



Contribution à l'étude du contrôle transcriptionnel de la maturation de la graine d'Arabidopsis

Guillaume Barthole

► To cite this version:

Guillaume Barthole. Contribution à l'étude du contrôle transcriptionnel de la maturation de la graine d'Arabidopsis. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. <NNT : 2013PA112166>. <tel-01202164>

HAL Id: tel-01202164

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01202164>

Submitted on 19 Sep 2015

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.

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VÉGÉTAL
Institut Jean-Pierre Bourgin

DISCIPLINE : BIOLOGIE

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenance prévue le 18/09/2013

par

Guillaume BARTHOLE

Contribution à l'étude du contrôle
transcriptionnel de la maturation de la graine
d'Arabidopsis

Composition du jury :

Directeur de thèse :

Co-encadrant :

Rapporteurs :

Examineurs :

Loïc LEPINIEC

Sébastien BAUD

Julia BUITINK

Richard THOMPSON

Arnould SAVOURE

Marianne DELARUE

Directeur de recherche (INRA)

Chargé de recherche (CNRS)

Directeur de recherche (INRA)

Directeur de recherche (INRA)

Professeur (Université Pierre-et-Marie-Curie)

Maître de conférence (Université Paris-sud/11)

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Sébastien Baud et Loïc Lepiniec mes deux directeurs de thèse pour leur investissement dans le bon déroulement de ce projet que ce soit à la paillasse ou autour d'une table, pour leur soutien et pour leurs encouragements. Ils forment un couple atypique doué d'une très grande rigueur scientifique, d'une volonté sans pareil d'aller de l'avant, toujours à l'écoute et attentionné où le pessimisme de l'un est contrebalancé par l'optimisme de l'autre. Ils m'ont offert un environnement scientifique et humain particulièrement propice tout au long de mon stage de Master et de ma thèse. Une mention spéciale pour Sébastien pour tout le savoir qu'il a pu me transmettre au cours de ces trois années et toute l'aide qu'il a pu m'apporter à la paillasse depuis mes débuts en Master jusqu'au sprint final, son efficacité sans commune mesure font de lui un directeur de thèse que beaucoup m'ont envié.

Un grand merci aussi à Martine Miquel pour sa disponibilité et pour m'avoir appris à dompter cette terrible machine qu'est le chromatographe en phase gazeuse, à Alexandra To et Céline Boulard pour tous leurs conseils en biochimie, domaine de la biologie plus apparenté à la cuisine qu'à la science, à Sabine D'Andrea et Carine Deruyffelaere, les spécialistes des protéines de la graine, à Zsolt Kelemen pour tous ses conseils et ses techniques novatrices en biologie moléculaire, à Chloé Marchive pour les longues heures passées au confocal, à Sandrine Balzergue pour l'analyse transcriptomique, sans oublier Bruno Letarnec, Amélie Degeuse, Mickael Anjuere, Hervé Ferry et Patrick Grillot, qui ont pris soin de mes plantes tout au long de ces trois années. Leur aide précieuse a été un facteur déterminant, contribuant largement au bon déroulement de cette thèse.

Pour tous leurs conseils et les nombreuses discussions toujours très enrichissantes, pour avoir travaillé à mes cotés tout au long de ces années, merci à Bertrand, Johanne, Kristina, Julien, Susana, Nathalie, Christian, Jean-Marc, Annie, Helen, François, Erwann, Loïc, Marc, Imen, Delphine, Martine, Gwendal, Béatrice, Isabelle, Elodie, Johanne, Enrico, Elisa, Davy, Wenjia, Damaris. Merci à tous les membres de l'ex-biologie des semences pour l'ambiance chaleureuse et leur accueil au sein du laboratoire.

Merci aussi à tous mes collègues et amis, que j'ai pu cotoyer à Orsay ou à Cachan et qui ont partagé ma thèse coté enseignement, pour leur soutien sans faille et leurs encouragements, Hélène, Christian, Chadli, Chrystelle, Samuel, Céline, Marianne, Valérie, Uriel, Pascale, Gérald, ...

Pour conclure, je tiens tout particulièrement à remercier Richard Thompson et Julia Buitink, mes rapporteurs mais aussi Arnould Savouré et Marianne Delarue pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

Sommaire

Introduction.....	1
I – La graine	1
1.1 Structures et types de graine.....	2
1.2 Importance physiologique et écologique pour la plante	4
1.3 Importance socio-économique pour l'homme	6
II – La première étape du développement de la graine chez Arabidopsis : l'embryogenèse ou morphogenèse précoce	8
2.1 De la formation de l'ovule à la fécondation	8
2.1.1 L'ovule	8
2.1.2 La double fécondation	9
2.2 Les téguments	10
2.2.1 Développement des différentes assises	11
2.2.2 Mucilage, flavonoïdes et cutine.....	12
2.3 L'embryon et son développement.....	14
2.3.1 La mise en place d'un axe apico-basal	14
2.3.1.1 Les premiers stades de développement.....	14
2.3.1.2 La régulation de la mise en place de l'axe apico-basal.....	15
2.3.2 La mise en place des méristèmes	17
2.3.2.1 Le méristème apical caulinaire (MAC).....	17
2.3.2.2 Le méristème apical racinaire (MAR).....	19
2.3.3 La mise en place des axes de symétrie	20
2.3.3.1 Mise en place d'une symétrie bilatérale.....	20
2.3.3.2 Mise en place d'une symétrie radiale et formation de l'axe embryonnaire.....	20
2.3.3.2 Mise en place d'une symétrie adaxiale-abaxiale.....	21
2.4 L'albumen	22
2.4.1 Le développement de l'albumen	22
2.4.1.1 Le stade coenocytique	22
2.4.1.2 La cellularisation.....	22
2.4.1.3 La différenciation et la régionalisation de l'albumen selon l'axe antéro-postérieur..	25
2.4.1.4 La symétrie radiale de l'albumen	26
2.4.1.5 Le rôle et la dégénérescence de l'albumen	27
2.4.2 La régulation du développement de l'albumen	28
2.4.2.1 Les acteurs régulant le développement de l'albumen	28
2.4.2.2 La régulation des grandes étapes du développement de l'albumen.....	33
2.4.2.3 Les interactions entre l'albumen et les autres tissus durant le développement : le contrôle de la taille de la graine	35
2.4.2.4 Coordination de la croissance de l'albumen et de l'embryon.....	38
III – La deuxième étape du développement de la graine chez Arabidopsis : la maturation.....	39
3.1 L'accumulation de composés de réserve au cours de la maturation	41
3.1.1 Origine des nutriments.....	41
3.1.2 Le métabolisme carboné primaire.....	42
3.1.2.1 Le devenir des nutriments importés	42
3.1.2.2 La mise en réserve transitoire d'amidon.....	43
3.1.3 Le métabolisme lipidique et les triacylglycérols	45
3.1.3.1 La synthèse du squelette de glycérol.....	46
3.1.3.2 La synthèse des acides gras.....	46
3.1.3.3 La modification des acides gras.....	50
3.1.3.4 L'assemblage des triacylglycérols	51
3.1.3.5 Stockage des triacylglycérols dans les oléosomes.....	51
3.1.4 Le métabolisme protéique et les protéines de réserve	53
3.1.4.1 Diversité.....	53
3.1.4.2 Synthèse et stockage	54

3.2 Les processus de la maturation tardive : La dessiccation et l'entrée en dormance.....	55
3.3 La régulation de la maturation de la graine	57
3.3.1 Les régulateurs maîtres	57
3.3.1.1 Les mutants des régulateurs maîtres.....	57
3.3.1.2 Les protéines	59
3.3.1.3 Patron d'expression des régulateurs maîtres	61
3.3.1.4 Mode d'action et cibles des régulateurs maîtres.....	62
3.3.1.5 Un réseau complexe de relations au sein des régulateurs maîtres	67
3.3.2 WRINKLED1 et la synthèse des acides gras	67
3.3.3 La régulation des régulateurs maîtres	69
3.3.3.1 Via AGL15 et AGL18.....	69
3.3.3.2 Régulation de LEC2 par des facteurs chromatinien et non chromatinien	69
3.3.4 Des activateurs de l'entrée en dormance et de la dessiccation	70
3.3.5 Des represseurs de la maturation	71
3.3.5.1 Les facteurs de transcription	71
3.3.5.2 Les acteurs chromatinien.....	73
3.3.6 Le rôle des hormones : la balance ABA/GA	75
Le Projet.....	77
1. L'étude de la maturation de la graine chez Arabidopsis	77
2. Le projet SOLAR.....	77
3. Un candidat d'intérêt : MYB118	79
4. Un deuxième candidat : WB3	84
5. Présentation du mémoire.....	86
Chapitre I – Etude comparée de la maturation de l'embryon et de l'albumen dans la graine d'Arabidopsis.....	89
I – Cinétique d'accumulation des composés de réserve.....	89
1.1 La mise en réserve des triacylglycérols	89
1.1.1 Répartition du contenu en huile dans la graine sèche.....	89
1.1.2 Cinétique d'accumulation des huiles de réserve	90
1.1.3 Composition en acides gras des huiles de réserve	92
1.2. La mise en réserve des protéines	95
II – Expression des gènes du métabolisme	97
2.1 Les acteurs du métabolisme lipidique	98
2.2 Les gènes codant les protéines de réserve.....	101
III – Expression des régulateurs transcriptionnels de la maturation de la graine....	102
3.1 Les régulateurs maîtres de la maturation de la graine	102
3.2 Un régulateur secondaire de la maturation de la graine : WR1	104
Conclusion et perspectives	105
Chapitre II – MYB118, un facteur de transcription régulant la répartition des composés de réserve dans la graine d'Arabidopsis.....	107
I - Patron d'expression de MYB118.....	107
1.1 Etude de l'expression de MYB118 par RT-PCR quantitative	107
1.2 Activité du promoteur de MYB118.....	109
1.3 Localisation de l'accumulation des transcrits MYB118 dans les différents tissus de la graine	112
II - Régulation de l'expression de MYB118 par LEC2	113
2.1 Le contrôle de l'expression de MYB118 par les régulateurs maîtres de la maturation de la graine.....	113
2.1.1 Obtention d'une collection de mutants pour les régulateurs maîtres de la maturation de la graine	114
2.1.1.1 Caractérisation d'allèles mutants lec2	114
2.1.1.2 Caractérisation d'allèles mutants fus3	116
2.1.1.3 Caractérisation d'allèles mutants abi3	117
2.1.1.4 Caractérisation d'allèles mutants lec1	118
2.1.1.5 Caractérisation d'un allèle mutant l1l	120

