deviation.

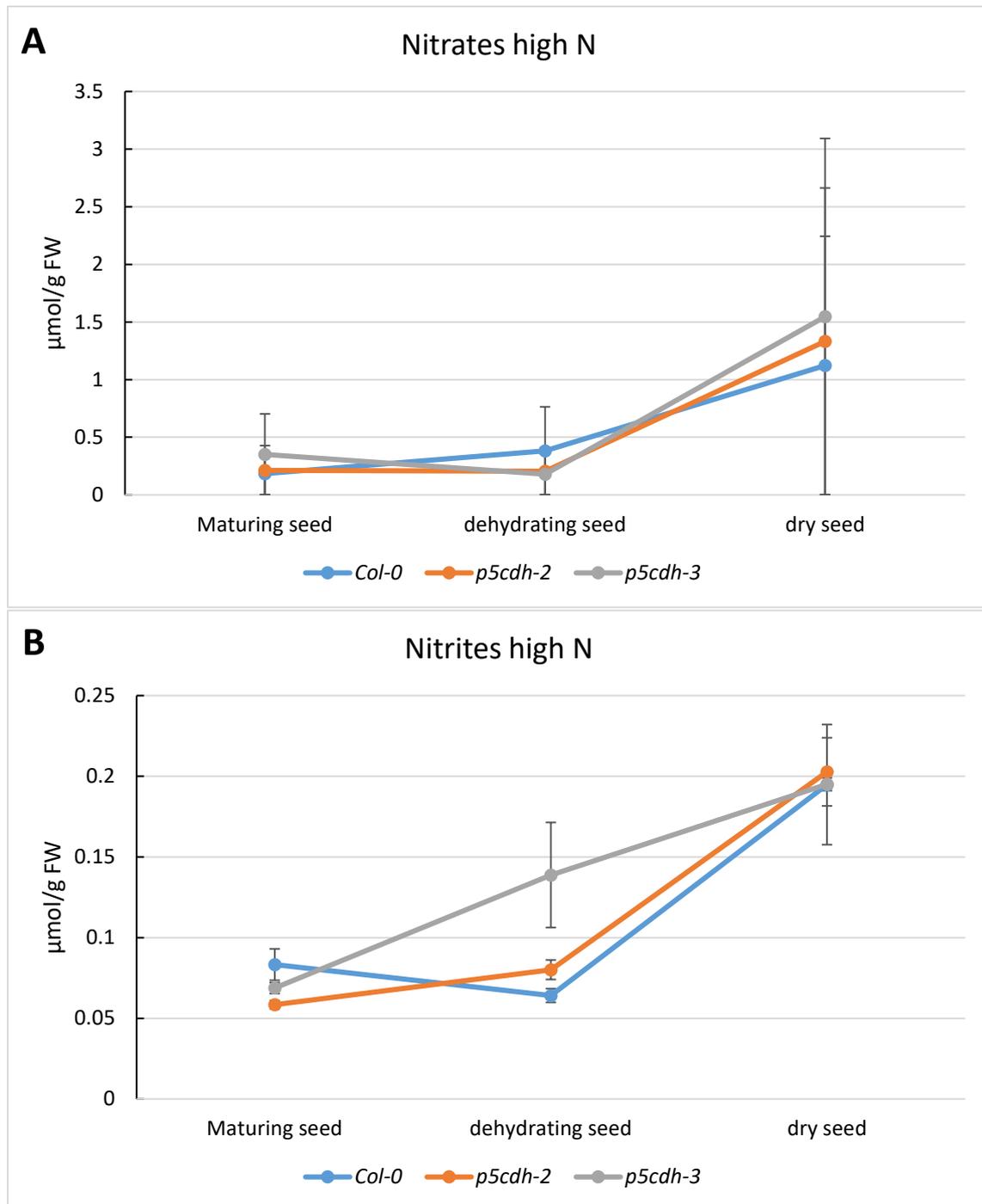


Figure S8: Nitrates and Nitrite content measurements in Col-0, p5cdh-2 and p5cdh-3 mutant seeds.

Nitrates and Nitrites were extracted from maturing seeds, dehydrating seed and dry seeds removed from their siliques and their content were measured following the method of Miranda et al., 2001. Errors bars: standard error. Statistics: t.test, threshold p-value: 0.05. A: Nitrates content. B: Nitrites content.

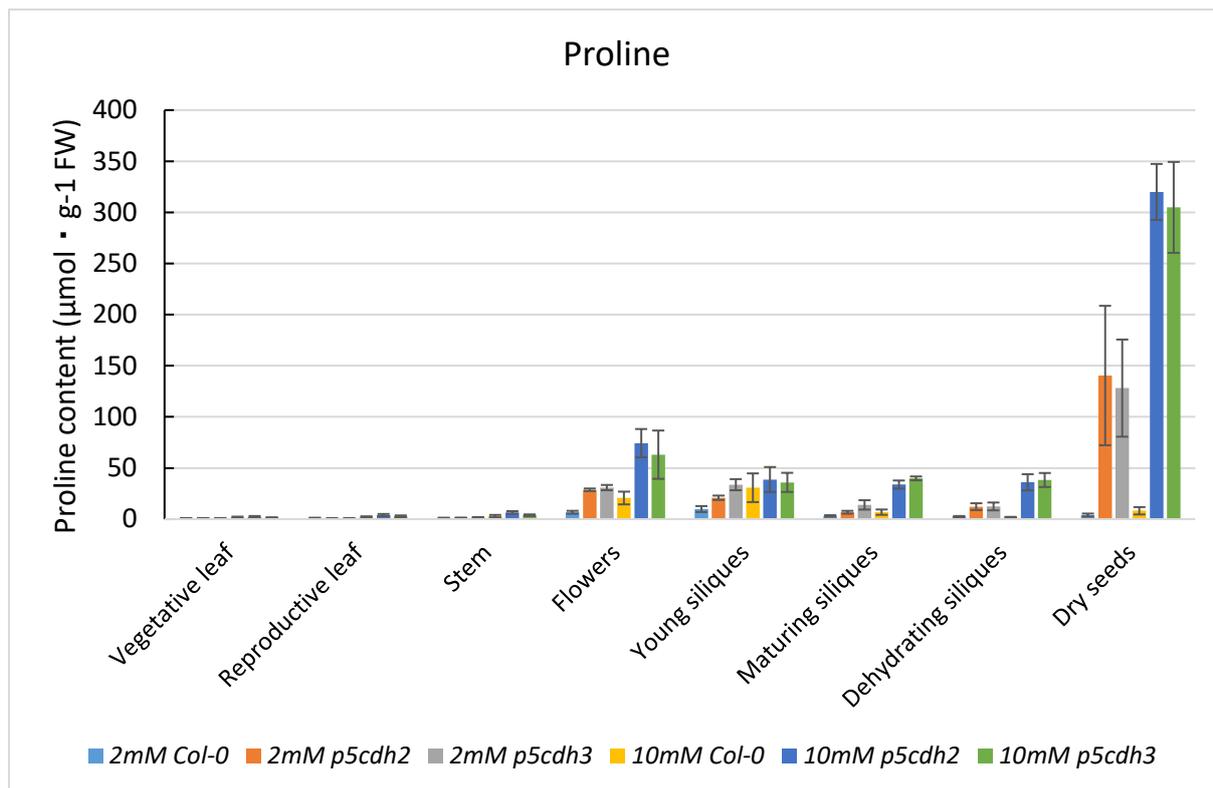


Figure S9: Free proline content in various organs and dry seeds from Col-0, *p5cdh-2* and *p5cdh-3* mutants during vegetative and reproductive development. Plants grown under 2 or 10mM nitrates. Proline content was estimated with Ninhydrin colorimetric measurements. Errors bars: standard error.

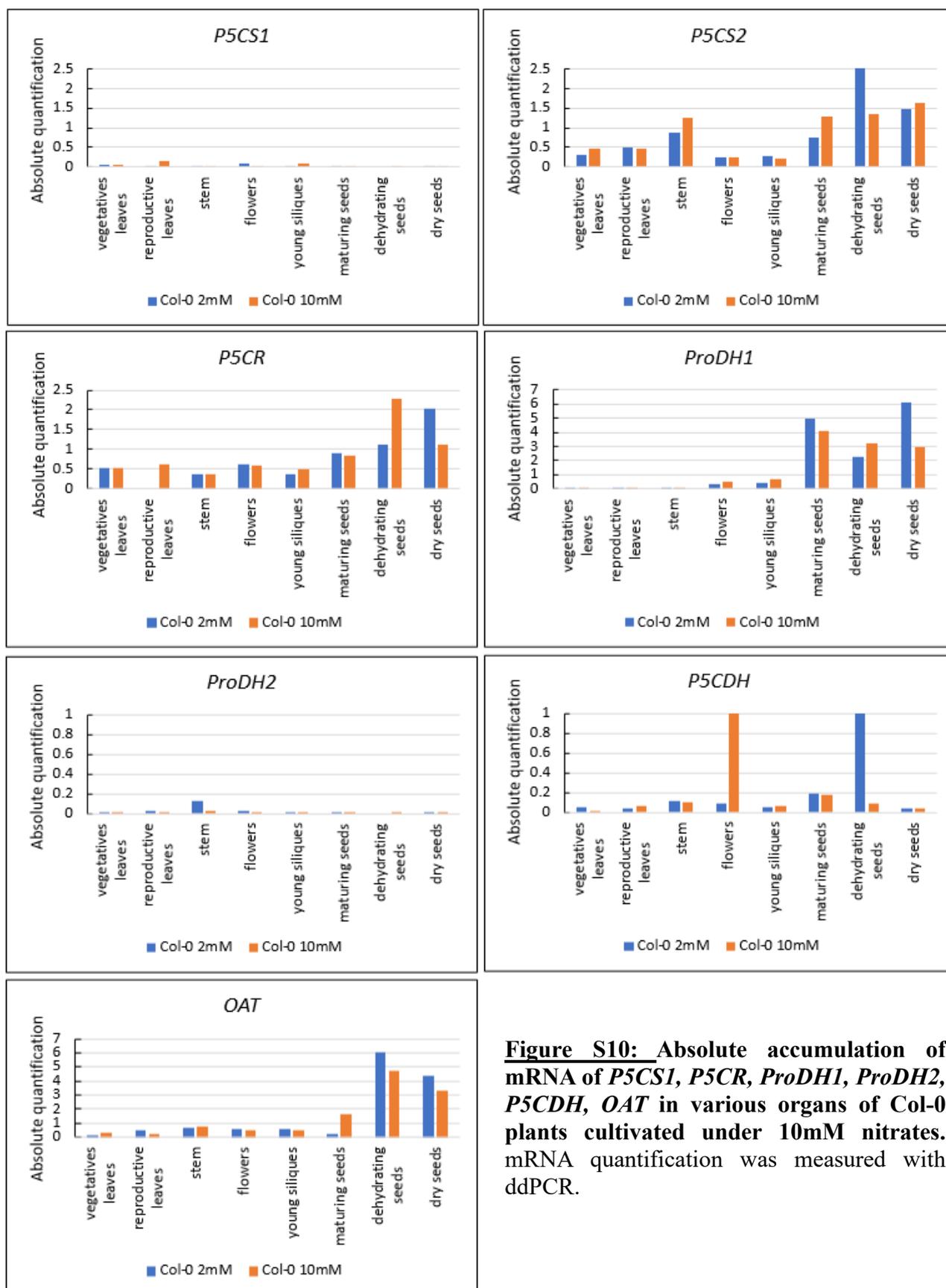


Figure S10: Absolute accumulation of mRNA of *P5CS1*, *P5CR*, *ProDH1*, *ProDH2*, *P5CDH*, *OAT* in various organs of Col-0 plants cultivated under 10mM nitrates. mRNA quantification was measured with ddPCR.

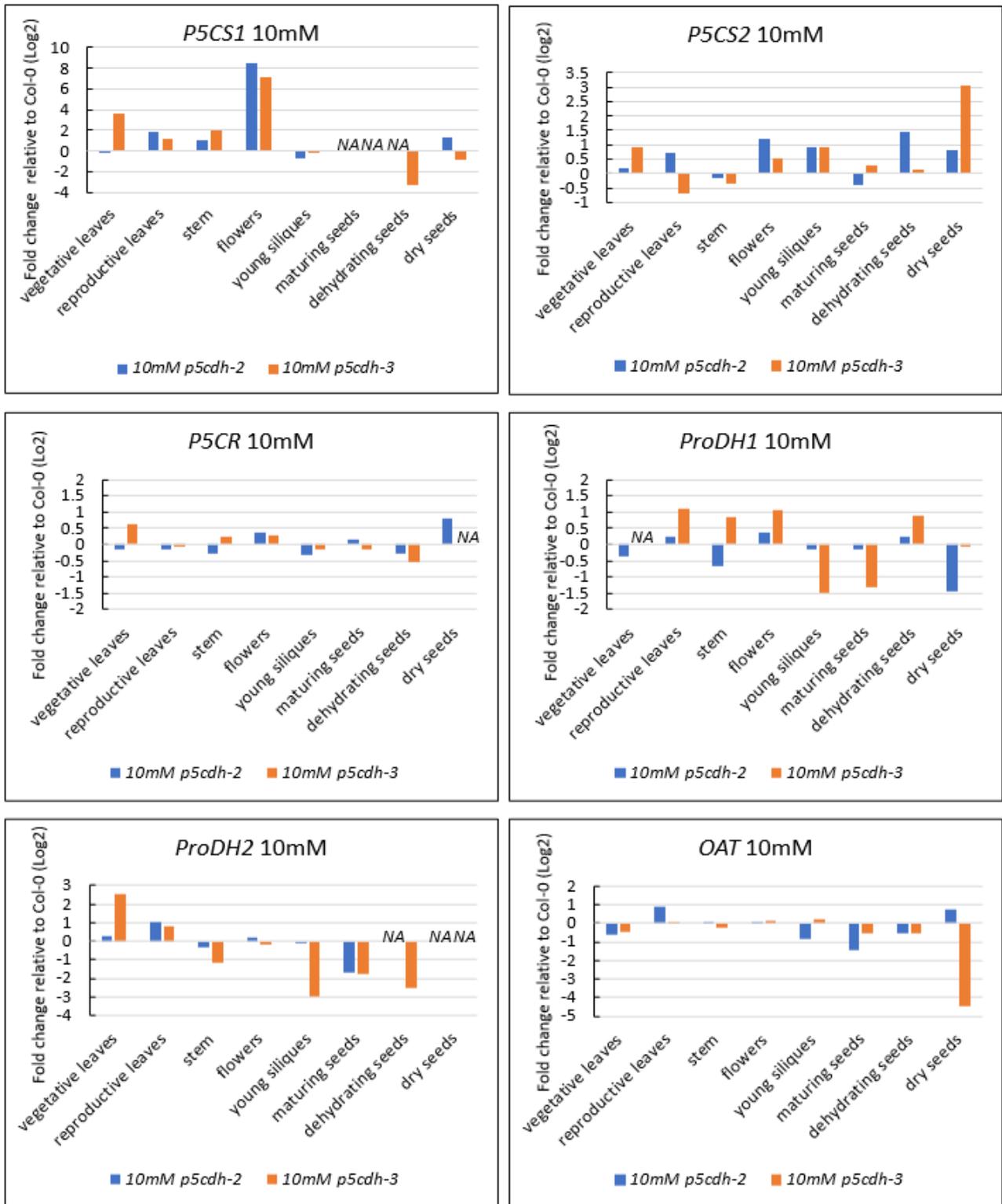


Figure S11: Relative accumulation of mRNA of *P5CS1*, *P5CS2*, *P5CR*, *ProDH1*, *ProDH2* and *OAT* in various organs of *p5cdh* mutants grown under 10mM of nitrates. Values are expressed as Log2 relative to WT

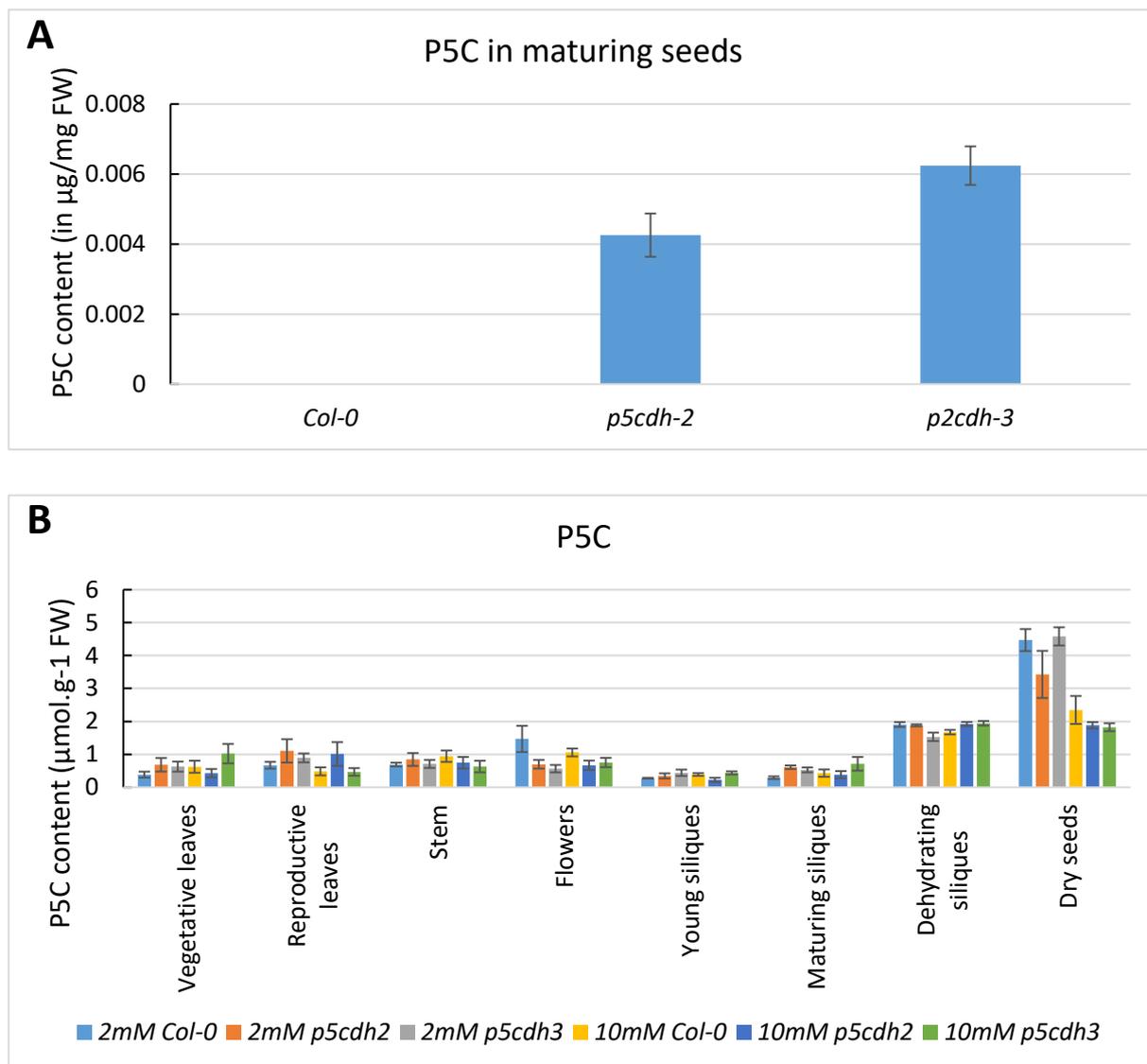
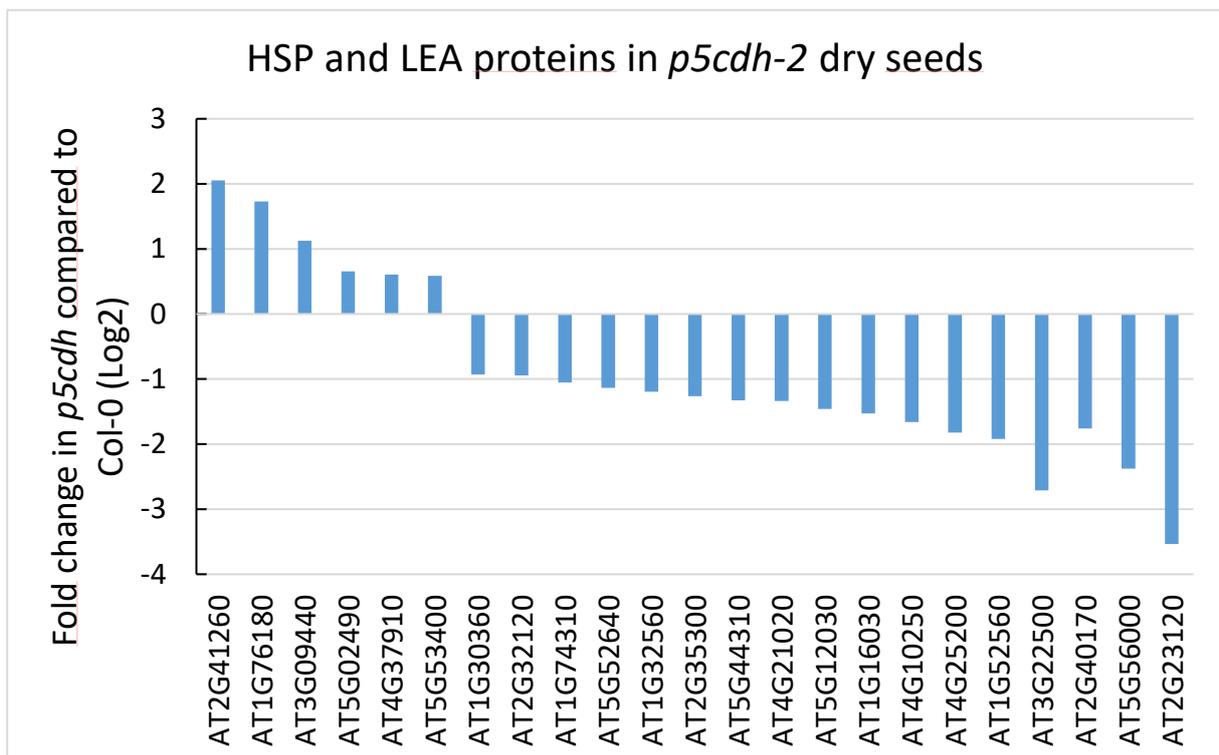
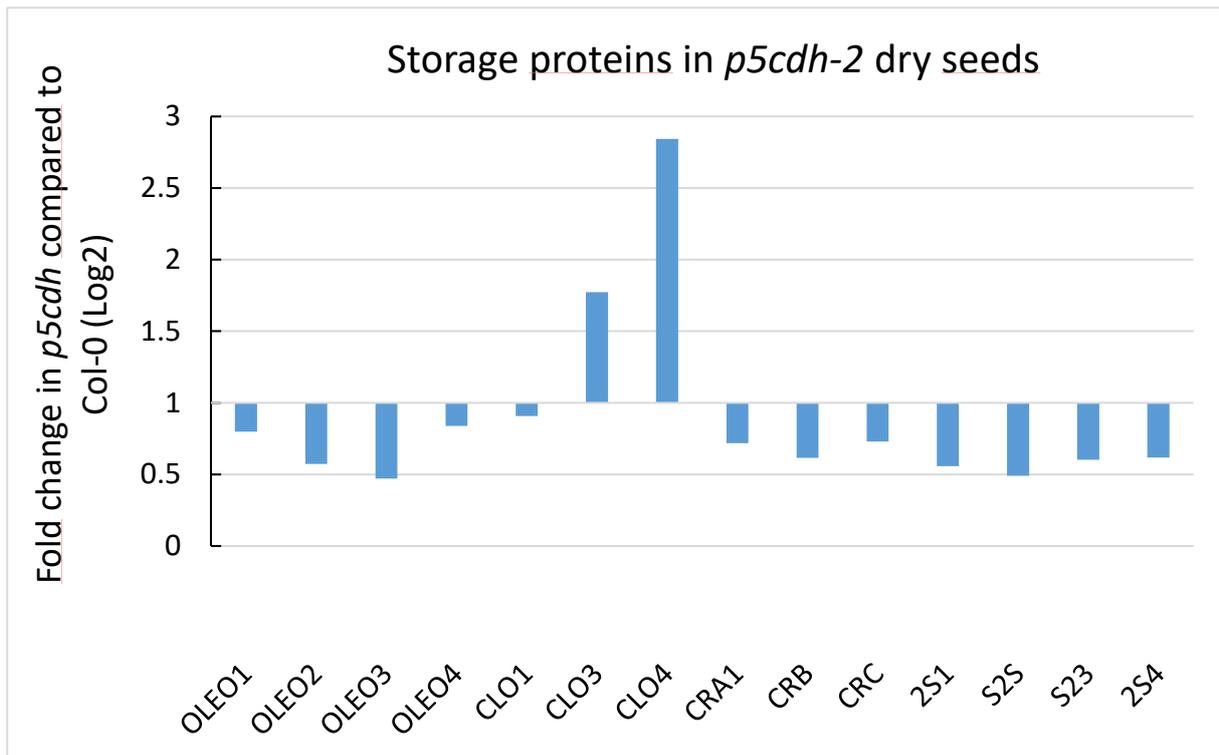


Figure S12: Free P5C content in different plant organs and maturing seeds in *Col-0*, *p5cdh-2* and *p5cdh-3* mutant.

A: P5C content in maturing seeds removed from their siliques in *Col-0*, *p5cdh-2* and *p5cdh-3*. P5C content was measured by GC-MS. Errors bars: standard error.

B: P5C content in different plant organs in *Col-0*, *p5cdh-2* and *p5cdh-3* mutants. P5C content was estimated with O-aminobenzaldehyde colorimetric measurements. Errors bars: standard error.



Figures S13: storage protein and LEA/HSP protein changes in *p5cdh-2* seeds compared to Col-0 seeds. Plants were grown under 10mM of nitrates. Values are expressed as Log2 relative to WT. Proteins levels were measured with UPLC-MS/MS.

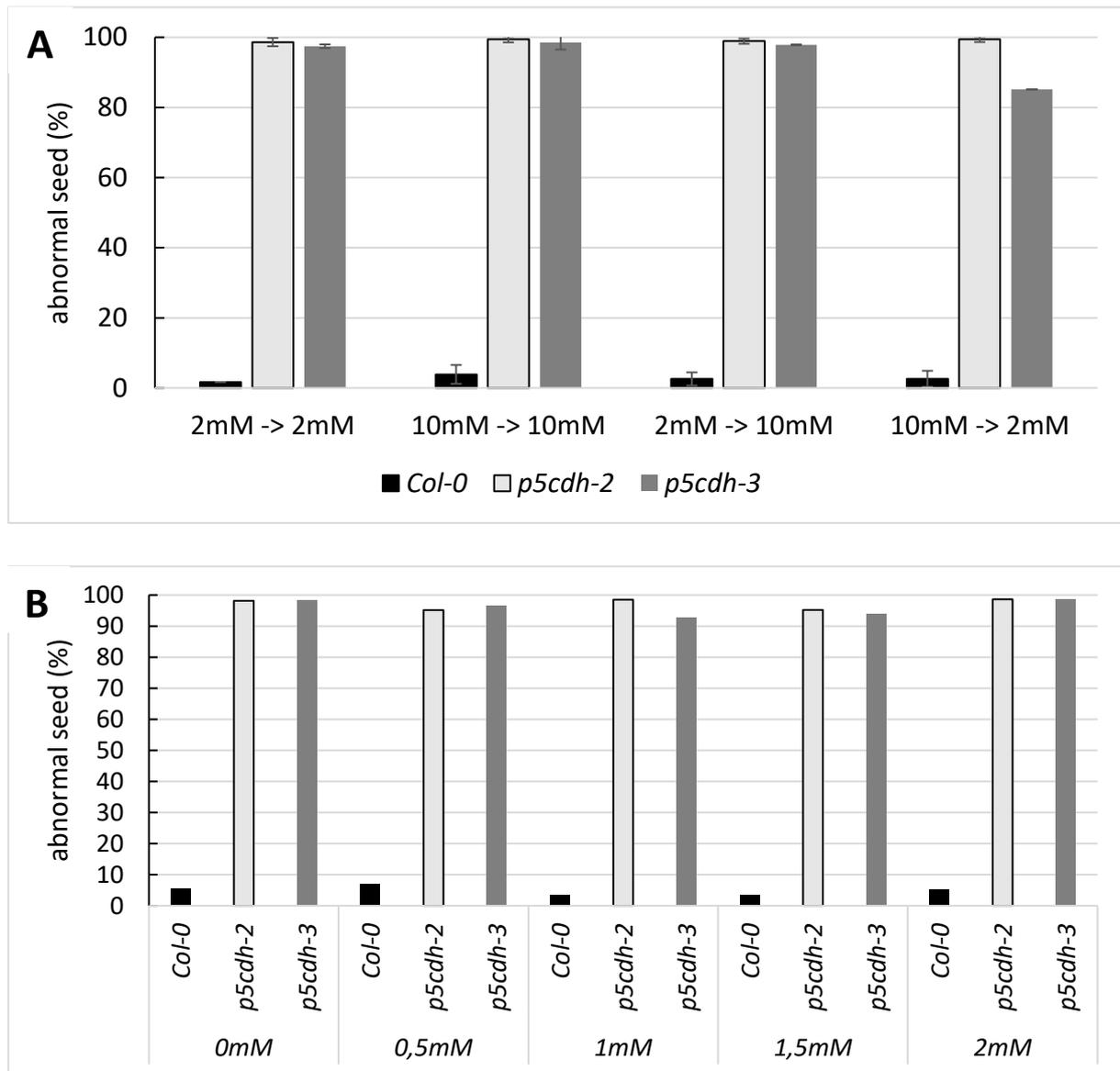


Figure S14: Proportion of abnormal seeds produced by isolated stem. Plants were grown under 2mM or 10mM of nitrates

A: Isolated floral stem from Col-0, *p5cdh-2* and *p5cdh-3* plants initially grown on 2mM or 10mM nitrates were transferred in nutritive solution of 10mM or 2mM and *vice versa*.

B: Isolated floral stem from Col-0, *p5cdh-2* and *p5cdh-3* plants initially grown on soil were transferred in nutritive solution with a range of nitrates concentration from 0mM to 2mM.

Table S1 : Nutritive solutions used in the study

	0 mM	0,5 mM	1 mM	1,5 mM	2 mM	10mM
KNO ₃	0 mM	0,4375 mM	0,8745 mM	1,312 mM	1,749 mM	4,995mM
Ca(NO ₃) ₂ -4 H ₂ O	0 mM	0,0315 mM	0,0625 mM	0,094 mM	0,125 mM	2,4985 mM
CaCl ₂ – 2 H ₂ O	0 mM	0,2195 mM	0,188 mM	0,157 mM	0,1255 mM	-
KCl	0 mM	1,312 mM	0,8745 mM	0,4375 mM	-	-
NaCl	-	-	-	-	-	0,2mM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ⁻ 4 H ₂ O	0,04µM					
H ₂ BO ₃	24,3µM					
MnSO ₄ -H ₂ O	11,8µM					
ZnSO ₄ -7H ₂ O	3,48µM					
CuSO ₄	1µM					
Sequestrene® (Syngenta)	0,001% (m/V)					
KH ₂ PO ₄	0,25mM					
MgSO ₄	0,25mM					

Table S2: classification of the different metabolites on the different axis of PCA analysis

	V1	V2	V3	V4	V5
Ammonium	-0,0046	-0,7848	0,3753	0,1455	0,1297
Hydroxyproline	-0,6930	-0,1760	0,0849	-0,0291	-0,4161
Histidine	-0,0361	-0,9080	-0,0141	-0,0130	0,0977
Asparagine	-0,2246	-0,5782	-0,2332	0,4677	-0,1593
Serine	-0,9440	-0,0918	0,0046	0,1828	-0,0959
Glutamine	-0,7786	-0,1030	-0,4622	0,1731	-0,2526
Arginine	0,1463	-0,8903	-0,1452	-0,0556	0,2339
Glycine	-0,6516	-0,3554	0,1098	-0,0076	-0,4592
Aspartate	-0,9373	0,1108	-0,0933	0,2315	0,0237
Glutamate	-0,6822	0,1788	-0,1192	0,4386	0,3225
Beta-Alanine	0,3051	-0,8388	-0,1215	-0,1535	-0,0436
Threonine	-0,7831	-0,1672	-0,2926	0,4556	0,0274
Alpha-Alanine	-0,8400	-0,2332	0,2140	0,0951	-0,1643
GABA	-0,8816	0,0671	0,1849	-0,1208	-0,2350
Proline	-0,0414	-0,8924	-0,0797	-0,1030	-0,2391
Methylcysteine	0,2548	-0,4186	0,4895	0,0074	-0,0370
Ornithine	0,5097	-0,0895	0,3504	0,3725	-0,1731
Cystine	0,1531	0,1062	0,7667	0,3754	0,0091
Lysine	-0,5372	-0,7862	0,0538	0,0129	0,1203
Tyrosine	-0,4661	0,0528	0,3275	-0,6452	-0,2800
Methionine	-0,4688	-0,1350	0,4501	0,3507	0,4634
Valine	-0,3255	-0,8533	0,1872	-0,0318	0,2524
Isoleucine	-0,0972	-0,6409	-0,2897	-0,5012	0,3667
Leucine	-0,8861	-0,2554	0,1965	-0,0414	0,1363
Phenylalanine	-0,4035	-0,7512	0,2700	-0,1065	0,0189
Tryptophane	0,6329	-0,5254	0,1335	-0,0398	0,0739
Succinate	-0,8388	0,2008	0,1925	0,0823	-0,0862
Glycerate	-0,6771	0,2905	0,1500	-0,5310	-0,0629
Fumarate	-0,6670	0,2886	-0,2062	0,2734	0,4649
Malate	-0,9334	0,1655	-0,1688	0,0556	-0,0378
Xylose	0,0394	0,0433	-0,3029	-0,3212	0,2125

	V1	V2	V3	V4	V5
Citrate	-0,3988	0,1725	-0,3600	-0,0383	0,2701
Fructose	-0,9246	0,1708	-0,1119	-0,0747	-0,1568
Glucose	-0,8968	0,1729	0,2705	-0,0667	-0,1000
Myo-inositol	-0,7501	0,1847	0,2497	-0,1626	-0,2362
Saccharose	0,9290	-0,0945	0,0725	0,1280	-0,0429
Cellobiose	0,8283	-0,0255	0,1560	0,2937	-0,2858
Trehalose	0,0064	0,2236	-0,2239	-0,2883	0,4099
Maltose	-0,5419	0,2910	0,4084	-0,1354	0,4478
Gentiobiose	-0,3814	-0,2021	-0,5304	0,6139	-0,0895
Galactinol	0,6652	0,3948	0,3456	0,2968	0,0487
Raffinose	0,8797	-0,0181	-0,0193	0,1491	-0,1581
Galactose	-0,4266	0,1626	0,7022	0,1070	0,3167

II. Résultats et discussion supplémentaires

Nous avons montré que, chez le mutant *p5cdh*, les perturbations du développement de l'embryon apparaissaient après la phase d'embryogenèse, au début donc de la phase de maturation. En effet, d'un point de vue phénotypique, l'embryon *p5cdh* est tout à fait comparable à l'embryon sauvage. De plus, sa cinétique de développement est également la même que celle du sauvage. Cette phase d'embryogenèse tout à fait comparable à celle du sauvage a été confirmée par l'étude de deux phénomènes régulateurs clé, la division cellulaire et la signalisation auxinique.