2.1.2 Crible pour l'expression de <i>MYB118</i> en fonds mutants	121
2.2 LEC2, activateur de l'expression de <i>MYB118</i>	122
2.2.1 Etude de l'activité du promoteur de <i>MYB118</i> en fond mutant <i>lec2</i>	122
2.2.2 Activation de l'expression de <i>MYB118</i> par LEC2 de manière ectopique	124
2.2.2.1 Utilisation de lignées Pro _{35S} :LEC2::ΔGR	124
2.2.2.2 Cinétique d'induction de l'expression de <i>MYB118</i> par le système Pro _{35S} :LEC2::ΔGR	125
2.2.2.3 Activation du promoteur de <i>MYB118</i> par le système Pro _{35S} :LEC2::ΔGR.....	126
III - Caractérisation fonctionnelle de MYB118	127
3.1 Caractérisation moléculaire de mutants <i>myb118</i> et de surexpresseurs de <i>MYB118</i>	127
3.3.1 Caractérisation d'un mutant d'insertion ADN-T.....	127
3.3.2. Obtention et caractérisation d'une lignée antisens	129
3.3.3 Obtention et caractérisation de surexpresseurs	129
3.2 Phénotype des mutants <i>myb118</i>	131
3.2.1 Suivi du développement de la graine	131
3.2.2 Contenu en acides gras totaux de la graine	132
3.2.2.1 Teneur en acides gras de la graine.....	132
3.2.2.2 Composition en acides gras de la graine	135
3.2.3 Contenu en protéines de réserve de la graine	138
3.2.4 Bilan.....	141
3.2.5 Cinétique d'accumulation des composés de réserve	143
3.3 Recherche de cibles de MYB118 : analyse transcriptomique	145
3.3.1 Les gènes négativement régulés par MYB118	145
3.3.2 Les gènes positivement régulés par MYB118	150
3.4 Etude d'interaction entre MYB118 et ses promoteurs cibles.....	156
IV - Relation entre MYB118 et LEC2.....	157
4.1 Analyse morphologique du double mutant <i>myb118 lec2</i>	158
4.2 Suivi du développement embryonnaire des doubles mutants <i>myb118 lec2</i>	160
4.3 Contenu en acides gras des doubles mutants <i>myb118 lec2</i>	162
Conclusion et perspectives	164
Chapitre III - Analyse fonctionnelle des paralogues de MYB118.....	167
I - Données d'expression concernant les paralogues de MYB118	167
1.1 MYB115, le plus proche paralogue de MYB118.....	167
1.1.1 Etude du patron d'expression de <i>MYB115</i> par RT-PCR quantitative	167
1.1.2 Localisation tissulaire de l'expression de <i>MYB115</i> dans la graine par RT-PCR quantitative.....	169
1.1.3 Activité du promoteur de <i>MYB115</i>	170
1.2 <i>MYB22</i> et <i>MYB100</i> , deux pseudogènes ?	172
II - Régulation de MYB115.....	172
III - Caractérisation fonctionnelle de MYB115	176
3.1 Caractérisation moléculaire d'un allèle mutant <i>myb115</i>	176
3.3.1 Le mutant <i>myb115-1</i>	176
3.3.2 Le double mutant <i>myb118 myb115</i>	177
3.2. Phénotypes des mutants <i>myb115-1</i> et <i>myb118 myb115</i>	178
3.2.1 Suivi du développement de la graine	178
3.2.2 Contenu en acides gras totaux de la graine	178
3.2.3 Composition en acides gras de la graine	180
Conclusions et perspectives	182
Chapitre IV - Régulation et fonction des stéaroyl-ACP désaturases (SAD) dans la graine d'Arabidopsis.....	185
I - Quelques éléments d'introduction : structure et activité catalytique des stéaroyl-ACP désaturases (SAD).....	185
1.1 La réaction de désaturation	186
1.2.1 Le site actif	187
1.2.2 Le mécanisme réactionnel.....	189

1.2.3 La poche de fixation des substrats	190
1.2.4 Des acyl-ACP désaturases non conventionnelles	192
1.3 Les SAD d'Arabidopsis	193
II - Patron d'expression des SAD d'Arabidopsis	195
2.1 Etude du patron d'expression des gènes de la famille des SAD dans les différents organes d'une plante sauvage	195
2.1.1 Etude par RT-PCR quantitative	195
2.1.2 Etude de l'activité du promoteur des gènes SAD	197
2.2 Etude du patron d'expression des SAD dans les différents tissus de la graine	199
III - Activité catalytique des SAD d'Arabidopsis	203
3.1 Expression hétérologue des SAD d'Arabidopsis dans les feuilles de tabac	203
3.2 Etude de mutants <i>sad</i>	205
3.3 Modélisation de la structure tridimensionnelle des SAD	210
3.4 Bilan sur l'activité catalytique des SAD d'Arabidopsis	214
3.5 Perspectives concernant l'étude de l'activité catalytique des SAD	217
IV - Régulation de l'expression des SAD d'Arabidopsis	217
4.1 Régulation de l'expression des gènes SAD d'Arabidopsis par MYB118	217
4.1.1 Expression des SAD en fond mutant <i>myb118</i>	219
4.1.2 Activité du promoteur de <i>SAD3</i> en fond mutant <i>myb118-1</i>	221
4.1.3 Bilan	222
4.1.4 Interactions moléculaires	222
4.2 Régulation de l'expression des gènes SAD d'Arabidopsis par WRI1	223
4.2.1 Expression des SAD en fond mutant <i>wri1</i>	225
4.2.2 Interactions moléculaires	225
4.3 Bilan et perspectives sur la régulation des gènes SAD	226
Conclusion et perspectives générales	228
Chapitre V – Premières données sur WB3	229
I - Patron d'expression de WB3	229
1.1 Etude de l'expression de WB3 par RT-PCR quantitative	229
1.2 Activité du promoteur de WB3	231
II - Quelques éléments de régulation de l'expression de WB3	232
III - Caractérisation fonctionnelle de WB3	233
3.1 Caractérisation moléculaire de mutants <i>wb3</i>	233
3.1.1 Structure du gène WB3 en fond Ws	233
3.1.2 Transcrits WB3 en fond Ws	234
3.1.3 Mutants <i>wb3</i> en fond Col-0	235
3.1.4 Mutant <i>wb3</i> en fond Ws	236
3.2 Phénotype des mutants <i>wb3</i>	237
3.2.1 Développement de la rosette et de la hampe florale	237
3.2.2 Suivi du développement de la graine et de l'embryon	238
3.2.3 Contenu et composition en acides gras de la graine	239
3.3 Complémentation du phénotype du mutant <i>wb3-3</i>	241
IV- Perspectives	243
Discussion	245
I - Stratégie d'étude des facteurs de transcription	245
II - Le développement et la maturation de l'albumen : d'Arabidopsis aux céréales	248
2.1 Apparition et rôle de l'albumen	248
2.2 Graines albuminées ou exalbuminées ?	249
2.3 Conservation de la fonction des régulateurs transcriptionnels de la maturation entre graines albuminées et exalbuminées	251
2.4 Contrôle du stockage des réserves dans la graine : albumen ou embryon ?	253

III – Des applications biotechnologiques à partir des connaissances acquises chez Arabidopsis	254
3.1 Modification de la teneur en composés de réserve de la graine.....	254
3.2 Modification de la composition des réserves de la graine	255
3.3 Modification de la répartition des composés de réserve au sein de la graine, un enrichissement en composés tissus spécifiques	256
Matériels et méthodes.....	259
I - Matériels.....	259
1.1 Matériel végétal	259
1.2 Souches bactériennes	259
1.3 Souches de levures	260
1.4 Vecteurs.....	260
II - Méthodes	263
2.1 Conditions de culture	263
2.1.1 In vitro	263
2.1.2 En serre	263
2.1.3 Agroinfiltration	264
2.1.3.1 Agroinfiltration d'Arabidopsis.....	264
2.1.3.2 Agroinfiltration de feuilles de tabac	265
2.1.4 Culture in vitro et système inductible à la dexaméthasone	266
2.2 Analyses moléculaires.....	266
2.2.1 Extraction d'acides nucléiques	266
2.2.1.1 Extraction rapide d'ADN génomique.....	266
2.2.1.2 Extraction d'ADN plasmidique : minipréparation (préparation de 2 à 5 µg d'ADN plasmidique).....	267
2.2.1.3 Extraction d'ARN totaux.....	267
2.2.2 La transcription inverse	268
2.2.3 PCR	268
2.2.4 RT-PCR quantitative	270
2.2.5 Electrophorèse d'acides nucléiques	272
2.2.6 Clonage	273
2.2.6.1 PCR à haute fidélité.....	273
2.2.6.2 Clonage Gateway.....	273
2.2.6.3 Clonage sans ligation (Ligation independent cloning).....	274
2.2.6.4 Préparation des bactéries électrocompétentes	275
2.2.6.5 Transformation par électroporation	275
2.2.7 Séquençage	275
2.2.8 Analyse transcriptomique sur puce CATMA	276
2.2.9 Simple hybride	277
2.3 Analyses biochimiques.....	280
2.3.1 Analyses lipidiques	280
2.3.2 Analyses des protéines	280
2.3.2.1 Extraction des protéines.....	280
2.3.2.2 Electrophorèse SDS-PAGE.....	281
2.3.2.3 Western blot.....	281
2.4 Analyses morphologiques et cytologiques	282
2.4.1 Suivi de la morphogenèse de l'embryon	282
2.4.2 Suivi du développement de l'albumen	282
2.4.3 Observation de la morphologie des graines et estimation de leurs dimensions	283
2.4.4 Activité GUS	283
2.4.5 Coloration d'Alexander : test de viabilité du pollen	283
2.4.6 Observation de graines au Microscope Electronique à Balayage (MEB)	284
2.5 Analyses bioinformatiques.....	284
2.5.1 Alignement de séquences et phylogénie	284
2.5.2 Modélisation de la structure tridimensionnelle de protéines	284
Références bibliographiques.....	285

Table des illustrations

Introduction

<i>Figure 0.1. Place des plantes à graines au sein de la lignée des Embryophytes.</i>	1
<i>Figure 0.2. Structure d'une graine d'Arabidopsis en fin de développement.</i>	2
<i>Figure 0.3. Origine des structures constituant une graine d'Arabidopsis.</i>	3
<i>Figure 0.4. Les trois types de graines.</i>	4
<i>Figure 0.5. Cycle de vie d'une Angiosperme hermaphrodite.</i>	5
<i>Figure 0.6. Développement de l'ovule d'Arabidopsis</i>	9
<i>Figure 0.7. Représentation schématique du devenir des cellules spermatiques lors de la double fécondation.</i>	10
<i>Figure 0.8. Structure de la testa d'Arabidopsis.</i>	11
<i>Figure 0.9. La différenciation de la testa.</i>	13
<i>Figure 0.10. Origine embryonnaire des structures de la plantule.</i>	15
<i>Figure 0.11. Domaines d'expression des gènes WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN (WOX)</i>	16
<i>Figure 0.12. Expression embryonnaire de WUSCHEL</i>	17
<i>Figure 0.13. Développement du méristème apical caulinaire et réseau de régulation.</i>	18
<i>Figure 0.14. Mise en place du méristème apical racinaire.</i>	19
<i>Figure 0.15. Mise en place d'une symétrie radiale : le cas de l'épiderme.</i>	20
<i>Figure 0.16. Etapes majeures du développement de l'albumen d'Arabidopsis.</i>	23
<i>Figure 0.17. Stades de développement de l'albumen d'Arabidopsis.</i>	24
<i>Figure 0.18. Représentation schématique du développement de l'albumen.</i>	25
<i>Figure 0.19. Développement de l'albumen des céréales.</i>	27
<i>Figure 0.20. Les complexes PRC2 impliqués dans le développement de la graine chez Arabidopsis.</i>	29
<i>Figure 0.21. Modèle présentant les mécanismes moléculaires contrôlant l'expression maternelle ou paternelle des gènes soumis à une empreinte parentale.</i>	32
<i>Figure 0.22. Modèle du contrôle de la taille de la graine chez Arabidopsis.</i>	36
<i>Figure 0.23. Représentation schématique du développement de la graine chez Arabidopsis.</i>	40
<i>Figure 0.24. Schéma simplifié du métabolisme primaire dans des embryons</i>	45
<i>Figure 0.25. Composition en acides gras d'une graine d'Arabidopsis</i>	46
<i>Figure 0.26. Synthèse des acides gras dans le plaste d'embryons</i>	48
<i>Figure 0.27. Schéma simplifié des réactions impliquées dans l'assemblage des triacylglycérols</i>	49
<i>Figure 0.28. Biogenèse et trafic vésiculaire des structures de réserve dans les graines</i>	52
<i>Figure 0.29. Schéma simplifié de la maturation des protéines de réserve de type napine</i>	54
<i>Figure 0.30. Modèle hypothétique de régulation du processus d'entrée en dormance</i>	56
<i>Figure 0.31. Quelques phénotypes des mutants lec1, lec2 et fus3</i>	58
<i>Figure 0.32. Tableau récapitulatif des principaux phénotypes des mutants des régulateurs maîtres</i>	59
<i>Figure 0.33. Diagramme présentant l'organisation en domaines des différents sous-groupes de la famille B3 chez Arabidopsis et structure tridimensionnelle de ABI3.</i>	60
<i>Figure 0.34. Patron d'expression des gènes des régulateurs maîtres</i>	62
<i>Figure 0.35. Modèle du contrôle de la synthèse et de l'accumulation des composés de réserve</i>	64
<i>Figure 0.36. Modèle présentant les interactions génétiques et moléculaires entre les acteurs du réseau de régulation du processus de maturation</i>	65
<i>Figure 0.37. Complexe d'activation de la transcription du facteur ABI3</i>	67
<i>Figure 0.38. Modèle de régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans la biosynthèse des triacylglycérols</i>	68
<i>Figure 0.39. Représentation schématique du promoteur de LEC2 et de sa régulation</i>	70

Figure 0.40. Modèle putatif de régulation négative des gènes codant des napines (2S) par ASIL1	72
Figure 0.41. Modèle de répression des gènes de maturation dans les feuilles par des miARN.....	75
Figure 0.42. Mode d'action de l'ABA dans les graines.....	76

Le projet

Figure 0.43. Profil d'expression des gènes WRI1, MYB118 et WB3 d'après AtGenExpress	79
Figure 0.44. Représentation schématique des formes libres et complexées à l'ADN du domaine R2 (a) et R3 (b) des facteurs R2R3-MYB.	80
Figure 0.45. Représentation schématique des relations entre les différents sous-groupes de R2R3-MYB chez Arabidopsis.....	81
Figure 0.46. Représentation schématique des relations entre les différents R2R3-MYB du sous-groupe numéro 25 chez Arabidopsis	82
Figure 0.47. Le mutant pga37, un activateur de l'embryogenèse somatique.....	83
Figure 0.48. MYB118 est un facteur de transcription.	84
Figure 0.49. Famille REM des facteurs de transcription de type B3.	85

Chapitre I

Figure 1.1. Contenu en acides gras d'une graine sèche sauvage	90
Figure 1.2. Cinétique d'accumulation de l'acide eicosanoïque.....	91
Figure 1.3. Observation au microscope confocal de cellules d'embryon ou d'albumen.	91
Figure 1.4. Composition en acides gras d'une graine sèche	92
Figure 1.5. Evolution de la proportion en acides gras à très longue chaîne.	93
Figure 1.6. Cinétiques d'accumulation des acides gras monoinsaturés en n-9 ou en n-7 dans la graine.....	94
Figure 1.7. Cinétique d'accumulation des protéines de réserve dans la graine.	95
Figure 1.8. Immunodétection des cruciférines (12S), des napines (2S) et de l'oléosine S3 sur des embryons en développement d'une graine sauvage.....	96
Figure 1.9. Immunodétection des cruciférines (12S), des napines (2S) et de l'oléosine S3 sur la fraction albumen au cours du développement d'une graine sauvage.	97
Figure 1.10. Évaluation de la « pureté » des d'ARNm extraits de la fraction albumen ou de l'embryon.....	98
Figure 1.11. Cinétiques d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des TAG dans la fraction albumen et dans l'embryon.....	99
Figure 1.12. Cinétiques d'expression de gènes codant des protéines de réserve dans la fraction albumen et dans l'embryon.	101
Figure 1.13. Cinétiques d'expression des régulateurs maîtres du développement de la graine et de WRI1 dans la fraction albumen et dans l'embryon.	103
Figure 1.14. Schéma interprétatif présentant le processus de maturation et sa régulation dans l'embryon et l'albumen.	105

Chapitre II

Figure 2.1. Expression relative de MYB118 dans différents organes d'une plante sauvage.	108
Figure 2.2. Cinétique d'accumulation des transcrits de MYB118 dans des graines en développement.....	108
Figure 2.3. Analyse de l'activité β -glucuronidase (GUS) chez des plantes transgéniques Pro _{MYB118} :uidA.	110
Figure 2.4. Cinétique d'accumulation des transcrits MYB118 dans les différentes fractions de la graine.....	112
Figure 2.5. Caractérisation de mutants lec2 (en fond Col-0).....	115
Figure 2.6. Caractérisation de mutants fus3 (en fond Col-0).....	116
Figure 2.7. Caractérisation de mutants abi3 (en fond Col-0).....	118

<i>Figure 2.8. Caractérisation de mutants lec1 (en fond Col-0).</i>	119
<i>Figure 2.9. Caractérisation du mutant l1l-1</i>	120
<i>Figure 2.10. Expression relative de MYB118 dans des graines de mutants des régulateurs maîtres</i>	122
<i>Figure 2.11. Activité du promoteur de MYB118 dans des graines en fond sauvage ou en fond mutant lec2.</i>	123
<i>Figure 2.12. Induction ectopique de MYB118 à l'aide du système Pro_{35S}:LEC2::ΔGR.</i>	124
<i>Figure 2.13. Cinétique d'induction de MYB118 à l'aide du système Pro_{35S}:LEC2::ΔGR.</i>	125
<i>Figure 2.14. Activation du gène rapporteur uidA placé sous le contrôle du promoteur de MYB118 par le système Pro_{35S}:LEC2::ΔGR.</i>	127
<i>Figure 2.15. Caractérisation du mutant myb118-1 (en fond Col-0).</i>	128
<i>Figure 2.16. Caractérisation de lignées transgéniques affectées dans l'expression de MYB118.</i>	129
<i>Figure 2.17. Étude de surexpresses de MYB118.</i>	130
<i>Figure 2.18. Embryons en développement observés à 8, 10 et 12 JAF chez le sauvage et le mutant myb118-1.</i>	131
<i>Figure 2.19. Cellules de l'albumen observées chez le sauvage et le mutant myb118-1.</i>	132
<i>Figure 2.20. Contenu en acides gras totaux d'une graine sèche chez le sauvage, myb118-1, T16 et OE3.</i>	133
<i>Figure 2.21. Génération de lignées transgéniques par insertion d'un ADN-T.</i>	134
<i>Figure 2.22. Contenu en acides gras totaux d'une graine sèche chez le sauvage, myb118-1 et chez cinq lignées myb118-1 complétées par le transgène Pro_{MYB118(2535pb)}:MYB118g.</i>	135
<i>Figure 2.23. Composition en acides gras d'une graine sèche chez le sauvage, myb118-1, T16 et OE3.</i>	136
<i>Figure 2.24. Composition en acides gras d'une graine sèche chez le sauvage, myb118-1 et chez cinq lignées myb118-1 complétées par le transgène Pro_{MYB118(2535pb)}:MYB118g.</i>	137
<i>Figure 2.25. Contenu en protéines de graines sèches d'Arabidopsis sauvage, myb118-1 ou OE3, entières ou disséquées, analysées en SDS-PAGE.</i>	138
<i>Figure 2.26. Immunodétection des cruciférines (12S) sur des graines sèches d'Arabidopsis sauvage, myb118-1 ou OE3, entières ou disséquées.</i>	139
<i>Figure 2.27. Quantification relative des cruciférines (12S) d'une graine sèche sauvage, myb118-1 ou OE3 disséquée.</i>	139
<i>Figure 2.28. Immunodétection des napines (2S) sur des graines sèches d'Arabidopsis sauvages, myb118-1 ou OE3, entières ou disséquées.</i>	140
<i>Figure 2.29. Quantification relative des napines (2S) d'une graine sèche sauvage, myb118-1 ou OE3 disséquée.</i>	140
<i>Figure 2.30. Représentation schématique de l'accumulation des composés de réserve dans une graine d'Arabidopsis.</i>	142
<i>Figure 2.31. Deux modèles pour expliquer l'accumulation accrue de composés de réserve dans l'albumen du mutant myb118-1.</i>	143
<i>Figure 2.32. Contenu en acides gras de graines disséquées âgées de 12 jours après floraison chez le sauvage et myb118-1.</i>	144
<i>Figure 2.33. Sélection de gènes inhibés par MYB118 identifiés par analyse transcriptomique sur puce à ADN (CATMA).</i>	146
<i>Figure 2.34. Expression relative de dix gènes inhibés par MYB118 dans des graines sauvage, myb118-1 ou OE3</i>	147
<i>Figure 2.35. Expression relative de 12 gènes inhibés par MYB118 dans les différentes fractions d'une graine en sauvage ou myb118-1.</i>	149
<i>Figure 2.36. Sélection de gènes induits par MYB118 identifiés par analyse transcriptomique sur puce à ADN (CATMA).</i>	150
<i>Figure 2.37. Expression relative de huit gènes induits par MYB118 dans divers fonds génétiques.</i>	152
<i>Figure 2.38. Expression relative de 8 gènes induits par MYB118 dans les différentes fractions d'une graine sauvage ou myb118-1.</i>	153

Figure 2.39. Test d'activation du gène rapporteur <i>uidA</i> sous contrôle des promoteurs Pro_{ODD} , Pro_{AERF8} et Pro_{PER17} par MYB118 dans des feuilles de tabac.	155
Figure 2.40. Cibles transcriptionnelles directes de LEC2.	157
Figure 2.41. Le phénotype des mutants <i>myb118</i> est-il uniquement dû à l'augmentation de l'expression de LEC2 dans l'albumen ?	158
Figure 2.42. Morphologie des graines des doubles mutants <i>myb118 lec2</i>	159
Figure 2.43. Masse et dimensions des graines des doubles mutants <i>myb118 lec2</i>	159
Figure 2.44. Embryons matures des doubles mutants <i>myb118 lec2</i>	160
Figure 2.45. Développement embryonnaire des doubles mutants <i>myb118 lec2</i>	162
Figure 2.46. Contenu en acides gras de graines sèches de type sauvage, <i>myb118-1</i> , <i>lec2</i> et <i>myb118 lec2</i>	163
Figure 2.47. Représentation schématique de l'accumulation des composés de réserve dans une graine d' <i>Arabidopsis</i> sauvage : rôles de MYB118 et LEC2.	164

Chapitre III

Figure 3.1. Expression relative de MYB115 dans différents organes d'une plante sauvage.	168
Figure 3.2. Cinétique d'accumulation des transcrits de MYB115 dans les graines en développement.	169
Figure 3.3. Cinétique d'accumulation des transcrits de MYB115 dans les différents compartiments de la graine d'une plante sauvage.	170
Figure 3.4. Analyse de l'activité β -glucuronidase (<i>GUS</i>) chez des plantes transgéniques $Pro_{MYB115}::uidA$	171
Figure 3.5. Expression relative de MYB115 dans des graines de mutants des régulateurs maîtres.	173
Figure 3.6. Induction ectopique de MYB115 à l'aide du système $Pro_{35S}::LEC2::\Delta GR$	174
Figure 3.7. Cinétique d'induction de MYB115 à l'aide du système $Pro_{35S}::LEC2::\Delta GR$	175
Figure 3.8. Caractérisation du mutant <i>myb115-1</i> en fond <i>Col-0</i>	176
Figure 3.9. Expression de MYB118 et MYB115 chez <i>myb118-1</i> , <i>myb115-1</i> et <i>myb118 myb115</i>	177
Figure 3.10. Embryons en développement observés à 8, 10 et 12 JAF chez le sauvage, le mutant <i>myb115-1</i> et le double mutant <i>myb118 myb115</i>	178
Figure 3.11. Contenu en acides gras totaux d'une graine sèche chez le sauvage, <i>myb118-1</i> , <i>myb115-1</i> et <i>myb118 myb115</i>	179
Figure 3.12. Composition en acides gras d'une graine sèche chez le sauvage, <i>myb118-1</i> , <i>myb115-1</i> et le double mutant <i>myb118 myb115</i>	180

Chapitre IV

Figure 4.1. Chaîne de transport des électrons utilisés par la Δ^9 -18:0-ACP désaturase à l'obscurité ou au sein de tissus non photosynthétiques.	186
Figure 4.2. Structure de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin (<i>Ricinus communis</i>).	187
Figure 4.3. Site catalytique de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin (<i>Ricinus communis</i>).	188
Figure 4.4. Représentation tridimensionnelle des sites actifs des désaturases de lierre (<i>Hedera helix</i>) et de ricin (<i>Ricinus communis</i>).	189
Figure 4.5. Proposition de mécanismes réactionnels pour la méthane monooxygénase et l'acyl-ACP désaturase.	190
Figure 4.6. Représentation de la poche de fixation du substrat de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin.	190
Figure 4.7. Superposition des structures de la désaturase de lierre et de la désaturase de ricin.	191
Figure 4.8. Distribution dans le génome des SAD et analyse phylogénétique des SAD.	194
Figure 4.9. Patron d'expression des sept gènes SAD d' <i>Arabidopsis</i> dans différents organes d'une plante sauvage.	195
Figure 4.10. Cinétiques d'accumulation des transcrits des sept gènes SAD d' <i>Arabidopsis</i> dans des graines en développement d'une plante sauvage.	196