1. Étude de la division cellulaire

L'utilisation de la lignée *pCycB1;1:GUS* permet de mettre en évidence les cellules en division cellulaire, plus précisément les cellules entrant en mitose (Colon-Carmona *et al.*, 1999). En effet, la cycline B1,1 étant une cycline mitotique, son promoteur ne s'exprime qu'en fin de phase G2 du cycle cellulaire, et son expression marque donc l'entrée des cellules en mitose. Cette lignée a donc été croisée avec la lignée mutante *p5cdh-2* afin de visualiser les divisions cellulaires au cours de l'embryogenèse chez le mutant *p5cdh-2*. L'observation de ces deux lignées homozygotes pour la construction *pCycB1;1:GUS* et la mutation *p5cdh* n'a révélé aucune différence entre les génotypes Col-0 et *p5cdh* (**Fig S15**). Ces observations confirment donc que la morphogenèse de cet embryon mutant, qui à ce moment du développement repose essentiellement sur de la division cellulaire, se déroule normalement.

2. Étude de la signalisation hormonale

La signalisation de l'auxine a pu être mise en évidence avec une lignée *DR5:GUS*, cette lignée exprimant un promoteur synthétique (DR5) qui possède un domaine spécifique incluant le site de liaison de facteurs de gènes répondant à l'auxine, le site TGTCTC (Ulmasov *et al.*, 1997).

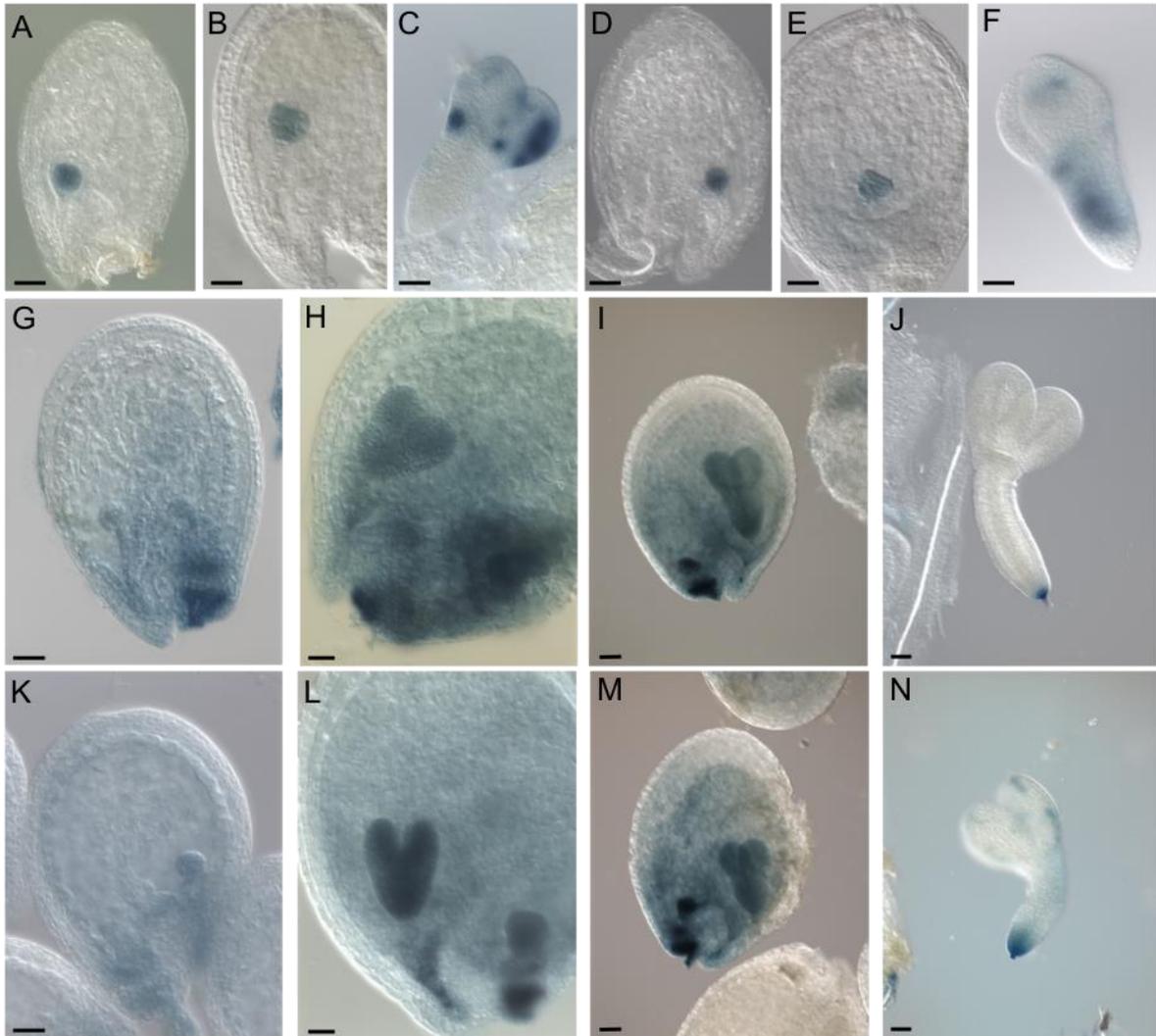


Figure S15: Mise en évidence de la régulation de la morphogenèse

A-F: Mise en évidence de la division cellulaire avec un système GUS. Les lignées *pCycB1.1:GUS* (A-C) et *p5cdh-2/pCycB1.1:GUS* (D-F) ont été cultivées avec 10mM de nitrates.

G-N: Mise en évidence de la signalisation auxine avec un système GUS Les lignées *DR5:GUS* (G-J) et *p5cdh-2/DR5:GUS* (K-N) ont été cultivées avec 10mM de nitrates
 échelle : 50µm

Cette lignée a donc été croisée avec le mutant *p5cdh-2*. Les lignées homozygotes pour la construction *DR5:GUS* et pour la mutation *p5cdh-2* ont permis de visualiser la signalisation auxinique dans la graine à plusieurs stades de développement. Ces observations n'ont pas permis d'établir de différences entre WT et mutants *p5cdh* (**Fig S15**). En effet, dans les deux génotypes, aux stades globulaire et cœur, l'auxine est présente dans tout l'embryon et dans le domaine chalazal de l'albumen. Le signal auxinique diminue ensuite progressivement au début du stade torpille pour ne se restreindre qu'à la pointe de la racicule en fin du stade torpille.

L'absence de différences au cours des divisions cellulaires et dans la signalisation auxine dans l'embryon et l'albumen lors des premiers stades de développement confirme bien que la phase de morphogénèse n'est pas perturbée. Les différents compartiments de la graine se développent donc normalement, aucune perturbation majeure n'étant détectable avant la phase de maturation.

3. Étude de l'influence de la forme moléculaire d'azote dans le phénotype

Les hampes florales isolées de leur rosette et plongées dans une solution nutritive contenant 2, 10 mM de nitrates ont produit des graines morphologiquement anormales dans les mêmes proportions que ce qui était retrouvé sur sable. Afin de vérifier si le phénotype *p5cdh* n'était pas dépendant des nitrates mais était retrouvé avec d'autres formes d'azote, ce système expérimental a été repris en substituant les nitrates par de la glutamine ou de l'asparagine. Des résultats similaires à ceux obtenus lorsque l'azote était apporté sous forme de nitrates ont été obtenus. Cette expérience nous a donc permis de conclure la forme moléculaire de la source d'azote n'était pas en cause dans le phénotype.

4. Étude de l'origine spatiale du phénotype par complémentation fonctionnelle

L'expérience réalisée à partir de hampes florales isolées de leur rosette et plongées dans une solution nutritive contenant 2 ou 10 mM de nitrates nous a permis de conclure à l'absence de responsabilités des parties végétatives dans le phénotype. Afin de mesurer l'influence de l'embryon et de l'albumen dans le phénotype *p5cdh* des expériences de complémentations fonctionnelles ont été mises en place en créant des lignées transgéniques exprimant la forme sauvage de *P5CDH* sous le contrôle du promoteur d'un gène s'exprimant spécifiquement dans l'embryon, et du promoteur d'un gène s'exprimant spécifiquement de l'albumen. Afin de sélectionner ces promoteurs, une analyse bibliographique approfondie a été menée. 118 gènes candidats ont été sélectionnés à partir d'analyse bioinformatiques, computationnelles et d'études transcriptomiques déjà publiées (Becerra *et al.*, 2006; Hundertmark & Hinch, 2008; Hofmann *et al.*, 2019). Pour chacun des gènes candidats, une recherche de leurs motifs d'expression spatio-temporels a été menée en utilisant l'outil BAR (eFP Browser, bar.utoronto.ca) (Winter *et al.*, 2007) et en recherchant des résultats de constructions GUS ou GFP pour ces gènes. Une courte liste de gènes a alors été établie selon les critères suivants : l'expression du gène candidat doit être restreinte à l'embryon ou l'albumen et avoir lieu entre le stade globulaire et la fin de développement de la graine. De plus, la construction moléculaire se faisant grâce à la technique du Golden Gate reposant sur l'utilisation de l'enzyme de restriction Bsa I, aucun site de restriction pour cette enzyme ne devait se trouver dans la séquence du promoteur. Ainsi, le promoteur *RGP3* a été sélectionné pour induire une expression spécifiquement dans l'albumen (Rautengarten *et al.*, 2011). La lignée homozygote mutante pour *pc5dh-2* a été transformée grâce à la technique du « floral dip » et la lignée transgénique ainsi créée, la lignée *pRGP3:P5CDH::GFP*, est actuellement en cours de génotypage.

Le promoteur du gène *At5G16460* a quant à lui été sélectionné pour induire une expression spécifique de l'embryon (Jeong *et al.*, 2014). Pour la réalisation de cette construction, au maximum 1500pb en amont du codon initiateur de la traduction (ATG) ont été sélectionnés. La construction *pAT5G16460:P5CDH::GFP* a été intégrée dans un mutant

p5cdh-2 grâce à la technique du « floral dip » et des lignées homozygotes ont été sélectionnées.

Comme indiqué dans le chapitre 2, cette lignée exprimant *P5CDH* spécifiquement dans l'embryon n'a permis qu'une complémentation incomplète du phénotype puisque 42% des graines produites par cette lignées étaient anormales contre 82% pour un mutant *p5cdh* et 4% pour un individu sauvage. Cela peut s'interpréter par l'influence des compartiments entourant l'embryon dans le phénotype, l'expression de *P5CDH* étant alors nécessaire également dans l'albumen voire dans les téguments. L'identification des promoteurs candidats a été effectuée à partir de critères spatio-temporels. Cependant, la force du promoteur sélectionné n'a pas été étudiée et comparée à la force du promoteur *pP5CDH*. Une partie de cet écart dans la proportion de graines anormales produites entre une lignée Col-0 et la lignée transformée pourrait donc également s'expliquer par une expression de *P5CDH* induite par le promoteur *pAT5G16460* moins forte que celle du promoteur endogène de *P5CDH*.

L'ensemble de nos résultats montrent cependant que, en absence de *P5CDH*, seule la phase de maturation de l'embryon est perturbée. Des expériences complémentaires sont maintenant nécessaires pour déterminer les rôles respectifs de l'embryon et/ou de l'albumen dans ce phénotype.

Chapitre 4 : Impact de la mutation *p5cdh*
sur le gamétophyte mâle : une nouvelle
histoire ?

Les résultats détaillés dans le chapitre 2 montrent que P5CDH est un élément clé du développement de la graine. En effet, cette enzyme permettrait la navette de pouvoir réducteur entre la mitochondrie et le cytosol, et est déterminante pour le maintien de capacités photosynthétiques permettant un métabolisme aérobie et une production d'énergie suffisante pour permettre la maturation de la graine. Cependant, bien que des expériences de complémentation aient été effectuées, les compartiments dans lesquels l'expression de *P5CDH* est nécessaire pour le bon développement de la graine restent indéterminés. En effet, une lignée induisant l'expression de *P5CDH* uniquement dans l'embryon n'a permis qu'une complémentation partielle du phénotype, suggérant que l'environnement tissulaire de l'embryon avait également son importance dans le phénotype.

Pour répondre à cette question, nous avons fait varier le génotype des différents compartiments au travers de croisements réciproques de mutants *p5cdh* homozygotes avec des mutants hétérozygotes et avec Col-0. L'analyse de la morphologie des graines obtenues à l'issue de ces croisements et de l'autofécondation de mutants hétérozygotes pour *p5cdh* s'est avérée surprenante. En effet, les croisements ont systématiquement produit moins de graines morphologiquement anormales que ce qui était attendu. Ces résultats semblent confirmer que les compartiments autour de l'embryon influent sur le phénotype *p5cdh* dans la graine. Cependant, ils peuvent également s'expliquer par un impact de la mutation *p5cdh* sur le développement du gamétophyte femelle et/ou mâle, rendant ainsi les événements de fécondation avec des gamètes *p5cdh* moins fréquents qu'avec des gamètes WT chez des hétérozygotes. Ces deux hypothèses ne sont pas exclusives l'une de l'autre. La distribution des génotypes s'est effectivement avérée déséquilibrée lorsque le parent mâle était hétérozygote, indiquant alors un impact de la mutation sur le développement du pollen. De plus, si les grains de pollen *p5cdh* présentent une morphologie externe normale, leur viabilité est fortement réduite.

Ces observations ouvrent la voie à de nouvelles recherches sur le rôle de P5CDH dans le développement du pollen. Un parallèle peut également être fait avec les rôles déjà établis de P5CDH et du catabolisme de la proline dans le développement de la graine et la sénescence. Ainsi, le catabolisme de la proline pourrait être important au cours du développement et de la maturation du pollen, ainsi qu'à la préparation de ce dernier à la déshydratation, processus marquant la fin du développement du pollen. Ces résultats sont présentés dans le chapitre suivant.

Nous avons montré que les mutants *p5cdh* produisent des graines anormales lorsqu'ils sont cultivés avec un apport d'azote non limitant. L'origine spatiale de ce phénotype a été recherchée. Au cours du développement de la graine et dès le début de la phase de maturation, l'embryon absorbe progressivement la quasi-totalité de l'albumen (Baud *et al.*, 2008). Or, les communications et échanges entre embryon et albumen étant nombreux, la persistance de l'albumen lors de cette phase de maturation peut donc impliquer un maintien de ces échanges et donc modifier défavorablement l'influence réciproque d'un compartiment sur le développement de l'autre (Doll & Ingram, 2022). Ainsi, afin d'établir si l'origine du phénotype *p5cdh* dans la graine est déterminée par l'embryon et/ou l'albumen, différents croisements ont été effectués afin de faire varier le génotype de ces deux compartiments. Nous avons alors calculé la proportion de graines anormales produites par l'autofécondation de mutants hétérozygotes pour *p5cdh*, et par des croisements réciproques de mutants hétérozygotes pour *p5cdh* avec des mutants homozygotes pour *p5cdh*.

I. Le phénotype *p5cdh* n'est que partiellement lié à l'embryon

Dans un premier temps, des croisements réciproques Col-0 x *p5cdh* ont été initiés afin d'induire une variation allélique de *P5CDH* dans l'albumen triploïde (**Fig 1**). Aucune différence dans la proportion de graines anormales n'a été établie quel que soit le sens du croisement. Ces résultats permettent d'éliminer l'hypothèse d'une implication dans le phénotype de l'enveloppe de la graine qui est diploïde et d'un génome entièrement d'origine maternel. Ces résultats peuvent suggérer une absence d'influence de l'albumen dans le phénotype. Cependant, l'hypothèse d'une influence de l'albumen dans le phénotype est très délicate à déterminer sur la base de ces seuls croisements. En effet, ces croisements ne permettent pas d'obtenir un albumen totalement mutant pour *p5cdh* et sauvage pour l'embryon. L'albumen étant triploïde, ces croisements ne peuvent faire varier la présence de l'allèle muté *p5cdh* que d'une à deux copies tout en maintenant au moins une copie *P5CDH* sauvage. Or la mutation *p5cdh* n'induit un phénotype que lorsqu'elle est présente à l'état homozygote. De plus, il n'est

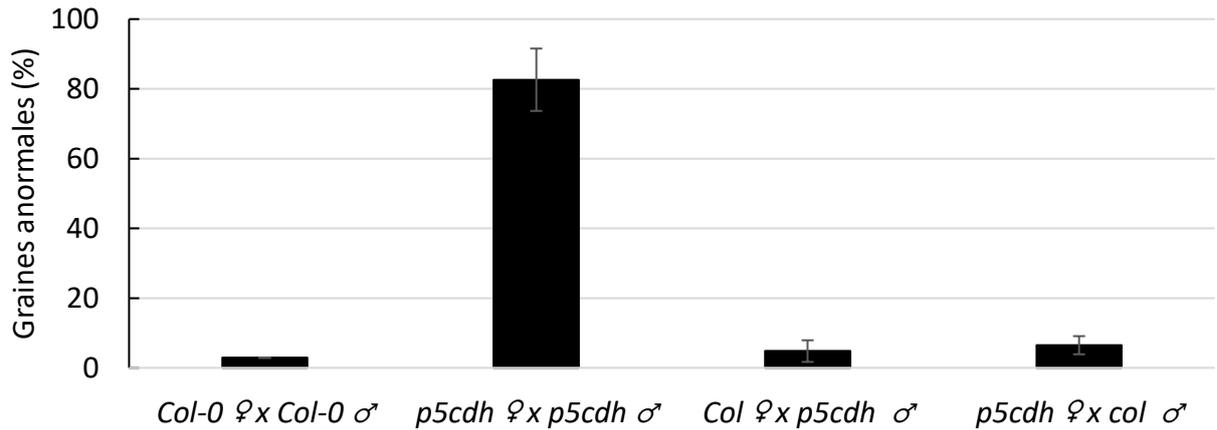


Figure 1: Proportion de graines morphologiquement anormales obtenues après différents croisements

Les plantes Col-0 et homozygotes pour *p5cdh* ayant servi aux croisements ont été cultivées avec 10 mM de nitrates. n>2000. Statistiques : Student, seuil = 0,05

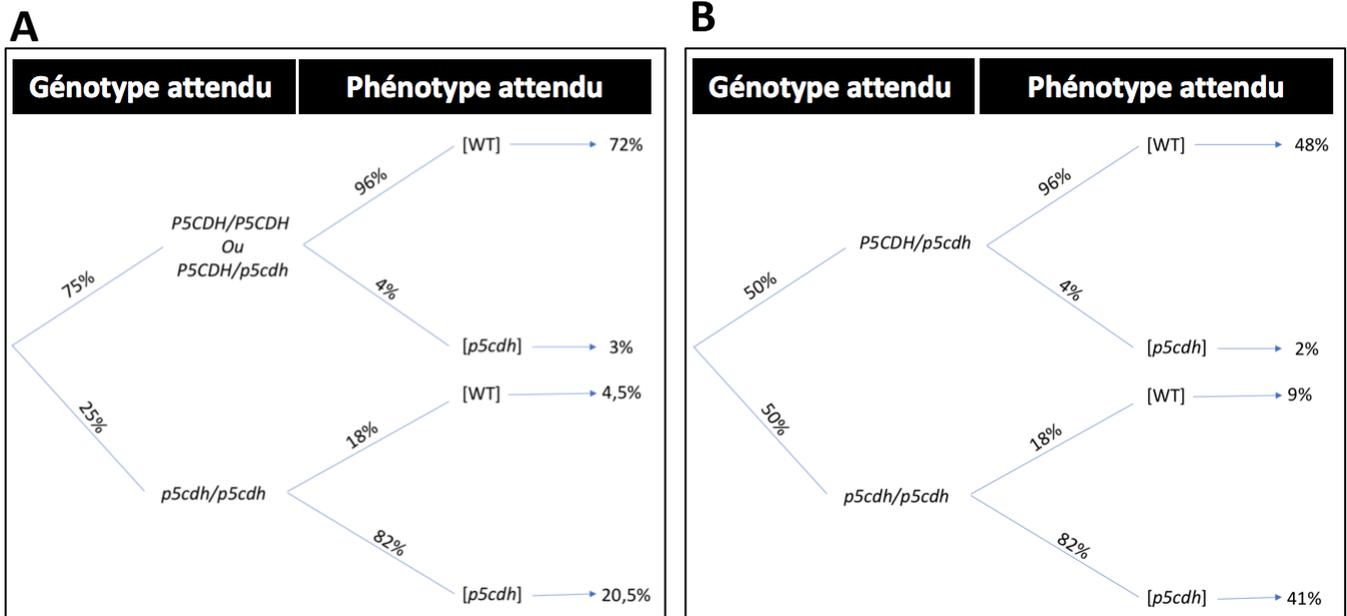


Figure 2: Proportions attendues des différents phénotypes associés à la mutation *p5cdh* en fonction du croisement de plantes cultivées en présence de 10 mM de nitrates.

A: Autofécondation d'hétérozygotes pour la mutation *p5cdh*. B: Croisements réciproques d'hétérozygotes avec des homozygotes pour la mutation *p5cdh*.

pas possible d'induire des variations génétiques dans l'albumen sans influencer le génome embryonnaire ce qui rend l'étude indépendante des deux compartiments impossible.

La seule condition qui permettrait d'éliminer l'albumen comme étant à l'origine du phénotype serait que *P5CDH* soit soumis à une empreinte parentale dans l'albumen. Cependant, cette hypothèse paraît peu plausible puisque ce gène n'a jamais été identifié dans les études ayant mis en évidence des gènes soumis à empreinte parentale (Grossniklaus *et al.*, 1998; Hsieh *et al.*, 2011; del Toro-De León *et al.*, 2014; Moreno-Romero *et al.*, 2019). De plus, il apparaît que parmi les gènes soumis à empreinte parentale, nombreux sont ceux impliqués dans la mise en place de ces empreintes comme *MEDEA (MEA)*, *FERTILIZATION INSENSITIVE SEED2 (FIS2)* et *FERTILIZATION INDEPENDANT ENDOSPERM (FIE)* (del Toro-De León *et al.*, 2014; Moreno-Romero *et al.*, 2019). Or *P5CDH* n'est pas un gène impliqué dans ce type de mécanisme.

Puisque *P5CDH* n'est pas ne semble pas soumis à empreinte parentale, ces croisements réciproques indiquent seulement que dans un tissu triploïde comme l'albumen, une seule version de *P5CDH* est suffisante pour assurer sa fonction. La mise en évidence de l'influence de l'albumen sur le phénotype *p5cdh* dans la graine devra donc être effectuée grâce à la création de lignées mutantes *p5cdh* exprimant *P5CDH* sous l'influence du promoteur *RGP3*, gène s'exprimant spécifiquement dans l'albumen (Rautengarten *et al.*, 2011). La création de telles lignées est actuellement en cours.

L'hypothèse selon laquelle l'embryon serait à l'origine du phénotype a été également testée. La proportion de graines anormales produites par l'autofécondation de mutants hétérozygotes pour *p5cdh*, et par les croisements réciproques de mutants homozygotes pour *p5cdh* avec des mutants hétérozygotes a été calculée en tenant compte de la caractéristique suivante : après autofécondation, les mutants *p5cdh* cultivés sous 10 mM nitrates produisent en moyenne 82% de graines anormales alors que Col-0 produit 4% de graines anormales (**Fig 2**). Donc si l'origine du phénotype est exclusivement embryonnaire, en tenant compte de la proportion de graines anormales produites par les mutants homozygotes pour *p5cdh* en conditions de nitrates élevées, les proportions attendues de graines anormales seraient les suivantes : 23,5% pour l'autofécondation des mutants hétérozygotes, et 43% pour les deux croisements réciproques de mutants hétérozygotes avec des mutants homozygotes (**Fig 3**). En effet, le croisement d'un mutant hétérozygote et d'un mutant homozygote pour *p5cdh* devrait

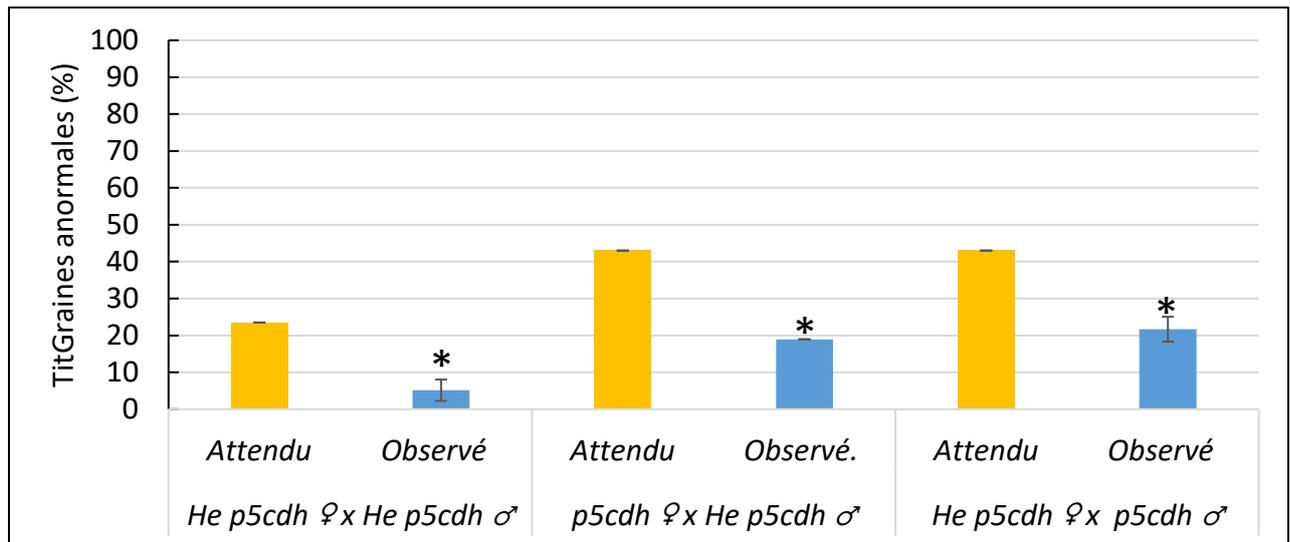


Figure 3: Proportion de graines anormales produites selon différents croisements.

Graines produites par l'autofécondation de mutants hétérozygotes pour la mutation *p5cdh* et par les croisements réciproques de mutants hétérozygotes avec des mutants homozygotes pour *p5cdh*. N>500. Test statistique: Khi-2 au seuil de 0,05. Les croisements ont été effectués sur des plantes cultivées en présence de 10mM de nitrates. Les valeurs attendues ont été estimées à partir des lois de génétique mendéliennes sur la transmission d'un locus et à partir des proportions de graines anormales produites par l'autofécondation de Col-0 et de mutants homozygotes pour *p5cdh* dans les mêmes conditions de culture.

produire 50% de mutants homozygotes *p5cdh* qui eux-mêmes devraient produire 82% de graines anormales, soit 43% de graines anormales au total. Pour l'autofécondation de mutants hétérozygotes pour *p5cdh*, en suivant le même raisonnement, 23,5% des graines produites devraient être morphologiquement anormales puisque 25% des embryons devraient être homozygotes pour la mutation *p5cdh* (**Fig 2**).

Au final, les résultats obtenus sont les suivants : dans tous ces cas, la proportion de graines anormales observée a été significativement inférieure par rapport aux valeurs attendues (**Fig 3**). En effet, les mutants hétérozygotes autofécondés ont produit 5% de graines anormales comme le ferait un individu sauvage. Et les croisements réciproques de mutants hétérozygotes avec des mutants homozygotes pour *p5cdh* ont produit 18,94% de graines anormales lorsque le mutant homozygote pour *p5cdh* était le parent femelle, et 21,67% de graines anormales lorsque le mutant homozygote pour *p5cdh* était le parent mâle. A l'issue de ces observations, le test χ^2 de comparaison entre les valeurs attendues et observées pour les graines anormales a indiqué que l'embryon seul ne pouvait être responsable du phénotype *p5cdh*. De plus, des tests supplémentaires testant l'absence d'implications des gamétophytes dans le phénotype comme hypothèse H0 nous ont également fait rejeter l'hypothèse H0. Par ailleurs, les lignées de complémentation construites afin d'exprimer *P5CDH* spécifiquement dans l'embryon n'ont permis d'obtenir qu'une complémentation partielle puisque 42% des graines produites par cette lignée étaient anormales contre 82% pour une lignée *p5cdh* mutante (Dourmap *et al.*, en préparation (chapitre 2)).

Ainsi, l'ensemble de ces données nous a permis de déterminer que l'embryon seul n'est pas responsable du phénotype observé, les autres compartiments de la graine, à savoir l'albumen et/ou les téguments, étant également impliqués.

II. La mutation *p5cdh* induit une répartition non mendélienne des allèles

L'analyse de ces différents croisements impliquant les mutants hétérozygotes a soulevé une autre hypothèse de travail : la mutation *p5cdh* affecterait-elle le développement des gamétophytes ? En effet si un gamétophyte mutant mâle ou femelle est défavorisé lors

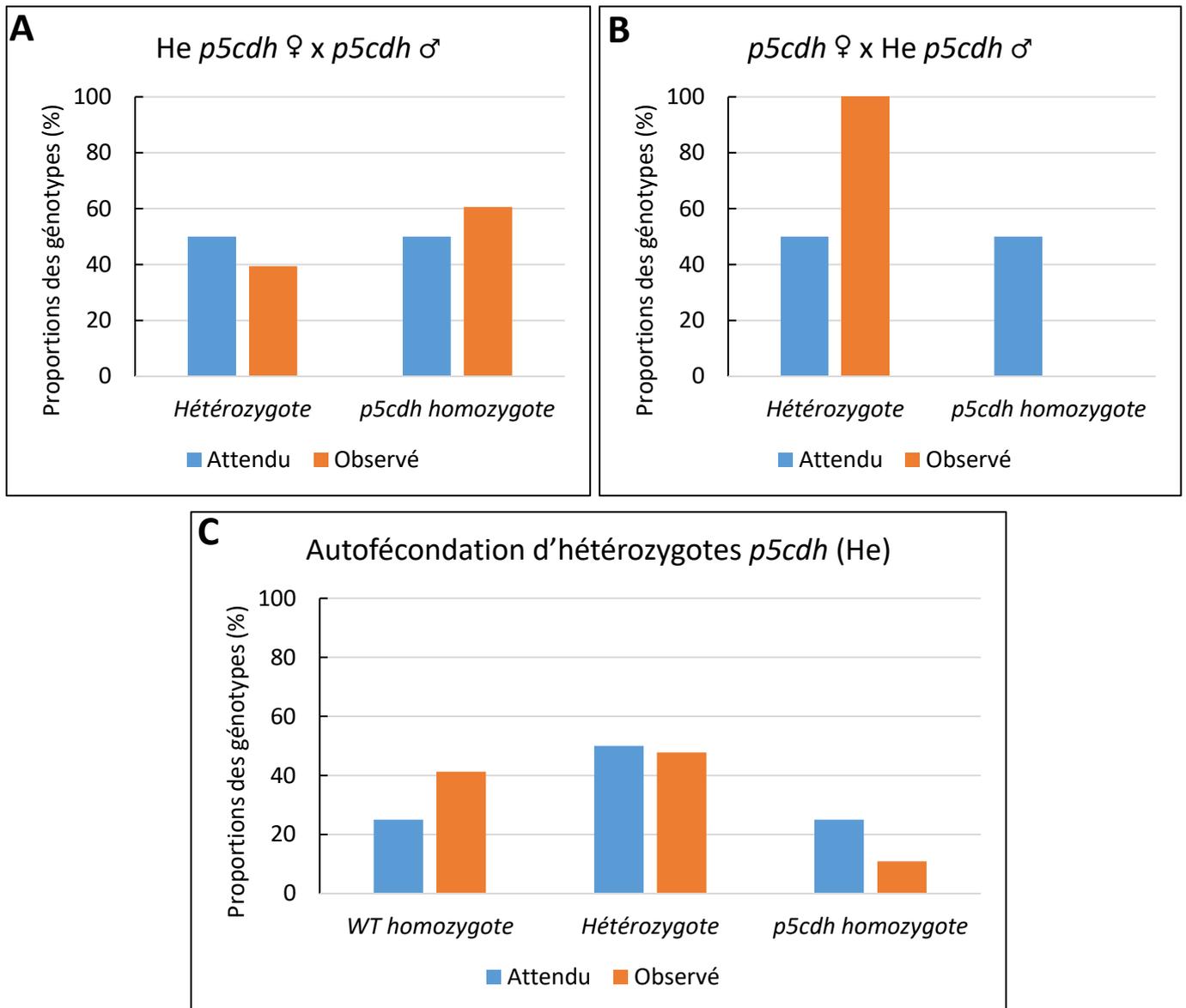


Figure 4: Répartition des génotypes dans la descendance de différents croisements (A,B) et d'autofécondation d'un hétérozygote pour *p5cdh* (C).

Les valeurs attendues ont été calculées à partir des lois de génétique mendélienne sur la transmission d'un locus. A, Descendance de croisements d'hétérozygotes *p5cdh* en parent femelle avec un homozygote *p5cdh* en parent mâle. B, Descendance de croisements d'homozygotes *p5cdh* en parent femelle avec des hétérozygotes *p5cdh* en parents mâles. C: Descendance issue de l'autofécondation de mutants hétérozygotes *p5cdh*.

Pour ces différents croisements, les plantes ont été cultivées en présence de 10 mM de nitrates.

de la pollinisation, alors les proportions attendues de graines anormales issues de cette pollinisation le seront également, puisque seules les graines homozygotes mutantes sont anormales.

Nous avons donc cherché à évaluer l'impact potentiel de la mutation *p5cdh* sur les gamétophytes mâles et femelle. Pour cela, la descendance des croisements précédemment effectués a donc été génotypée (**Fig 4**). Dans le cas de croisements réciproques de mutants *p5cdh* homozygotes avec des mutants *p5cdh* hétérozygotes, selon la répartition mendélienne des allèles, il était attendu que 50% de la descendance soit hétérozygote tandis que les 50% restants devaient être homozygotes pour la mutation *p5cdh*. Lorsque le mutant hétérozygote était le parent femelle, la répartition attendue des allèles était respectée avec 39,4% et 60,6% de mutants hétérozygotes et homozygotes respectivement (χ^2 , p-value = 0,45). Au contraire, lorsque le mutant homozygote *p5cdh* était le parent mâle, la répartition attendue des allèles n'était pas respectée puisque toutes les plantes générées dans la descendance étaient hétérozygotes (χ^2 , p-value = $1,1 \cdot 10^{-10}$). Enfin, l'autofécondation de plantes hétérozygotes pour la mutation *p5cdh* devait conduire à 25% de WT homozygotes, 50% de mutants hétérozygotes et 25% de mutants homozygotes pour *p5cdh* ; or les génotypes obtenus étaient répartis comme suit : 10,9% de mutants *p5cdh* homozygotes, 41,3% de WT homozygotes et 47,8% d'hétérozygotes. La proportion obtenue des hétérozygotes était bien celle attendue dans ce dernier cas, mais un enrichissement en homozygotes WT au détriment des homozygotes *p5cdh* a été constaté. Ce déséquilibre dans la répartition des allèles seulement lorsque le parent mâle est hétérozygote suggère donc que le développement du gamétophyte mâle et/ou sa germination sont affectés par la mutation *p5cdh*.

III. La mutation *p5cdh* entraîne une perte de la viabilité du pollen.

Nous avons donc cherché à déterminer les caractéristiques du pollen des mutants *p5cdh*. Dans un premier temps, les grains de pollen issus des plantes sauvages, *p5cdh-2* et *p5cdh-3* cultivées en présence de 2 ou 10 mM de nitrates, ont été observés en microscopie

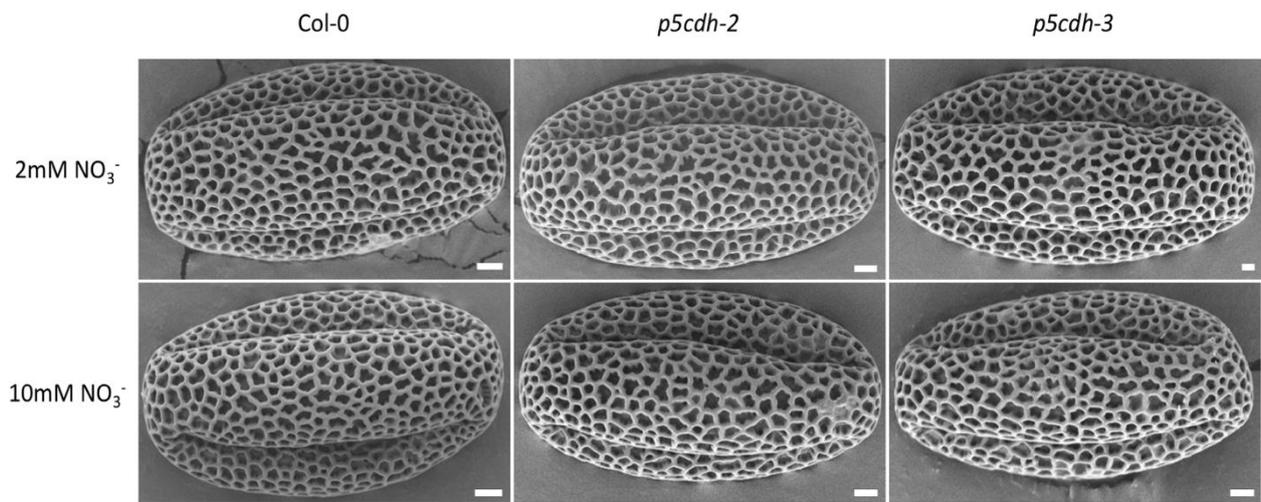


Figure 5: Grains de pollen observés en microscopie électronique à balayage. Échelle = 2µm

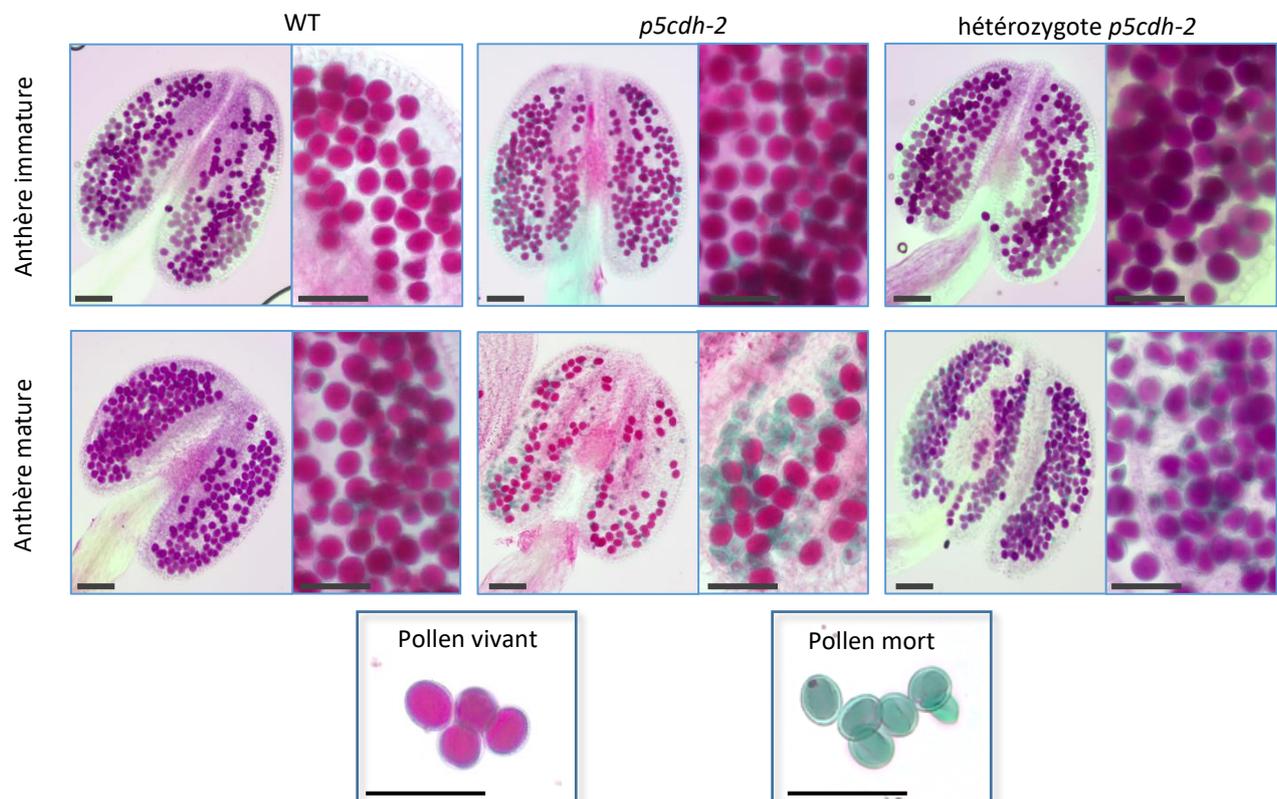


Figure 6: Tests de viabilité sur le pollen réalisés sur des anthères matures et immatures de plantes cultivées sur 10mM de nitrates. Les anthères prélevées sur des fleurs ouvertes (matures) et non ouvertes (immatures) ont été colorées par la solution d'Alexander puis les grains de pollen ont été observés en microscopie optique. Echelle = 50 µm

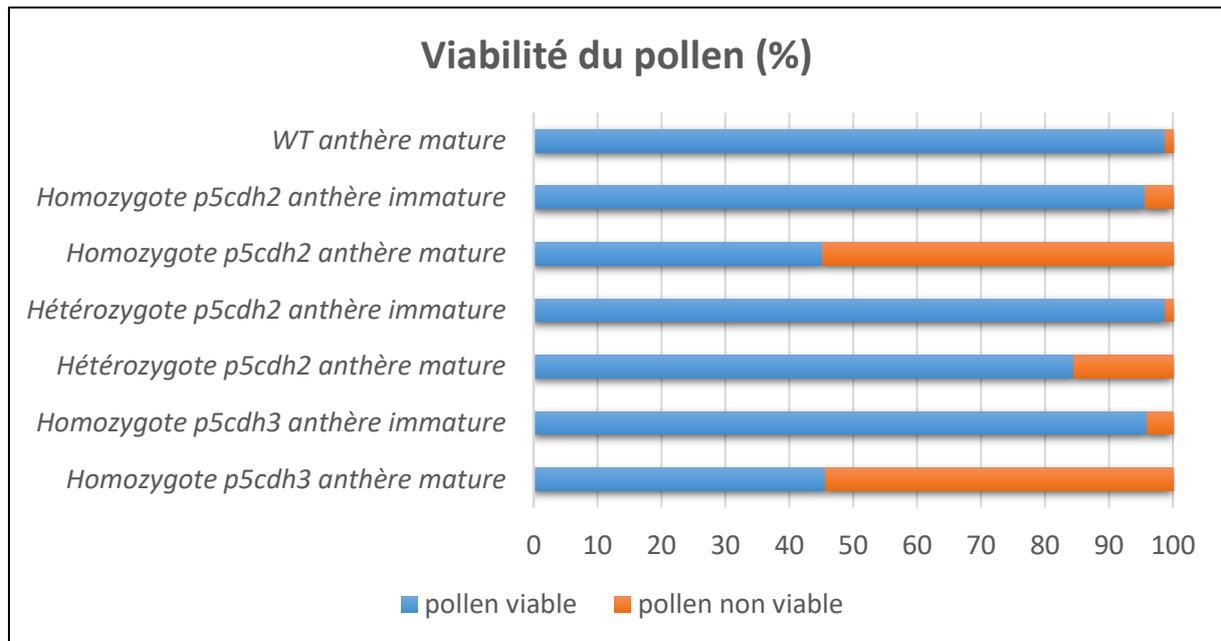


Figure 7: Proportion de grains de pollen viables et non-viables dans les anthères matures et immatures de Col-0, de mutants *p5cdh* homozygotes et hétérozygotes cultivés avec 10 mM de nitrates. L'observation est effectuée en microscopie optique après coloration du pollen par la solution d'Alexander. n > 4000

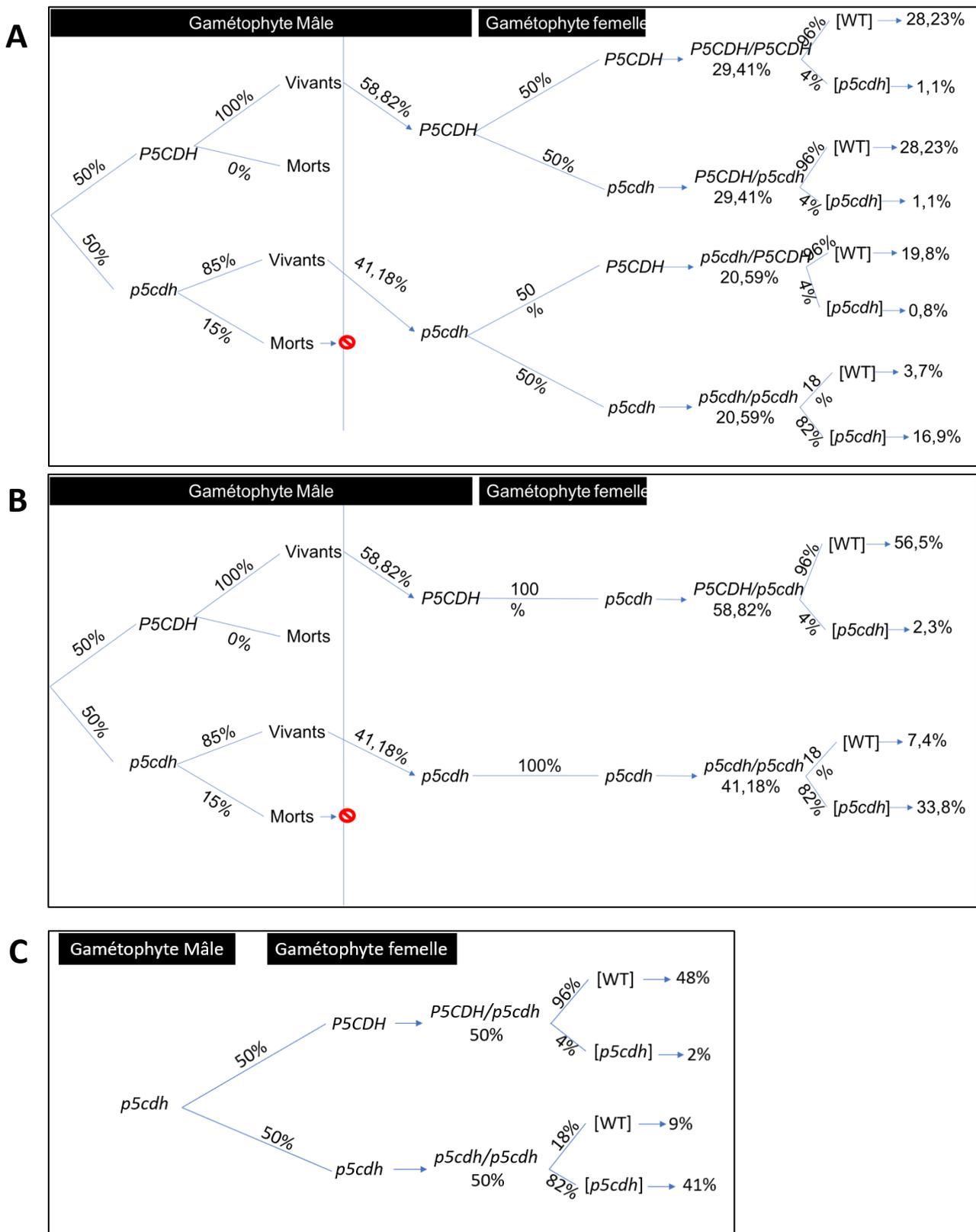


Figure 8: Proportions attendues des différents phénotypes associés à la mutation *p5cdh* en fonction du croisement sachant l'impact de la mutation sur la viabilité du pollen

A: Autofécondation d'hétérozygotes pour la mutation *p5cdh*. B: Croisements d'homozygotes *p5cdh* en parent femelle avec des hétérozygotes *p5cdh* en parent mâle. C: Croisements d'hétérozygotes *p5cdh* en parent femelle avec des homozygotes *p5cdh* en parents mâles.

électronique à balayage (**Fig 5**). Aucune différence morphologique visible n'a été détectée entre les différents génotypes ou traitements.

Ensuite des tests de viabilité d'Alexander ont été effectués sur des pollen immatures et matures (**fig 6**). Presque tous les grains de pollen étaient vivants dans l'anthère immature, quel que soit le génotype : 98,75% et 95,8% des grains de pollen chez les mutants hétérozygotes et mutants homozygotes pour *p5cdh* respectivement (**Fig 7**). Dans l'anthère mature, 98,83% des grains de pollen étaient viables chez Col-0 ; par contre dans l'anthère mature des mutants homozygotes pour *p5cdh*, seulement 45,15% des grains de pollen étaient viables. Enfin dans l'anthère mature du mutant hétérozygote pour *p5cdh*, 84% des grains de pollen étaient vivants. Ces résultats confirment donc que la mutation *p5cdh* entraîne une perte de la viabilité du pollen, cette perte de viabilité intervenant lors de la phase de maturation des grains de pollen.

Considérant l'impact de la mutation *p5cdh* sur le développement des gamétophytes, l'hypothèse d'une cause embryonnaire du phénotype a été testée à nouveau (**Fig 8**). Pour cela les valeurs attendues ont été modifiées en fonction du taux de mortalité du pollen *p5cdh*. En effet seuls 45% des grains de pollen des mutants homozygotes pour *p5cdh* et 85% des grains de pollen des mutants hétérozygotes pour *p5cdh* étaient viables. Malgré cela, la p-value obtenue à ce test de χ^2 ne nous a pas permis de conclure avec certitude à une cause embryonnaire du phénotype. Dans tous ces croisements, au moins une version sauvage de *P5CDH* était encore présente dans un compartiment de la graine. On peut donc imaginer qu'en raison des échanges permanents entre l'embryon et l'albumen, la présence d'une version sauvage de *P5CDH* dans l'albumen entourant l'embryon est suffisante pour restaurer un phénotype WT.

Il est intéressant de noter que le développement du pollen a des points communs avec celui de la graine. En effet, il entre dans une phase de maturation au cours de laquelle il accumule des sucres, des lipides, des transcrits et des protéines avant une phase finale de déshydratation contrôlée. Lors de cette dernière, la cellule végétative du pollen conserve sa viabilité grâce à l'accumulation de solutés osmoprotectants comme la proline ou la glycine-bétaïne (Schwacke *et al.*, 1999; Buitink & Leprince, 2008). Les tests de viabilité ont révélé que le taux de mortalité des grains de pollen *p5cdh* augmentait fortement entre l'état immature et l'état mature de l'anthère. Il est donc plausible que ces grains de pollen meurent au cours

de leur phase de déshydratation. Par ailleurs, Zheng *et al.* (2021) ont montré que le métabolisme de la proline pourrait constituer une navette de pouvoir réducteur entre le cytosol où la proline est synthétisée et la mitochondrie où elle est dégradée. Ce système est semblable à la valve malate ou la valve glycérol-3-phosphate. Il est apparu dans le chapitre 2 que cette navette de pouvoir réducteur assurée par le métabolisme de la proline est cruciale pour l'approvisionnement en énergie durant le développement de la graine et sa déshydratation. La même situation pourrait se retrouver dans le développement du pollen. En effet, chez les mutants *p5cs1 p5cs2/P5CS2*, l'absence de synthèse de la proline entraîne une production de pollen stérile et non viable (Mattioli *et al.*, 2012). De plus, comme le propose Mattioli *et al.* (2012), la proline pourrait servir de substrat énergétique au cours de l'élongation du tube pollinique. Une incapacité à la dégrader engendrerait ainsi un désavantage donnant encore moins de chances à un pollen *p5cdh* de parvenir à féconder un gamétophyte femelle qu'un grain de pollen WT.

Un nouveau chapitre s'ouvre donc maintenant concernant l'impact de la mutation *p5cdh* sur le développement du gamétophyte mâle. Afin de caractériser plus précisément cet impact et de vérifier si le rôle de P5CDH dans le développement du pollen est similaire à celui qui lui est attribué dans le cadre du développement de la graine, il conviendra de compléter cette étude par de nouvelles analyses cytologiques, métaboliques et protéomiques.

Discussion générale
et
Perspectives

I. Discussion générale

Les études initiales sur le mutant *p5cdh* indiquaient une perturbation du métabolisme azoté et des graines à faible capacité germinative (Deuschle *et al.*, 2001 ; 2004). Cette thèse s'est donc attachée dans un premier temps à évaluer les capacités de remobilisation du mutant *p5cdh*. Ces travaux ont permis de mettre en évidence un défaut de remobilisation de l'azote et du carbone chez le mutant *p5cdh*, en particulier lorsque ce dernier est cultivé en présence d'une concentration non-limitante en azote. Ils ont pu mettre également en évidence la production par ce mutant de graines morphologiquement anormales. La seconde partie de cette thèse a donc été de comprendre et de caractériser le phénotype de ces graines mutantes pour *p5cdh*, mais également de comprendre le rôle de P5CDH dans le développement de la graine. Il s'agissait en particulier de découvrir à quel moment l'activité P5CDH est cruciale pour le développement de la graine. Les études conduites tout au long de cette thèse ont ainsi permis de mettre en évidence le rôle essentiel de P5CDH au cours de la maturation et de la déshydratation de la graine, le catabolisme de la proline garantissant une production d'énergie et une homéostasie redox optimale pour achever correctement ce programme de maturation. Les points discutés ci-après viennent compléter les discussions développées dans les différents chapitres. Ils s'attachent notamment à établir le lien entre le catabolisme de la proline et le métabolisme de l'azote dans le développement de la graine, à discuter de l'existence d'un cycle P5C-proline au cours du développement de la graine ainsi que du rôle métabolique et signalétique de la proline et de son métabolisme dans le développement reproductif.

1. L'absence de P5CDH induit de grandes perturbations de la balance

Carbone/Azote

1.1. 10mM de nitrates est une concentration non-limitante en azote

Le point de départ de cette thèse était d'évaluer les capacités de remobilisation de l'azote et du carbone chez le mutant *p5cdh*. Les travaux effectués à cet égard et durant tout le projet ont été réalisés avec une alimentation contrastée en azote : 2 mM qui constitue une carence et une condition de forte concentration azote, *i.e.* 10 mM nitrates. Une telle

concentration est non limitante en azote et permet un développement végétatif important (Lemaître *et al.*, 2008). Il est à noter que les cinq premières semaines de cultures se déroulaient en condition de jours courts afin de favoriser au maximum le développement végétatif des plantes et ainsi stimuler la remobilisation au cours de la phase reproductive. En effet ce dispositif permet l'accumulation de réserves azotées dans les organes végétatifs et de maximiser le potentiel de remobilisation de l'azote (Lemaître *et al.*, 2008). Bien que non limitante, une concentration de 10 mM de nitrates ne représente pas pour autant une contrainte pour la plante (Iqbal *et al.*, 2015). En effet, une étude précédente sur des gammes de concentrations en azote chez la moutarde ont permis de montrer qu'une forte concentration en nitrates à partir de 20 mM induit une contrainte saline (Iqbal *et al.*, 2015). En effet à cette concentration, des marqueurs moléculaires de la contrainte saline telles que l'augmentation du niveau d'H₂O₂, de proline, la baisse de l'activité photosynthétique, apparaissent sans que des phénotypes morphologiques puissent être observés (Iqbal *et al.*, 2015). 10 mM de nitrate est donc une concentration d'azote optimale, non-limitante et non stressante pour la plante. Le système de culture utilisé était totalement minéral, et l'azote n'était apporté que sous forme de nitrates. L'hypothèse que cette forme d'azote pourrait avoir une influence dans le phénotype *p5cdh* a donc été étudiée. L'étude de hampes florales isolées de la partie végétative de la plante et mises à pousser dans une solution nutritive avec 10 mM de nitrates ou avec des acides aminés asparagine et glutamine comme source d'azote a permis de répondre à cette question. En effet, les proportions de graines anormales produites par *p5cdh* étaient identiques quelle que soit la forme d'azote appliquée. Il en était de même pour Col-0 qui, en présence d'acides aminés produisait des graines morphologiquement normales. Par conséquent, le phénotype observé chez le mutant *p5cdh* ne semble pas lié à la forme d'azote. Il n'y a de surcroît, aucune différence significative entre les teneurs de nitrates et de nitrites observées entre les graines en cours de développement et les graines sèches des mutants *p5cdh* et celles produites par Col-0. La réduction des nitrates en nitrites puis en ammonium semble donc se faire normalement.

1.2. Les fortes teneurs en ammonium sont le reflet d'une perturbation

Carbone/Azote

De grandes disparités ont été mises en évidence concernant les teneurs en ammonium entre les graines de mutants *p5cdh* et Col-0. Ces fortes teneurs en ammonium semblent être le témoin d'un déséquilibre de la balance Carbone/Azote. On retrouve en effet parmi les nombreux acides aminés libres présents dans les graines des mutants *p5cdh* des proportions plus importantes d'acides aminés riches en azote tels que la lysine, l'arginine ainsi que leurs dérivés urate et pipecolate, ce qui indique une certaine saturation des squelettes carbonés en azote. En effet, le défaut de remobilisation observé chez le mutant *p5cdh* est plus accentué pour le carbone que pour l'azote. Or les quantités de carbone remobilisées sont également plus importantes que les quantités d'azote remobilisées. En valeur absolue, un défaut de remobilisation du carbone a donc un plus grand impact qu'un défaut de remobilisation de l'azote. L'ammonium libre présent en grande quantité dans les graines des mutants *p5cdh* serait ainsi dû au manque de squelettes carbonés permettant d'accepter de l'azote pour son assimilation. Il peut également être dû à une désamination des acides aminés qui seraient alors catabolisés pour alimenter le métabolisme énergétique.

Bien que plus important pour le carbone, ce déficit de remobilisation touche également le métabolisme de l'azote, ce qui pourrait provoquer une certaine carence en azote chez *p5cdh*. Or, une telle carence a des répercussions au niveau de la mise en place des parois avec notamment une diminution de l'expression des expansines (Zheng, 2009). L'analyse protéomique a aussi mis en évidence une diminution des teneurs de plusieurs protéines impliquées dans la mise en place de ces parois cellulaires telles que l'EXPANSIN 23 (EXP23) qui présente des teneurs 3 fois inférieures chez *p5cdh* en début de maturation par rapport à celles observées chez Col-0. On retrouve également dans les résultats des analyses métabolomiques de plus fortes teneurs en myo-inositol et hydroxyproline qui sont des composés associés aux glycoprotéines des parois. Ces derniers seraient alors moins utilisés. Enfin de plus fortes teneurs en tréhalose-6-phosphate (T6P) ont été mesurées dans les graines des mutants *p5cdh* au cours de la maturation. Il est acquis aujourd'hui que le T6P a un rôle de molécule signal régulant différents aspects du développement, telles que la floraison et l'embryogenèse, en régulant en particulier l'assimilation du carbone et les besoins énergétiques des cellules en sucres (Ponnu *et al.*, 2011; Fichtner & Lunn, 2021).

Il est donc possible que ces plus fortes teneurs en T6P observées participent aux défauts de remobilisation observés.

1.3. Le recyclage de l'azote est perturbé chez les mutants *p5cdh*

La voie de l'Ornithine-Aminotransférase (OAT) constitue un des liens entre le catabolisme de la proline et le recyclage de l'azote. On retrouve d'ailleurs chez le mutant *oat* du riz des similarités phénotypiques avec le mutant *p5cdh* chez *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2018). En effet, l'OAT chez le riz est fortement exprimée dans les tissus reproducteurs. Chez le mutant *oat* du riz, comme chez le mutant *p5cdh* chez *Arabidopsis*, les grains de pollen produits n'ont aucune altération morphologique visible et sont normalement libérés de l'anthere, mais leur capacité de pollinisation est faible (Liu *et al.*, 2018). Les graines produites après fécondation sont en revanche anormales, de taille réduite et présentent un défaut de remplissage. L'ajout d'urée dans le milieu permettant de restaurer un phénotype sauvage chez le riz, ce défaut viendrait donc d'un problème de réutilisation de l'azote (Liu *et al.*, 2018). Cependant, la comparaison avec *p5cdh* chez *Arabidopsis* semble délicate à établir. En effet, le mutant *oat-2* chez *Arabidopsis* ne montre aucun phénotype particulier, il produit des graines morphologiquement normales et l'embryon *oat-2* présente un phénotype au sauvage. Il est important de noter que le double mutant *p5cdh-oat* présente un phénotype similaire au simple mutant *p5cdh*. Le phénotype *p5cdh* étant aggravé par un fort apport en azote, un problème de réutilisation de l'azote pourrait donc néanmoins exister. Il se caractériserait alors par une impossibilité de P5CDH de prendre en charge le P5C produit par l'OAT bloquant ainsi cette voie de recyclage. L'accumulation de proline constatée constituerait alors un réservoir d'azote et de carbone inutilisable.

Le recyclage de l'azote au cours de la phase reproductive a pour point de départ la sénescence des parties végétatives qui est induite par le déclenchement de la floraison (Wuest *et al.*, 2016). Une perturbation de la sénescence chez le mutant *p5cdh* semblerait logique en raison de son défaut de remobilisation. C'est en effet ce qui a été observé par Zheng *et al.* (en révision) au cours de la sénescence induite par l'obscurité (Dark-Induced Senescence - DIS). Cependant ces derniers n'ont pas noté de différences dans la mise en place de cette sénescence entre le mutant *p5cdh* et Col-0 contrairement à ce qui a pu être constaté dans

notre étude. En effet, le jaunissement des feuilles de rosette est apparu plus tardivement chez les mutants *p5cdh* que chez Col-0, bien que les dates de floraison observées chez Col-0 et *p5cdh* soit comparables. En revanche, la floraison chez les mutants *p5cdh* dure plus longtemps que chez Col-0. Cela peut s'expliquer par un défaut de fécondation de nombreuses fleurs, ce phénomène est peut-être lié à une plus grande létalité du pollen. La perturbation de la phase de maturation puis la mort de l'embryon peut ainsi conduire à un arrêt de l'appel de nutriments de la part de la graine. L'arrêt de cet appel de nutriments peut alors expliquer le défaut de remobilisation constaté chez les mutants *p5cdh*. Une moindre remobilisation peut induire un moindre besoin de recyclage des ressources dans les parties végétatives. Cela expliquerait alors une sénescence moindre ou ralentie observée par un jaunissement de la rosette plus tardif.

2. Analyse de la toxicité du P5C et de l'existence d'un cycle P5C-Proline

2.1. Les niveaux de P5C ne présentent pas de toxicité dans les graines des mutants *p5cdh*

En absence de régulation de ProDH par P5CDH, le blocage du catabolisme de la proline chez les mutants *p5cdh* devrait aboutir à une accumulation de P5C. A ce titre, la toxicité du P5C est régulièrement évoquée (Hellmann *et al.*, 2000; Deuschle *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2021). En effet, chez le mutant *put2*, homologue de *P5CDH* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, de hauts niveaux de P5C sont notés et s'accompagnent également de hauts niveaux de ROS (Deuschle *et al.*, 2001). Chez l'homme, il est établi qu'une élévation des niveaux de P5C induit une apoptose due à une élévation des niveaux de ROS (Maxwell & Davis, 2000). P5CDH est d'ailleurs une cible du suppresseur de tumeur p53 et les niveaux de PCD induit par cette dernière augmentent ainsi en cas de KO *p5cdh* (Maxwell & Davis, 2000). Chez Arabidopsis, la PCD donne lieu à une accumulation d'acides aminés ramifiés (BCAA) (valine, isoleucine, leucine) (Sew *et al.*, 2016) et à l'induction de gènes parmi lesquels le gène *SENESCENCE ASSOCIATED GENE 12 (SAG12)* (Havé *et al.*, 2017). Or aucun de ces deux phénomènes n'est observé dans les graines du mutant *p5cdh*. Les niveaux de P5C mesurés dans nos échantillons présentent effectivement des teneurs plus élevées dans les graines en

cours de maturation des mutants *p5cdh* par rapport à Col-0 mais sans que cela ne provoque des nécroses comme observé par Hellmann *et al.* (2000) lors d'une forte accumulation de P5C à la suite d'une application exogène de proline.

2.2. La mutation *p5cdh* n'induit pas de cycle P5C-Proline

Dès lors, la possibilité de l'existence d'un cycle P5C-proline qui permet le passage du P5C généré dans la mitochondrie par la ProDH vers le cytosol pour y être pris en charge par la P5CR a été proposé chez les plantes par Miller *et al.* (2009). Ce cycle, générateur de ROS pourrait alors expliquer les fortes teneurs en proline retrouvées chez le mutant *p5cdh* après un stress alors que la première étape du catabolisme de la proline est toujours fonctionnelle et devrait produire du P5C (Miller *et al.*, 2009). En effet, un tel cycle induirait une augmentation de l'activité ProDH. Or cette enzyme a également la capacité d'oxyder l'oxygène et de produire des ROS (Lee *et al.*, 2013). Cependant, des éléments vont à l'encontre de l'existence d'un tel cycle dans la graine. En effet, une accumulation de proline 3 fois supérieure à celle observée chez Col-0 a été mesurée dans les graine sèches des double-mutants *prodh1prodh2*. Cependant, cette accumulation est sans commune mesure avec celle mesurée dans les graines sèches des mutants *p5cdh* où la proline est présente dans des teneurs 30 fois supérieures à Col-0. Si un cycle P5C-proline existe, il devrait produire un cycle de synthèse et de dégradation de proline et l'accumulation de proline devrait donc être inférieure chez les mutants *p5cdh* par rapport aux doubles mutants *prodh1prodh2*. De plus, si les analyses en métabolomique ont permis d'établir que les teneurs en P5C étaient plus élevées dans les graines des mutants *p5cdh* par rapport à Col-0, ces teneurs restaient 500 fois inférieures aux teneurs en proline. Enfin, aucune nécrose n'est visible chez *p5cdh* et la recherche de marqueurs de stress oxydant (dosages de MDA, marquage au DAB et NBT, transcrits *CAT1*) n'a pas permis de mettre en évidence un tel stress. Donc de telles teneurs en P5C ne sont probablement pas de nature à provoquer des dommages oxydants. Enfin, les analyses de transcrits du métabolisme de la proline n'ont pas révélées de différences entre Col-0 et mutants *p5cdh* pour les niveaux de transcrits des gènes *P5CR* et *ProDH1*. Cela n'exclut pas une régulation post-transcriptionnelle de ces deux gènes mais la ProDH1 n'a été détectée dans les graines du mutant *p5cdh* ni lors de l'analyse protéomique, ni en western blot. Pris ensemble, ces résultats semblent indiquer

que les éléments prouvant l'existence d'un cycle P5C-proline pouvant générer des ROS ne semblent pas présents dans les graines des mutants *p5cdh*. Les données indiquent en revanche plutôt une coordination de la régulation de l'expression de *P5CDH* et de *ProDH1*. L'absence de P5CDH inhiberait ainsi la ProDH1 pour prévenir l'accumulation de P5C comme cela a déjà été évoqué par Zheng *et al.* (en révision).