<i>Figure 4.11. Analyse de l'activité β-glucuronidase (GUS) chez des plantes transgéniques Pro_{SAD1}:uidA, Pro_{SAD2}:uidA, Pro_{SAD3}:uidA, Pro_{SAD4}:uidA, Pro_{SAD5}:uidA, Pro_{SAD6}:uidA et Pro_{FAB2}:uidA.</i>	198
<i>Figure 4.12. Patrons d'expression des sept gènes SAD d'Arabidopsis dans la fraction albumen et dans l'embryon de la graine d'une plante sauvage.</i>	200
<i>Figure 4.13. Analyse de l'activité β-glucuronidase (GUS) dans des graines de plantes transgéniques Pro_{SAD1}:uidA, Pro_{SAD2}:uidA, Pro_{SAD3}:uidA, Pro_{SAD4}:uidA, Pro_{SAD5}:uidA, Pro_{SAD6}:uidA et Pro_{FAB2}:uidA.</i>	201
<i>Figure 4.14. Ratio des acides monoinsaturés en n-7 et en n-9 de feuilles de tabac transfectées avec des vecteurs permettant l'expression transitoire des différents gènes SAD d'Arabidopsis.</i>	204
<i>Figure 4.15. Caractérisation moléculaire de mutants d'insertion pour les sept gènes SAD d'Arabidopsis.</i>	207
<i>Figure 4.16. Doubles mutants sad.</i>	208
<i>Figure 4.17. Résultats préliminaires présentant la composition en acides gras d'une graine sèche chez le sauvage, sad3-1 et sad3-2.</i>	209
<i>Figure 4.18. Tableau de correspondance des résidus entre les différentes SAD d'Arabidopsis et la Δ^9-18:0-ACP désaturase de ricin.</i>	211
<i>Figure 4.19. Modélisation de la structure tridimensionnelle d'un monomère de FAB2, SAD3 et SAD4.</i>	213
<i>Figure 4.20. Représentation schématique de l'origine des différents acides gras de la graine d'Arabidopsis et rôle hypothétique des différentes SAD.</i>	216
<i>Figure 4.21. Expression relative des sept gènes SAD d'Arabidopsis dans divers fonds génétiques</i>	218
<i>Figure 4.22. Expression relative des sept gènes SAD d'Arabidopsis dans les différentes fractions d'une graine sauvage ou myb118-1.</i>	220
<i>Figure 4.23. Activité du promoteur de SAD3 dans des graines sauvage ou myb118-1.</i>	221
<i>Figure 4.24. Analyse de l'interaction de MYB118 et de WRI1 avec les promoteurs de SAD1, SAD2, SAD3, SAD4, SAD5, SAD6 et FAB2 en simple hybride.</i>	223
<i>Figure 4.25. Composition en acides gras d'une graine sèche chez le sauvage (Col-0), et chez les mutants wri1-3 et wri1-4.</i>	224
<i>Figure 4.26. Représentation schématique de la régulation de l'expression des sept gènes SAD dans la graine d'Arabidopsis.</i>	227

Chapitre V

<i>Figure 5.1. Accumulation des transcrits de WB3 dans différents organes d'une plante sauvage.</i>	230
<i>Figure 5.2. Cinétique d'accumulation des transcrits de WB3 dans des graines</i>	230
<i>Figure 5.3. Analyse de l'activité β-glucuronidase (GUS) chez des plantes transgéniques Pro_{WB3.1kb}:uidA</i>	231
<i>Figure 5.4. Expression relative de WB3 dans des graines chez des mutants lec2.</i>	232
<i>Figure 5.5. Comparaison de la séquence du gène WB3 en fond Col-0 et Ws.</i>	233
<i>Figure 5.6. Analyse des transcrits WB3 en fond Ws.</i>	234
<i>Figure 5.7. Prédiction de la structure des protéines WB3 à partir des transcrits en fond Col-0 et Ws.</i>	235
<i>Figure 5.8. Caractérisation des mutants wb3 en fond Col-0.</i>	236
<i>Figure 5.9. Caractérisation du mutant wb3-3 en fond Ws.</i>	237
<i>Figure 5.10. Morphologie des rosettes âgées de deux semaines du sauvage (Ws), du mutant wb3-3 et de huit lignées wb3-3 portant le transgène Pro_{35Sdual}:WB3-A.</i>	238
<i>Figure 5.11. Graines et embryons en développement observés à 8, 10 et 12 JAF chez le sauvage (Col-0) et les deux mutants wb3-1 et wb3-2.</i>	239
<i>Figure 5.12. Contenu et composition en acides gras d'une graine sèche chez le sauvage (Ws) et wb3-3.</i>	240
<i>Figure 5.13. Contenu et composition en acides gras de graines sèches sauvages (Col-0 et Ws), du mutant wb3-3 et de quatre lignées wb3-3 complémentées par le transgène Pro_{35Sdual}:WB3(Col-0)</i>	242

Discussion

<i>Figure 6.1. Développement et évolution des albumens.</i>	<i>250</i>
<i>Figure 6.2. Homologues de MYB118 chez le maïs (Zea mays).....</i>	<i>252</i>
<i>Figure 6.3. Promoteurs de gènes de protéines de réserve : éléments de régulation et facteurs de transcription.</i>	<i>254</i>
<i>Figure 6.4. Contenu en acides gras de graines sèches sauvage, myb118, wri1 et myb118 wri1.</i>	<i>257</i>

Abréviations et symboles

2S	2 Svedberg, napines	
12S	12 Svedberg, cruciférines	
16:0	acide hexadécanoïque	acide palmitique
16:1 n-7	acide <i>cis</i> -9-hexadécanoïque	acide palmitoléique
16:1 n-6	acide <i>cis</i> -6-hexadécanoïque	acide sapiénique
17:0	acide heptadécanoïque	acide margarinique
18:0	acide octadécanoïque	acide stéarique
18:1 n-7	acide <i>cis</i> -9-octadécanoïque	acide <i>cis</i> -vaccénique
18:1 n-9	acide <i>cis</i> -9-octadécanoïque	acide oléique
18:1 n-12	acide <i>cis</i> -6-octadécanoïque	acide pétrosélinique
18:2	acide <i>cis, cis</i> -9,12-octadécadiénoïque	acide linoléique
18:3	acide <i>cis, cis, cis</i> -9, 12, 15-octadécatriénoïque	acide linoléique
20:0	acide eicosanoïque	acide arachidique
20:1 n-7	acide <i>cis</i> -13-eicosanoïque	acide paullinique
20:1 n-9	acide <i>cis</i> -11-eicosanoïque	acide gadoléique
22:0	acide docosanoïque	acide béhénique
22:1	acide <i>cis</i> -13-docosénoïque	acide érucique

A, C, G, T	adénosine, cytosine, guanidine, thymidine
a.a.	acide aminé
ABA	acide abscissique
ABRE	« ABA Responsive Element »
ACP	« acyl carrier protein » (protéine porteuse d'acyl)
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADN-T	acide désoxyribonucléique transféré
AFL	ABI3-FUS3-LEC
Ala	alanine
ARF	« Auxin Response Factor »
ARNm	acide ribonucléique messenger
ADP	adénosine diphosphate
ATP	adénosine triphosphate
BET	bromure d'éthidium
ChIP	« Chromatin ImmunoPrecipitation »
CO ₂	dioxyde de carbone
CoA	coenzyme A
Col-0	Columbia 0
C-ter	C-terminal
DAG	diacylglycérol
DEX	dexaméthasone
dNTP	déoxynucléotides triphosphates

DO	densité optique
fus	fusca
g	gravité
g, mg, ug	gramme, milligramme, microgramme
G3PDH	glycérol-3-phosphate déshydrogénase
GA	acide gibbérellique
GFP	« green fluorescent protein »
Glc, Glc-1-P, Glc-6-P	glucose, glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate
Glu	glutamate
Gln	glutamine
Gly, Gly-3-P	glycérol, glycérol-3-phosphate
GR	« Glucocorticoïde Receptor » (récepteur aux glucocorticoïdes)
GUS	beta-glucuronidase
H, min, s	heure, minute, seconde
H3K27	histone H3, lysine K27
HPT	hygromycine phosphotransférase
HRP	« Horse Radish Peroxidase » (peroxydase de raifort)
JAF	jour après floraison
KAS	kétoacyl-ACP synthase
KCS	kétoacyl-CoA synthase
L, mL, uL	litre, millilitre, microlitre
LB	Luria Bertani
LEA	« Late Embryogenesis Abundant »
lec	« leafy cotyledon »
M, cm, mm, um	mètre, centimètre, millimètre, micromètre
M, mM, uM	molaire, millimolaire, micromolaire
MAC	méristème apical caulinaire
MAR	méristème apical racinaire
MEB	microscope électronique à balayage
MS	Murashige et Skoog
N-ter	N-terminal
PAGE	« polyacrylamide gel electrophoresis »
pb, kb	paire de bases, kilobase
PC	phosphatidylcholine
PCR	« Polymerisation Chain Reaction » (réaction de polymérisation en chaîne)
PRC2	« Polycomb Repressive Complex 2 »
PUFA	« PolyUnsaturated Fatty Acid » (acide gras polyinsaturé)
<i>p</i> -value	valeur <i>p</i> ou <i>p</i> -valeur
PVDF	polyfluorure de vinylidène
RT	« reverse transcription » (transcription inverse)
SAD	stéaroyl-ACP désaturase
SDS	sodium dodécyl-sulfate
TAG	triacylglycérol
U	unité enzymatique commerciale
UV	ultraviolets
V, kV	volt, kilovolt
VLCFA	« Very Long Chain Fatty Acid » (acide gras à très longue chaîne)
Ws	Wassiliewskja

Introduction

I – La graine

La graine est une structure apparue au Permien avec les premiers Gymnospermes Spermaphytes (littéralement, les plantes à graines) et qui a connu son essor avec l'apparition des Angiospermes (littéralement, les plantes à fleurs) au Crétacé (Figure 0.1). Elle constitue une structure de protection permettant à la plante de résister à des conditions défavorables et de coloniser le milieu (<http://www.ucmp.berkeley.edu/IB181/VPL/Dir.html>). Dans la suite de ce chapitre, nous laisserons de côté les Gymnospermes et nous nous intéresserons à la graine des Angiospermes, graine contenue dans un fruit.