3. Impact du catabolisme de la proline dans l'équilibre redox et la production d'énergie

3.1. Liens entre le catabolisme de la proline et l'état redox des cellules

L'absence d'un cycle P5C-Proline et de stress oxydant n'empêche pas une éventuelle désorganisation des équilibres redox dans la cellule. En impactant le catabolisme de la proline, la capacité d'échange de pouvoir réducteur entre la mitochondrie et le cytosol est ainsi compromise et peut se répercuter à l'ensemble de la cellule. Plusieurs mutants impliqués dans ces équilibres redox présentent ainsi des similarités phénotypiques avec le mutant *p5cdh* dans les graines. Ainsi, les graines de la lignée *mmdh*, mutée au niveau de la Malate Déshydrogénase mitochondriale, se caractérisent par un faible verdissement des embryons, un développement embryonnaire arrêté avant le retournement des cotylédons, une perte de viabilité des embryons, et des graines sèches morphologiquement anormales présentant de très faibles taux de germination (Sew *et al.*, 2016). De même, le mutant *ndt2*, muté dans un transporteur impliqué dans l'apport de NAD dans la mitochondrie ne présente pas de phénotype végétatif mais produit des graines plus légères, accumulant des sucres et présentant un profil d'acides gras déséquilibré avec un enrichissement en acides gras saturés et monoinsaturés au détriment des PUFA (Feitosa-Araujo *et al.*, 2020). Un lien entre métabolisme lipidique et proline semble d'ailleurs prégnant. En effet, les mutants affectés dans la synthèse de VLCFA accumulent plus de proline chez *Arabidopsis* (Shinde *et al.*, 2016). Le fait de retrouver un métabolisme lipidique fortement perturbé chez *p5cdh* constitue donc un indice supplémentaire d'une modification de l'état redox des cellules dans la graine du mutant *p5cdh*. En effet, le métabolisme de la proline, comme la synthèse des VLCFA, permettent de maintenir l'homéostasie redox intracellulaire en piégeant ou produisant du pouvoir réducteur (Shinde *et al.*, 2016).

3.2. Quels liens entre le catabolisme de la proline et la production d'énergie au cours de la maturation ?

Cet état redox perturbé peut avoir des répercussions sur le métabolisme énergétique, on observe ainsi en protéomique des niveaux de Cytidine Tri Phosphate (CTP) synthase 3 fois inférieurs à Col-0 dès le début de maturation chez les mutants *p5cdh*. En effet, le pouvoir réducteur produit par le catabolisme de la proline peut être dirigé vers la chaîne de transfert des électrons mitochondriale et ainsi participer à la phosphorylation oxydative. Dès lors, il est étonnant que le phénotype *p5cdh* n'apparaisse qu'en fin d'embryogenèse alors même que la demande énergétique est élevée durant tout le développement de la graine. Cependant, la production d'énergie ne dépend pas des mêmes mécanismes au cours de l'embryogenèse et de la maturation. En effet, au début du développement, la graine est suffisamment petite et les téguments perméables pour assurer un métabolisme aérobie. L'augmentation de volume de la graine et la mise en place de certaines structures imperméabilisantes réduit fortement la diffusion de l'oxygène, ce qui nécessite l'établissement de capacités photosynthétiques au sein même de la graine afin de restaurer un métabolisme aérobie (Borisjuk & Rolletschek, 2009). Le traitement de siliques avec du DCMU (3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée) qui bloque le transfert des électrons au cours de la phase photochimique de la photosynthèse induit une baisse de proline et une hausse de GABA (Allorent *et al.*, 2015). Or le GABA est un marqueur d'une faible disponibilité en oxygène car connu pour être accumulé en cas d'hypoxie (Bouché *et al.*, 2003). Une baisse des niveaux de proline peut également être expliquée par son utilisation pour générer du pouvoir réducteur et de l'énergie comme le propose Launay *et al.* (2019) au cours de la sénescence. Cependant, les teneurs en GABA mesurées dans les graines ne varient pas entre Col-0 et *p5cdh*. L'hypoxie dans les graines des mutants *p5cdh* est donc probablement faible si elle est présente. Ainsi cette hypoxie pourrait perturber la maturation de la graine mais ne constituerait pas un stress. En effet, bien qu'impactant la maturation de la graine en réduisant le niveau d'oxygène, la production d'énergie et de pouvoir réducteur, une absence de verdissement permet tout de même de garantir le programme développemental et la production d'une graine viable (Allorent *et al.*, 2015), ce qui n'est pas le cas chez le mutant *p5cdh*. En impactant le fonctionnement de la mitochondrie, l'absence de P5CDH pourrait également avoir des répercussions sur le fonctionnement du chloroplaste notamment au niveau de l'intégrité des composants de la

photosynthèse. Ces travaux mettent donc également en évidence la nécessité d'une communication entre le chloroplaste et la mitochondrie. Une telle communication peut être assurée par les différents valves permettant le transfert de pouvoir réducteur entre les différents compartiments (Dao *et al.*, 2022). Le bon déroulement de la phase de maturation de la graine repose donc sur trois éléments : un maintien de l'aérobiose grâce aux capacités photosynthétiques de la graine ; la fourniture de pouvoir réducteur par le catabolisme de la proline ; et une homéostasie redox à l'échelle cellulaire permise par le métabolisme de la proline grâce à sa capacité d'échange de pouvoir réducteur entre la mitochondrie et le cytosol.

4. Quelle origine tissulaire pour le phénotype *p5cdh* ?

4.1. Les parties végétatives de la plante ne sont pas à l'origine du phénotype *p5cdh*

Des expériences de hampes florales isolées de leur rosettes et cultivées dans un gradient de solution nutritive allant de 0 à 2 mM de nitrates ont conduit à l'obtention de graines présentant le même phénotype que si elles avaient été obtenues lors d'une culture sur sable arrosée avec 10 mM de nitrates. Or, avec des plantes entières cultivées sur sable, l'intensité du phénotype est dépendante de la dose de nitrates appliquée. Le phénotype est en effet plus marqué lorsque les plantes sont cultivées avec une plus forte concentration en nitrates. Par conséquent, les parties végétatives peuvent atténuer le phénotype en retenant une partie de l'azote apporté aux plantes. Mais elles ne sont pas responsables de ce dernier puisque leur absence aboutit tout de même au phénotype *p5cdh*. Ce phénotype a donc son origine dans la graine même.

4.2. L'environnement tissulaire de l'embryon influe sur son développement

Si le début du développement de l'albumen est tout à fait normal chez *p5cdh* avec une prolifération des noyaux et une cellularisation, sa présence tout au long du processus de maturation dans la graine chez le mutant *p5cdh* empêche de préciser l'origine spatiale du phénotype. Des expériences supplémentaires de complémentation génétique et fonctionnelle ont également été mises en place. Les différents croisements réalisés n'ont pas pu mettre clairement en évidence un compartiment précis à l'origine du phénotype dans la graine. En

effet, même en tenant compte de l'impact de la mutation *p5cdh* sur la viabilité du pollen, la p-value associée aux tests χ^2 vérifiant l'hypothèse d'un embryon responsable du phénotype, bien qu'augmentée, reste largement inférieure au seuil d'acceptation. Chez un mutant hétérozygote *p5cdh/P5CDH* à la suite d'une autofécondation, certaines graines produites possèdent un embryon homozygote pour la mutation. Cependant, les proportions de graines anormales obtenues sont largement inférieures aux prévisions. Il a été montré qu'au cours de son développement, il y a des communications constantes entre l'embryon et son environnement (Doll & Ingram, 2022 ; Wang *et al.*, 2022). Ce dernier se compose de l'albumen mais également des téguments de la graine et du péricarpe de la silique. Ces deux derniers tissus étant diploïdes et à 100% d'origine maternelle, ils possèdent chez un hétérozygote au moins une version sauvage de *P5CDH*. Cette copie sauvage compenserait le défaut de *p5cdh* et ainsi permettrait le développement complet de l'embryon. De plus, la construction génétique réalisée afin de restreindre l'expression de *P5CDH* à l'embryon ne montre qu'une complémentation partielle. C'est une donnée supplémentaire indiquant qu'un seul compartiment de la graine ne peut pas être responsable à lui seul du phénotype observé. Dès lors, l'environnement tissulaire de l'embryon a également son importance et la présence d'un allèle sauvage de *P5CDH* dans ces tissus pourrait permettre une restauration au moins partielle du phénotype dans un embryon mutant.

4.3. Il n'y a pas de désorganisation spatiale de la mise en réserve des lipides chez *p5cdh*

L'absence d'origine spatiale précise peut également laisser penser que les perturbations du développement ne concernent pas que l'embryon. Bien que l'albumen soit toujours présent, on ne constate pas de désorganisation spatiale dans la mise en réserve du carbone. En effet, comme chez le WT, on observe moins de lipides dans l'albumen que dans l'embryon en valeur absolue chez tous les génotypes. Le niveau d'acides gras est tout de même plus élevé dans l'albumen des graines sèches de *p5cdh* par rapport à Col-0 qui peut s'expliquer par la place qu'occupe cet albumen chez les mutants alors qu'il n'en reste qu'une assise cellulaire résiduelle chez Col-0. Une répartition plus équilibrée des acides gras entre l'embryon et l'albumen aurait pu être attendue du fait de la grande part qu'occupe l'albumen

dans la graine des mutants *p5cdh*. Le fait que l'essentiel des lipides s'accumulent dans l'embryon comme chez Col-0 peut indiquer qu'il n'y a pas de désorganisation spatiale de la mise en réserve des lipides. De plus, les acides gras omega-7, connus pour s'accumuler quasi exclusivement dans l'albumen (Troncoso-Ponce *et al.*, 2016), sont bien retrouvés en très grande majorité dans ce tissu.

Cette absence de perturbation spatiale des réserves lipidiques ne signifie pas que la mise en réserve des protéines n'est pas perturbée. En effet, d'importantes teneurs en acides aminés ont été mesurées dans les graines. Il subsiste la possibilité que cette accumulation d'acides aminés ait lieu dans l'albumen. Ces derniers ne seraient alors pas transférés à l'embryon et ne permettraient ainsi pas la constitution des protéines de réserve. Cependant, aucun transporteur d'acides aminés ne figurait dans la liste de protéines différentiellement exprimées entre les graines des mutants *p5cdh* et celles de Col-0. Par conséquent, la mise en place des différents composés de réserve ne semble pas subir de désorganisation spatiale.

5. Comment expliquer les fortes teneurs en acides aminés libres au cours de la maturation des graines chez le mutant *p5cdh* ?

Les fortes teneurs en acides aminés mesurées témoignent pour partie de l'arrêt de la maturation. En effet, le profil métabolique des graines sèches chez les mutants *p5cdh* présente des similitudes avec les profils métaboliques observés chez Col-0 au cours de la maturation et de la déshydratation. Cependant, la teneur en acides aminés libres reste systématiquement plus élevée chez les mutants. Dès lors, la question de l'origine de ces acides aminés se pose. Ils peuvent provenir du démantèlement de la machinerie photosynthétique du chloroplaste. Ils peuvent aussi venir d'un détournement de leur métabolisme à des fins énergétiques ou redox. En effet, on retrouve également des perturbations métaboliques dans des processus associés au métabolisme des acides aminés comme le cycle de Krebs. Ainsi, des variations de ses intermédiaires sont relevées dans les graines des mutants *p5cdh*. Au cours de la maturation, une baisse notable mais non significative de malate, succinate, α -CG ont été notées ainsi qu'une hausse des niveaux de fumarate et de pyruvate. Même s'il ne s'agit pas d'une baisse générale de tous les intermédiaires du cycle de Krebs, au regard du nombre d'interactions avec des voies métaboliques extérieures au cycle, cela suggère que le cycle de Krebs est ralenti, impactant ainsi le catabolisme des acides aminés. La proline représente une

large majorité des acides aminés libres dosés dans la graine. Celle-ci mise à part, les teneurs en acides aminés libres dans les graines des mutants *p5cdh* restent supérieures aux teneurs observées chez Col-0. Cependant, ce surplus d'acides aminés pourrait également être expliqué par ces trop fortes teneurs en proline qui serait alors en large excès par rapport aux autres acides aminés ce qui bloquerait la traduction au niveau des ribosomes.

6. Les fortes teneurs en proline peuvent-elles avoir des effets osmotiques ?

Les fortes teneurs en proline observées dans les graines sèches des mutants *p5cdh* proviennent pour moitié d'une néosynthèse dans la graine sous l'influence notamment de *P5CS2*, et pour moitié d'un import depuis les parties végétatives à cause de l'augmentation de l'expression de *P5CS1*. En effet, des dosages de proline sur des graines produites par des inflorescences isolées de leur rosette et plongées dans de la solution nutritive 10 mM de nitrates ont montré que ces graines étaient également très riches en proline chez les mutants *p5cdh* mais que leur teneur était inférieure de 50% à celle observée dans des graines sèches de plantes *p5cdh* cultivées sur sable et arrosés avec 10 mM de nitrates. Au vu de ces teneurs exceptionnelles en proline dans les graines, cette dernière pourrait avoir des effets osmotiques retenant ainsi l'eau et empêchant la déshydratation. Grâce à des mesures de teneurs relatives en eau, la concentration molaire en proline a été calculée dans les graines aux différents stades de développement. Cette concentration est de 3 M dans les graines sèches des mutants *p5cdh* cultivés sur 10 mM de nitrates contre 85 mM chez Col-0. Cette très forte concentration est à mettre en perspective avec la très faible teneur en eau contenue dans les graines sèches. En effet, de plus fortes teneurs en eau seraient sans doute nécessaires pour que cette concentration ait réellement des effets osmotiques. Dans les siliques en cours de maturation (âgées de 7-9 jours, l'embryon étant alors en train de se retourner) et de déshydratation, la concentration molaire en proline est plus faible et atteint 50 mM chez les mutants *p5cdh* contre 1 à 3 mM chez Col-0. Ces concentrations ne sont pas de nature à avoir des effets osmotiques puisque chez les plantes halophytes où la proline joue ce rôle, cette dernière s'accumule à des concentrations de l'ordre plusieurs centaines de mM (Murakeözy *et al.*, 2003). Ainsi, la proline présente dans la graine des mutants n'empêche pas la déshydratation d'avoir lieu. De plus, la déshydratation des graines *p5cdh* se déroule selon la

même cinétique que les graines Col-0 alors même que ces dernières contiennent 30 fois moins de proline ; ceci constitue une preuve supplémentaire de l'absence d'effets osmotiques liés aux fortes teneurs en proline dans les graines *p5cdh*. Au cours de la phase de déshydratation, une baisse des niveaux de fumarate est également observée chez les mutants *p5cdh*, témoignant ainsi de l'incapacité de la graine à tolérer la déshydratation, le fumarate étant le seul acide organique accumulé au cours de la phase de dessiccation de la graine (Fait *et al.*, 2006).

7. Impacts des niveaux de proline sur la signalisation hormonale régulant la maturation

La forte teneur en proline peut également induire des réponses signalétiques. En effet, on trouve des séquences 5'ACTCAT-3' constituant des éléments de réponse à la proline (PRE) dans le promoteur de certains gènes impliqués dans la signalisation ABA (*REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR 1 - RCAR1*). Or l'ABA peut intégrer des stress mitochondriaux médiés notamment par des variations de niveaux de proline et induire une signalisation rétrograde vers d'autres compartiments (Dourmap *et al.*, 2020). Il est donc ainsi plausible que des fortes teneurs en proline induites par la mutation *p5cdh* entraînent des répercussions dans le chloroplaste telles que le démantèlement de l'appareil photosynthétique. L'observation de lignées R-ABRE :GFP et *p5cdh2-R-ABRE :GFP* indiquent en effet des différences dans les embryons à partir du stade torpille entre les conditions WT et *p5cdh*. Il y aurait ainsi une perturbation de la signalisation ABA dans les graines du mutant *p5cdh* lors de la phase de maturation. Cependant, ces perturbations sont sans doute légères car les niveaux de transcrits *LEC2* ne varient pas entre les graines Col-0 et *p5cdh* (Dourmap, 2019). De plus, on ne retrouve pas les caractéristiques des mutations *FUS3* telles que l'accumulation d'anthocyanes dans l'embryon ou l'apparition de trichome au niveau de la graine. Or *LEC2* et *FUS3* sont des *LAFL*, régulateurs maîtres de la maturation de la graine relayant le signal ABA (Lepiniec *et al.*, 2018). De plus de nombreux aspects du phénotype *p5cdh* tels que la mise en place d'un métabolisme fermentaire ou l'absence de verdissement ne sont pas communs avec les traits phénotypiques observés chez des mutants de la signalisation ABA dans la graine. La perturbation du signal ABA chez le mutant *p5cdh* ne peut donc expliquer que partiellement le

phénotype *p5cdh*, il pourrait d'ailleurs n'être qu'une conséquence d'un début de maturation perturbé.

Pour conclure, cette thèse a permis de mettre en évidence le rôle crucial de P5CDH dans le développement de la graine chez *Arabidopsis* notamment dans le cadre d'un apport non limitant en azote. En effet, P5CDH est une clé de voute du catabolisme de la proline, garantissant une homéostasie dans la répartition du pouvoir réducteur entre les différents compartiments subcellulaires. Au début de la phase de maturation de la graine, sa présence permet ainsi un fonctionnement optimal du métabolisme photosynthétique dans le chloroplaste, garantissant ainsi une production suffisante de pouvoir réducteur pour la synthèse de composés de réserves ainsi qu'une production d'oxygène maintenant un métabolisme aérobie. Cette phase de développement de la graine étant hautement énergétique, la P5CDH, par la production de $\text{NADH} + \text{H}^+$ qu'elle engendre, permet de compléter ce programme développemental et métabolique.

II. Perspectives

1. Le déficit énergétique et le déséquilibre redox sont-ils à l'origine du phénotype des graines du mutant *p5cdh* ?

Ce travail de thèse a montré que la mutation *p5cdh* empêche l'oxydation de la proline et donc compromet la capacité du métabolisme de la proline à transférer du pouvoir réducteur entre la mitochondrie et le cytosol. Elle impacte ainsi la production d'énergie et les capacités photosynthétiques de la graine qui sont des éléments nécessaires à la maturation et à la survie de l'embryon. Les analyses protéomiques déjà effectuées ont été réalisées sur des siliques contenant des graines à la transition entre embryogenèse et maturation, le but était alors d'identifier des marqueurs précoces du phénotype *p5cdh*. Elles ont également été effectuées sur des graines en cours de déshydratation et des graines sèches, le but étant d'expliquer l'incapacité des graines à tolérer la déshydratation. L'analyse protéomique sur des graines en cours de déshydratation a permis de tirer un certain nombre de conclusions sur la maturation de la graine. En effet, chez *Arabidopsis*, le basculement entre les phases de maturation et de déshydratation est progressif. Ainsi ces processus ne sont pas fortement distincts mais sont chevauchant dans le temps (Leprince *et al.*, 2017). Les conclusions des travaux déjà réalisés tendent à montrer que l'arrêt du métabolisme est progressif à mesure que l'énergie s'épuise dans la graine. Afin de compléter et de confirmer ces conclusions, une nouvelle analyse complémentaire en protéomique non-ciblée est en cours sur des graines vertes en cours de maturation. Ces nouvelles données devraient nous permettre de mettre en évidence des marqueurs précoces de ce déséquilibre énergétique.

Afin d'apporter la preuve d'un déséquilibre redox et d'un déficit énergétique, des dosages de nucléotides (NAD(P)⁺, NAD(P)H+H⁺) dans les graines en cours de maturation, de déshydratation et graines sèches seront également effectués, de même que le dosage d'ATP et d'ADP. Si les résultats obtenus sont conformes aux conclusions des précédents travaux, alors la balance ATP/ADP devrait fortement diminuer du fait d'un appauvrissement en ATP et d'un enrichissement en ADP. De leur côté, les dosages de nucléotides devraient mettre en évidence une oxydation générale de la cellule.

L'hypothèse d'un déficit énergétique et d'un déséquilibre redox repose également sur le blocage complet du catabolisme de la proline dans la graine des mutants *p5cdh*. Les analyses de transcrits et les dosages de P5C semblent en effet indiquer que ProDH1 est soumise à régulation post-transcriptionnelle et n'est pas présente ou active lorsque P5CDH est absente (Zheng *et al.*, en révision). Un western blot mettant en évidence l'absence de ProDH1 dans les graines en cours de développement a déjà été réalisé, mais devra être répété pour confirmer ce premier résultat.

2. Quels sont les rôles des différents compartiments de la graine dans le phénotype *p5cdh* ?

Les expériences visant à préciser l'origine spatiale du phénotype *p5cdh* n'ont à ce jour, pas permis d'établir une origine précise du phénotype. Nos données suggèrent une influence de l'environnement tissulaire et des différents compartiments de la graine sur le phénotype de l'embryon *p5cdh*. L'environnement tissulaire de l'embryon comportant une copie sauvage de *P5CDH* peut ainsi participer à la restauration ou à l'atténuation du phénotype. Ces résultats s'appuient sur des croisements ainsi que sur des lignées de fusions traductionnelles où *P5CDH* est exprimé sous le contrôle d'un promoteur spécifique de l'embryon ou de l'albumen. A ce jour, seule la lignée *pAT5G16460 :P5CDH ::GFP* permettant une expression de *P5CDH* dans l'embryon a pu être exploitée. Afin de confirmer l'influence du génotype de l'environnement tissulaire sur l'embryon *p5cdh*, la morphologie des graines produites par la lignée *pRGP3 :P5CDH ::GFP* permettant une expression spécifique de *P5CDH* dans l'albumen doit être étudiée. Parallèlement, grâce à la présence de la GFP dans ces constructions, des observations vont être effectuées en microscopie à fluorescence afin de s'assurer que les promoteurs choisis ne s'expriment que dans l'albumen ou l'embryon. Enfin, afin de conforter l'influence de l'environnement tissulaire dans le phénotype, une expérience de sauvetage d'embryon pourra être conduite. Elle aura pour but de vérifier l'influence des parties maternelles en comparant le développement *in vitro* d'un embryon sorti de sa graine avec un embryon conservé à l'intérieur de la graine. Des premières expériences de culture de siliques *in vitro* ont d'ores-et-déjà été effectuées et ces expériences préliminaires n'ont pas abouti à une restauration du phénotype sauvage lorsque les siliques entières du mutant *p5cdh* sont

mises en culture. Des expériences de culture d'embryons isolés doivent maintenant être effectuées.

3. Le rôle de l'impact de la mutation *p5cdh* sur le développement du pollen

Les résultats présentés sur l'impact de la mutation *p5cdh* sur le gamétophyte mâle montrent que cette dernière induit la mort d'une part significative des grains de pollen. Cependant, elle n'affecte pas leur morphologie externe. Il convient de déterminer maintenant l'origine de cette perte de viabilité. Des mises en évidence par le DAPI des noyaux des grains de pollen permettront ainsi de vérifier si les grains de pollen matures ont totalement terminé leur développement et comportent donc un noyau végétatif et deux noyaux reproducteurs, ou si leur développement est bloqué à un stade plus antérieur. La capacité du pollen *p5cdh* à assurer la fécondation doit également être étudiée. Des expériences de germination de pollen *in vivo* devront donc être effectuées. Elles permettront également, de mesurer la vitesse de croissance du tube pollinique afin d'établir une comparaison entre pollen *p5cdh* et Col-0. Enfin, étant donné les similarités de développement entre le grain de pollen et la graine, cela pourrait suggérer que les processus responsables de la mort du grain de pollen sont les mêmes que ceux provoquant la mort de l'embryon. En effet, comme la graine, le pollen connaît une phase de maturation durant laquelle il accumule des composés de réserve avant de se déshydrater. Les grains de pollen mutants pourraient donc eux aussi ne pas être correctement préparés à cette déshydratation. Des analyses protéomiques et métabolomiques devront être effectuées afin d'y retrouver les marqueurs identifiés dans les graines des mutants *p5cdh*.

4. L'intérêt de P5CDH dans une perspective agronomique

Ces travaux ont pu mettre en évidence que P5CDH est cruciale pour le développement normal de la graine chez *Arabidopsis* à cause de son implication dans les navettes de pouvoir réducteur entre la mitochondrie et le cytosol, permettant ainsi d'assurer le bon déroulement des processus métaboliques associés à la maturation de la graine. Par la nécessité de sa présence au cours du développement de la graine, P5CDH permet aussi de contrôler la force

d'appel des nutriments depuis les parties végétatives vers la graine au cours de la remobilisation.

Des tels aspects sont stratégiques pour l'amélioration d'espèces cultivées. C'est par exemple le cas du Colza (*Brassica napus*), qui appartient aussi à la famille des Brassicacées comme *Arabidopsis*, et dont la culture permet la production d'huile pour l'alimentation humaine, la fabrication d'agrocarburants et de protéines pour l'alimentation animale. Cette culture est stratégique pour l'Union Européenne (UE) car une augmentation de sa production permettrait de s'affranchir des importations de soja nécessaire à l'alimentation animale en dehors de l'UE. Or le colza cultivé aujourd'hui présente un NUE médiocre du fait de mauvaises capacités de remobilisation de l'azote (Girondé *et al.*, 2015).

Ainsi, après vérification que le rôle de *P5CDH* découvert chez *Arabidopsis* s'applique également au Colza, une stratégie de génie génétique et métabolique pourrait améliorer les performances du colza cultivé. Il s'agirait alors d'augmenter le catabolisme de la proline ou d'accélérer l'intégralité du métabolisme de la proline au travers d'une surexpression de *P5CDH* et/ou de *P5CS2* et *P5CR* dans la graine. Cela pourrait reposer sur l'identification d'allèles induisant une plus forte expression de ces gènes ou une mutagenèse ciblée d'éléments cis répresseurs de la transcription dans leur promoteurs endogènes grâce aux nouvelles techniques de sélection. Cela permettrait d'augmenter les échanges de pouvoir réducteur entre la mitochondrie et le cytosol avec pour objectif d'entraîner une accélération générale du métabolisme.

Cette accélération du métabolisme au cours du développement de la graine pourrait augmenter la synthèse de réserves, augmentant ainsi la force d'appel des nutriments et la remobilisation de l'azote vers la graine en formation. *In fine*, cela permettrait une amélioration du NUE et du rendement répondant ainsi aux enjeux d'augmentation de production et d'agriculture durable.

Matériels et Méthodes

I. Matériel

1. Matériel Végétal

1.2. Lignées sauvage et mutantes d'*Arabidopsis*

L'écotype d'*Arabidopsis thaliana* Columbia-0 noté Col-0 a été utilisé comme référence sauvage (WT). Les lignées *p5cdh-2* (SALK-018453), *p5cdh-3* (SALK-021026), *oat-2* (SALK-010095) ont été utilisées en tant que mutant alléliques d'insertion T-DNA du gène *P5CDH* et *OAT*. La lignée homozygote double mutante *prodh1prodh2* issue du croisement de *prodh1-4* (SALK_119334) et de *prodh2-2* (GABI_328G05) a été également utilisée (Cabassa-Hourton *et al.*, 2016). Lors de ce travail, la lignée homozygote double mutante *p5cdh-oat* a été créée par croisement de la lignée *p5cdh-3* avec la lignée *oat-2*.

1.3. Créations de lignées rapportrices mutantes

Les lignées rapportrices *pCycB1;1 :GUS* (Colon-Carmona *et al.*, 1999), *DR5 :GUS* (Ulmasov *et al.*, 1997) et *6xABRE :eGFP* (Wu *et al.*, 2018) ont été respectivement utilisées pour mettre en évidence la division cellulaire, la signalisation auxinique et la signalisation acide abscissique.

Toutes ces lignées rapportrices ont été croisées avec les mutants *p5cdh-2* et *p5cdh-3* pour introduire ces constructions rapportrices dans nos fonds génétiques d'intérêt. L'homozygotie des lignées obtenues pour la construction rapportrice et la mutation ont été contrôlées par PCR. Les amorces utilisées sont détaillées en **Annexe 1**.

1.4. Construction de lignées traductionnelles

Le gène *RGP3* qui code une UDP-arabinose mutase s'exprime spécifiquement dans l'albumen (Rautengarten *et al.*, 2011). Une lignée *pRGP3:P5CDH::tGFP* permettant l'expression de la *P5CDH*, fusionnée à la *tGFP* (turboGFP), sous le contrôle du promoteur *pRGP3* a été construite.

Le gène *At5G16460* qui code une protéine membranaire responsable de la genèse des gouttelettes lipidique a une expression restreinte à l'embryon (Jeong *et al.*, 2014). Une lignée *pAt5G16460:P5CDH::tGFP* permettant l'expression de la fusion *P5CDH::tGFP* sous le contrôle du promoteur *pAt5G16460* a été construite.

2. Souches Bactériennes utilisées lors de la construction de lignées transgéniques

2.1. *Escherichia coli*

La souche DH5 α a été utilisée pour multiplier les plasmides primaires d'entrée dans le cadre du clonage par Golden Gate (Engler *et al.*, 2009). Il s'agit d'une souche thermocompétente. Son génotype est: F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG* Φ 80*dlacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169, *hsdR17*(r_K⁻ m_K⁺), λ ⁻.

La souche XL1-blue a été utilisée pour multiplier le plasmide final de destination après clonage Golden Gate. Il s'agit d'une souche thermocompétente permettant une sélection visuelle des transformants par un clivage coloré blanc-bleu après clivage du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal) par une β -galactosidase. Son génotype est *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F *proAB lacIq* Δ M15 *Tn10* (Tetr)].

2.2. *Agrobacterium tumefaciens*

La souche GV3101 a été utilisée lors les expériences de transformation d' *A. thaliana* (Clough & Bent, 1998). Cette souche porte la résistance à la rifampicine sur le chromosome bactérien et la résistance à la gentamycine sur le plasmide pMP90 (pTiC58 Δ T-DNA) où sont présents les gènes *Vir* pour le transfert d'ADN-T.

II. Méthodes

1. Construction de lignées transgéniques

1.1. Plasmides utilisés pour les clonages

La technique de clonage Golden Gate nécessite l'utilisation de plusieurs plasmides d'entrée complémentaires afin de permettre une jonction continue des différentes « briques élémentaires » lors de l'étape unique de clonage final. Dans le cadre de constructions complexes de type *promoteur_{embryon/albumen} :P5CDH ::GFP*, 4 plasmides d'entrée ont été utilisés : pICH41295, pAGM1287, pICSL50016 et pICH44300. La séquence insérée dans ces derniers au niveau des sites Bsa I a été transférée à un plasmide de destination finale pICH86966.

- pICH41295: Ce plasmide confère une résistance à la spectinomycine et possède un site de restriction Bsa I unique aux extrémités 5'GGAG et AATG-3' permettant le clonage par Golden Gate.
- pAGM1287 : Ce plasmide confère une résistance à la spectinomycine et possède un site de restriction Bsa I unique aux extrémités 5'AATG et TTCG-3' permettant le clonage par Golden Gate.
- pICSL50016 : Ce plasmide confère une résistance à la spectinomycine. Il possède un insert contenant la séquence codante de *tGFP* (turboGFP) optimisé pour les plantes (présence d'un intron). Les sites Bsa I multiples ont été retirés par mutations ponctuelles de manière à ne laisser qu'un site de restriction unique aux extrémités 5'TTCG et GCTT-3'.
- pICH44300 : Ce plasmide confère une résistance à la spectinomycine. Il possède un insert contenant une séquence 3'UTR (Untranslated Terminal Region) ainsi qu'un signal de polyadénylation optimisé pour les plantes avec intron. Les sites Bsa I multiples ont été retirés par mutations ponctuelles de manière à ne laisser qu'un site de restriction unique aux extrémités 5'GCTT et CGCT-3'.
- pICH86966 : Ce plasmide confère une résistance à la kanamycine, possède un site de restriction Bsa I unique et le gène *lacZ* comme marqueur de sélection

1.2. Clonage des promoteurs *RGP3* et *At5G16460* dans le plasmide d'entrée pICH41295

Les promoteurs exempts de sites de restriction Bsa I ont été amplifiés avec l'ADN polymérase Pfu à partir d'ADN de feuille de plantes Col-0. Les amorces utilisées sont détaillées en **annexe 1**. Le produit de PCR a été purifié à l'aide du kit GeneJET Gel Extraction et DNA Cleanup Micro (Thermo) en suivant les instructions du fabricant.

Ensuite, 200 ng de produit de PCR et 400 ng de plasmide pICH41295 ont été digérés avec 1µL de Bsa I, 3µL de tampon Bsa I et qsp 30µL d'eau ultrapure stérile en incubant les échantillons pendant 5 minutes à 37°C avant d'augmenter la température à 65°C pendant 5 minutes pour inactiver l'enzyme. Les plasmides ont été déphosphorylés par ajout de 1µL de phosphatase alcaline Anza (Invitrogen) et 2,3µL de tampon 10X Anza pendant 15 minutes à 37°C. Puis l'enzyme a été inactivée pendant 20 minutes à 80 °C.

Les promoteurs ont été clonés dans pICH41295 en utilisant 5µL de T4 Anza Ligase Master Mix (Invitrogen), 75ng de vecteur et un volume d'insert permettant d'aboutir à un ratio vecteur : insert de 1 :3, le tout dans un volume final réactionnel de 20µL ajusté avec de l'eau ultrapure stérile. La ligation s'effectue en incubant l'échantillon pendant 15 minutes à 22°C.

1.3. Transformation de bactéries *E. coli* DH5α avec le plasmide d'entrée pICH41295 cloné et sélection des transformants

La transformation est effectuée en mélangeant 5µL de produit de ligation avec 100µL de bactéries thermocompétentes *DH5α*. Après incubation de 30 minutes sur glace, un choc thermique est réalisé en exposant le tube à 42°C pendant 40 secondes. Le tube est ensuite de nouveau refroidi sur glace pendant 5 minutes.

500µL de milieu LB liquide stérile sont ensuite ajoutés dans le tube qui est incubé pendant 1h30 à 37°C sous agitation à 150rpm. Après centrifugation 1 minute à 956xg pour culotter les bactéries, 450µL de surnageant sont éliminés et le culot de bactérie est resuspendu dans le surnageant restant. Cette solution bactérienne est étalée sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB solide à contenant de la spectinomycine (50mg/L). Après 24h d'incubation des boîtes de Pétri à 37°C, toutes les colonies apparentes sont censées avoir intégré le plasmide et être donc résistantes à la spectinomycine. Une vérification est effectuée en piquant chaque colonie avec une pointe de cône avant de le tremper dans un puits de PCR

contenant un mix permettant l'amplification de l'insert. Les amorces utilisées sont détaillées en **annexe 1**.

Les colonies sont ensuite repiquées sur une nouvelle boîte de pétri de milieu LB solide + spectinomycine et de nouveau incubées 24h à 37°C. Les clones positifs à la PCR sont prélevés et déposés dans 5mL de milieu LB liquide + spectinomycine dans un tube Falcon de 50mL. La culture liquide est effectuée dans un minitron à 37°C, tournant à 180rpm pendant 24h maximum.

1.4. Purification de plasmides et vérification de l'intégrité de l'insert par séquençage

La purification de plasmide se fait à partir de la culture liquide et avec le kit GeneJET plasmid miniprep Kit (Thermo) en suivant les indications du fabricant.

Afin de vérifier l'exactitude de la séquence insérée dans le plasmide, un séquençage est réalisé sur 20µL de plasmide dilué à 90ng/µL. Le séquençage est confié à Eurofins GATC. Les amorces utilisées sont désignées de manière à couvrir la totalité de la séquence insérée sachant que les reads de séquençage font 1kb et que les extrémités du read ne sont pas fiables. Les amorces utilisées doivent donc s'accrocher sur le plasmide en amont de la séquence d'intérêt. Ces amorces sont fournies par le prestataire de séquençage (Eurofins GATC).

1.5. Clonage des promoteurs *RGP3* ou *At5G16460*, de la séquence codante de *P5CDH*, GFP et du 3'UTR dans le plasmide de destination pICH86966 par la technique du Golden Gate.

Les promoteurs ont préalablement été clonés dans pICH41295, l'ORF de *P5CDH* a été cloné dans pAGM1287, l'ORF *tGFP* se trouve dans pICSL50016 et la séquence 3'UTR se trouve dans pICH44300. La construction finale a été mise en place en utilisant la technique du Golden Gate pour insérer les quatre plasmides d'entrée dans pICH86966. Cette technique utilise la complémentarité de séquence à l'extrémité de chaque insert pour permettre la ligation de plusieurs inserts à la bonne place en une seule réaction de ligation.

Le mélange réactionnel était composé de 50fmol de plasmide de destination, 100fmol de chaque plasmide d'entrée avec 1µL Bsa I, 1µL T4 DNA ligase 30U/µL (Thermo), 1mM ATP

et 2µL de FastDigest Buffer qsp 20µL d'eau ultrapure. Le clonage par Golden Gate nécessite 3 cycles de 10 minutes à 37°C et 10 minutes à 22°C. Ensuite, les échantillons ont été incubés pendant 10 minutes à 37°C et 20 minutes à 65°C.

1.6. Transformation de bactéries *E. coli* XL1-Blue avec le plasmide d'entrée pICH86966 cloné, sélection des transformants, purification de plasmides et vérification de l'intégrité de la séquence.

Les produits de clonage par Golden Gate ont été insérés dans la bactérie *E. coli* XL1-Blue par choc thermique de la même façon que précédemment. Les bactéries transformées ont été sélectionnées sur du milieu LB solide additionné de kanamycine (50mg/L), 80 mg/mL de X-Gal et 100 µM d'IPTG. La bonne insertion de la séquence d'intérêt dans les colonies positives de couleur blanche ont été vérifiées par PCR et les plasmides ont été extraits à l'aide du kit GeneJET Plasmid miniprep (ThermoFisher) de la même façon que précédemment. L'intégrité de la séquence a été vérifiée par séquençage de la même façon que précédemment.

1.7. Transformation de bactéries *A. tumefaciens* avec le plasmide Golden Gate par électroporation

Le plasmide de destination a été dilué à 50ng/µL dans un volume final de 10µL. 1µL de cette dilution a été mélangée avec 40µL d'*Agrobacterium tumefaciens* de souche GV3101 dans du glycérol. Le tout a été transféré dans une cuvette d'électroporation puis a été soumis à une décharge brève de 1800V. 1mL de milieu LB liquide a ensuite été ajouté puis le tout a été incubé dans un Eppendorf de 2mL à 28°C pendant 3h à 200rpm. Après centrifugation 1 minute à 956xg, 200µL de surnageant sont éliminés et le culot de bactérie est resuspendu dans le surnageant restant. Cette solution bactérienne est étalée sur une boîte de LB solide à laquelle a été ajoutée de la kanamycine (50mg/L) et de la gentamycine (50mg/L). Après 72h d'incubation des boîtes de Pétri à 28°C, toutes les colonies apparentes sont censées avoir intégré le plasmide et être donc résistantes à la kanamycine.

1.8. Transformation des plantes d'*A. thaliana* par la technique du « floral dip »

Les colonies transformantes ont été repiquées dans 5mL de milieu LB liquide additionné de kanamycine (50mg/L) et de gentamycine (50mg/L) pendant 24h à 28°C sous agitation (200rpm) dans un minitron. Cette première culture est diluée au 1/100^e dans 200mL de milieu LB additionné de kanamycine et gentamycine, de nouveau incubée à 28°C pendant 24h sous agitation à 200rpm. La DO 600nm est ensuite mesurée et la culture liquide est diluée dans un volume final de 800mL avec une solution de saccharose à 5% de manière à obtenir une DO 600nm comprise entre 0,8 et 1. La transformation est réalisée en plongeant directement les fleurs d'*Arabidopsis* dans la solution à laquelle aura été rajouté au préalable 0,05% de Silwet (De Sangosse). La plante transformée est emballée dans du film alimentaire durant 48h afin de maintenir des conditions d'humidité propices à la transformation.

1.9. Sélection des transformants

Les graines issues des fleurs transformées ont été semées sur milieu de Murashige et Skoog dilué deux fois (MS/2 : 2,2g/L poudre MS (Murashige & Skoog, 1962) ; 10g/L saccharose ; 0,5g/L MES, pH 5,7 ; 10g/L plant agar additionné de kanamycine (50mg/L)).

Les graines ont été stérilisées en dissolvant une pastille de Javel (hypochlorite de sodium) dans 40mL d'eau bidistillée. Puis 1mL de cette solution de Javel est diluée dans 9mL d'éthanol absolu. 1mL de solution de stérilisation est versé sur les graines contenues dans un tube Eppendorf. Après 9 minutes d'agitation douce, la solution est retirée et 3 rinçages de 30 secondes à l'éthanol absolu sont effectués. A l'issue du dernier rinçage, les graines sont mises à sécher sous une hotte à flux laminaire plusieurs heures.

Les graines stérilisées ont été semées à la volée dans la boîte de Pétri. Ces dernières ont ensuite été refermées et scellées avec du sparadrap Micropore® et placées à 4°C à l'obscurité (emballées dans du papier aluminium) pendant au moins 24h avant d'être placées en chambre de culture (photopériode 16h jour/8h nuit, 70µmol/m²/s lumière, température jour : 22°C ; température nuit 20°C).

Les plantules résistantes à la kanamycine ont été repiquées dans une nouvelle boîte de pétri contenant un milieu MS/2 additionné en kanamycine. Après confirmation de leur résistance à la kanamycine, les jeunes plantes ont été repiquées sur terreau et cultivées jusqu'à

à fructification. Au cours de la culture, un génotypage pour une partie de la construction a été effectué en amplifiant un fragment d'ADN entre les séquences de *P5CDH* et celles de *tGFP* afin de vérifier la bonne insertion de la séquence d'intérêt. Lors de la troisième génération, l'homozygotie de la construction est contrôlée par génotypage de toutes les plantes issues d'une même plante mère. Cette dernière étant homozygote pour la construction si et seulement si 100% de sa descendance montre une amplification de la séquence *P5CDH-tGFP* au génotypage. Les amorces utilisées lors du génotypage sont détaillées en **annexe 1**.

2. Conditions de culture des différentes lignées d'Arabidopsis

2.1. Culture sur sable

Le protocole de culture sur sable est adapté de (Masclaux-Daubresse & Chardon, 2011). Les cultures des différentes lignées d'*A. thaliana* sont réalisées sur sable de Fontainebleau dans des pots au fond desquels est apposé un film plastique perméable permettant une culture en hydroponie. Après semis et levée des plantules, un éclaircissage est effectué pour ne laisser qu'une plante par pot. Les plantes sont cultivées dans un premier temps en jours courts (photopériode : 8h lumière/16h obscurité, température du jour : 21°C, température de la nuit : 19°C, 70µmol/m²/s lumière). Les pots sont arrosés de manière permanente à l'eau jusqu'à 15 jours après germination. Les plantes sont ensuite arrosées 3 fois par semaine avec 500mL de solution nutritive concentrée à 2mM ou 10mM de nitrates. Du quartz noir est ajouté pour recouvrir le sable au cours de la croissance des plantes afin d'éviter le développement d'algues. Après 5 semaines en jours courts, les plantes sont transférées en jours longs (photopériode : 16h lumière/8h obscurité, température du jour : 21°C, température de la nuit : 19°C, 70 µmol/m²/s) et arrosées 3 fois par semaine avec 500mL de solution nutritive concentrée à 2mM ou 10mM de nitrates jusqu'à fructification.

2.1.1. Composition des solutions nutritives nitrates

- Une solution d'oligo-éléments est constituée avec 0,04mM molybdate d'ammonium ((NH₄)₆Mo₇O₂₄) ; 24,3mM acide borique (H₂BO₃) ; 11,8mM sulfate de manganèse

(MnSO_4) ; 3,48mM sulfate de zinc (ZnSO_4) et 1mM sulfate de cuivre (CuSO_4). Elle sera ensuite diluée au 1/1000^e dans la solution nutritive finale (soit 1mL/L).

- Une solution A est constituée avec 50mM KH_2PO_4 et 50mM sulfate de magnésium (MgSO_4). Elle sera ensuite diluée au 1/200^e dans la solution nutritive finale (soit 5mL/L).
- Une solution B permettant l'obtention d'une concentration finale de 2mM de nitrates est constituée avec : 349,7mM nitrate de potassium (KNO_3), 25mM nitrate de calcium ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) et 25,1mM chlorure de calcium (CaCl_2). Elle sera diluée au 1/200^e dans la solution nutritive finale (soit 5mL/L).
- Une solution B permettant l'obtention d'une concentration finale de 10mM de nitrates est constituée avec 1M nitrate de potassium (KNO_3), 0,5M nitrate de calcium ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) et 40mM chlorure de sodium (NaCl). Elle sera diluée au 1/200^e dans la solution nutritive finale (soit 5mL/L).
- Une solution de Fer à 10g/L de Sequestrène 138 Fe 100 Sg (Syngenta®) est réalisée. Elle sera diluée au 1/1000^e dans la solution nutritive finale (soit 1mL/L).

2.2. Culture sur terreau

Les cultures sont réalisées dans du terreau à raison d'une plante par pot. Le semis est effectué directement dans les pots et l'éclaircissage du surplus de plantules est effectué après deux semaines de croissance. Les plantes sont cultivées en condition de jours longs (photopériode : 16h lumière/8h obscurité, température du jour : 21°C, température de la nuit : 19°C, 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) et arrosées avec de l'eau de ville deux fois par semaine.

2.3. Cultures de hampes florales isolées

Les hampes florales secondaires des plantes cultivées sur du sable et arrosées avec une solution nutritive ont été retirées de la plante mère et immergées dans 50 ml de solution nutritive (2 mM ou 10 mM de nitrates) après que toutes les siliques et fleurs ouvertes déjà formées sur la tige aient été retirées. La solution nutritive a été renouvelée deux fois par

semaine durant toute la durée de formation de nouvelles fleurs et de siliques, et ce jusqu'au séchage complet des siliques nouvellement formées.

Alternativement, un gradient de nitrates de 0mM à 2mM a été appliqué également à ce système sur des inflorescences prélevées depuis une culture sur sable 2mM de nitrates. La composition adaptée des solutions nutritives est détaillée en **Annexe 2**.

3. Teneur relative en eau

La teneur relative en eau (TRE) est une donnée qui permet d'évaluer le pourcentage d'eau présent dans l'organe considéré par rapport à la valeur obtenue en pleine turgescence qui est définie comme le 100%.

Des siliques sont prélevées puis pesées immédiatement après prélèvement. Elles sont ensuite disposées dans une boîte de Pétri remplie d'eau distillée. La boîte est ensuite scellée avec du parafilm et mise à l'obscurité dans du papier aluminium. Après 24h à l'obscurité et à 4°C, les siliques sont alors en pleine turgescence, elles sont égouttées, épongées puis de nouveau pesées. Leur masse sèche sera ensuite relevée après lyophilisation. La TRE est alors calculée par la formule suivante :

TRE (en %) = $(\text{masse initiale} - \text{Masse sèche}) * 100 / (\text{masse turgescence} - \text{Masse sèche})$.

4. Techniques d'imagerie

4.1. Microscopie optique

4.1.1. Technique d'éclaircissement des siliques et graines en cours de développement

Après prélèvement, les siliques ont été coupées aux deux extrémités et mises dans une solution de fixation FAA (formaldéhyde, acide acétique glacial, éthanol 96 % 2:1:17 v/v/v). Au bout de 24h à 4°C, la solution FAA a été retirée et 2 rinçages d'une heure à l'éthanol 96 % ont été effectués. Les échantillons ont alors été incubés dans la solution d'éclaircissement de Hoyers (30 mL d'eau distillée, 50g d'Hydrate de Chloral, 2,5mL de Glycérol, 3,26g de Gomme

Arabique). Un passage sous vide a été effectué pendant au moins 5 minutes de façon à faciliter la pénétration. Les échantillons ont été laissés dans cette solution jusqu'à éclaircissement puis ont été observés à l'aide d'un microscope photonique doté d'un module Apotome équipé en contraste interférentiel de Nomarski (DIC) (Axioscope, Zeiss).

4.1.2. Activités GUS

Des graines sorties de siliques en cours de développement issues des lignées rapportrices GUS ont été prélevées, coupées aux deux extrémités et mises à incuber 24h à 37°C dans une solution X-Gluc (1mM X-gluc, 10mM EDTA, 1mM ferrocyanure de potassium, 1mM ferricyanure de potassium, 1 goutte de triton X100 dans du tampon phosphate 100mM pH = 7). 30 minutes sous vide ont été appliqués en début d'incubation pour faciliter la pénétration du substrat. Après 24h, la solution X-Gluc a été retirée et remplacée par une solution fixatrice d'acide acétique glacial (1 volume) et éthanol 96 % (9 volumes). Au bout d'une heure, la solution fixatrice a été retirée, les échantillons ont été incubés dans la solution de Hoyer et conservés à 4°C jusqu'à observation.

4.2. Mise en évidence des ROS

Pour la visualisation d' H_2O_2 et d' O_2^- , les siliques en développement ont été immergées dans du tampon DAB (10 mM MES, 0,5 mg/mL 3,3-diaminobenzidine, 0,05 % Tween 20, ; pH : 5,8) (Daudi & O'Brien, 2012) et du tampon NBT (10 mM KPO_4 , 10 mM NaN_3 , 0,05 % Tween 20) (Ramel *et al.*, 2009) respectivement. Les échantillons ont été infiltrés sous vide pendant 45 minutes et incubés pendant 4 heures à température ambiante, sous agitation, puis observés en microscopie optique.

4.3. Microscopie à fluorescence

Des siliques en cours de maturation de lignées exprimant la GFP ont été prélevées puis immédiatement disséquées pour en sortir les graines. Ces dernières ont été observées sous

une loupe binoculaire à fluorescence en GFP (MacroApotome, Zeiss) à la plateforme de Microscopie de l'Institut de Biologie Paris-Seine (France).

4.4. Microscopie électronique à Balayage

Des graines sèches et le pollen de plantes sauvages et mutantes ont été séchées dans une chambre de séchage à point critique CPD300 (Leica) afin de progressivement remplacer l'eau par du CO₂ liquide, puis les échantillons ont été recouverts de platine par pulvérisation cathodique. Les échantillons ont ensuite été observés avec un microscope électronique à balayage GeminiSEM 500 (Zeiss) dans le service de microscopie électronique (EMF) de l'Institut de Biologie Paris-Seine (France).

5. Visualisation des composés de réserves dans les graines

5.1. Mise en évidence des lipides dans la graine

Les graines préalablement éclaircies par la solution de Hoyer ont été incubées dans une solution de noir Soudan mélangé à saturation dans de l'éthanol à 70 %, et observées en microscopie optique.

5.2. Mise en évidence de l'amidon dans la graine

L'amidon a été visualisé par le réactif de coloration à l'iode de Lugol (solution d'iodo-iodure de potassium à 1 %, Johansen, 1940). Les graines sèches ont été incubées dans le réactif pendant 5 minutes, lavées à l'eau puis observées en microscopie optique.

6. Tests de germination

Un milieu MES (2-(N-morpholino)éthylsulfonique acid) (0,5g/L MES, pH 5,7 ajusté avec KOH; plant agar 10g/L) a été utilisé pour effectuer des tests de germination. Chaque boîte de Pétri a été divisée en zones afin de supprimer un éventuel effet boîte. Le semis a été

effectué sans stérilisation préalable des graines à l'aide d'un cure-dent pour aligner les graines une à une. Les boîtes de Pétri ont ensuite été refermées et scellées avec du sparadrap Micropore® et placées à 4°C à l'obscurité (emballées dans du papier aluminium) pendant au moins 24h avant d'être placées en chambre de culture (photopériode 16h jour/8h nuit, 70µmol/m²/s lumière, température jour : 22°C ; température nuit 20°C). L'émergence de la radicule a ensuite été contrôlée au bout de 16h, 24h, 48h, 72h et 7 jours à l'aide d'une loupe binoculaire. Deux réplicats biologiques contenant deux réplicats techniques de 30 graines ont été effectués.

7. Tests de viabilité

7.1. Test de viabilité du pollen

Les anthères fraîches issues de fleurs non ouvertes (anthères immatures) ou ouvertes (anthères matures) ont été fixées dans une solution de Carnoy (acide acétique glacial:chloroforme:éthanol 10:30:60) pendant 24h et stockées à 4°C. Ensuite, les anthères ont été colorées dans une solution d'Alexander modifiée (Alexander, 1969; Peterson *et al.*, 2010) dont la composition est la suivante : éthanol 95% 10mL, vert de malachite 1% dans l'éthanol 95% 1mL, eau distillée 50mL, glycérol 25mL, fuchsine acide 1% dans l'eau 5mL, orange G 1% dans l'eau 0,5mL, acide acétique glacial 4mL). Les anthères sont déposées dans une goutte de la solution colorante sur des lames de microscope préalablement chauffées sur une platine chauffante. Les lames sont laissées pendant au moins 15 minutes sur la platine chauffante puis les échantillons sont montés entre lame et lamelle et observés au microscope optique : le cytoplasme des grains de pollen viables est alors coloré en rouge, celui des grains de pollen morts est coloré en bleu.

7.2. Test de viabilité de l'embryon

Les graines extraites des siliques vertes en maturation, des siliques jaunes en cours de déshydratation et des embryons sortis de graines sèches ont été incubées dans une solution de rouge de tétrazolium 1% dans de l'eau bidistillée pendant 1h30 à 28°C. Les échantillons ont

été infiltrés sous vide pendant 5 minutes et incubés pendant 24h à 28°C. Après coloration, les embryons prélevés sur la graine ont ensuite été observés à la loupe binoculaire (Zeiss SteREO Discovery).

8. Détermination de la cinétique de développement des siliques et des graines

Dans un premier temps des stades de développement d'une silique ont été définis et notés de A à F. Ils sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Stade	Taille de la silique	Aspect visuel
A	0 cm	Fleur ouverte
B	<0,5 cm	La silique naissante dépasse de la fleur
C	0,5 cm	La silique est deux fois plus grande que la fleur
D	1cm	La silique est 3 fois plus grande que la fleur
E	1,5 cm	La silique est immature mais a fini sa croissance
F	1.5 cm	La silique E est passée du vert au jaune

Par la suite, une cinétique de développement plus précise a été définie : des fils de tissus ont été noués autour de boutons floraux juste avant leur ouverture (temps T0) puis les siliques générées ont été prélevées à 24h d'intervalle pendant 20 jours. Les siliques ont immédiatement été ouvertes et les graines fixées dans un mélange acide acétique :éthanol (1:9, v/v) puis éclaircies dans du glycérol avant d'être observées en microscopie optique afin de déterminer le stade de développement de l'embryon toutes les 24h dans les 20 jours suivant la fécondation.

9. Techniques de biologie moléculaire

9.1. Géotypage

9.1.1. *Extraction d'ADN génomique au bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB)*

Les feuilles de rosettes de plantes âgées de 3 semaines ont été prélevées dans des Eppendorf de 2mL et congelées dans l'azote liquide. Après broyage avec des billes de verre dans de l'azote liquide, 400µL de tampon d'extraction (cetyltrimethyl ammonium bromide-CTAB 2% ; NaCl 1,4M ; EDTA 20mM ; Tris 100mM, 2-mercaptoethanol 0,2%, pH=8) ont été ajoutés et les tubes ont été vortexés puis chauffés à 60°C sous agitation (450 rpm) pendant 30 minutes. Après avoir ajouté 400µL de mélange chloroforme-isoamyl alcool (24:1 v/v), les tubes ont été vortexés et centrifugés pendant 15 minutes à 2655xg, 4°C. 300µL de surnageant ont ensuite été récupérés et mélangés à 300µL d'isopropanol dans un nouveau tube. Les échantillons ont été centrifugés pendant 20 minutes à 20817xg, 4°C et le surnageant a été jeté. Le culot a été lavé avec de l'éthanol 80% et a ensuite été séché avant sa dissolution dans 60µL d'eau stérile ultrapure.

9.1.2. *Extraction alternative d'ADN génomique*

Pour chaque plante, une feuille de rosette a été prélevée puis broyée à l'aide d'un broyeur à billes dans de l'azote liquide. L'ADN a été extrait à l'aide d'un tampon d'extraction 0,2M Tris-HCl pH = 7.5 ; 0,25M NaCl; 25mM EDTA ; SDS 0,5 %. 500µL de tampon ont été ajoutés au broyat puis après homogénéisation et centrifugation 1 minute (16060xg), 300µL de surnageant a été récupéré et ajouté à 300µL d'isopropanol. Après agitation douce et centrifugation pendant 5 minutes (16060xg), le surnageant a été éliminé et remplacé par 600µL d'éthanol 70 %. Après une nuit à -20°C, l'éthanol a été retiré et le culot d'ADN séché puis dissout dans 50µL d'eau ultrapure.

9.1.3. *PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne*

Pour chaque géotypage, 1 µl de chaque extraction d'ADN a été utilisé. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est réalisée dans un volume final de 25 µL avec 0,625 U soit

0,125µL de DreamTaq polymérase à 5U/µL, 1µL de chaque amorce diluée à 10µM, 0,5 µL de chaque dNTP (dATP, dTTP, dGTP et dCTP) dilués à 10mM, 2,5µL de Tampon DreamTaq contenant 20mM de MgCl₂, 18,875µL d'eau ultrapure stérile et 1µL d'ADN dissous dans de l'eau ultrapure stérile.

Pour le génotypage, le programme de PCR a été le suivant : 5 min de dénaturation à 94°C, 40 cycles de 30s à 94°C, 15s à la température d'hybridation (°C), 60s par kbp de produit PCR attendu à 72°C). La PCR se termine par 7 min d'élongation à 72°C. La température d'hybridation est déterminée expérimentalement et se situe 5°C en dessous du T_m le plus bas des deux amorces (**Annexe 1**).

9.1.4. Migration des acides nucléiques par électrophorèse sur gel d'agarose

Après PCR, les acides nucléiques sont chargés dans les puits d'un gel d'agarose à 1,5% (m/v) réalisé avec du tampon TAE 0,5X (Tris Acétate EDTA Buffer), avec ajout de Midori Green (Nippon Genetics) (5µL/100mL). Les fragments d'acides nucléiques sont séparés selon leur taille par migration électrophorétique sous une tension de 100 V pendant 25 min. La taille des fragments est estimée sous lampe à UV par comparaison avec le profil de migration de marqueurs de taille connue.

9.2. Analyses de transcrits

9.2.1. Extraction des ARN totaux par précipitation au chlorure de lithium

Des siliques immatures ont été prélevées et conservées dans de l'azote liquide puis broyées à l'aide d'un mortier. A la poudre obtenue, a été ajouté 500µL de tampon d'extraction (Tris-HCl 2M ; SDS 0,5 % ; NaCl 0,25M ; EDTA 25mM ; Eau DEPC) puis 500µL de mélange phénol-chloroforme-isopropanol (25 :24 :1 v/v/v) après agitation. Les échantillons ont été centrifugés à 3709xg à 4°C après agitation 5 minutes. La phase aqueuse supérieure a été récupérée puis 500µL de mélange phénol-chloroforme-isopropanol a été ajouté. Le tout a été agité puis centrifugé 5 minutes (10304xg) à 4°C. L'opération a été reproduite 2 fois puis un volume de chlorure de lithium 4M a été ajouté à la phase supérieure récupérée. Après une incubation d'une nuit à 4°C sur glace, les échantillons ont été centrifugés 15 minutes à 23511xg

à 4°C. Après avoir éliminé le surnageant, 300µL d'éthanol 70 % a été ajouté. Après centrifugation de 15 minutes à 23511xg à 4°C, le surnageant a été éliminé et le culot a été repris dans 200µL d'eau Rnase free avec 0,1 % de DEPC. 1 volume de chlorure de lithium 4M a été ajouté. Après une incubation de 6h à 4°C sur glace, les échantillons ont été centrifugés 15 minutes à 23511xg à 4°C. Le surnageant a ensuite été éliminé puis 300µL d'éthanol 70 % a été ajouté. Après une centrifugation de 15 minutes à 23511xg à 4°C, l'éthanol 70 % a été éliminé puis le culot a été repris dans 50µL d'eau DEPC. Les échantillons d'ARN ont été conservés à -20°C après avoir reposé 1h à 4°C sur glace.

9.2.2. Extraction des ARN totaux avec le RNeasy Plant Minikit (QIAGEN)

Des siliques de 10 à 13 jours après fécondation (siliques en cours de maturation) et de siliques en cours de déshydratation (stade F, 14-15 jours après fécondation) sont prélevées et fixées sur le dos d'une petite boîte de Pétri recouverte de ruban adhésif double-face. Les siliques sont ouvertes sous une loupe binoculaire à l'aide d'un scalpel en faisant deux incisions longitudinales de part et d'autre de des fentes de déhiscence. Les graines sont ensuite récupérées à l'aide d'une pointe montée et congelées immédiatement dans de l'azote liquide. La dissection de 10 siliques procure environ 10mg de graines. Les graines prélevées ont été broyées au mortier dans de l'azote liquide avec une pointe de spatule de PVP insoluble. Après avoir réduit grossièrement l'ensemble, 450µL de tampon RLC (Qiagen) additionné de 2-mercaptoéthanol (10µL/mL) sont ajoutés et le broyage est poursuivi. Une pâte se forme alors et le broyage doit être poursuivi jusqu'à obtention d'un liquide. Ce dernier est alors prélevé et transvasé directement dans la colonne violette pour continuer l'extraction selon le protocole indiqué par le fabricant.

9.2.3. Dosage des ARN

Le dosage des acides nucléiques est réalisé avec un spectrophotomètre NP80 Nanophotometer (Implen). L'absorbance est mesurée à 260 nm, 230nm et 280nm sur 1 µL d'extrait d'ADN ou d'ARN. L'absorbance à 260 est directement proportionnelle à la concentration en acide nucléique dans l'échantillon d'après la loi de Beer-Lambert. Les ratios

d'absorbance 260/280 et 260/230 renseignent sur la qualité de l'ARN et doivent être compris entre 1,80 et 2 et 2 et 2,2 respectivement.

9.2.4. Rétro-transcription

Un contrôle de la quantité et de la qualité de l'ARN extraits a été effectué par migration sur gel d'agarose à 2%. 200ng d'ARN dans 8µL d'eau ultrapure stérile ont subi un traitement à la DNase par ajout de 2µL de tampon DNase 10X et 1µL (2U) de Turbo DNase (Invitrogen). Après une incubation de 30 minutes à 37°C, 1 µl d'EDTA 50 mM et 2 µl d'oligo dT 10mM ont été ajoutés au mélange afin de stopper la réaction de digestion des ADN. Après une incubation de 10 minutes à 70°C, 4µL de tampon 5X RT, 2µL de dNTP 10mM et 200U de RT revert Aid (EP0441, Life Technologies) ont été ajoutés, et les échantillons sont incubés à 42°C pendant une heure.

9.2.5. ddPCR : PCR Digitale en Gouttelettes

La PCR digitale en gouttelettes (digital droplet PCR : ddPCR) a été effectuée avec 5µL de matrice contenant 5ng d'ADNc et 17µL d'un mix composé de 11µL d'un mélange de tampon contenant du tampon ADN polymérase, des dNTP, un intercalant fluorescent EvaGreen, et de l'ADN polymérase (QX200 ddPCR EvaGreen Supermix, Bio-Rad), 0,22µL de chaque amorce et 5,5µL d'eau. Les amorces utilisées sont détaillées en **Annexe 1**.

L'ensemble de ces réactifs a été émulsionné (Bio-Rad QX200 Droplet Generator) avec 70µL d'huile (Droplet generation oil for EvaGreen, Bio-Rad) afin de créer des microgouttelettes pour avoir environ 1 molécule d'ADNc chacune. Chaque échantillon contient au final environ 20 000 gouttelettes soit autant de réactions PCR par échantillon. Le programme de qPCR (CFX96 Bio-Rad) comprend 10 minutes à 95°C puis 40 cycles de 95°C pendant 30 secondes, 58°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 45 secondes. La dernière étape comprend 5 minutes à 4°C, 5 minutes à 90°C puis une conservation jusqu'à l'arrêt à 5°C. La lecture des résultats est effectuée grâce au Bio-Rad QX200 Droplet Reader qui fonctionne d'une façon similaire à un cytomètre en flux en mesurant la fluorescence de chaque gouttelette. Cela permet *in fine* d'établir un rapport entre le nombre de gouttelettes fluorescentes et le nombre de gouttelettes totales d'un puits.

L'interprétation des résultats de ddPCR a été effectuée en calculant le rapport du nombre de gouttelettes positives pour le gène considéré sur le nombre moyen de gouttelettes positives pour les gènes de référence (*AT5G* et *APT1*) (Launay *et al.*, 2019) afin de normaliser les données par rapport aux gènes de référence. L'expression de chaque gène pour chaque condition a été ensuite calculée en calculant le rapport de la valeur normalisée pour la condition testée (mutant) par rapport à celle de la condition de référence (WT).

10. Techniques de biochimie des protéines

10.1. Extraction de protéines totales

10.1.1. Méthode 1 :

10mg de graines sèches et 30mg de graines en cours de maturation et en cours de déshydratation ont été retirées de leur silique puis broyées au piston dans un tube Eppendorf de 1,5mL avec 300µL de tampon d'extraction de protéines (50 mM Tris; 0,5mM DTT ; 0,5mM EDTA ; 0,5mM MgCl₂ ; inhibiteur de protéase (Merck) ; PMSF 0,1 mM ; 1 % de Triton X-100 ; pointe de spatule de PVP30). Après 10 minutes de centrifugation à 20 000xg, 4°C, le surnageant a été récupéré.

10.1.2. Méthode 2 :

Alternativement 30-40 mg de siliques immatures ont été broyées dans de l'azote liquide à l'aide d'un broyeur à billes puis 2 volumes de tampon d'extraction (1µL 2-mercapto-éthanol, 5µL d'inhibiteur de protéases (Merck), 50µL de PMSF 0,1M dissous dans de l'éthanol ajoutés à 0,7875mL de tampon d'extraction (8 M urée, 5% (m/v) SDS, 40 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1 mM EDTA, bleu de bromophénol 0.4 mg ml⁻¹). 100 graines ont été broyées dans 150µL de tampon d'extraction avec un piston. Les échantillons ont été agités fortement pendant 5 minutes puis ont été laissés sur glace 5 minutes, cette opération a été répétée 3 fois. Après une centrifugation de 10minutes à (18001xg) à 10°C, les surnageants ont été récupérés puis conservés à -20°C.

10.2. Dosage de protéine au réactif de Bradford

La teneur en protéines est déterminée avec la méthode de Bradford (Bradford, 1976) et est réalisable à partir des extraits protéiques issus de la méthode d'extraction n°1. 200 µL de réactif de Bradford ont été ajoutés à 795 µL d'eau distillée et 5 µL d'extrait de protéines et l'absorbance à 595 nm a été lue avec un spectrophotomètre (NP80 Nanophotometer®, Implen). L'absorbance obtenue a été comparée à la courbe standard obtenue avec une gamme de 0 à 15 µg de BSA (Bovine Serum Albumin). La concentration en protéines a été calculée avec la formule suivante : Concentration = ((Absorbance/pente de la courbe standard)/volume d'extrait de protéine)*Facteur de dilution.

10.3. Séparation de protéines sur gel SDS-PAGE

Les extraits protéiques sont séparés selon leur masse moléculaire en condition dénaturante sur un grand gel de polyacrylamide. Ce gel comprend deux parties : un gel de concentration sur sa partie supérieure qui permet de faciliter le départ des échantillons des puits de dépôts et de garantir une migration uniforme ensuite. Ce gel est composé de 4% d'acrylamide, 125mM de Tris-HCl pH=6,8, SDS 0,1%, persulfate d'ammonium 0,1%, TEMED 0,1%. La partie basale du gel est un gel de séparation à plus fort pourcentage en acrylamide afin d'avoir un maillage plus fin et une meilleure séparation des protéines. Ce gel est composé de 10% d'acrylamide, 375mM de Tris-HCl pH 8,8, SDS 0,1%, persulfate d'ammonium 0,1% et TEMED 0,1%. 150µg d'extraits protéiques sont chauffés à 95°C pendant 5 minutes afin de dénaturer les protéines puis sont mélangés avec du tampon de charge Laemmli (62mM Tris-HCl, SDS 0,2% glycérol 10%, 2-mercaptoéthanol 5%, Bleu de Bromophénol 400mg/L). Les échantillons sont chargés dans les puits du gel. L'électrophorèse se déroule dans un tampon de migration (Tris 25mM ; glycine 192mM, SDS 0,1%) et dure 8h sous l'influence d'un courant de 16mA et 300V. La révélation des protéines est effectuée sur une nuit à l'aide d'une solution de coloration (acide acétique 40%, éthanol 50%, bleu de Coomassie R 0,05%). La décoloration du gel se fait sur 2 jours à l'aide d'une solution de décoloration d'acide acétique 7%, éthanol 5%.