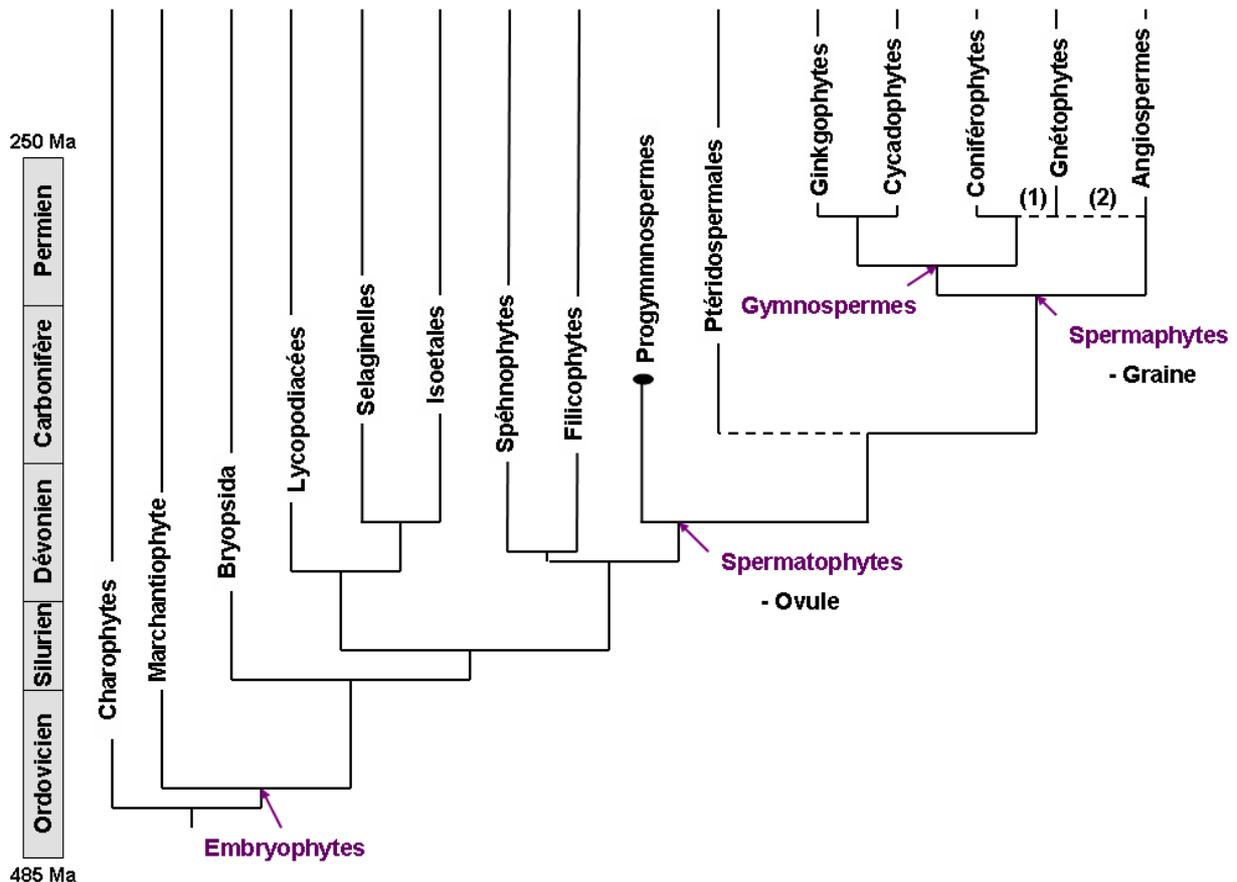


Figure 0.1. Place des plantes à graines au sein de la lignée des Embryophytes.

Les deux hypothèses (1) et (2) concernant la position phylogénétique des Gnétophytes sont représentées. D'après Virtual Paleobotanical Lab de l'Université de Berkeley. (<http://www.ucmp.berkeley.edu/IB181/VPL/Dir.html>)

Introduction

1.1 Structures et types de graine

La graine des Spermatophytes est constituée de trois tissus : l'embryon, l'albumen et les téguments (Figure 0.2). Ces trois structures dérivent du développement d'un ovule ayant été fécondé (Figure 0.3). L'oosphère du sac embryonnaire, fécondée par la première cellule germinative, donne naissance à l'embryon (aussi appelé zygote principal), tandis que la fusion de la seconde cellule germinative avec la cellule centrale donne naissance à l'albumen (encore appelé zygote secondaire ou accessoire). Le nucelle de l'ovule, tissu entourant le sac embryonnaire, dégénère dans la plupart des cas. Chez certaines espèces, il persiste néanmoins ; il est alors à l'origine du péricarpe. Enfin, les téguments de l'ovule sont à l'origine des téguments de la graine. La graine est donc constituée à la fois de tissus d'origine maternelle (téguments et péricarpe s'il est persistant) et de tissus dits zygotiques (embryon et albumen) car issus de la fécondation (Morot-Gaudry et *al.*, 2009).

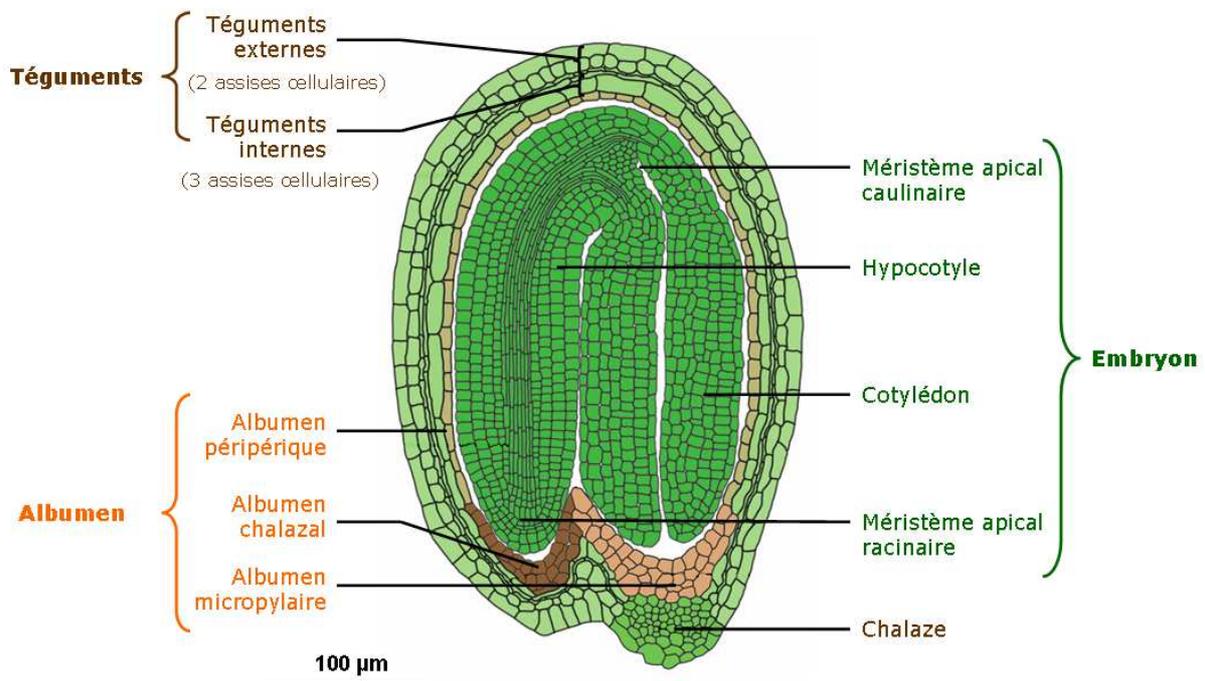


Figure 0.2. Structure d'une graine d'Arabidopsis en fin de développement.
(<http://seedgenenetwork.net>).

Introduction

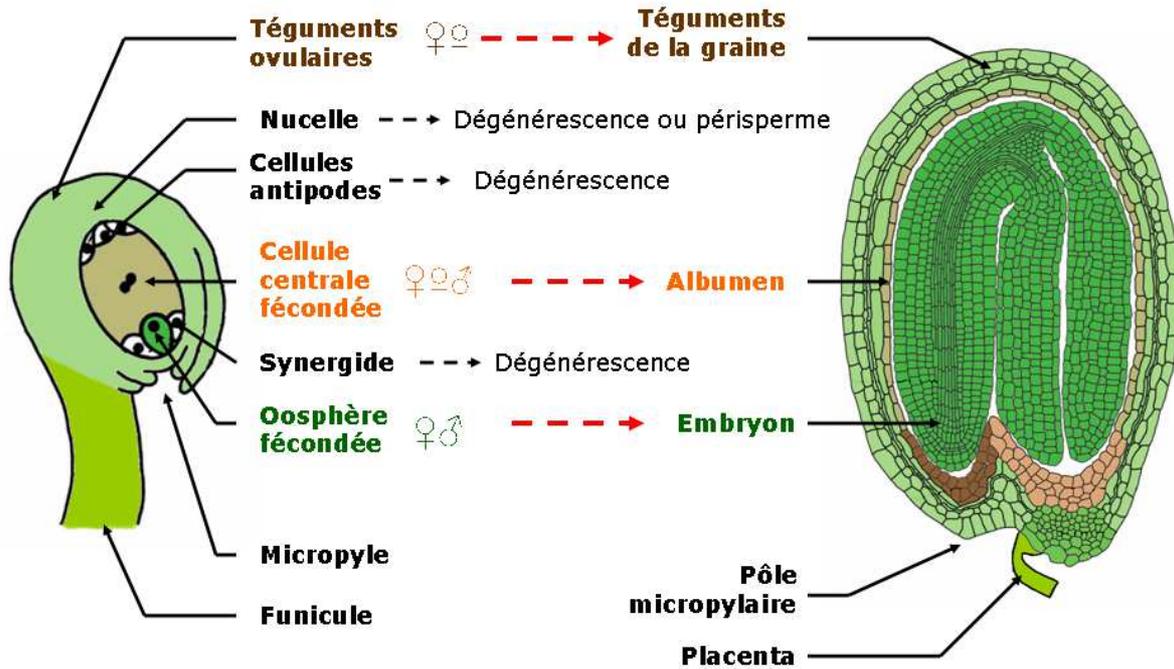


Figure 0.3. Origine des structures constituant une graine d'Arabidopsis.

(Lafon et al., 1996 ; <http://seedgenenetwork.net>)

L'embryon avec son ou ses cotylédon(s), son hypocotyle, son méristème apicale caulinaire (MAC) et son méristème apical racinaire (MAR) donnera naissance à la future plantule lors de la germination (Figure 0.2). Les téguments assurent la protection de ce dernier contre les stress biotiques et abiotiques, sont impliqués dans les processus de dormance et participent à sa dispersion. Enfin, l'albumen est essentiellement un pourvoyeur de nutriments pour l'embryon à la fois au cours du développement de la graine mais aussi lors des premiers stades de la germination, particulièrement pour les graines dites albuminées (Morot-Gaudry et al., 2009).

Selon l'importance relative des différents tissus, trois types de graines peuvent être distingués :

(1) Les graines albuminées, chez lesquelles l'albumen représente une part importante de celles-ci. La graine des Poacées en est un bon exemple. L'embryon réduit possède un seul cotylédon (scutellum), la majeure partie de la graine est occupée par l'albumen (Figure 0.4b). L'albumen peut alors être divisé en plusieurs sous-domaines : (i) la couche à aleurones périphérique riche en protéines et en huile et qui fournira la majorité des enzymes hydrolytiques permettant la remobilisation de l'amidon lors de la germination, (ii) l'albumen central dont les cellules sont remplies d'amidon.

Introduction

(2) Les graines exalbuminées chez lesquelles l'albumen est extrêmement réduit comme chez la graine d'Arabidopsis ou celle du pois (*Pisum sativum*). La majorité des réserves est alors accumulée dans les cotylédons hypertrophiés de l'embryon sous forme de protéines ou d'huile le plus souvent (Figure 0.4c).

(3) Les graines à périsperme, plus rares, chez lesquelles le nucelle persiste et se développe. Il se gorge de réserves (de nature variée) comme chez le poivrier (Figure 0.4a) (Lafon et al., 1996).

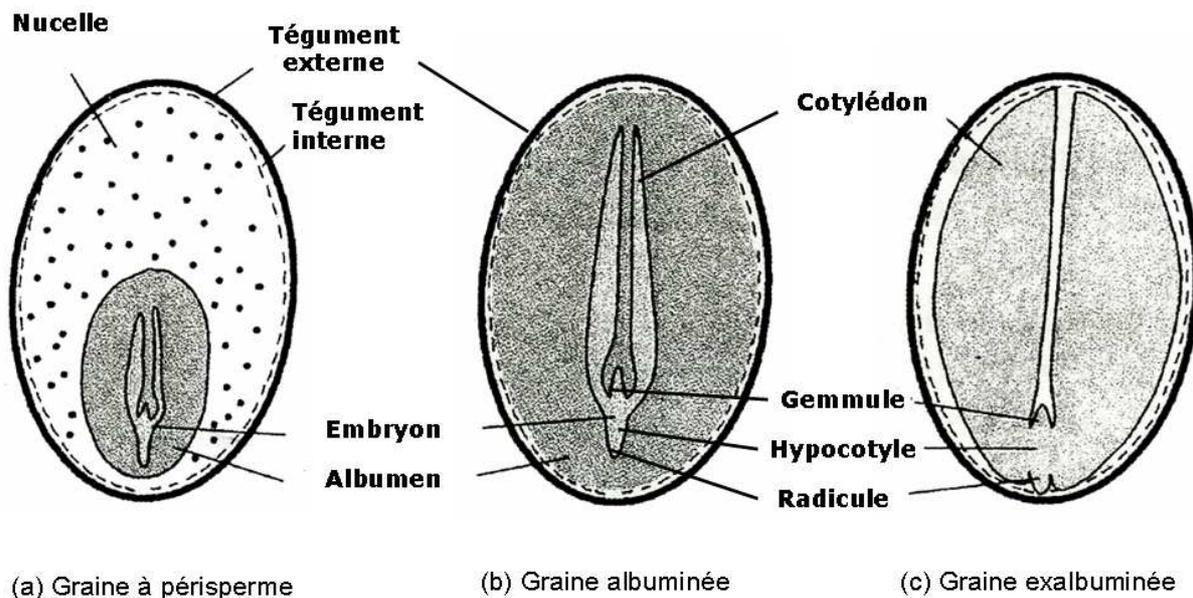


Figure 0.4. Les trois types de graines.