10.4. Western Blot

Les protéines séparées sur gels SDS-PAGE ont été transférées sur membrane de nitrocellulose pendant 1h30 à 120V dans du tampon de transfert (Tris-HCl 2,5mM, pH 8,3 ; glycine 15mM) puis colorées au rouge Ponceau pendant 5 minutes afin de vérifier la bonne réalisation du transfert. La membrane a ensuite été incubée pendant une heure dans un tampon de blocage (TBS-T + lait écrémé en poudre 5 %), puis lavée deux fois avec du tampon TBS-T (TBS + Tween 0,1%) avant d'être incubée une nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire anti-ProDH1 (8µL dilué au 1/1000e dans le tampon de blocage). Après 4 lavages de 30 minutes au total dans du TBS-T, la membrane a été incubée pendant 1h avec l'anticorps secondaire marqué à la HRP (anticorps anti-IgG de lapin) et dilué au 1/8000e dans du TBS-T. Après 3 lavages de 25 minutes au total dans du TBS-T, les membranes ont été lavées 5 minutes dans du TBS (Tris-Cl 20mM, NaCl 150mM, pH 7,6) puis mises en contact avec les réactifs d'immunodétection mélangés selon un ratio de volume 1:1 (ECL Prime, GE Healthcare). Après 5 minutes d'incubation à l'obscurité, l'excès de réactifs sur la membrane est enlevé et la membrane est révélée à l'aide d'une caméra ECL et du logiciel LAS 300Image.

11.Évaluations individuelles de teneurs en métabolites libres, ions et composés de réserves

11.1. Dosage de proline

Le dosage de proline est un dosage colorimétrique à partir de ninhydrine réagissant avec la proline en formant un précipité rouge (Bates *et al.*, 1973).

A partir de 30 à 40mg de matériel végétal broyé au mortier dans de l'azote liquide, 1,5mL d'acide sulfosalicylique 3% sont ajoutés puis vortexés et centrifugés 10 minutes à 20817xg. 400µL de surnageant sont récupérés dans un nouveau tube de 2mL puis 400µL de tampon ninhydrine (2,5% ninhydrine m/v ; 59% acide acétique glacial, 38,5% acide phosphorique 6M) sont ajoutés puis 400µL d'acide acétique glacial. Après avoir été vortexés, les tubes sont incubés dans un bain sec de 100°C pendant 1h. Après avoir fait refroidir les tubes dans la glace, 800µL de toluène sont ajoutés aux échantillons puis les tubes sont vortexés afin d'extraire la coloration rouge. L'absorbance à 520nm de la phase supérieure des échantillons

est alors lue au Nanodrop (NP80 Nanophotometer, Implen). La concentration en proline est déterminée en s'aidant d'une gamme de proline de 0 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 et 20 mg/mL traitée de la même façon que les échantillons. La couleur rouge peut être très intense pour certains échantillons notamment les graines et les fleurs ce qui nécessite de diluer la phase supérieure pour relecture. La teneur en proline (en $\mu\text{mol/g}$ MF) est calculée par la formule suivante : $C = ((\text{Concentration mesurée (en } \mu\text{g/mL}) \cdot \text{Facteur de dilution} \cdot \text{Volume d'extraction (en mL)}) / (\text{Masse fraîche d'échantillon (en g)} \cdot \text{MM proline (en g/mol)})) \Leftrightarrow C = ((\text{Concentration mesurée (en } \mu\text{g/mL}) / \text{Facteur de dilution} \cdot 1,5) / (\text{Masse fraîche d'échantillon (en g)} \cdot 115,1))$. Les dosages de proline ont été réalisés en triplicats biologiques et duplicats techniques.

11.2. Dosage de P5C

Le dosage de P5C est un dosage colorimétrique à partir de O-aminobenzaldéhyde réagissant avec le P5C pour former une couleur orange (Miller *et al.*, 2009). Il s'effectue à partir de 400 μL de surnageant prélevé au cours du dosage de proline après l'étape d'extraction à l'acide sulfosalicylique. 50 μL de solution d'O-aminobenzaldéhyde 0,6% sont ensuite ajoutés aux échantillons. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance à 440nm est lue au spectrophotomètre Nanodrop (NP80 Nanophotometer, Implen). La teneur en P5C (en $\mu\text{mol/g}$ MF) est déterminée à l'aide de la formule suivante : $C = ((\text{Absorbance à 440nm} \cdot \text{facteur de dilution}) / \epsilon_{\text{P5C 440nm}} \cdot \text{Volume d'extraction (en mL)}) / \text{masse de poudre (en g)} \Leftrightarrow C = ((\text{Absorbance 440nm} \cdot 1,125) / 2,58) \cdot 1,5 / \text{Masse de poudre (en g)}$.

Les dosages de P5C ont été réalisés en triplicats biologiques et duplicats techniques.

11.3. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Le MDA est un témoin du stress oxydant. Il résulte de l'oxydation des acides gras sous l'effet des ROS. L'extraction des MDA (Grotto *et al.*, 2009) s'effectue dans des tubes en verre avec bouchon en téflon à vis. A partir de 50mg de matériel végétal broyé au mortier dans de l'azote liquide, 1 ml de solution d'extraction (acide thiobarbiturique 0,5 %, acide trichloroacétique 20 %) a été ajouté aux échantillons. Ensuite, ces derniers ont été incubés pendant 30 minutes au bain marie à 95°C. Après centrifugation (10 min, 15521xg, 4°C).

L'absorbance du surnageant complété à 1,5mL avec de la solution d'extraction a été mesurée pour 532 nm et 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanophotometer NP80® Implen). La teneur en MDA (en $\mu\text{mol/g}$ MF) a été estimée avec la formule suivante: $C = ((\text{Abs}_{532\text{nm}} - \text{Abs}_{600\text{nm}}) / (\epsilon_{\text{complexe}} \text{ (en L/mol/cm)} * \text{Largeur cuve (en cm)})) * \text{Volume d'extrait (en mL)} * (1/\text{masse fraiche (en g)}) \Leftrightarrow C = ((\text{Abs}_{532\text{nm}} - \text{Abs}_{600\text{nm}}) / (155 * 1)) * 1,5 * (1/\text{Masse Fraiche (en g)})$.

Les dosages de MDA ont été réalisés en triplicats biologiques et duplicats techniques.

11.4. Dosage de l'amidon

Le contenu en amidon dans les graines sèches a été mesuré avec l'aide du kit Total Starch Assay (Megazyme). La réaction consiste à effectuer une digestion enzymatique de l'amidon en glucose puis à faire réagir le glucose avec un réactif « GOPOD » (réaction de peroxydation) afin de pouvoir en mesurer l'absorbance à 510nm.

A partir 100mg de graines broyées finement au mortier dans de l'azote liquide, 200 μL d'éthanol 80% sont ajoutés aux échantillons puis 2mL de NaOH 1,7M. Après agitation des tubes pendant 15 minutes en les vortexant toutes les 5 minutes, 8mL de tampon C (acétate de sodium 600mM, chlorure de calcium 5mM, pH3,8) sont ajoutés. Le pH du milieu réactif doit alors être de 5. 100 μL d' α -amylase thermostable sont ajoutés aux échantillons puis 100 μL d'AMG (amyloglucosidase). Les échantillons sont ensuite chauffés à 50°C pendant 30 minutes au bain-marie puis refroidis. 2mL d'échantillons sont ensuite prélevés et centrifugés à 20817xg. 1mL de surnageant est alors transféré dans un tube de 15mL contenant 4mL de tampon A (acétate de sodium 100mM, pH 5, chlorure de calcium 5mM). Après avoir vortexé les échantillons, 3mL de réactif GOPOD sont ajoutés au milieu puis les échantillons sont incubés à 50°C pendant 20 minutes au bain marie. L'absorbance à 510nm est alors lue. Le blanc du spectrophotomètre est effectué avec 100 μL de tampon A (acétate de sodium 100mM, pH5, CaCl₂ 5mM) additionné de 3mL de réactif GOPOD. Des échantillons contrôles sont également mesurés en ajoutant 100 μL de solution standard de glucose (1mg/mL) additionné de 3mL de GOPOD. Le pourcentage d'amidon est déterminé par la formule suivante : (absorbance de l'échantillon – absorbance du blanc) * facteur de conversion des valeurs en glucose * volume d'extraction (en mL) * (facteur de dilution/masse de l'échantillon (en mg) * facteur de

conversion du glucose libre en amidon. \Leftrightarrow (Abs 510nm échantillon – Abs 510nm blanc)*(100/Abs standard glucose)*10,2*(facteur dilution/masse de l'échantillon (en mg))*0,9. Les dosages d'amidon ont été réalisés en triplicats biologiques et duplicats techniques.

11.5. Dosage de nitrates, nitrites et ammonium

11.5.1. Extraction de nitrates, nitrites et ammonium

L'extraction se fait à l'aide d'une solution hydroalcoolique dans un volume 10 fois supérieur à la masse de matériel (ou 20 fois supérieur dans le cadre de graines sèches) soit 500 μ L pour 50mg de matériel ou 1mL pour 50mg de graines sèches. Elle doit se faire également impérativement sur glace et avec des réactifs froids pour préserver l'ammonium.

A partir de 30mg de graines fraîches (en cours de maturation ou de déshydratation), 40% du volume d'extraction total en éthanol 80% froid à pH 6 est ajouté aux échantillons dans des tubes de 1,5mL puis le tout est broyé à l'aide d'un piston. Les échantillons sont mis à tourner sur roue à 4°C pendant 1h30 puis centrifugés à 4°C à 10621xg. Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube. Après avoir ajouté 30% du volume d'extraction total en éthanol 50% froid sur le culot et vortexé, les échantillons sont mis à tourner sur roue à 4°C pendant 1h. Après une centrifugation de 10 minutes à 4°C et 10621xg, le surnageant est récupéré puis ajouté au premier. Les 30% restant du volume d'extraction en eau ultrapure sont alors ajoutés sur le culot et les échantillons sont mis à tourner sur roue à 4°C pendant 1h après avoir été vortexés. Le surnageant est récupéré après centrifugation des échantillons à vitesse maximale pendant 10 minutes.

11.5.2. Dosage de nitrates et de nitrites

Ce dosage est effectué selon la méthode de Miranda (Miranda *et al.*, 2001) qui repose sur la réduction du nitrate en nitrite par du chlorure de vanadium. Les nitrites forment alors un chromophore rose grâce à une réaction de diazotation de la sulfanilamide en milieu acide suivi d'un couplage avec le N-1-naphtylethylenediamine (NNED).

Le dosage des nitrates s'effectue dans une plaque 96 puits. Dans chacun des puits est déposé 20 μ L d'échantillon, 80 μ L d'eau milliQ puis 100 μ L de réactif de Miranda (HCl 0,498N,

16mM chlorure de vanadium ; 0,269mM NNED ; 6mM sulfanilamide). La plaque est placée à l'étuve à 60°C pendant 1h30 puis refroidie à température ambiante pendant 20 minutes. L'absorbance à 540nm est alors lue au spectrophotomètre. La concentration en nitrates est alors déterminée à partir d'une gamme de nitrates de sodium de 0 à 70µM de nitrates.

Le dosage de nitrites s'effectue de la même façon avec une gamme de nitrites de sodium. Il n'y a cependant pas de Chlorure de vanadium dans le réactif de Miranda afin de ne pas réduire les nitrates en nitrites mais de ne doser que les nitrites existants.

Les dosages de nitrates et de nitrites ont été réalisés en triplicats biologiques et duplicats techniques.

11.5.3. Dosage de l'ammonium

Le dosage de l'ammonium repose sur la formation d'un complexe coloré bleu (indophénol) par réaction de l'ammonium avec de l'hypochlorite de Sodium (Javel) et un phénol en milieu basique.

Le dosage de l'ammonium s'effectue dans une plaque 96 puits. Dans chacun des puits sont déposés 10µL d'échantillon puis 100µL de phénolate de sodium 0,33M, pH=13, puis 100µL de nitroprussiate de sodium 0,01% et enfin 100µL d'hypochlorite de sodium 1,6%. L'absorbance des échantillons à 635nm est lue après une incubation de 40 minutes à température ambiante. La concentration en ammonium est alors déterminée à partir d'une gamme de sulfate d'ammonium.

Les dosages d'ammonium ont été réalisés en triplicats biologiques et duplicats techniques.

12. Analyses élémentaires

Les analyses élémentaires de C et de N permettent de déterminer le % de Carbone et d'Azote que contiennent des graines. Pour cela, 1 à 2 mg de graines sont encapsulées dans des cupules en étain qui sont chauffées à 1000°C, les atomes des molécules organiques sont alors rendus gazeux et sont poussés vers une colonne par de l'hélium pour être analysés en chromatographie en phase gazeuse. La masse des atomes étant différentes, le temps de rétention de ces derniers par la colonne permet de les séparer et de les quantifier à l'aide de

l'aire contenue sous les pics présentés en sortie d'analyse. La détermination de la quantité de N et de C se fait à l'aide d'une gamme de masse croissante d'atropine dont les quantités de N et de C sont connues.

13. Analyses Omiques

13.1. Métabolomique

13.1.1. Extraction d'acides aminés, acides organiques et sucres

Le protocole utilisé a été adapté de Renault *et al.* (2010). L'extraction se fait avec du méthanol, de l'eau et du chloroforme afin de récupérer les composés polaires et hydrosolubles. A partir de 10mg de poudre de tissus lyophilisés, 400µL de solution contenant 20mM d'adonitol (standard interne pour l'analyse de glucides) et 10mM de BABA (acide β-aminobutyrique, standard interne pour l'analyse d'acides aminés) dans du méthanol sont ajoutés puis les échantillons sont vortexés avant d'être mis sous agitation pendant 15 minutes. 200µL de chloroforme sont ajoutés à chaque tube afin de piéger les débris et les lipides. Après avoir été vortexés, les échantillons sont de nouveau agités pendant 10 minutes puis 400µL d'eau ultrapure sont ajoutés aux échantillons qui sont ensuite de nouveau vortexés. Après une centrifugation de 5 minutes à 12000xg à 15°C, le surnageant est récupéré puis transféré dans un tube de 1,5mL. 50µL de surnageant seront utilisés pour l'analyse d'acides aminés en UPLC, 50µL de surnageant seront utilisés pour l'analyse d'acides organiques et sucres en GC. Ces 50µL de surnageant sont évaporés pendant 2h dans un speedvac à 35°C.

13.1.2. Dérivation des acides aminés et analyse UPLC

Le protocole de dérivation des acides aminés est adapté de Renault *et al.* (2010). La dérivation pour l'analyse UPLC consiste à accrocher un AccQTag au niveau de l'amine libre du radical de l'acide aminé en condition basique. Cet AccQTag est un composé phénolique avec des doubles liaisons conjuguées absorbant dans l'UV et qui ne modifie pas la polarité de l'acide aminé. Elle permet la détection de l'acide aminé dans l'UPLC après lecture de l'absorbance à

280nm. Dans l'UPLC (Chromatographe Liquide Ultra-haute Performance), le temps de rétention des acides aminés dans la colonne dépend de leur encombrement et de leur polarité.

La dérivation des acides aminés s'effectue à l'aide du kit de dérivation AccQTag Ultra Derivatization Kit (Waters Corporation). A partir des 50µL de surnageant séchés en fin d'extraction de métabolites, les échantillons sont repris dans 50µL d'eau ultrapure. Dans un nouveau tube, 35µL de tampon borate sont déposés puis 5µL d'extrait de métabolites puis 10µL de réactif de dérivation AccQTag. Les échantillons sont vortexés puis placés au bain marie à 55°C pendant 10 minutes. Le contenu des tubes est ensuite transféré dans des vials UPLC. Des standards externes (échantillons contenant tous les acides aminés détectables en quantité connues) sont également dérivés de la même manière que les échantillons. 1µL d'échantillon est ensuite analysé par un chromatographe liquide UPLC (Acquity UPLC system, Waters Corporation) dans un flux d'éluant (AccQTag Ultra Eluent, Waters Corporation) et d'acétonitrile en proportions variables afin d'établir un gradient de polarité dans la colonne. La teneur en acides aminés dans les échantillons est calculée à partir de l'aire des pics en sortie d'UPLC.

Elles sont calculées par la formule
$$\frac{\left(\frac{[BABA]}{Aire_{BABA}} \times RF_{Espèce} \times Aire_{Espèce}\right) \times Volume\ de\ l'extrait\ (en\ mL)}{Masse\ sèche}$$

avec $\left(\frac{[BABA]}{Aire_{BABA}} \times RF_{Espèce} \times Aire_{Espèce}\right)$: Concentration ; $RF_{Espèce}$: Rapport de surface (sans unité) permettant d'établir un coefficient de proportionnalité entre l'aire d'un pic pour une espèce donnée et l'aire du BABA à partir des données de standard externe. Il est calculé par : $\frac{[Espèce\ standard\ externe]}{Aire_{Espèce\ Standard\ externe}} \times \frac{Aire_{BABA\ Standard\ Externe}}{[BABA]}$. D'après le protocole décrit ci-avant, le calcul s'effectue avec les données suivantes : [BABA] = 100µM ; [Espèce standard externe] = 100µM ; Volume de l'extrait = 0,8mL.

13.1.3. Dérivation des acides organiques et sucres et analyse GC

Le protocole de dérivation des acides organiques et sucres a été adapté de Renault *et al.* (2010). La dérivation pour l'analyse GC permet de rendre des composés polaires volatiles afin d'être détectables en chromatographie en phase gazeuse. Pour cela, les acides organiques et sucres extraits sont silylés afin de les rendre volatils. Dans un chromatographe en phase gazeuse, les échantillons silylés sont chauffés, en passant sous forme gazeuse donc volatile, ces derniers sont détectés au niveau d'une colonne qui permet de les quantifier, le temps de

volatilisation étant propre à chaque molécule et dépendant de leur masse moléculaire, cela permet également leur qualification.

Les étapes décrites ci-après sont entièrement automatisées par un dérivateur automatique (Multi Purpose Sampler, Gerstel). A partir des 50µL de surnageant séchés après l'extraction, 50µL de solution d'hydrochloride de méthoxyamine dissoute dans de la pyridine (20mg/mL) est ajoutée à chaque échantillon. Les échantillons sont ensuite vortexés puis chauffés à 30°C pendant 90 minutes dans un bain sec. 50µL de N-méthyl-N(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (MSTFA) sont ensuite ajoutés dans chaque échantillon puis ces derniers sont placés dans un bain sec à 37°C pendant 30 minutes après avoir été vortexés. Les échantillons ainsi que des standards externes (mélanges de molécules détectables par la colonne de GC en concentrations connues) traités de la même manière que les échantillons sont ensuite analysés par un chromatographe en phase gazeuse (GC 6890N, Agilent). La teneur en chaque métabolite détecté est calculée à partir de l'aire des pics relevés sur le spectre donné par le chromatographe. A partir du rendement de la réaction calculé par $R = \text{surface adonitol échantillon} / \text{surface adonitol standard externe}$. L'aire des pics est corrigée par $\text{Aire corrigée} = \text{Aire brute} / \text{rendement}$. Les concentrations (en nmol/µL) peuvent alors être calculées par $C = ((\text{Aire corrigée} * \text{Concentration des standards (en mM)}) / (\text{surface du standard externe} * \text{Facteur de dilution}))$. Les teneurs en métabolites sont alors calculées par la formule $Q = (\text{concentration} * \text{volume de l'extrait}) / \text{Masse sèche de départ}$.

13.1.4. Analyse métabolomique par GC-MS

Une analyse métabolomique complémentaire a été effectuée sur des graines en cours de maturation sorties de leur silique. Les métabolites ont été identifiés et dosés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). Ces analyses ont été confiées à l'observatoire du végétal – chimie/métabolisme de l'Institut Jean-Pierre Bourgin de Versailles (INRAE).

13.1.5. Extraction et Analyse d'acides gras GC sur graines sèches

Le protocole utilisé pour l'extraction et l'analyse des acides gras a été adapté de Li *et al.* (2006). L'analyse de la nature et de la quantité d'acides gras présents dans des graines repose sur une chromatographie en phase gazeuse. Les analyses ont été effectuées sur des

graines sèches entières et des graines disséquées pour analyse séparée des fractions embryon et albumen/enveloppe.

L'extraction s'effectue dans des tubes en verre à bouchons en téflon à vis à partir de 40 graines entières et de 50 embryons et de 50 albumens/enveloppes. La séparation des deux fractions se fait par dissection des graines sous une loupe binoculaire après imbibition de 3h dans de l'eau distillée. Après dissection, les fractions sont conservées dans de l'azote liquide.

L'extraction est effectuée à l'aide d'un mélange méthanol-acide sulfurique-toluène. Le toluène permet ainsi d'extraire les lipides sans devoir broyer et perdre des échantillons. Les acides gras présents dans les échantillons sur des squelettes de triacylglycérols vont être détachés de leur squelette glycérol puis attachés à du méthanol de manière à pouvoir être volatils et individualisés. Cette réaction se fait en milieu acide et à chaud. L'analyse en GC se fait grâce à l'ajout d'hexane en guise de solvant.

Dans chaque tube 1,325mL de mélange méthanol :acide sulfurique :toluène (100 :2,5 :30, v/v/v) additionnés de C17 :0 (standard interne) sont distribués puis les tubes sont centrifugés pendant 2 minutes à 850xg avant d'être placés au bain-marie à 94°C pendant 1h30. Les échantillons sont ensuite refroidis dans la glace puis 450µL d'hexane est ajouté puis 1,5mL d'eau salée (NaCl 0,9%). Une émulsion est créée par agitation vigoureuse sans vortex et les échantillons sont de nouveau centrifugés 2 minutes à 850xg. La phase supérieure est alors concentrée sous flux d'azote jusqu'à atteindre 3mm. 100µL de phase supérieure est alors transférée dans les flasques de GC puis les échantillons sont séchés entièrement sous flux d'azote avant ajout de 30µL d'hexane. Les échantillons sont ensuite analysés en GC (GC system 7890B, Agilent technologies avec Bras injecteur Autosampler 7693, Agilent Technologies). La teneur en chaque espèce d'acide gras est déterminée à partir de l'aire des pics sous la courbe sortie par l'analyse GC. La teneur (en % des acides gras totaux) est calculée par la formule : $Q = \frac{\text{Aire du pic/MM espèce}}{\text{somme des rapports (aire du pic/MM espèce)}} \text{ pour toutes les espèces détectées dans l'échantillon} * 100$.

13.2. Protéomique

13.2.1. Principe

L'analyse protéomique non ciblée comprend 4 étapes principales : l'extraction des protéines en condition dénaturantes (avec SDS et iodoacétamide), la digestion des protéines en peptides après récolte sur billes en utilisant de la trypsine qui clive en C-term après les arginines et les lysines si elles ne sont pas suivi par une proline, le passage en UPLC qui permet de trier les peptides selon un gradient d'hydrophobicité puis le passage en spectrométrie de Masse (MS) afin de déterminer la masse des peptides et d'en déduire leur séquence par analyse bioinformatique.

13.2.2. Extraction de protéines totale et digestion

L'extraction des protéines, leur accrochage sur des billes et leur digestion en peptides s'inspire des protocoles développés par Hughes *et al.* (2019) et Mikulášek *et al.* (2021). Après broyage de 5 minutes de 30mg de graines au froid et avec des billes de métal, 500µL de tampon d'extraction SDT (4% SDS ; 0,1M DTT ; 0,1M Tris-HCl ; pH 7,6) sont ajoutés au broyat et agités pendant 2h à 95°C et 1000rpm. Après centrifugation de 10 minutes à 20 000xg à température ambiante, 400µL de surnageant sont transférés dans un nouveau tube. Les échantillons sont ensuite soumis à 10 minutes de sonication puis de nouveau centrifugés pendant 10 minutes à 20 000xg à température ambiante. 30µL de surnageant sont transférés dans un nouveau tube et 7,5µL d'iodoacétamide 100mM sont ajoutés afin de permettre l'alkylation des échantillons. Les tubes sont ensuite incubés sous agitation pendant 30 minutes dans le noir, à 24°C et 600rpm. 2µL de DTT 100mM sont ensuite ajoutés aux échantillons puis 30µL de solution de billes SP3 (Sera-Mag Carboxylate-Modified Beads, GE Life Science). Après mélange des billes et de l'échantillon par aspiration-relargage 70µL d'éthanol absolu est ajouté puis les échantillons sont incubés pendant 10 minutes à 24°C sous agitation à 1000rpm. Après incubation, les phases solides (billes et protéines attachées) et liquide (reste) sont séparées sur un portoir magnétique permettant de plaquer contre les parois du tube la phase solide chargée. Le surnageant est alors éliminé et les billes sont rincées 4 fois avec 140µL d'éthanol 80%. 140µL d'éthanol sont ensuite de nouveau ajoutés aux échantillons et la suspension est

transférée dans un tube LPB (Low Protein Binding) placé de nouveau sur un portoir magnétique afin d'éliminer tout le surnageant.

La digestion des peptides dure au moins 18h à l'obscurité, à 37°C et sous agitation à 1000rpm après avoir ajouté 50µL de réactif de digestion (40% Trypsine 0,1µg/µL, 60% bicarbonate d'ammonium à 50mM, 20% d'eau ultrapure). En fin de digestion, les échantillons sont centrifugés (20 000xg, 10 minutes) puis placés sur un portoir magnétique pendant 2 minutes. Le surnageant est ensuite récupéré dans un nouveau tube LPB et 60µL de bicarbonate d'ammonium sont ensuite ajoutés pour éluer les peptides. L'opération est renouvelée 3 fois.

13.2.3. Purification, dessalement de peptides et préparation des échantillons

La purification et le dessalement des peptides permet de laver les peptides pour éliminer tous les résidus de sels et réactifs issus de l'échantillon ou du processus d'extraction et de digestion. Elle s'effectue à l'aide d'un kit SepPak (Waters Corporation) en suivant strictement les instructions du protocole. Les échantillons sont acidifiés à l'aide d'acide formique afin de faire passer les acides aminés à travers la colonne sous leur forme acide. En fin de lavage, les échantillons sont élués avec une solution de 50% d'acétonitrile, 0,1% acide formique puis évaporés dans un SpeedVac pendant une nuit.

Après reprise des échantillons dans 110µL d'Eau ultrapure un dosage de peptides est effectué en utilisant la méthode de Bradford à l'aide du kit Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay (Thermo) en suivant strictement les instructions du protocole. 10µL d'échantillons sont ensuite déposés dans chaque vials d'UPLC puis complétés avec de l'acide formique 0,1% de manière à obtenir une concentration en peptides de 100ng/µL.

13.2.4. Analyse UPLC-MS/MS

L'analyse protéomique est effectuée par un chromatographe liquide ultra-haute performance couplé à un spectromètre de masse à temps de vol en tandem (TIMS-TOF, Bruker). Les données m/z sont ensuite comparées à une base de données de peptides digérés afin d'en retrouver leur séquence. Cette analyse est effectuée avec l'outil bioinformatique MaxQuant.

14. Bioinformatique

14.1. SnapGene

Le design expérimental des expériences de clonage ainsi que la vérification de leur faisabilité *in silico* a été faite à l'aide du logiciel SnapGene 6.1.

14.2. Perseus

Le premier traitement bioinformatique des données protéomique non ciblée a été effectuée à l'aide du logiciel Perseus (Max Planck Institute of Biochemistry) notamment l'élimination de potentiel contaminants, des séquences inversées, des identifications partielles ou non répétées. Perseus a été également été utilisé pour contrôler la validité des données par classification hiérarchique (clustering) et pour préparer leur exploitation en les transformant en Log2 puis en les normalisant avant d'effectuer un T-test généralisé.

14.3. R-Studio

Le tri de données de protéomique, leur mise en forme selon les critères d'analyse ainsi que la recherche de protéines d'intérêt ont été effectués en utilisant R-Studio.

L'analyse statistique globale des données métabolomiques a été effectuée en utilisant les paquets FactoMineR, ade4 et TidyR sur RStudio.

Les différents tests statistiques (Shapiro, Fisher, Anova, Tukey, Student, Wilcoxon, Khi-2) effectués sur les données récoltées ont été effectués en utilisant R-Studio.

14.4. Virtual Plant, Kegg et MapMan

La cartographie des voies métaboliques perturbées à partir des données de protéomique non-ciblée a été réalisée à l'aide de MapMan 3.0 à partir de données de ratios mutants *p5cdh* / WT.

Le tri des catégories métaboliques significativement différentes entre les différents génotypes à partir des données de protéomique non ciblées a été effectué en utilisant l'outil

BioMaps de Virtual Plant 1.3 (virtualplant.bio.nyu.edu). Cet outil utilise la base de données KEGG-pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (genome.jp/kegg). A partir d'une liste de numéro d'accessions correspondant aux protéines significativement différentes entre WT et mutants, cet outil dégage une liste de processus métaboliques associés avec une p-value. Cette dernière caractérise la probabilité du processus métabolique en question de ne pas être impacté chez *p5cdh* par rapport à Col-0.

14.5. MeV

A partir des teneurs mesurées pour chaque composé en métabolomique, des ratios *p5cdh*/WT sont calculées. Ces ratios sont transformés en Log2. Ces valeurs sont converties en HeatMap à l'aide de MeV 10.2.

14.6. Bases de données utilisées

14.6.1. Tair

L'analyse fonctionnelle des protéines dégagées par l'analyse protéomique est permise par l'utilisation de Tair (arabidopsis.org) notamment au travers de l'outil Data Bulk Retrieval et GeneOntology Annotation.

L'analyse de gènes candidats pour l'expression albumen spécifique et embryon spécifique a été permise notamment grâce à l'outil Bar (UToronto, Winter *et al.*, 2007) à partir de Tair.

L'analyse de séquences pour la stratégie de clonage a été effectuée à partir de l'outil SequenceViewer depuis Tair.

14.6.2. Uniprot

La localisation subcellulaire des protéines dégagées par l'analyse protéomique a été faite à l'aide de la base de donnée UniProt.

Références Bibliographiques

Abell BM, Holbrook LA, Abenes M, Murphy DJ, Hills MJ, Moloney MM. 1997. Role of the proline knot motif in oleosin endoplasmic reticulum topology and oil body targeting. *The Plant Cell* **9**: 1481–1493.

Académie d'agriculture de France. 2021. Evolution du rendement moyen annuel du blé France entière de 1815 à 2020. https://www.academie-agriculture.fr/sites/default/files/publications/encyclopedie/01.02.r02_rendt_ble_tendre_france_1815_2020.pdf.

Ahmad I, Hellebust JA. 1988. The Relationship between Inorganic Nitrogen Metabolism and Proline Accumulation in Osmoregulatory Responses of Two Euryhaline Microalgae. *Plant Physiology* **88**:348-354

Alexander MP. 1969. Differential Staining of Aborted and Nonaborted Pollen. *Stain Technology* **44**: 117–122.

Alia, Saradhi PP. 1993. Suppression in Mitochondrial Electron Transport Is the Prime Cause behind Stress-Induced Proline Accumulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **193**: 54–58.

Allorent G, Osorio S, Ly Vu J, Falconet D, Jouhet J, Kuntz M, Fernie AR, Lerbs-Mache S, Macherel D, Courtois F, et al. 2015. Adjustments of embryonic photosynthetic activity modulate seed fitness in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **205**: 707–719.

Almagro A, Lin SH, Tsay YF. 2009. Characterization of the *Arabidopsis* Nitrate Transporter NRT1.6 Reveals a Role of Nitrate in Early Embryo Development. *The Plant Cell* **20**: 3289–3299.

Alvarez ME, Savouré A, Szabados L. 2022. Proline metabolism as regulatory hub. *Trends in Plant Science* **27**: 39–55.

Andrews M, Raven JA, Lea PJ. 2013. Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants: Do plants need nitrate? *Annals of Applied Biology* **163**: 174–199.

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

Araújo WL, Tohge T, Ishizaki K, Leaver CJ, Fernie AR. 2011. Protein degradation – an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends in Plant Science*.

Armengaud P, Thiery L, Buhot N, Grenier-de March G, Savoure A. 2004. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. *Physiologia Plantarum* **120**: 442–450.

Asthir B, Duffus CM, Smith RC, Spoor W. 2002. Diamine oxidase is involved in H₂O₂ production in the chalazal cells during barley grain filling. *Journal of Experimental Botany* **53**: 677–682.

Aubert Y, Leba L-J, Cheval C, Ranty B, Vavasseur A, Aldon D, Galaud J-P. 2011. Involvement of RD20, a member of caleosin family, in ABA-mediated regulation of germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 538–540.

- Bailly C. 2004.** Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* **14**: 93–107.
- Barthole G, To A, Marchive C, Brunaud V, Soubigou-Taconnat L, Berger N, Dubreucq B, Lepiniec L, Baud S. 2014.** MYB118 represses endosperm maturation in seeds of Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 3519–3537.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID. 1973.** Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* **39**: 205–207.
- Baud S, Dubreucq B, Miquel M, Rochat C, Lepiniec L. 2008.** Storage Reserve Accumulation in Arabidopsis: Metabolic and Developmental Control of Seed Filling. *The Arabidopsis Book* **6**: e0113.
- Baud S, Guyon V, Kronenberger J, Wuille S, Miquel M, Caboche M, Lepiniec È, Rochat C. 2002.** Multifunctional acetyl-CoA carboxylase 1 is essential for very long chain fatty acid elongation and embryo development in Arabidopsis. *The Plant journal* **33**:75-86
- Baud S, Lepiniec L. 2010.** Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Progress in Lipid Research* **49**: 235–249.
- Baud S, Vaultier M-N, Rochat C. 2004.** Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **55**: 397–409.
- 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. *The Plant Journal* **43**: 824–836.
- Becerra C, Puigdomenech P, Vicient CM. 2006.** Computational and experimental analysis identifies Arabidopsis genes specifically expressed during early seed development. *BMC Genomics* **7**.
- Beier MP, Kojima S. 2021.** The function of high-affinity urea transporters in nitrogen-deficient conditions. *Physiologia Plantarum* **171**: 802–808.
- Belmonte MF, Kirkbride RC, Stone SL, Pelletier JM, Bui AQ, Yeung EC, Hashimoto M, Fei J, Harada CM, Munoz MD, et al. 2013.** Comprehensive developmental profiles of gene activity in regions and subregions of the Arabidopsis seed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**.
- Berger F. 2003.** Endosperm: the crossroad of seed development. *Current Opinion in Plant Biology* **6**:42-50
- Bergsdorf E-Y, Zdebik AA, Jentsch TJ. 2009.** Residues Important for Nitrate/Proton Coupling in Plant and Mammalian CLC Transporters. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 11184–11193.
- Bies-Ethève N, Gaubier-Comella P, Debures A, Lasserre E, Jobet E, Raynal M, Cooke R, Delseny M. 2008.** Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology* **67**: 107–124.

- Bloom AJ, Sukrapanna SS, Warner RL. 1992.** Root Respiration Associated with Ammonium and Nitrate Absorption and Assimilation by Barley. *Plant Physiology* **99**: 1294–1301.
- Blume C, Ost J, Mühlenbruch M, Peterhänsel C, Laxa M. 2019.** Low CO₂ induces urea cycle intermediate accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE* **14**: e0210342.
- Boggess SF, Koeppe DE, Stewart CR. 1978.** Oxidation of Proline by Plant Mitochondria. *Plant Physiology* **62**: 22–25.
- Borg M, Brownfield L, Twell D. 2009.** Male gametophyte development: a molecular perspective. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1465–1478.
- Borisjuk L, Rolletschek H. 2009.** The oxygen status of the developing seed. *New Phytologist* **182**: 17–30.
- Bouché N, Lacombe BB, Fromm H. 2003.** GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism. *Trends in cell biology*. **13**:12
- Bradford M. 1976.** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- Braybrook SA, Stone SL, Park S, Bui AQ, Le BH, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ. 2006.** Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 3468–3473.
- Brown RC, Lemmon BE, Nguyen H, Olsen O-A. 1999.** Development of endosperm in *Arabidopsis thaliana*. *Sexual Plant Reproduction* **12**: 32–42.
- Browse J, Somerville C. 1991.** Glycerolipid Synthesis: Biochemistry and Regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 467–506.
- Brugière N, Dubois F, Limami AM, Lelandais M, Roux Y, Sangwan RS, Hirel B. 1999.** Glutamine Synthetase in the Phloem Plays a Major Role in Controlling Proline Production. *The Plant Cell* **11**: 1995–2011.
- Bucher M, Brander KA, Sbicego S, Mandel T, Kuhlemeier C. 1995.** Aerobic fermentation in tobacco pollen. *Plant Molecular Biology* **28**: 739–750.
- Buitink J, Hemminga MA, Hoekstra FA. 1999.** Characterization of Molecular Mobility in Seed Tissues: An Electron Paramagnetic Resonance Spin Probe Study. *Biophysical Journal* **76**: 3315–3322.
- Buitink J, Hemminga MA, Hoekstra FA. 2000.** Is There a Role for Oligosaccharides in Seed Longevity? An Assessment of Intracellular Glass Stability. *Plant Physiology* **122**: 1217–1224.
- Buitink J, Leprince O. 2008.** Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *Comptes Rendus - Biologies* **331**: 788–795.

- Buitink J, Walters-Vertucci C, Hoekstra FA, Leprince O. 1996.** Calorimetric Properties of Dehydrating Pollen (Analysis of a Desiccation-Tolerant and an Intolerant Species). *Plant Physiology* **111**: 235–242.
- Cabassa-Hourton C, Schertl P, Marianne BJ, Saadallah K, Guivarc'h A, Lebreton S, Planchais S, Klodmann J, Eubel H, Crilat E, et al. 2016.** Proteomic and functional analysis of proline dehydrogenase 1 link proline catabolism to mitochondrial electron transport in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* **473**: 2623–2634.
- Capron A, Chatfield S, Provart N, Berleth T. 2009.** Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell. *The Arabidopsis Book* **7**: e0126.
- Carranco R, Espinosa JM, Prieto-Dapena P, Almoguera C, Jordano J. 2010.** Repression by an auxin/indole acetic acid protein connects auxin signaling with heat shock factor-mediated seed longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 21908–21913.
- Carvalho HG, Lopes-Cardoso IA, Lima LM, Melo PM, Cullimore J v. 2003.** Nodule-Specific Modulation of Glutamine Synthetase in Transgenic *Medicago truncatula* Leads to Inverse Alterations in Asparagine Synthetase Expression. *Plant Physiology* **133**: 243–252.
- Castello PR, David PS, McClure T, Crook Z, Poyton RO. 2006.** Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: Implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metabolism* **3**: 277–287.
- Chardon F, Barthélémy J, Daniel-Vedele F, Masclaux-Daubresse C. 2010.** Natural variation of nitrate uptake and nitrogen use efficiency in *Arabidopsis thaliana* cultivated with limiting and ample nitrogen supply. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2293–2302.
- Chatelain E, Hundertmark M, Leprince O, le Gall S, Satour P, Deligny-penninck S, Rogniaux H, Buitink J. 2012.** Temporal profiling of the heat-stable proteome during late maturation of *Medicago truncatula* seeds identifies a restricted subset of late embryogenesis abundant proteins associated with longevity. *Plant, Cell & Environment* **35**: 1440–1455.
- Chen L, Lin IW, Qu XQ, Sosso D, McFarlane HE, Londoño A, Samuels AL, Frommer WB. 2015a.** A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the *Arabidopsis* embryo. *Plant Cell* **27**: 607–619.
- Chen M, Zhang B, Li C, Kulaveerasingam H, Chew FT, Yu H. 2015b.** TRANSPARENT TESTA GLABRA1 regulates the accumulation of seed storage reserves in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **169**: 391–402.
- Chopin F, Orsel M, Dorbe M-F, Chardon F, Truong H-N, Miller AJ, Krapp A, Daniel-Vedele F. 2007.** The *Arabidopsis* ATNRT2.7 Nitrate Transporter Controls Nitrate Content in Seeds. *The Plant Cell* **19**: 1590–1602.
- Christensen CA, King EJ, Jordan JR, Drews GN. 1997.** Megagametogenesis in *Arabidopsis* wild type and the Gf mutant. *Sexual Plant Reproduction* **10**: 49–64.

- Chrobok D, Law SR, Brouwer B, Lindén P, Ziolkowska A, Liebsch D, Narsai R, Szal B, Moritz T, Rouhier N, et al. 2016.** Dissecting the metabolic role of mitochondria during developmental leaf senescence. *Plant Physiology* **172**: 2132–2153.
- Clough SJ, Bent AF. 1998.** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**: 735–743.
- Cochrane MP. 2000.** Changes in chalazal cell walls and in the peroxidase enzymes of the crease region during grain development in barley. *Journal of Experimental Botany* **51**: 507–520.
- Colon-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P. 1999.** Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *The Plant Journal* **20**: 503–508.
- Crawford NM, Glass ADM. 1998.** Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* **3**: 389–395.
- Curaba J, Moritz T, Blervaque R, Parcy F, Raz V, Herzog M, Vachon G. 2004.** *AtGA3ox2*, a Key Gene Responsible for Bioactive Gibberellin Biosynthesis, Is Regulated during Embryogenesis by *LEAFY COTYLEDON2* and *FUSCA3* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **136**: 3660–3669.
- Dahlgren KVO. 1927.** Die Morphologie des Nuzellus mit besonder Berücksichtigung der deckzellosten Typen. *Jahr Wiss Bot*: 347–426.
- Dao O, Kuhnert F, Weber APM, Peltier G, Li-Beisson Y. 2022.** Physiological functions of malate shuttles in plants and algae. *Trends in Plant Science* **27**: 488–501.
- Daudi A, O'Brien JA. 2012.** Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in *Arabidopsis* Leaves. *Bio-protocol* **2**.
- DeRocher AE, Vierling E. 1994.** Developmental control of small heat shock protein expression during pea seed maturation. *The Plant Journal* **5**: 93–102.
- Deuschle K, Funck D, Forlani G, Stransky H, Biehl A, Leister D, van der Graaff E, Kunze R, Frommer WB. 2004.** The role of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. *Plant Cell* **16**: 3413–3425.
- Deuschle K, Funck D, Hellmann H, da È Schner K, Binder S, Frommer WB. 2001.** A nuclear gene encoding mitochondrial D 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *The plant journal* **27**(4):345-355
- Diaz C, Lemaître T, Christ A, Azzopardi M, Kato Y, Sato F, Morot-Gaudry JF, le Dily F, Masclaux-Daubresse C. 2008.** Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition. *Plant Physiology* **147**: 1437–1449.
- Diaz C, Saliba-Colombani V, Loudet O, Belluomo P, Moreau L, Daniel-Vedele F, Morot-Gaudry JF, Masclaux-Daubresse C. 2006.** Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **47**: 74–83.

- Doll NM, Ingram GC. 2022.** Embryo–Endosperm Interactions. *Annual Review of Plant Biology* **73**: 293–321.
- Doll NM, Royek S, Fujita S, Okuda S, Chamot S, Stintzi A, Widiez T, Hothorn M, Schaller A, Geldner N, et al. 2020.** A two-way molecular dialogue between embryo and endosperm is required for seed development. *Science* **367**:431-435
- Dolzblasz A, Gola E, Sokołowska K, Smakowska-Luzan E, Twardawska A, Janska H. 2018.** Impairment of Meristem Proliferation in Plants Lacking the Mitochondrial Protease AtFTSH4. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 853.
- Dourmap C. 2019.** *Etude du rôle de la Pyrroline-5-Carboxylate Déshydrogénase dans la formation de la graine chez Arabidopsis thaliana: Conséquences d'un excès de nitrates.* Rennes.
- Dourmap C, Marmagne A, Lebreton S, Guivarc'h A, Savouré A, Masclaux-Daubresse C.** The Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase is a key determinant for carbon and nitrogen remobilization during seed filling in *Arabidopsis thaliana*. *in prep.*
- Dourmap C, Roque S, Morin A, Caubrière D, Kerdiles M, Béguin K, Perdoux R, Reynoud N, Bourdet L, Audebert P-A, et al. 2020.** Stress signalling dynamics of the mitochondrial electron transport chain and oxidative phosphorylation system in higher plants. *Annals of Botany* **125**: 721–736.
- Drews GN, Yadegari R. 2002.** Development and Function of the Angiosperm Female Gametophyte. *Annual Review of Genetics* **36**: 99–124.
- Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, Marillonnet S. 2009.** Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type IIs Restriction Enzymes. *PLoS ONE* **4**: e5553.
- Escobar MA, Geisler DA, Rasmusson AG. 2006.** Reorganization of the alternative pathways of the *Arabidopsis* respiratory chain by nitrogen supply: opposing effects of ammonium and nitrate. *The Plant Journal* **45**: 775–788.
- Fait A, Angelovici R, Less H, Ohad I, Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR, Galili G. 2006.** *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology* **142**: 839–854.
- Fait A, Nesi AN, Angelovici R, Lehmann M, Pham PA, Song L, Haslam RP, Napier JA, Galili G, Fernie AR. 2011.** Targeted enhancement of glutamate-to- γ -aminobutyrate conversion in *Arabidopsis* seeds affects carbon-nitrogen balance and storage reserves in a development-dependent manner. *Plant Physiology* **157**: 1026–1042.
- Fait A, Yellin A, Fromm H. 2005.** GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen intermediates: Insight from *Arabidopsis* mutants. *FEBS Letters* **579**: 415–420.
- Fan S-C, Lin C-S, Hsu P-K, Lin S-H, Tsay Y-F. 2009.** The *Arabidopsis* Nitrate Transporter NRT1.7, Expressed in Phloem, Is Responsible for Source-to-Sink Remobilization of Nitrate. *The Plant Cell* **21**: 2750–2761.

- Fan T, Yang W, Zeng X, Xu X, Xu Y, Fan X, Luo M, Tian C, Xia K, Zhang M. 2020.** A Rice Autophagy Gene OsATG8b Is Involved in Nitrogen Remobilization and Control of Grain Quality. *Frontiers in Plant Science* **11**.
- FAO. 2021.** *Transforming food systems for food security, improved nutrition and affordable healthy diets for all* (FAO, Ed.). Rome: FAO.
- Fatland BL, Ke J, Anderson MD, Mentzen WI, Cui LW, Allred CC, Johnston JL, Nikolau BJ, Wurtele ES. 2002.** Molecular Characterization of a Heteromeric ATP-Citrate Lyase That Generates Cytosolic Acetyl-Coenzyme A in Arabidopsis. *Plant Physiology* **130**: 740–756.
- Feitosa-Araujo E, de Souza Chaves I, Florian A, da Fonseca-Pereira P, Condori Apfata JA, Heyneke E, Medeiros DB, Pires MV, Mettler-Altmann T, Neuhaus HE, et al. 2020.** Downregulation of a Mitochondrial NAD⁺Transporter (NDT2) Alters Seed Production and Germination in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **61**: 897–908.
- Feng X, Dickinson HG. 2007.** Packaging the male germline in plants. *Trends in Genetics* **23**: 503–510.
- Fichtner F, Lunn JE. 2021.** The Role of Trehalose 6-Phosphate (Tre6P) in Plant Metabolism and Development. *Annual Review of Plant Biology* **72**: 737–760.
- Figueiredo DD, Batista RA, Roszak PJ, Hennig L, Köhler C. 2016.** Auxin production in the endosperm drives seed coat development in Arabidopsis. *eLife* **5**.
- Figueiredo DD, Batista RA, Roszak PJ, Köhler C. 2015.** Auxin production couples endosperm development to fertilization. *Nature Plants* **1**: 15184.
- Firon N, Nepi M, Pacini E. 2012.** Water status and associated processes mark critical stages in pollen development and functioning. *Annals of Botany* **109**: 1201–1214.
- Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jürgens G. 2003.** Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of Arabidopsis. *Nature* **426**: 147–153.
- Fujita T, Maggio A, Garcia-Rios M, Bressan RA, Csonka LN. 1998.** Comparative Analysis of the Regulation of Expression and Structures of Two Evolutionarily Divergent Genes for Δ 1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase from Tomato. *Plant Physiology* **118**: 661–674.
- Funck D, Baumgarten L, Stift M, von Wirén N, Schönemann L. 2020.** Differential Contribution of P5CS Isoforms to Stress Tolerance in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* **11**.
- Funck D, Eckard S, Müller G. 2010.** Non-redundant functions of two proline dehydrogenase isoforms in Arabidopsis. *BMC Plant Biology* **10**: 70.
- Funck D, Stadelhofer B, Koch W. 2008.** Ornithine- δ -aminotransferase is essential for Arginine Catabolism but not for Proline Biosynthesis. *BMC Plant Biology* **8**.
- Funck D, Winter G, Baumgarten L, Forlani G. 2012.** Requirement of proline synthesis during Arabidopsis reproductive development. *BMC Plant Biology* **12**.

Gass N, Glagotskaia T, Mellema S, Stuurman J, Barone M, Mandel T, Roessner-Tunali U, Kuhlemeier C. 2005. Pyruvate Decarboxylase Provides Growing Pollen Tubes with a Competitive Advantage in Petunia. *The Plant Cell* **17**: 2355–2368.

Geelen D, Lurin C, Bouchez D, Frachisse J-M, Lelièvre F, Courtial B, Barbier-Brygoo H, Maurel C. 2000. Disruption of putative anion channel gene AtCLC-a in Arabidopsis suggests a role in the regulation of nitrate content. *The Plant Journal* **21**: 259–267.

Geng P, Qin W, Xu G. 2021. Proline metabolism in cancer. *Amino Acids* **53**: 1769–1777.

Gibon Y, Vigeolas H, Tiessen A, Geigenberger P, Stitt M. 2002. Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates, and glycolytic intermediates based on a novel enzymic cycling system. *The Plant Journal* **30**: 221–235.

GIEC. 2014. *Climate change 2013: the physical science basis* (GIEC, Ed.). New York: Cambridge university press.

Gillespie J, Rogers SW, Deery M, Dupree P, Rogers JC. 2004. A unique family of proteins associated with internalized membranes in protein storage vacuoles of the Brassicaceae. *The Plant Journal* **41**: 429–441.

Giraud E, van Aken O, Ho LHM, Whelan J. 2009. The Transcription Factor ABI4 Is a Regulator of Mitochondrial Retrograde Expression of *ALTERNATIVE OXIDASE1a*. *Plant Physiology* **150**: 1286–1296.

Girondé A, Etienne P, Trouverie J, Bouchereau A, le Cahérec F, Leport L, Orsel M, Niogret M-F, Nesi N, Carole D, et al. 2015. The contrasting N management of two oilseed rape genotypes reveals the mechanisms of proteolysis associated with leaf N remobilization and the respective contributions of leaves and stems to N storage and remobilization during seed filling. *BMC Plant Biology* **15**: 59.

Goffman FD, Alonso AP, Schwender J, Shachar-Hill Y, Ohlrogge JB. 2005. Light enables a very high efficiency of carbon storage in developing embryos of rapeseed. *Plant Physiology* **138**: 2269–2279.

Goldberg RB, de Paiva G, Yadegari R. 1994. Plant Embryogenesis: Zygote to Seed. *Science*. **266**:605-614

Good AG, Shrawat AK, Muench DG. 2004. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends in Plant Science* **9**: 597–605.

van der Graaff E, Schwacke R, Schneider A, Desimone M, Flüge U-I, Kunze R. 2006. Transcription Analysis of Arabidopsis Membrane Transporters and Hormone Pathways during Developmental and Induced Leaf Senescence. *Plant Physiology* **141**: 776–792.

Gregerson RG, Miller SS, Twary SN, Gantt JS, Vance CP. 1993. Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules. *The Plant Cell* **5**: 215–226.

- Grossniklaus U, Vielle-Calzada J-P, Hoepfner MA, Gagliano WB. 1998.** Maternal Control of Embryogenesis by *MEDEA*, a *Polycomb* Group Gene in *Arabidopsis*. *Science* **280**: 446–450.
- Grotto D, Maria LS, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, Pomblum VJ, Rocha JBT, Farina M. 2009.** Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Química Nova* **32**: 169–174.
- Guan LM, Scandalios JG. 2002.** Catalase gene expression in response to auxin-mediated developmental signals. *Physiologia Plantarum* **114**: 288–295.
- Guiboileau A, Yoshimoto K, Soulay F, Bataillé M, Avice J, Masclaux-Daubresse C. 2012.** Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **194**: 732–740.
- Guo L, Luo X, Li M, Joldersma D, Plunkert M, Liu Z. 2022.** Mechanism of fertilization-induced auxin synthesis in the endosperm for seed and fruit development. *Nature Communications* **13**: 3985.
- Hafidh S, Fila J, Honys D. 2016.** Male gametophyte development and function in angiosperms: a general concept. *Plant Reproduction* **29**: 31–51.
- Hare PD, Cress WA. 1996.** Tissue-specific accumulation of transcript encoding γ -pyrroline-5-carboxylate reductase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* **19**: 249–256.
- Hare PD, Cress WA, van Staden J. 2002.** Disruptive effects of exogenous proline on chloroplast and mitochondrial ultrastructure in *Arabidopsis* leaves. *South African Journal of Botany* **68**: 393–396.
- Hare PD, Cress WA, van Staden J. 2003.** A regulatory role for proline metabolism in stimulating *Arabidopsis thaliana* seed germination. *Plant Growth Regulation* **39**: 41–50.
- Haut Conseil pour le Climat. 2021.** *Renforcer l'atténuation, engager l'adaptation. Troisième rapport annuel du Haut Conseil pour le Climat.*
- Havé M, Marmagne A, Chardon F, Masclaux-Daubresse C. 2017.** Nitrogen remobilization during leaf senescence: Lessons from *Arabidopsis* to crops. *Journal of Experimental Botany* **68**: 2513–2529.
- Hehenberger E, Kradolfer D, Köhler C. 2012.** Endosperm cellularization defines an important developmental transition for embryo development. *Development* **139**: 2031–2039.
- Heinemann B, Hildebrandt TM. 2021.** The role of amino acid metabolism in signaling and metabolic adaptation to stress-induced energy deficiency in plants. *Journal of Experimental Botany* **72**: 4634–4645.
- Hellmann H, Funck D, Rentsch D, Frommer WB. 2000.** Hypersensitivity of an *Arabidopsis* Sugar Signaling Mutant toward Exogenous Proline Application 1. *Plant Physiology* **122**: 357–367

- Hildebrandt TM, Nunes Nesi A, Araújo WL, Braun H-P. 2015.** Amino Acid Catabolism in Plants. *Molecular Plant* **8**: 1563–1579.
- Hill JL, Lord DR. 1994.** Wild-Type flower development: gynoecial initiation. In: Bowman J, ed. *Arabidopsis: An Atlas of Morphology and Development*. New-York: Springer Verlag, 158–159.
- Hills MJ. 2004.** Control of storage-product synthesis in seeds. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 302–308.
- Ho C-H, Tsay Y-F. 2010.** Nitrate, ammonium, and potassium sensing and signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 604–610.
- Hofmann F, Schon MA, Nodine MD. 2019.** The embryonic transcriptome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Reproduction* **32**: 77–91.
- Hollinshead KER, Munford H, Eales KL, Bardella C, Li C, Escribano-Gonzalez C, Thakker A, Nonnenmacher Y, Kluckova K, Jeeves M, et al. 2018.** Oncogenic IDH1 Mutations Promote Enhanced Proline Synthesis through PYCR1 to Support the Maintenance of Mitochondrial Redox Homeostasis. *Cell Reports* **22**: 3107–3114.
- Hsieh TF, Shin J, Uzawa R, Silva P, Cohen S, Bauer MJ, Hashimoto M, Kirkbride RC, Harada JJ, Zilberman D, et al. 2011.** Regulation of imprinted gene expression in *Arabidopsis* endosperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 1755–1762.
- Hsu S-C, Belmonte MF, Harada JJ, Inoue K. 2010.** Indispensable Roles of Plastids in *Arabidopsis thaliana* Embryogenesis. *Current genomics* **11**:338-349
- Hubel F, Beck E. 1996.** Maize Root Phytase (Purification, Characterization, and Localization of Enzyme Activity and Its Putative Substrate). *Plant Physiology* **112**: 1429–1436.
- Hughes CS, Moggridge S, Müller T, Sorensen PH, Morin GB, Krijgsveld J. 2019.** Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nature Protocols* **14**: 68–85.
- Huh JH, Bauer MJ, Hsieh T-F, Fischer RL. 2007.** Endosperm Gene Imprinting and Seed Development. *Current opinion in genetics and development*. **17**(6):480-485
- Hundertmark M, Hinch DK. 2008.** LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* **9**.
- Hur J, Jung K-H, Lee C-H, An G. 2004.** Stress-inducible OsP5CS2 gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Science* **167**: 417–426.
- Iqbal N, Umar S, Khan NA. 2015.** Nitrogen availability regulates proline and ethylene production and alleviates salinity stress in mustard (*Brassica juncea*). *Journal of Plant Physiology* **178**: 84–91.
- Jeong HJ, Choi JY, Shin HY, Bae JM, Shin JS. 2014.** Seed-specific expression of seven *Arabidopsis* promoters. *Gene* **553**: 17–23.

Jiang P-L, Tzen JTC. 2010. Caleosin serves as the major structural protein as efficient as oleosin on the surface of seed oil bodies. *Plant Signaling & Behavior* **5**: 447–449.

Jin T, Huppe HC, Turpin DH. 1998. In Vitro Reconstitution of Electron Transport from Glucose-6-Phosphate and NADPH to Nitrite1. *Plant Physiology* **117**: 303–309.

Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*.

Jurgens G, Mayer U, Busch M, Lukowitz W, Laux T. 1995. Pattern formation in the Arabidopsis embryo: a genetic perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **350**: 19–25.

Karmann J, Müller B, Hammes UZ. 2018. The long and winding road: transport pathways for amino acids in Arabidopsis seeds. *Plant Reproduction* **31**: 253–261.

Kennedy EP. 1961. Biosynthesis of complex lipids. *Federation proceedings* **20**: 934–40.

Kiba T, Feria-Bourrellier A-B, Lafouge F, Lezhneva L, Boutet-Mercey S, Orsel M, Bréhaut V, Miller A, Daniel-Vedele F, Sakakibara H, et al. 2012. The Arabidopsis Nitrate Transporter NRT2.4 Plays a Double Role in Roots and Shoots of Nitrogen-Starved Plants . *The Plant Cell* **24**: 245–258.

Kim I, Zambryski PC. 2005. Cell-to-cell communication via plasmodesmata during Arabidopsis embryogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 593–599.

Kirsch T, Gerber DW, Byerrum RU, Tolbert NE. 1992. Plant Dihydroxyacetone Phosphate Reductases. *Plant Physiology* **100**: 352–359.

Kitashiba H, Kitazawa E, Kishitani S, Toriyama K. 1999. Partial male sterility in transgenic tobacco carrying an antisense gene for alternative oxidase under the control of a tapetum-specific promoter. *Molecular Breeding* **5**: 209–218.

Kiyosue T, Yoshiba Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1996. A Nuclear Gene Encoding Mitochondrial Proline Dehydrogenase, an Enzyme Involved in Proline Metabolism, Is Upregulated by Proline but Downregulated by Dehydration in Arabidopsis. *The plant cell* **8**:1323-1335

Kong L, Xie Y, Hu L, Feng B, Li S. 2016. Remobilization of vegetative nitrogen to developing grain in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research* **196**: 134–144.

Kotur Z, Mackenzie N, Ramesh S, Tyerman SD, Kaiser BN, Glass ADM. 2012. Nitrate transport capacity of the *Arabidopsis thaliana* NRT2 family members and their interactions with AtNAR2.1. *New Phytologist* **194**: 724–731.

Krapp A, David LC, Chardin C, Girin T, Marmagne A, Leprince AS, Chaillou S, Ferrario-Méry S, Meyer C, Daniel-Vedele F. 2014. Nitrate transport and signalling in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **65**: 789–798.

Kroj T, Savino G, Valon C, Giraudat J, Parcy F. 2003. Regulation of storage protein gene expression in *Arabidopsis*. *Development* **130**: 6065–6073.

- Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM. 1997.** Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. *Nature* **385**: 59–61.
- Lafon-Placette C, Köhler C. 2014.** Embryo and endosperm, partners in seed development. *Current Opinion in Plant Biology* **17**: 64–69.
- Launay A, Cabassa-Hourton C, Eubel H, Maldiney R, Guivarc’h A, Crilat E, Planchais S, Lacoste J, Bordenave-Jacquemin M, Clément G, et al. 2019.** Proline oxidation fuels mitochondrial respiration during dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **70**: 6203–6214.
- Lee IR, Lui EYL, Chow EWL, Arras SDM, Morrow CA, Fraser JA. 2013.** Reactive Oxygen Species Homeostasis and Virulence of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans* Requires an Intact Proline Catabolism Pathway. *Genetics* **194**: 421–433.
- Lee S-LJ, Warmke HE. 1979.** Organelle size and number in fertile and T-cytoplasmic male-sterile corn. *American Journal of Botany* **66**: 141–148.
- Lehmann S, Funck D, Szabados L, Rentsch D. 2010.** Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids* **39**: 949–962.
- 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 and Cell Physiology* **49**: 1056–1065.
- Lemaitre T, Urbanczyk-Wochniak E, Flesch V, Bismuth E, Fernie AR, Hodges M. 2007.** NAD-dependent isocitrate dehydrogenase mutants of *Arabidopsis* suggest the enzyme is not limiting for nitrogen assimilation. *Plant Physiology* **144**: 1546–1558.
- Lepiniec L, Devic M, Roscoe TJ, Bouyer D, Zhou DX, Boulard C, Baud S, Dubreucq B. 2018.** Molecular and epigenetic regulations and functions of the LAFL transcriptional regulators that control seed development. *Plant Reproduction* **31**: 291–307.
- Leprince O, Colson P, Houssier C, Deltour R. 1995.** Changes in chromatin structure associated with germination of maize and their relation with desiccation tolerance. *Plant, Cell and Environment* **18**: 619–629.
- Leprince O, Pellizzaro A, Berriri S, Buitink J. 2017.** Late seed maturation: Drying without dying. *Journal of Experimental Botany* **68**: 827–841.
- Leprince O, Walters-Vertucci C. 1995.** A Calorimetric Study of the Glass Transition Behaviors in Axes of Bean Seeds with Relevance to Storage Stability. *Plant Physiology* **109**: 1471–1481.
- Léran S, Varala K, Boyer J-C, Chiurazzi M, Crawford N, Daniel-Vedele F, David L, Dickstein R, Fernandez E, Forde B, et al. 2014.** A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends in Plant Science* **19**: 5–9.
- Li F, Asami T, Wu X, Tsang EWT, Cutler AJ. 2007.** A Putative Hydroxysteroid Dehydrogenase Involved in Regulating Plant Growth and Development. *Plant Physiology* **145**: 87–97.

- Li Y, Beisson F, Pollard M, Ohlrogge J. 2006.** Oil content of Arabidopsis seeds: The influence of seed anatomy, light and plant-to-plant variation. *Phytochemistry* **67**: 904–915.
- Li J, Berger F. 2012.** Endosperm: food for humankind and fodder for scientific discoveries. *New Phytologist* **195**: 290–305.
- Li M, Bu R-Y, Han S, Cheng Y, Yu Z, Wang H, Cheng W-L, Wu J. 2020.** Current status of fertilizer application and utilization efficiency of winter wheat in Anhui Province, China. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao = The Journal of Applied Ecology* **31**: 3051–3059.
- Li F, Dong C, Yang T, Bao S, Fang W, Lucas WJ, Zhang Z. 2021.** The tea plant CsLHT1 and CsLHT6 transporters take up amino acids, as a nitrogen source, from the soil of organic tea plantations. *Horticulture Research* **8**: 178.
- Li B, Li G, Kronzucker HJ, Baluška F, Shi W. 2014.** Ammonium stress in Arabidopsis: signaling, genetic loci, and physiological targets. *Trends in Plant Science* **19**: 107–114.
- Liu H, Wang X, Ren K, Li K, Wei M, Wang W, Sheng X. 2017.** Light deprivation-induced inhibition of chloroplast biogenesis does not arrest embryo morphogenesis but strongly reduces the accumulation of storage reserves during embryo maturation in arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Liu C, Xue Z, Tang D, Shen Y, Shi W, Ren L, Du G, Li Y, Cheng Z. 2018.** Ornithine δ -aminotransferase is critical for floret development and seed setting through mediating nitrogen reutilization in rice. *Plant Journal* **96**: 842–854.
- Loewus FA. 2006.** Inositol and Plant Cell Wall Polysaccharide Biogenesis. In: *Biology of Inositols and Phosphoinositides*. Springer US, 21–45.
- Mansfield SG, Briarty LG, Erni S. 1991.** Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* . I. The mature embryo sac. *Canadian Journal of Botany* **69**: 447–460.
- Marmagne A, Jasinski S, Fagard M, Bill L, Guerche P, Masclaux-Daubresse C, Chardon F. 2020.** Post-flowering biotic and abiotic stresses impact nitrogen use efficiency and seed filling in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **71**: 4578–4590.
- di Martino C, Pizzuto R, Pallotta ML, de Santis A, Passarella S. 2006.** Mitochondrial transport in proline catabolism in plants: the existence of two separate translocators in mitochondria isolated from durum wheat seedlings. *Planta* **223**: 1123–1133.
- 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, Carrayol E, Valadier MH. 2005.** The two nitrogen mobilisation- and senescence-associated GS1 and GDH genes are controlled by C and N metabolites. *Planta* **221**: 580–588.
- Masclaux-Daubresse C, Chardon F. 2011.** Exploring nitrogen remobilization for seed filling using natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **62**: 2131–2142.

- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A. 2010.** Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* **105**: 1141–1157.
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Orsel M. 2008.** Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology* **10**: 23–36.
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Pageau K, Lelandais M, Grandjean O, Kronenberger J, Valadier M-H, Feraud M, Jouglet T, Suzuki A. 2006.** Glutamine Synthetase-Glutamate Synthase Pathway and Glutamate Dehydrogenase Play Distinct Roles in the Sink-Source Nitrogen Cycle in Tobacco. *Plant Physiology* **140**: 444–456.
- Matilla AJ. 2020.** Auxin: Hormonal Signal Required for Seed Development and Dormancy. *Plants* **9**: 705.
- Mattioli R, Biancucci M, Lonoce C, Costantino P, Trovato M. 2012.** Proline is required for male gametophyte development in Arabidopsis. *BMC Plant biology* **12**:236
- Mattioli R, Costantino P, Trovato M. 2009.** Proline Accumulates, Under Non-Stressed Conditions, in Reproductive Organs and Tissues. *Plant signalling and behavior* **4**:11, 1016-1018
- Mattioli R, Palombi N, Funck D, Trovato M. 2020.** Proline Accumulation in Pollen Grains as Potential Target for Improved Yield Stability Under Salt Stress. *Frontiers in Plant Science* **11**.
- Maxwell SA, Davis GE. 2000.** Differential gene expression in p53-mediated apoptosis-resistant vs. apoptosis-sensitive tumor cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 13009–13014.
- McCartney AW, Dyer JM, Dhanoa PK, Kim PK, Andrews DW, McNew JA, Mullen RT. 2004.** Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted co-translationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini. *The Plant Journal* **37**: 156–173.
- Meharg AA, Blatt MR. 1995.** NO₃⁻ transport across the plasma membrane of Arabidopsis thaliana root hairs: Kinetic control by pH and membrane voltage. *The Journal of Membrane Biology* **145**.
- Meitzel T, Radchuk R, McAdam EL, Thormählen I, Feil R, Munz E, Hilo A, Geigenberger P, Ross JJ, Lunn JE, et al. 2021.** Trehalose 6-phosphate promotes seed filling by activating auxin biosynthesis. *New Phytologist* **229**: 1553–1565.
- Melkus G, Rolletschek H, Radchuk R, Fuchs J, Rutten T, Wobus U, Altmann T, Jakob P, Borisjuk L. 2009.** The Metabolic Role of the Legume Endosperm: A Noninvasive Imaging Study. *Plant Physiology* **151**: 1139–1154.
- Meyer C, Stitt M. 2001.** Nitrate Reduction and signalling. In: Plant Nitrogen. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 37–59.
- Mikulášek K, Konečná H, Potěšil D, Holánková R, Havliš J, Zdráhal Z. 2021.** SP3 Protocol for Proteomic Plant Sample Preparation Prior LC-MS/MS. *Frontiers in Plant Science* **12**.