(a) Graine à périsperme. (b) Graine albuminée. (c) Graine exalbuminée (Lafon et al., 1996).

1.2 Importance physiologique et écologique pour la plante

Chez les Spermatophytes, le cycle de reproduction s'est affranchi du milieu aquatique grâce à la double siphonogamie. Comme chez tous les Embryophytes, le cycle de reproduction d'une Angiosperme comprend deux phases : une phase sporophytique et une phase gamétophytique. La phase sporophytique est majoritaire, les gamétophytes étant réduits à quelques cellules (microspores ou grain de pollen pour le mâle et mégaspore ou sac embryonnaire pour la femelle). Le cycle est donc dit digénétique haplo-diplophasique hétéromorphe à diplophase dominante (Figure 0.5).

Introduction

Le gamétophyte femelle, tout comme les zygotes issus de la fécondation, se développe aux dépens de la plante mère et de la structure qui les abrite, l'ovule, *via* le placenta. Il conduit à la formation d'une graine, point de départ d'un nouveau sporophyte (Meyer et *al.*, 2008).

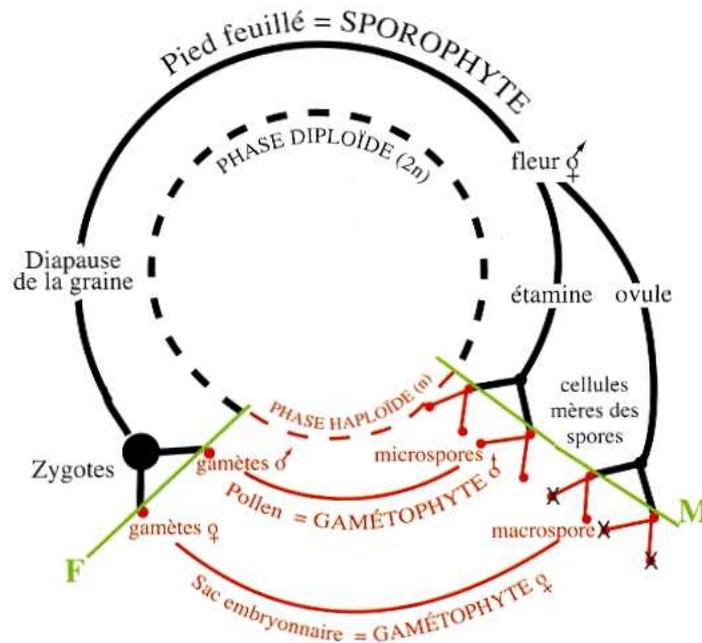


Figure 0.5. Cycle de vie d'une Angiosperme hermaphrodite : cycle digénétique haplo-diplophasique hétéromorphe à diplophase dominante.

Le sporophyte (2n) produit des fleurs hermaphrodites. Les étamines renferment les microspores ou grains de pollen ou gamétophyte mâle (n). L'ovaire est l'organe femelle qui contient des ovules. Ces ovules renferment les macrospores ou sac embryonnaire ou gamétophyte femelle (n). Gamétophytes mâles et femelles sont issus de cellules mères des spores (2n) par un processus nommé méiose. Gamètes mâles et femelles s'unissent lors de la fécondation pour former deux zygotes : l'un principal, l'embryon et l'autre accessoire, l'albumen ; c'est la double fécondation. Ces deux zygotes se développent au sein de l'ovule pour former la graine, qui, en germant donnera un nouveau sporophyte (Meyer et *al.*, 2008).

La dissémination de l'espèce s'effectue essentiellement par la graine ainsi formée. Les Angiospermes étant fixés par leur appareil racinaire, le rôle de cette étape de reproduction est donc fondamental pour la dissémination spatiale de l'espèce. La graine est une structure pluricellulaire adaptée à la dissémination :

(i) Ses téguments peuvent présenter différentes excroissances facilitant sa dissémination : des poils (coton, épilobe) ou des ailettes (lunaire) pour faciliter une dissémination anémochore, un arille au niveau du hile (violette), encore appelé élaïosome, appendice oléagineux qui sert de nourriture aux fourmis et permet une dissémination par myrmécochorie. Cependant, certaines

Introduction

graines ne sont pas directement libérées dans le milieu mais protégées au sein d'un fruit issu du développement de l'ovaire. C'est alors le fruit tout entier qui est disséminé, renfermant en son sein une ou des graines.

(ii) Au cours de son développement, elle accumule des réserves qui lui seront essentielles pour débiter sa vie de manière autonome en attendant de devenir autotrophe. En effet, la quasi totalité des réserves accumulées dans les cotylédons de l'embryon ou dans l'albumen sont remobilisées lors de la germination pour permettre dans un premier temps la protrusion de la radicule et sa croissance puis l'émergence du ou des cotylédons ou des premières feuilles photosynthétiques pour assurer à la fois la nutrition hydrominérale et organique.

(iii) Enfin, au cours de sa maturation, la graine acquiert la capacité à se dessécher et entre en dormance. Elle pourra ainsi affronter des conditions environnementales défavorables (températures très basses, sécheresse) pendant de longues années, son métabolisme étant extrêmement réduit. Elle constitue un stade diapausant qui pourra être levé lorsque les conditions idéales seront réunies pour sa germination (Meyer et *al.*, 2008).

1.3 Importance socio-économique pour l'homme

Les graines constituent un maillon essentiel de l'agriculture en temps que semence. Grâce à leur longévité, certaines peuvent être conservées plusieurs dizaines d'années dans des conditions adaptées. Elles renferment une grande diversité génétique permettant une production continue de nouvelles variétés et assurant la conservation de cette diversité génétique à long terme. Les semences représentent un enjeu stratégique mondial tant sur le plan de la conservation de la diversité génétique que sur le plan de l'amélioration variétale. La France détient une place de choix dans ce domaine en tant que premier producteur de semences et graines en Europe et troisième exportateur mondial (<http://reseau-graines.org/>).

De plus, les graines des espèces cultivées constituent la principale réserve alimentaire mondiale pouvant être stockée sur le long terme. Elles présentent un taux de matière sèche élevé par rapport aux autres organes végétaux et une certaine facilité à être transportées, stockées et conservées. Il existe trois grandes catégories de graines cultivées, chacune présentant des propriétés particulières : les graines de céréales (blé, maïs, riz, sorgho, mil,...), les graines de

Introduction

légumineuses (haricot, pois, lentille, fève,...) et les graines d'oléagineux (soja, tournesol, colza,...). Les premières sont très riches en amidon et renferment une petite proportion de protéines, les secondes contiennent à proportions égales de l'huile et des protéines, tout comme les dernières. L'association d'une céréale et d'une légumineuse fut la base de l'alimentation de nombreuses sociétés, que ce soit le blé et les lentilles en Mésopotamie ou le maïs et les haricots en Amérique centrale. Les espèces oléagineuses sont cultivées pour en extraire de l'huile (colza et tournesol) et/ou pour nourrir le bétail (soja, tourteau de colza) étant donné leur teneur élevée en protéines.

Cependant, en plus de leurs qualités nutritionnelles pour l'alimentation humaine et animale, les graines, sources de matières premières diverses (amidon, lipides, protéines, fibres) peuvent fournir la matière première pour des applications industrielles très diversifiées : pour la production de biocarburants (éthanol à partir d'amidon, biodiesel à partir d'huiles), pour la production de matériaux (pseudo-plastique à base d'amidon ou d'huile), de détergents ou de biolubrifiants (Dyer et *al.*, 2008 ; Tatsinkou Fossi et *al.*, 2009).

Dans la suite de l'introduction, nous nous concentrerons sur le développement de la graine d'*Arabidopsis*, plante modèle appartenant à la famille des Brassicacées. Après fécondation, le développement de la graine peut être divisé en deux grandes étapes. (i) L'embryogenèse (ou morphogenèse précoce), qui débute juste après la fécondation et qui dure environ une semaine, est marquée par le développement des zygotes. (ii) La maturation, qui fait suite à l'embryogenèse, est d'abord marquée par l'arrêt de la croissance et l'accumulation de réserves (protéiques et lipidiques) (Morot-Gaudry et *al.*, 2009). Mais c'est aussi plus tardivement au cours de cette phase que la graine devient tolérante à la dessiccation et entre progressivement en dormance, attendant des conditions favorables à sa germination (Angelovici et *al.*, 2010).

II – La première étape du développement de la graine chez *Arabidopsis* : l'embryogenèse ou morphogenèse précoce

La première étape du développement embryonnaire, nommée embryogenèse ou morphogenèse précoce, débute avec la double fécondation et s'achève lorsque l'embryon atteint le stade cœur. Cette première phase de développement dure environ six à huit jours chez *Arabidopsis* et permet la mise en place des axes de polarité embryonnaire au moment où la graine est l'objet d'une croissance rapide.

2.1 De la formation de l'ovule à la fécondation

2.1.1 L'ovule

L'ovule se développe par divisions périclinales puis anticlinales successives à partir des couches épidermiques du placenta (Gasser et *al.*, 1998 ; Jenik et Irish, 2000). Il prend d'abord l'aspect d'une protrusion parfaitement symétrique puis des axes de polarité proximo-distale et adaxiale-abaxiale se mettent en place (Schneitz et *al.*, 1995 ; Lepiniec et *al.*, 2005) (Figure 0.6).

Trois domaines se dessinent selon l'axe proximo-distal (Figures 0.3 et 0.6) : le funicule, la chalaze et le nucelle. Le funicule lie l'ovule (et la future graine) au placenta et assure sa nutrition *via* des faisceaux vasculaires. La chalaze donne vie aux deux couches tégumentaires (internes et externes) qui protégeront l'ovule. A l'extrémité distale, le nucelle est à l'origine de la cellule mère du gamétophyte femelle encore appelée mégaspore ou sac embryonnaire (Figure 0.6).

Au cours du développement du gamétophyte femelle, la mégaspore subit trois mitoses successives sans cellularisation pour donner une structure à huit noyaux. A maturité, après cellularisation, le sac embryonnaire haploïde comprend sept cellules (Figure 0.3) : l'oosphère qui donnera après fécondation le zygote principal, deux synergides, trois cellules antipodes et la cellule centrale binucléée (Drews et *al.*, 1998 ; Grossniklaus et Schneitz, 1998 ; Drews et Yadegari, 2002).

Au cours du développement de l'ovule, un second axe se met en place : l'axe adaxial-abaxial. En effet, les téguments croissent plus rapidement du côté abaxial que du côté adaxial, l'ovule se retourne en position campylotrope, le micropyle est alors antiparallèle à l'axe chalaze-funicule et le sac embryonnaire perpendiculaire à ces derniers (Robinson-Beers et *al.*, 1992) (Figure 0.6).