- Miller G, Honig A, Stein H, Suzuki N, Mittler R, Zilberstein A. 2009.** Unraveling Δ 1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 26482–26492.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA. 2001.** A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *Nitric Oxide* **5**: 62–71.
- Miyashita Y, Good AG. 2008.** Glutamate deamination by glutamate dehydrogenase plays a central role in amino acid catabolism in plants. *Plant Signaling & Behavior* **3**: 842–843.
- Morand P, Briand X. 1996.** Excessive Growth of Macroalgae: A Symptom of Environmental Disturbance. *Botanica Marina* **39**.
- Morcuende R, Krapp A, Hurry V, Stitt M. 1998.** Sucrose-feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of α -oxoglutarate synthesis, and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves. *Planta* **206**: 394–409.
- Mordor Intelligence. 2019.** Marché des semences commerciales - croissance, tendances et prévisions de l'industrie mondiale (2020-2025). <https://www.mordorintelligence.com/fr/industry-reports/commercial-seed-market> .
- Moreno-Romero J, del Toro-De León G, Yadav VK, Santos-González J, Köhler C. 2019.** Epigenetic signatures associated with imprinted paternally expressed genes in the Arabidopsis endosperm. *Genome Biology* **20**.
- Morley-Smith ER, Pike MJ, Findlay K, Köckenberger W, Hill LM, Smith AM, Rawsthorne S. 2008.** The Transport of Sugars to Developing Embryos Is Not via the Bulk Endosperm in Oilseed Rape Seeds . *Plant Physiology* **147**: 2121–2130.
- Mrówczyńska-Kamińska A, Bajan B, Pawłowski KP, Genstwa N, Zmyślona J. 2021.** Greenhouse gas emissions intensity of food production systems and its determinants. *PLOS ONE* **16**: e0250995.
- Müller B, Fastner A, Karmann J, Mansch V, Hoffmann T, Schwab W, Suter-Grotemeyer M, Rentsch D, Truernit E, Ladwig F, et al. 2015.** Amino Acid Export in Developing Arabidopsis Seeds Depends on UmamiT Facilitators. *Current Biology* **25**: 3126–3131.
- Müller B, Sheen J. 2008.** Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature* **453**: 1094–1097.
- Murakeözy ÉP, Nagy Z, Duhazé C, Bouchereau A, Tuba Z. 2003.** Seasonal changes in the levels of compatible osmolytes in three halophytic species of inland saline vegetation in Hungary. *Journal of Plant Physiology* **160**: 395–401.
- Murashige T, Skoog F. 1962.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497.
- Murgia M, Huang B-Q, Tucker SC, Musgrave ME. 1993.** Embryo Sac Lacking Antipodal Cells in Arabidopsis thaliana (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **80**: 824.

- Mus F, Crook MB, Garcia K, Garcia Costas A, Geddes BA, Kouri ED, Paramasivan P, Ryu M-H, Oldroyd GED, Poole PS, et al. 2016.** Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes. *Applied and Environmental Microbiology* **82**: 3698–3710.
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S. 2008.** Galactinol and Raffinose Constitute a Novel Function to Protect Plants from Oxidative Damage . *Plant Physiology* **147**: 1251–1263.
- Nunes-Nesi A, Fernie AR, Stitt M. 2010.** Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Molecular Plant* **3**: 973–996.
- Oliveira IC, Brears T, Knight TJ, Clark A, Coruzzi GM. 2002.** Overexpression of Cytosolic Glutamine Synthetase. Relation to Nitrogen, Light, and Photorespiration. *Plant Physiology* **129**: 1170–1180.
- O'Neill JP, Colon KT, Jenik PD. 2019.** The onset of embryo maturation in Arabidopsis is determined by its developmental stage and does not depend on endosperm cellularization. *Plant Journal* **99**: 286–301.
- Oostindiër-Braaksma FJ, Feenstra WJ. 1973.** Isolation and characterization of chlorate-resistant mutants of Arabidopsis thaliana. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **19**: 175–185.
- Ostrowski M, Ciarkowska A, Dalka A, Wilmowicz E, Jakubowska A. 2020.** Biosynthesis pathway of indole-3-acetyl-myoinositol during development of maize (*Zea mays* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology* **245**: 153082.
- Pacini E. 1996.** Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sexual Plant Reproduction* **9**: 362–366.
- Pandhare J, Donald SP, Cooper SK, Phang JM. 2009.** Regulation and function of proline oxidase under nutrient stress. *Journal of Cellular Biochemistry* **107**: 759–768.
- Pang PP, Pruitt RE, Meyerowitz EM. 1988.** Molecular cloning, genomic organization, expression and evolution of 12S seed storage protein genes of Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology* **11**: 805–820.
- Parre E, Ghars MA, Leprince A-S, Thiery L, Lefebvre D, Bordenave M, Richard L, Mazars C, Abdelly C, Saviouré A. 2007.** Calcium Signaling via Phospholipase C Is Essential for Proline Accumulation upon Ionic But Not Nonionic Hyperosmotic Stresses in Arabidopsis. *Plant Physiology* **144**: 503–512.
- Parthasarathy A, Savka MA, Hudson AO. 2019.** The synthesis and role of β -alanine in plants. *Frontiers in Plant Science* **10**.
- Paul MJ, Primavesi LF, Jhurrea D, Zhang Y. 2008.** Trehalose Metabolism and Signaling. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 417–441.
- Peoples M, Freney J, Mosier A. 1995.** Minimizing gaseous losses of nitrogen. In: Bacon P, ed. Nitrogen fertilization in the environment. Marcel Dekker Inc, 565–602.

- Peterson R, Slovin JP, Chen C. 2010.** A Simplified Method for Differential Staining of Aborted and Non-Aborted Pollen Grains. *International Journal of Plant Biology* **1**: e13.
- Piffanelli P, Ross JHE, Murphy DJ. 1998.** Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sexual Plant Reproduction* **11**: 65–80.
- Planchais S, Cabassa C, Toka I, Justin A-M, Renou J-P, Saviour A, Carol P. 2014.** BASIC AMINO ACID CARRIER 2 gene expression modulates arginine and urea content and stress recovery in Arabidopsis leaves. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Podgorska A, Ostaszewska M, Gardeström P, Rasmusson AG, Szal B. 2015.** In comparison with nitrate nutrition, ammonium nutrition increases growth of the *frostbite1* Arabidopsis mutant. *Plant, Cell & Environment* **38**: 224–237.
- Ponnu J, Wahl V, Schmid M. 2011.** Trehalose-6-Phosphate: Connecting Plant Metabolism and Development. *Frontiers in Plant Science* **2**.
- R. Long Sharon, Kahn Michael, Seefeldt Lance, Tsay Yi-Fang, Kopriva Stanislas. 2015.** Nitrogen and Sulfur. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, eds. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Wiley Blackwell, 711–768.
- Ramel F, Sulmon C, Bogard M, Couée I, Gouesbet G. 2009.** Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in Arabidopsis thaliana plantlets. *BMC Plant Biology* **9**: 28.
- Rasmusson AG, Escobar MA, Hao M, Podgórska A, Szal B. 2020.** Mitochondrial NAD(P)H oxidation pathways and nitrate/ammonium redox balancing in plants. *Mitochondrion* **53**: 158–165.
- Rautengarten C, Ebert B, Herter T, Petzold CJ, Ishii T, Mukhopadhyay A, Usadel B, Scheller HV. 2011.** The interconversion of UDP-arabinopyranose and UDP-arabinofuranose is indispensable for plant development in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**: 1373–1390.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. 2005.** *Biology of plants*. London: McMillan Publisher Ltd.
- Rayapati PJ, Stewart CR. 1991.** Solubilization of a Proline Dehydrogenase from Maize (*Zea mays* L.) Mitochondria. *Plant Physiology* **95**: 787–791.
- Reisenauer H. 1966.** Mineral nutrients in soil solution. In: Altman P, Dittmer D, eds. Environmental Biology. Federation of the American Society for Experimental Biology, 507–508.
- ben Rejeb K, Lefebvre-De Vos D, le Disquet I, Leprince AS, Bordenave M, Maldiney R, Jdey A, Abdelly C, Saviour A. 2015.** Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidases increases proline accumulation during salt or mannitol stress in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist* **208**: 1138–1148.
- Renault H, Roussel V, el Amrani A, Arzel M, Renault D, Bouchereau A, Deleu C. 2010.** The Arabidopsis pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC Plant Biology* **10**: 20.

- Righetti K, Vu JL, Pelletier S, Vu BL, Glaab E, Lalanne D, Pasha A, Patel R v., Provart NJ, Verdier J, et al. 2015.** Inference of Longevity-Related Genes from a Robust Coexpression Network of Seed Maturation Identifies Regulators Linking Seed Storability to Biotic Defense-Related Pathways. *The Plant Cell* **27**:2692-2708.
- Rizzi YS, Monteoliva MI, Fabro G, Grosso CL, Laróvere LE, Alvarez ME. 2015.** P5cdh affects the pathways contributing to pro synthesis after prodh activation by biotic and abiotic stress conditions. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Robert HS, Grones P, Stepanova AN, Robles LM, Lokerse AS, Alonso JM, Weijers D, Friml J. 2013.** Local Auxin Sources Orient the Apical-Basal Axis in Arabidopsis Embryos. *Current Biology* **23**: 2506–2512.
- Robert HS, Park C, Gutiérrez CL, Wójcikowska B, Pěňčík A, Novák O, Chen J, Grunewald W, Dresselhaus T, Friml J, et al. 2018.** Maternal auxin supply contributes to early embryo patterning in Arabidopsis. *Nature Plants* **4**: 548–553.
- Roberts EH. 1973.** Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* **1**: 499–514.
- da Rocha IMA, Vitorello VA, Silva JS, Ferreira-Silva SL, Viégas RA, Silva EN, Silveira JAG. 2012.** Exogenous ornithine is an effective precursor and the δ -ornithine amino transferase pathway contributes to proline accumulation under high N recycling in salt-stressed cashew leaves. *Journal of Plant Physiology* **169**: 41–49.
- Rolletschek H, Radchuk R, Klukas C, Schreiber F, Wobus U, Borisjuk L. 2005.** Evidence of a key role for photosynthetic oxygen release in oil storage in developing soybean seeds. *New Phytologist* **167**: 777–786.
- Rolletschek H, Schwender J, König C, Chapman KD, Romsdahl T, Lorenz C, Braun HP, Denolf P, van Audenhove K, Munz E, et al. 2020.** Cellular plasticity in response to suppression of storage proteins in the Brassica napus embryo. *Plant Cell* **32**: 2383–2401.
- Rolletschek H, Weber H, Borisjuk L. 2003.** Energy Status and Its Control on Embryogenesis of Legumes. Embryo Photosynthesis Contributes to Oxygen Supply and Is Coupled to Biosynthetic Fluxes. *Plant Physiology* **132**: 1196–1206.
- Rossato L, Lainé P, Ourry A. 2001.** Nitrogen storage and remobilization in Brassica napus L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1655–1663.
- Ruppel NJ, Logsdon CA, Whippo CW, Inoue K, Hangarter RP. 2011.** A Mutation in Arabidopsis *SEEDLING PLASTID DEVELOPMENT1* Affects Plastid Differentiation in Embryo-Derived Tissues during Seedling Growth. *Plant Physiology* **155**: 342–353.
- Russell SD. 1992.** Double Fertilization. In: 357–388.

- Sakakibara H, Watanabe M, Hase T, Sugiyama T. 1991.** Molecular cloning and characterization of complementary DNA encoding for ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaf. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 2028–2035.
- Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF, Coupland G. 2000.** Distinct Roles of CONSTANS Target Genes in Reproductive Development of *Arabidopsis*. *Science* **288**: 1613–1616.
- Sanders A, Collier R, Trethewy A, Gould G, Sieker R, Tegeder M. 2009.** AAP1 regulates import of amino acids into developing *Arabidopsis* embryos. *The Plant Journal* **59**: 540–552.
- Sanz-Luque E, Chamizo-Ampudia A, Llamas A, Galvan A, Fernandez E. 2015.** Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Sato Y, Yazawa K, Yoshida S, Tamaoki M, Nakajima N, Iwai H, Ishii T, Satoh S. 2011.** Expression and functions of myo-inositol monophosphatase family genes in seed development of *Arabidopsis*. *Journal of Plant Research* **124**: 385–394.
- Satoh R, Nakashima K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2002.** ACTCAT, a Novel cis-Acting Element for Proline- and Hypoosmolarity-Responsive Expression of the *ProDH* Gene Encoding Proline Dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **130**: 709–719.
- Savouré A, Jaoua S, Hua X-J, Ardiles W, van Montagu M, Verbruggen N. 1995.** Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **372**: 13–19.
- Scheible WR, Morcuende R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N, Schindelasch D, Thimm O, Udvardi MK, Stitt M. 2004.** Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiology* **136**: 2483–2499.
- Schmidt R, Stransky H, Koch W. 2007.** The amino acid permease AAP8 is important for early seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **226**: 805–813.
- Schneitz K, Hulskamp M, Pruitt RE. 1995.** Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount tissue. *The Plant Journal* **7**: 731–749.
- Schrauwen JAM, de Groot PFM, van Herpen MMA, van der Lee T, Reynen WH, Weterings KAP, Wullems GJ. 1990.** Stage-related expression of mRNAs during pollen development in lily and tobacco. *Planta* **182**: 298–304.
- Schwacke R, Grallath S, Breitzkreuz KE, Stransky E, Stransky H, Frommer WB, Rentsch D. 1999.** LeProT1, a Transporter for Proline, Glycine Betaine, and γ -Amino Butyric Acid in Tomato Pollen. *The Plant Cell* **11**: 377–391.
- Schwender J, Goffman F, Ohlrogge JB, Shachar-Hill Y. 2004.** Rubisco without the Calvin cycle improves the carbon efficiency of developing green seeds. *Nature* **432**: 779–782.

- Schwender J, Ohlrogge JB, Shachar-Hill Y. 2003.** A Flux Model of Glycolysis and the Oxidative Pentosephosphate Pathway in Developing *Brassica napus* Embryos. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 29442–29453.
- Schwender J, Shachar-Hill Y, Ohlrogge JB. 2006.** Mitochondrial metabolism in developing embryos of *Brassica napus*. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 34040–34047.
- Scott RJ, Spielman M, Dickinson H. 2004.** Stamen Structure and Function. *THE PLANT CELL ONLINE* **16**: S46–S60.
- Selinski J, Scheibe R. 2014.** Pollen tube growth: Where does the energy come from? *Plant Signaling and Behavior* **9**: e977200-1-e977200-9.
- Senge MO, Wiehe A, Ryppa C. 2007.** Synthesis, Reactivity and Structure of Chlorophylls. In: *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls*. Springer Netherlands, 27–37.
- Sew YS, Ströher E, Fenske R, Millar AH. 2016.** Loss of mitochondrial malate dehydrogenase activity alters seed metabolism impairing seed maturation and post-germination growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **171**: 849–863.
- Shao Q, Liu X, Su T, Ma C, Wang P. 2019.** New Insights Into the Role of Seed Oil Body Proteins in Metabolism and Plant Development. *Frontiers in Plant Science* **10**.
- Sharma S, Villamor JG, Verslues PE. 2011.** Essential Role of Tissue-Specific Proline Synthesis and Catabolism in Growth and Redox Balance at Low Water Potential. *Plant Physiology* **157**: 292–304.
- Shen Y, Xie J, Liu R, Ni X, Wang X, Li Z, Zhang M. 2014.** Genomic analysis and expression investigation of caleosin gene family in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **448**: 365–371.
- Sheoran S, Kumar S, Kumar P, Meena RS, Rakshit S. 2021.** Nitrogen fixation in maize: breeding opportunities. *Theoretical and Applied Genetics* **134**: 1263–1280.
- Shi M-Z, Xie D-Y. 2014.** Biosynthesis and Metabolic Engineering of Anthocyanins in *Arabidopsis thaliana*. *Recent Patents on Biotechnology* **8**: 47–60.
- Shimada T, Yamada K, Kataoka M, Nakaune S, Koumoto Y, Kuroyanagi M, Tabata S, Kato T, Shinozaki K, Seki M, et al. 2003.** Vacuolar processing enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 32292–32299.
- Shinde S, Villamor JG, Lin W-D, Sharma S, Verslues PE. 2016.** Proline coordination with fatty acid synthesis and redox metabolism of chloroplast and mitochondria. *Plant Physiology*: pp.01097.2016.
- Siegal L, Wilkerson J. 1989.** Structure and function of spinach ferredoxin-nitrite reductase. *Chemistry*.

- Siloto RMP, Findlay K, Lopez-Villalobos A, Yeung EC, Nykiforuk CL, Moloney MM. 2006.** The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 1961–1974.
- da Silva PMFR, Eastmond PJ, Hill LM, Smith AM, Rawsthorne S. 1997.** Starch metabolism in developing embryos of oilseed rape. *Planta* **203**: 480–487.
- Singer SD, Soolanayakanahally RY, Foroud NA, Kroebel R. 2020.** Biotechnological strategies for improved photosynthesis in a future of elevated atmospheric CO₂. *Planta* **251**: 24.
- Sjodahl S, Rodin J, Rask L. 1991.** Characterization of the 12S globulin complex of *Brassica napus*. Evolutionary relationship to other 11-12S storage globulins. *European Journal of Biochemistry* **196**: 617–621.
- Soltis DE, Soltis PS, Morgan DR, Swensen SM, Mullin BC, Dowd JM, Martin PG. 1995.** Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 2647–2651.
- Sørensen MB, 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.
- Soumare A, Diedhiou AG, Thuita M, Hafidi M, Ouhdouch Y, Gopalakrishnan S, Kouisni L. 2020.** Exploiting Biological Nitrogen Fixation: A Route Towards a Sustainable Agriculture. *Plants (Basel, Switzerland)* **9**: E1011.
- Stacey MG, Koh S, Becker J, Stacey G. 2002.** AtOPT3, a Member of the Oligopeptide Transporter Family, Is Essential for Embryo Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14**: 2799–2811.
- 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 Physiology* **139**: 701–712.
- Stein O, Avin-Wittenberg T, Krahnert I, Zemach H, Bogol V, Daron O, Aloni R, Fernie AR, Granot D. 2017.** *Arabidopsis* fructokinases are important for seed oil accumulation and vascular development. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Stone LM, Seaton KA, Kuo J, McComb JA. 2004.** Fast Pollen Tube Growth in *Conospermum* Species. *Annals of Botany* **93**: 369–378.
- Streit L, Martin BA, Harper JE. 1987.** A Method for the Separation and Partial Purification of the Three Forms of Nitrate Reductase Present in Wild-Type Soybean Leaves. *Plant Physiology* **84**: 654–657.
- Stymne S, Stobart AK. 1987.** Triacylglycerol biosynthesis. In: Stumpf PK, Conn EE, eds. *The biochemistry and plants*. New-York: Academic Press, 175–214.

- Sundaresan V. 2005.** Control of seed size in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**:17887-17888
- Szabados L, Savouré A. 2010.** Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* **15**: 89–97.
- Székely G, Ábrahám E, Cséplő Á, Rigó G, Zsigmond L, Csiszár J, Ayaydin F, Strizhov N, Jásik J, Schmelzer E, et al. 2008.** Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant Journal* **53**: 11–28.
- Tadege M, Kuhlemeier* C. 1997.** Aerobic fermentation during tobacco pollen development. *Plant Molecular Biology* **35**: 343–354.
- Tilman D. 1999.** Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 5995–6000.
- Tilsner J, Kassner N, Struck C, Lohaus G. 2005.** Amino acid contents and transport in oilseed rape (*Brassica napus* L.) under different nitrogen conditions. *Planta* **221**: 328–338.
- To A, Valon C, Savino G, Guilleminot J, Devic M, Giraudat J, Parcy F. 2006.** A Network of Local and Redundant Gene Regulation Governs *Arabidopsis* Seed Maturation. *The Plant Cell* **18**: 1642–1651.
- del Toro-De León G, García-Aguilar M, Gillmor CS. 2014.** Non-equivalent contributions of maternal and paternal genomes to early plant embryogenesis. *Nature* **514**: 624–627.
- Torzillo G, Seibert M. 2018.** Postscript. Future Perspectives. In: Microalgal Hydrogen Production. 483–487.
- Troncoso-Ponce MA, Barthole G, Tremblais G, To A, Miquel M, Lepiniec L, Baud S. 2016.** Transcriptional Activation of Two Delta-9 Palmitoyl-ACP Desaturase Genes by MYB115 and MYB118 Is Critical for Biosynthesis of Omega-7 Monounsaturated Fatty Acids in the Endosperm of *Arabidopsis* Seeds. *The Plant Cell* **28**: 2666–2682.
- Tunnacliffe A, Hinch DK, Leprince O, MacHerel D. 2010.** LEA proteins: Versatility of form and function. *Topics in Current Genetics* **21**: 91–108.
- Tzen J, Huang A. 1992.** Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *Journal of Cell Biology* **117**: 327–335.
- Ueda A, Yamamoto-Yamane Y, Takabe T. 2007.** Salt stress enhances proline utilization in the apical region of barley roots. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **355**: 61–66.
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1997.** Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell* **9**: 1963–1971.

- Veerabagu M, Kirchler T, Elgass K, Stadelhofer B, Stahl M, Harter K, Mira-Rodado V, Chaban C. 2014.** The interaction of the arabidopsis response regulator ARR18 with bZIP63 mediates the regulation of PROLINE DEHYDROGENASE expression. *Molecular Plant* **7**: 1560–1577.
- Verbruggen N, Hua XJ, May M, van Montagu M. 1996.** Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 8787–8791.
- Verbruggen N, Villarroel R, Montagu M van. 1993.** Osmoregulation of a Pyrroline-5-Carboxylate Reductase Gene in Arabidopsis thaliana. *Plant physiology* **103**:771-781
- Verdier J, Lalanne D, Pelletier S, Torres-Jerez I, Righetti K, Bandyopadhyay K, Leprince O, Chatelain E, Vu BL, Gouzy J, et al. 2013.** A Regulatory Network-Based Approach Dissects Late Maturation Processes Related to the Acquisition of Desiccation Tolerance and Longevity of Medicago truncatula Seeds. *Plant physiology* **163**: 757–774.
- Vigeolas H, Möhlmann T, Martini N, Neuhaus HE, Geigenberger P. 2004.** Embryo-Specific Reduction of ADP-Glc Pyrophosphorylase Leads to an Inhibition of Starch Synthesis and a Delay in Oil Accumulation in Developing Seeds of Oilseed Rape. *Plant Physiology* **136**: 2676–2686.
- Wang Y-Y, Tsay Y-F. 2011.** Arabidopsis Nitrate Transporter NRT1.9 Is Important in Phloem Nitrate Transport. *The Plant Cell* **23**: 1945–1957.
- Watson C, Miller H, Poland P, Kilpatrick D, Allen M, Garrett M, Christianson C. 1994.** Soil properties and the ability of the urease inhibitor N-(n-BUTYL) thiophosphoric triamide (nBTPT) to reduce ammonia volatilization from surface-applied urea. *Soil Biology and Biochemistry* **26**: 1165–1171.
- Webb MaryC, Gunning BrianES. 1990.** Embryo sac development in Arabidopsis thaliana. *Sexual Plant Reproduction* **3**.
- Wehmeyer N, Hernandez' LD, Finkelstein RR, Vierling E. 1996.** Synthesis of Small Heat-Shock Proteins 1s Part of the Developmental Program of late Seed Maturation. *Plant physiology* **112**:747-757
- von Wettstein-Knowles P. 1982.** Elongase and epicuticular wax biosynthesis. *Physiol Veg* **20**: 797–809.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson G v., Provart NJ. 2007.** An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE* **2**: e718.
- Wu HM, Cheung AY. 2000.** Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Molecular Biology* **44**: 267–281.
- Wu R, Duan L, Pruneda-Paz JL, Oh D, Pound M, Kay S, Dinneny JR. 2018.** The 6xABRE Synthetic Promoter Enables the Spatiotemporal Analysis of ABA-Mediated Transcriptional Regulation. *Plant Physiology* **177**: 1650–1665.

- Wuest SE, Philipp MA, Guthörl D, Schmid B, Grossniklaus U. 2016.** Seed production affects maternal growth and senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **171**: 392–404.
- Xu T-T, Ren S-C, Song X-F, Liu C-M. 2015.** *CLE19* expressed in the embryo regulates both cotyledon establishment and endosperm development in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **66**: 5217–5227.
- Yamamoto Y, Nishimura M, Hara-Nishimura I, Noguchi T. 2003.** Behavior of Vacuoles during Microspore and Pollen Development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **44**: 1192–1201.
- Yamamoto A, Yoshii M, Murase S, Fujita M, Kurata N, Hobo T, Kagaya Y, Takeda S, Hattori T. 2014.** Cell-by-Cell Developmental Transition from Embryo to Post-Germination Phase Revealed by Heterochronic Gene Expression and ER-Body Formation in *Arabidopsis* leafy cotyledon Mutants. *Plant and Cell Physiology* **55**: 2112–2125.
- 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.
- Yang J, Zhang J, Huang Z, Wang Z, Zhu Q, Liu L. 2002.** Correlation of Cytokinin Levels in the Endosperms and Roots with Cell Number and Cell Division Activity during Endosperm Development in Rice. *Annals of Botany* **90**: 369–377.
- Yim K-O, Bradford KJ. 1998.** Callose Deposition Is Responsible for Apoplastic Semipermeability of the Endosperm Envelope of Muskmelon Seeds¹. *Plant Physiology* **118**: 83–90.
- Zhang L, Becker DF. 2015.** Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–8.
- Zhang L, Tan Q, Lee R, Trethewey A, Lee Y-H, Tegeder M. 2010.** Altered Xylem-Phloem Transfer of Amino Acids Affects Metabolism and Leads to Increased Seed Yield and Oil Content in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **22**: 3603–3620.
- Zhang Z, Tucker E, Hermann M, Laux T. 2017.** A Molecular Framework for the Embryonic Initiation of Shoot Meristem Stem Cells. *Developmental Cell* **40**: 264–277.e4.
- Zheng Z-L. 2009.** Carbon and nitrogen nutrient balance signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior* **4**: 584–591.
- Zheng Y, Cabassa-Hourton C, Planchais S, Crilat E, Clément G, Dacher M, Bordenave-Jacquemin M, Guivarc’h A, Dourmap C, Carol P, et al.** Different fate of mitochondrial enzymes involved in pyrroline-5-carboxylate metabolism during dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment (in revision)*.
- Zheng Y, Cabassa-Hourton C, Planchais S, Lebreton S, Savouré A. 2021.** The proline cycle as an eukaryotic redox valve. *Journal of Experimental Botany* **72**: 6856–6866.

Annexes

Annexe 1 : Amorces utilisées au cours de l'étude

Amorces de géotypage

Amplification	Amorce F (5'-> 3')	Amorce R (5'-> 3')
<i>P5CDH</i>	CATCTTGATCACATTGCCATG	GGGTTGCTCCAAAGAGTTACC
<i>T-DNA p5cdh</i>	CATCTTGATCACATTGCCATG	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
<i>GUS</i>	GGCCAGCGTATCGTGCTGCG	GGTCGTGCACCATCAGCACG
<i>eGFP</i>	GCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC	GCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCC
<i>mGFP</i>	AGGATCGAGCTTAAGGGAAT	AGTTGAACGCTTCCATCTTC
<i>P5CDH-tGFP</i>	GGAAGTAATAGGGAACCTCAGTG	CCGATCACTCTTCCAGCCTCG

Amorces de clonage

Amplification	Amorce F (5'-> 3')	Amorce R (5'-> 3')
<i>Promoteur RGP3 + site Bsa I</i>	ATGGTCTCAGGAGTCTTTTCTATTTTCAGTT	ATGGTCTCACATTTTCAAACGACAAGGAAG
<i>Promoteur At5g16460 + site Bsa I</i>	ATGGTCTCACATTACGGTTTCTGTTTTATG	ATGGTCTCAGGAGAAATAAAAAAAGGAATA

Amorces de ddPCR

Amplification	Amorce F (5'-> 3')	Amorce R (5'-> 3')
<i>AT5G</i>	ACAAGCCAATTTTTGCTGAGC	ACAACAGTCCGAGTGTCATGGT
<i>APT1</i>	ACGACGCTTCTTCTCGACAC	CACCAATAGCCAACGCAATAG
<i>ProDH1</i>	AGCTGCCAAATCTTTACCAACATC	GCTTCCATGAGAGTTTGAAGTTCG
<i>ProDH2</i>	GCTGCTAAAACCCTACCTTCG	ACAGAGGACTTAAGCCGGAG
<i>ASN1</i>	AACTTGTCGCAAGATCAAGG	GGAACACGTGCCTCTAGTCC

<i>CAT6</i>	TCACAGTCATCATCTGTTGCAG	GAATCCCATCACGATCACG
<i>GDH2</i>	CACAGGTCGTGGTGTAGTATTT	ACCACTTTACCGCCTTTCTC
<i>GLN1.3</i>	CCTCAGGGACCTTACTACTGTGGTGTG	CAACCCAGACTTGATCACCAGAACTAAT
<i>GLN1.5</i>	TCTCCTAAACCTTGATCTATCAGACACC	CTCTTCAGCCTTCACATTGGGATGATC
<i>LEC2</i>	TGTCGGAGATCTGCACGTTA	TCCAAGTGAGTTGGTTGATTC
<i>MYB118</i>	CTTGATCTGCTCGGTCTTGA	TCAATTCAATATGCCAAAACCA
<i>ZOU</i>	TCTTCTGCCTCAACAAACACA	TGGGATGGTTTGATATTGGTG
<i>SUC5</i>	TTGGAGCTGTTAGACACATGAAA	CCAAGCGATCCAATTAATGA
<i>SUS3</i>	TTCAAGCTCCTGATCCTTCG	ACATTGGCTTGCCCGAAATA
<i>SIP2</i>	GCATACAACAGCCTTTTCCT	ATCTTGAGCAAGCTGATTCC
<i>WRI1</i>	AAGCAGAGCAACAAGAAGCA	GTCCCCACAACGATCCATT
<i>P5CS2</i>	TGTTCTTGAGGTTTGTACC	GACATGAAGAGAAGCTGCTAA
<i>P5CDH</i>	GCTCATATGCTCGCCTTACC	CCATAAGGCCAACGGTAACC
<i>P5CS1</i>	GAGCTAGATCGTTCACGTGCTTT	ACAAGTGTGTCCCAACCTTAAC
<i>P5CR</i>	CACAGACCGTTCTTGGAGCTG	GTGTTGCCCGGAAAGAGCCTTT
<i>CAT1</i>	TGGGATTCAGACAGGCAAGAACG	GTTTGGCCTCACGTTAAGACGAGT
<i>OAT</i>	TAACCGAGTGTGATCGCTGTGGAA	ACCGGTGCTGTGTCCTATGGAAAT

Annexe 2 : Composition des solutions nutritives utilisées dans le cadre du gradient de nitrates 0-2mM

	0 mM	0,5 mM	1 mM	1,5 mM	2 mM	10mM
KNO ₃	0 mM	0,4375 mM	0,8745 mM	1,312 mM	1,749 mM	4,995mM
Ca(NO ₃) ₂ -4 H ₂ O	0 mM	0,0315 mM	0,0625 mM	0,094 mM	0,125 mM	2,4985 mM
CaCl ₂ – 2 H ₂ O	0 mM	0,2195 mM	0,188 mM	0,157 mM	0,1255 mM	-
KCl	0 mM	1,312 mM	0,8745 mM	0,4375 mM	-	-
NaCl	-	-	-	-	-	0,2mM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ - 4 H ₂ O	0,04µM					
H ₂ BO ₃	24,3µM					
MnSO ₄ -H ₂ O	11,8µM					
ZnSO ₄ -7H ₂ O	3,48µM					
CuSO ₄	1µM					
Sequestrene® (Syngenta)	0,001% (m/V)					
KH ₂ PO ₄	0,25mM					
MgSO ₄	0,25mM					



Résumé :

La proline est un acide aminé protéinogène qui est impliqué dans le développement et l'adaptation des plantes aux contraintes environnementales. La Pyrroline-5-Carboxylate Déshydrogénase (P5CDH) est l'enzyme mitochondriale responsable de la seconde étape du catabolisme de la proline. L'objectif de cette thèse a été d'évaluer la remobilisation de l'azote chez le mutant *p5cdh* ainsi que son impact sur le développement de la graine. Il a ainsi été mis en évidence un défaut de remobilisation de l'azote et du carbone dans les graines du mutant *p5cdh*. Ce phénomène est exacerbé lors d'un apport non limitant en azote (10 mM de nitrates). Les graines produites par ce mutant sont alors morphologiquement anormales et affichent un très faible taux de germination. Les graines *p5cdh* présentent notamment un développement embryonnaire altéré avec un embryon bloqué à la transition entre les phases d'embryogenèse et de maturation. D'autre part la phase de maturation est fortement perturbée avec un faible verdissement des embryons, de faibles quantités de composés de réserve et une accumulation très importante d'acides aminés, notamment de proline. Une analyse multi-omique de siliques et graines du mutant *p5cdh* a mis en évidence une dégradation rapide des chloroplastes, un métabolisme anaérobie, une carence en énergie et un arrêt progressif du métabolisme au cours de la phase de maturation de la graine. A la fin de leur développement, les graines du mutant *p5cdh* présentent un défaut de tolérance à la phase de déshydratation qui entraîne la mort des embryons. L'ensemble de ces résultats suggère que le catabolisme de la proline et notamment l'enzyme P5CDH sont des éléments essentiels au maintien d'un équilibre redox dans la cellule et l'activité respiratoire au cours de la maturation de la graine. De plus, de nouvelles données démontrent que la mutation *p5cdh* a également un impact négatif sur le développement du pollen, ouvrant la voie à de nouveaux rôles pour P5CDH dans le développement reproducteur.

Mots-Clés : proline, développement de la graine, énergie, azote, *Arabidopsis thaliana*

Abstract :

Proline is a proteinogenic amino acid involved in the development and adaptation of plants to environmental challenges. Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase (P5CDH) is the mitochondrial enzyme responsible for the second step in proline catabolism. The objective of this thesis was to evaluate nitrogen remobilization and its impact on seed development in the *p5cdh* mutant. It was thus shown that seeds of *p5cdh* mutant presented a decrease of nitrogen and carbon remobilization. This phenomenon is exacerbated in case of a non-limiting nitrogen supply (10 mM nitrate). *p5cdh* seeds are morphologically abnormal and present a very low germination rate. *p5cdh* seeds also show altered embryonic development with an embryo blocked at the transition between embryogenesis and maturation phases. On the other hand, the maturation phase is strongly disrupted with a weak transient greening of the embryo, low accumulation of storage compounds and a very important accumulation of amino acids, notably proline. Multi-omics analysis of siliques and seeds of the *p5cdh* mutant revealed rapid chloroplast degradation, anaerobic metabolism, energy deficiency and a gradual metabolic arrest during seed maturation phase. At the end of their development, seeds of the *p5cdh* mutant show a lack of tolerance to the dehydration phase, which leads to death of the embryos. All of these results suggest that proline catabolism, and particularly the P5CDH enzyme, are essential elements for maintaining redox balance in cells and respiratory activity during seed maturation. Furthermore, our new data show that the *p5cdh* mutation also has a negative impact on pollen development, opening the route to new roles for P5CDH in reproductive development.

Key-Words: proline, seed development, energy, nitrogen, *Arabidopsis thaliana*