Introduction

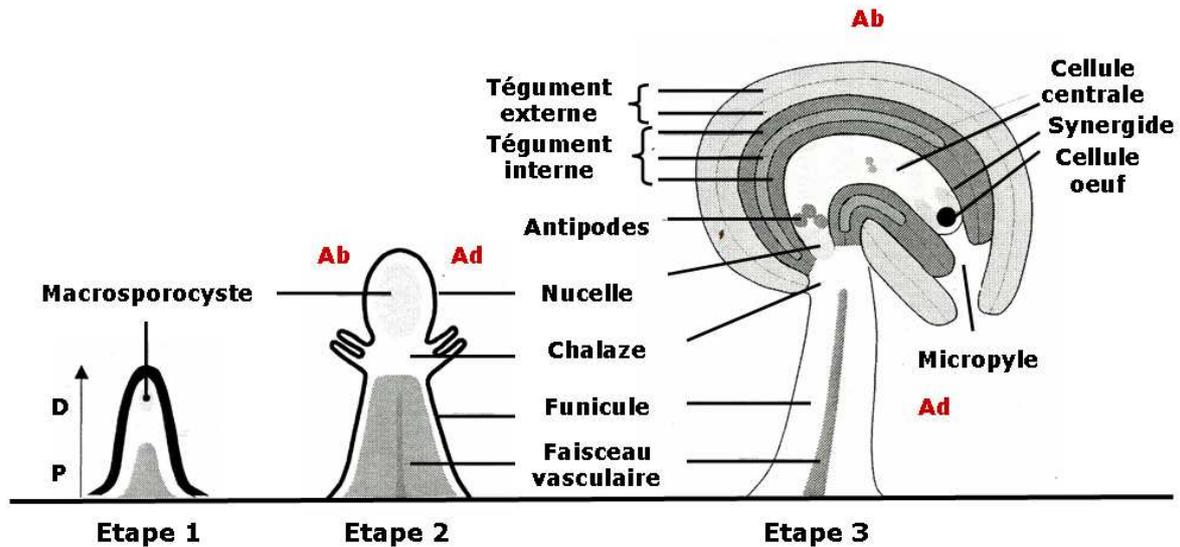


Figure 0.6. Développement de l'ovule d'Arabidopsis.

Etape 1 : le primordia croît le long de l'axe proximo-distal (P-D). Au pôle distal, le nucelle donne naissance au macrosporocyste, la cellule mère qui donnera le sac embryonnaire. Etape 2 : dans la région chalazale, l'épiderme donne naissance aux deux téguments, le tégument interne et le tégument externe. Le second axe du primordia (abaxial-adaxial) perpendiculaire à l'axe proximo-distal se met en place. Etape 3 : à maturité, le sac embryonnaire comprend sept cellules (la cellule-œuf, deux synergides, la cellule centrale, les trois cellules antipodes). Les téguments croissent intensément du côté abaxial et plus modérément du côté adaxial. Cette croissance asymétrique donne à l'ovule sa conformation campylotrope avec un micropyle adjacent au funicule. Ab, abaxial ; Ad, adaxial (Lepiniec et al., 2005).

2.1.2 La double fécondation

La fécondation chez les Angiospermes résulte de la rencontre entre un gamétophyte femelle et un gamétophyte mâle. Le grain de pollen (gamétophyte mâle) germe sur le stigmate de la fleur et le tube pollinique croît à l'intérieur du pistil en direction d'un ovule. Il pénètre à l'intérieur du sac embryonnaire *via* l'appareil filiforme d'une des synergides qui dégénère et libère deux cellules spermatiques haploïdes (Hamamura et al., 2011). Après une phase d'immobilité de quelques minutes, l'une fusionnera avec l'oopshère elle aussi haploïde pour donner le zygote principal diploïde. La seconde fusionnera avec la cellule centrale binucléée pour donner le zygote secondaire triploïde (Figure 0.7). Chez Arabidopsis, les gamétophytes mâle et femelle dérivant tous deux d'une seule cellule mère, les deux paires de noyaux participant à la double fécondation sont génétiquement identiques. Cependant, il faut noter que le zygote secondaire triploïde possède deux copies du génome maternel et une seule copie du génome paternel (Russell, 1993).

Introduction

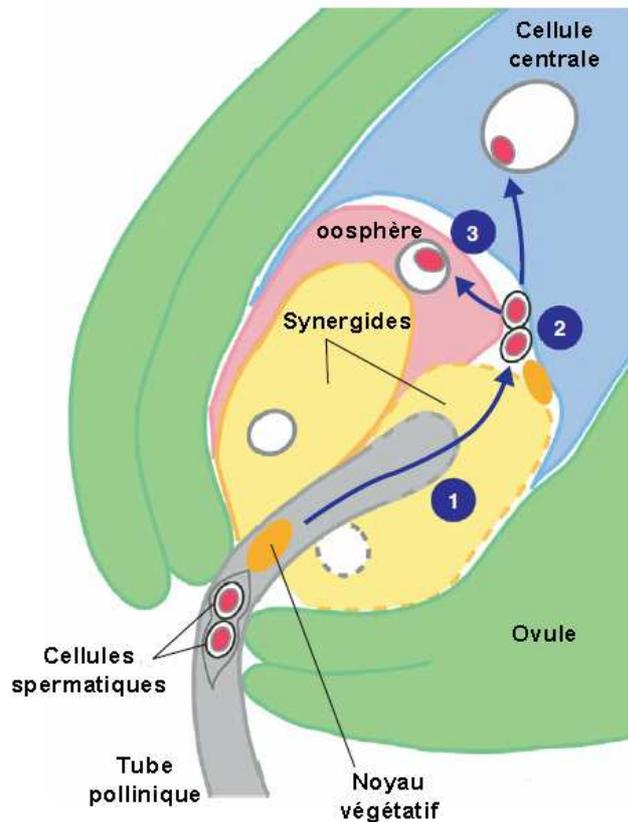


Figure 0.7. Représentation schématique du devenir des cellules spermatiques lors de la double fécondation.

Étape 1 : les cellules sont rapidement libérées du tube pollinique dans le gamétophyte femelle *via* une synergide qui dégénère. Étape 2 : les cellules spermatiques restent immobiles quelques minutes à la limite entre l'oosphère et la cellule centrale. Étape 3 : fécondation proprement dite des cellules spermatiques avec la cellule centrale ou l'oosphère. Leurs noyaux respectifs se dirigent alors vers les noyaux femelles (Hamamura et al., 2011).

De nombreux gènes maternels contrôlent le développement de l'ovule puis de la graine. Ainsi, une mutation dans le gène *SHORT INTEGUMENT (SIN1)* affecte le développement de l'ovule et la mise en place de l'axe embryonnaire (Ray et al., 1996).

De nombreux cribles ont été menés pour identifier des mutants de fécondation chez *Arabidopsis*. Parmi eux, les mutants *fis* (*fertilization independent seed*) nommés *mea* (*medea*), *fis2* (*fertilization independent seed2*) et *fie* (*fertilization independent endosperm*) voient l'ovule se transformer en graine sans qu'il y ait eu fécondation (Ohad et al., 1996 ; Grossniklaus et al., 1998 ; Luo et al., 1999 ; Ohad et al., 1999 ; Luo et al., 2000 ; Faure, 2001). Le rôle de ces trois gènes sera développé dans le paragraphe 2.4.2.

2.2 Les téguments

Les téguments (ou testa) protègent l'embryon contre différents stress et ont un impact sur la dormance et la germination des graines. Les téguments externes sont constitués de deux couches cellulaires alors que les téguments internes sont constitués de trois couches cellulaires (Figure 0.8a).

Introduction

2.2.1 Développement des différentes assises

Les téguments de la graine dérivent des téguments de l'ovule, ce sont donc des tissus maternels. Pendant les quelques jours qui suivent la fécondation, les cinq couches cellulaires composant le tégument sont le siège d'une croissance intense. La couche la plus interne du tégument interne, appelée endothélium, synthétise des tanins qui s'accumulent dans la vacuole centrale pendant la première semaine après fécondation puis s'oxydent, conférant à la graine sa couleur brune (Figure 0.8). La paroi cellulaire des cellules de l'endothélium faisant face à l'albumen est bordée par une structure riche en composés lipidiques appelée cuticule (Debeaujon et *al.*, 2007) (Figure 0.8b). Les deux autres couches cellulaires du tégument interne ne se différencient pas et adhèrent fortement entre elles. Les deux couches cellulaires du tégument externe (couche épidermique et sous-épidermique) accumulent de l'amidon pendant la phase de croissance de la graine (Figure 0.8). Puis la couche sous-épidermique produit une paroi épaisse sur sa face interne. Enfin, la couche épidermique synthétise et sécrète une grande quantité de mucilage dans l'apoplasme (Haughn et Chaudhury, 2005). Le mucilage riche en pectines est produit à partir de l'amidon stocké pendant les premières étapes de développement et dégradé par des α -amylases. Au cours de la sécrétion de mucilage, la vacuole des cellules épidermiques se contracte, laissant apparaître une colonne de cytoplasme au centre de la cellule entourée d'un espace apoplastique rempli de mucilage (Figure 0.8b).

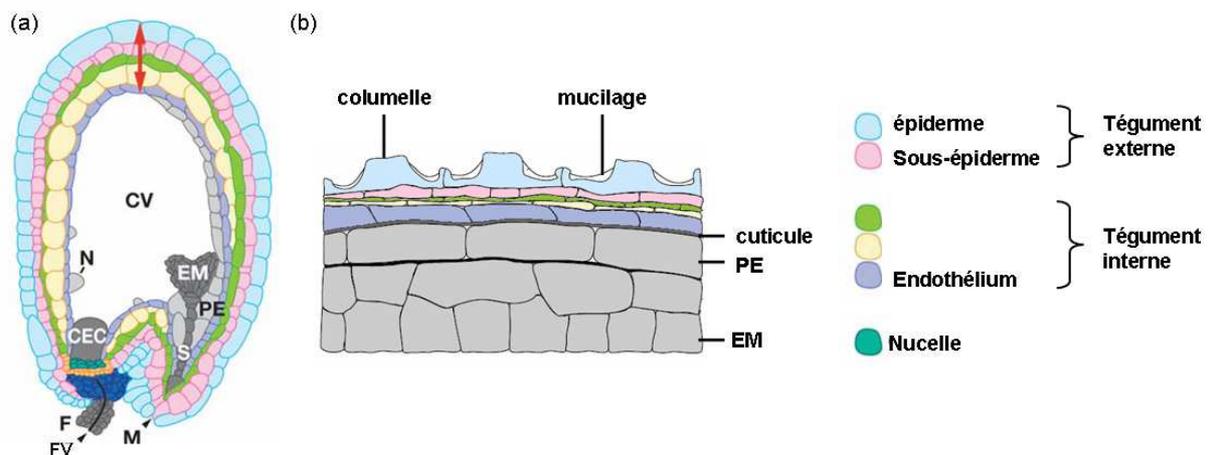


Figure 0.8. Structure de la testa d'Arabidopsis.

(a) Anatomie de la graine d'Arabidopsis au stade cœur en section longitudinale. (b) Section transversale d'une testa mature. C, Chalaze ; CEC, albumen chalazal ; CV, vacuole centrale ; EM, embryon ; F, funicule ; FV, faisceau vasculaire ; M, micropyle ; N, nodule d'albumen ; PE, albumen périphérique ; S, suspenseur (Debeaujon et *al.*, 2003 ; Lepiniec et *al.*, 2006 ; Debeaujon et *al.*, 2007).

Introduction

Au cours des stades ultérieurs du développement de la graine, l'ensemble des cellules des téguments meurt par mort cellulaire programmée. Seule la structure des cellules épidermiques est préservée par le mucilage et la columelle. Les autres couches cellulaires adhèrent fortement entre elles (Haughn et Chaudhury, 2005). Le mécanisme précis par lequel les différentes couches cellulaires de la testa meurent n'est pas établi. Néanmoins, Nakaune et collaborateurs (2005) ont montré une certaine corrélation entre la présence de VPE (VACUOLAR PROCESSING ENZYME), une cystéine protéinase avec une activité proche des caspases, et la mort cellulaire programmée dans ces assises cellulaires.

En 1994, Léon-Kloosterziel et collaborateurs (1994) isolent un mutant dont la graine présente une forme de coeur. Ils démontrent alors que les téguments de ce mutant qu'ils nomment *aberrant testa shape (ats)*, ne sont constitués que de trois couches cellulaires au lieu de cinq. *ATS*, encore appelé *KAN4 (KANADI4)*, est nécessaire pour maintenir la frontière entre les deux téguments de l'ovule et favoriserait aussi le développement des téguments internes (McAbee et al., 2006). Quelques années plus tard, des tests d'interaction en double hybride montrent que ETTIN (ETT, encore appelé AUXIN RESPONSE FACTOR 3) est capable d'interagir physiquement avec *ATS* (Kelley et al., 2012).

2.2.2 Mucilage, flavonoïdes et cutine

Le mucilage, les flavonoïdes et la cutine sont trois classes de composés conférant à la testa ses caractéristiques physiologiques.

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires dérivant de la voie des phénylpropanoïdes. Les téguments en contiennent deux types : les tannins et les flavonols. Ils assurent la longévité de la graine en la protégeant des pathogènes et de l'herbivorie et participent à la dormance tégumentaire (Winkel-Shirley, 2001). La voie de biosynthèse des flavonoïdes dans la graine a été bien caractérisée par l'étude de mutants *transparent testa (tt)* affectés dans la coloration de la testa (Lepiniec et al., 2006). Les gènes codant les enzymes de la partie amont de la voie de biosynthèse des flavonoïdes sont régulés par trois facteurs R2R3-MYB appelé MYB11, MYB12 et MYB111, alors que les gènes codant les enzymes de la partie aval de la voie de biosynthèse (conduisant aux tannins) sont régulés par un complexe TT8(bHLH)/TT2(R2R3-MYB)/TTG1 (Protéine WDR) (Baudry et al., 2004) (Figure 0.9).

Introduction

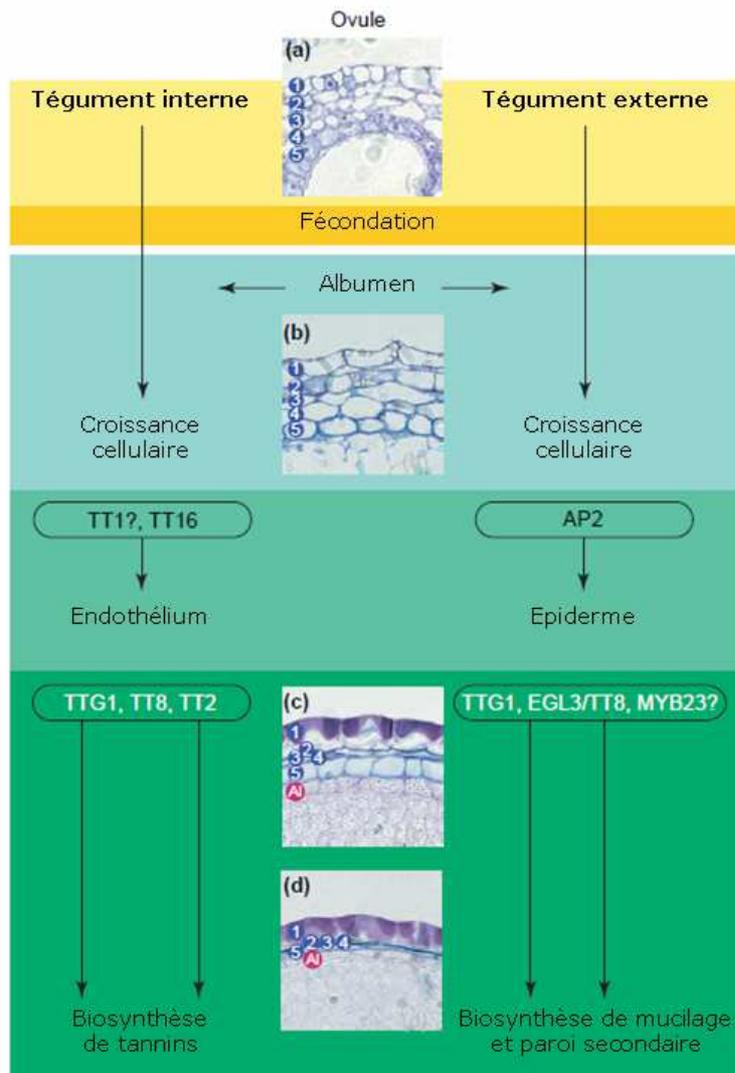


Figure 0.9. La différenciation de la testa.

La différenciation de la testa est contrôlée par une série d'étapes régulatrices commençant avec la fécondation de l'ovule (a). Puis le développement de l'albumen influence le développement des téguments (b) et des cascades de régulation spécifient certaines couches (c et d). Les chiffres 1 à 5 dans les figures (a) à (d) indiquent les différentes assises cellulaires du tégument. AP2, APETALA2 ; TT1, TRANSPARENT TESTA 1 ; TT2, TRANSPARENT TESTA 2 ; TT8, TRANSPARENT TESTA 8 ; TT16, TRANSPARENT TESTA 16 ; TTG1, TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 (Haughn et Chaudhury, 2005).

Le mucilage de la graine est essentiellement composé de pectines, des polysaccharides hydrophiles. Après extrusion, il s'organise en deux couches chimiquement et structuralement différentes : l'une, interne, adhérente et riche en rhamnogalacturonanes, homogalacturonanes et galactanes et l'autre, externe, hydrosoluble et riche en rhamnogalacturonanes (Macquet et *al.*, 2007). Ce mucilage faciliterait la germination et assurerait la protection de la graine contre des produits chimiques toxiques. Un complexe formé de trois protéines, TTG1, MYB5 et EGL3 ou TT8, régule la différenciation des cellules de l'épiderme à l'origine du mucilage (Figure 0.9) (Haughn et Chaudhury, 2005).

Enfin, la cutine et la subérine, deux esters d'acides gras, assurent l'imperméabilité de la paroi externe de l'assise épidermique avant extrusion du mucilage (Pollard et *al.*, 2008).

Introduction

2.3 L'embryon et son développement

Le développement de l'embryon depuis la fécondation de l'oosphère jusqu'à la fin de l'embryogenèse est marqué par une intense activité de division et de différenciation cellulaire.

2.3.1 La mise en place d'un axe apico-basal

2.3.1.1 Les premiers stades de développement

La première étape du développement du zygote principal, autrement dit de l'embryon, est une division asymétrique de la cellule-œuf issue de la double fécondation (Capron et *al.*, 2009) (Figure 0.10a). La cellule apicale ainsi formée est le siège de deux divisions verticales suivies de deux divisions horizontales aboutissant au stade octant (huit cellules). La cellule basale, quant à elle, se divisera successivement pour former une file de 7 à 9 cellules : le suspenseur (Figure 0.10b). L'embryon mature dérive donc de la cellule apicale, exception faite du centre quiescent et des cellules initiales de la coiffe racinaire (columelle) du méristème apical racinaire qui dérivent pour partie de l'hypophyse (Figures 0.10a à e) (Scheres et *al.*, 1994).

A la fin du stade octant, une série de divisions tangentielles séparent une couche externe formée de huit cellules (le protoderme) d'une masse interne composée également de huit cellules (Figure 0.10c) : c'est le stade dermatogène. Les cellules de la masse interne se divisent alors selon un axe apico-basal donnant naissance à deux groupes de cellules : les cellules de la moitié supérieure et celles de la moitié inférieure. A ce stade, l'embryon possède un axe de symétrie apico-basal. Immédiatement après, les cellules de la moitié inférieure se divisent asymétriquement donnant de petites cellules et initiant la formation d'un système vasculaire central (Figures 0.10d à f). Les cellules de la moitié supérieure semblent quant à elles ne pas obéir à un patron de division aussi strict et seront à l'origine des cotylédons.

En parallèle, les cellules basales du suspenseur grossissent fortement et entrent en contact avec les tissus maternels, ce qui facilite les échanges et font du suspenseur un pourvoyeur de nutriments pour l'embryon durant les phases précoces de son développement (Kim et Zambryski, 2005).

Introduction

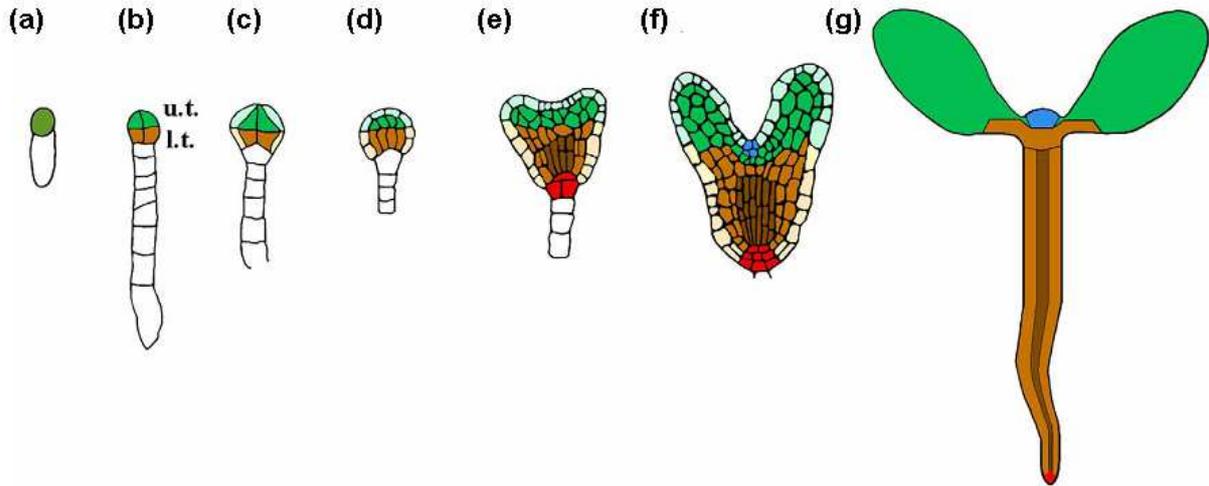


Figure 0.10. Origine embryonnaire des structures de la plantule.

La symétrie radiale est figurée en dégradés de couleurs : les tissus vasculaires en marron foncé, les tissus de remplissages en vert et marron clair et l'épiderme en pastel. Le long de l'axe apico-basal, la moitié supérieure et les cellules qui en dérivent sont représentées en vert alors que la moitié inférieure est représentée en marron. L'hypophyse et ses descendants sont représentés en rouge. (a) Stade deux cellules : une petite cellule apicale et une grosse cellule vacuolaire basale. (b) Stade octant : quatre cellules composent la moitié supérieure (u.t.) et les quatre autres la moitié inférieure (l.t.) (c) Stade dermatogène : une division tangentielle de chacune des huit cellules du stade octant donne les cellules internes et les cellules du protoderme (futur épiderme). (d) Stade globulaire : les divisions des cellules internes orientées selon l'axe apico-basal forment l'axe embryonnaire. (e) Stade cœur : les cellules de la moitié supérieure ont généré deux primordia de cotylédons ébauchant une symétrie bilatérale alors que les cellules de la moitié inférieure s'organisent en une symétrie radiale (comprenant un épiderme, des tissus de remplissage et des tissus vasculaires). A ce stade, l'hypophyse s'individualise du reste du suspenseur et se divise. (f) Stade torpille : les cotylédons et l'hypocotyle croissent. (g) Plantule (Capron et *al.*, 2009).

2.3.1.2 La régulation de la mise en place de l'axe apico-basal

La mise en place de cet axe chez *Arabidopsis* est contrôlé par deux acteurs principaux, des facteurs de transcription et une hormone : l'auxine.

Les gènes *WOX* (*WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN*) spécifient les différentes régions de l'axe apico-basal au cours de l'embryogenèse. Ainsi, après la division asymétrique de la cellule-oeuf, *WOX2* est exprimé dans la cellule apicale et *WOX8* et *WOX9* sont exprimés spécifiquement dans la cellule basale (Figure 0.11a à c). Par la suite, *WOX2* marquera les cellules de la moitié supérieure, *WOX9* les cellules de la moitié inférieure et de l'hypophyse, *WOX8* les cellules du suspenseur et également de l'hypophyse (Haecker et *al.*, 2004) (Figure 0.11d et e).

Introduction

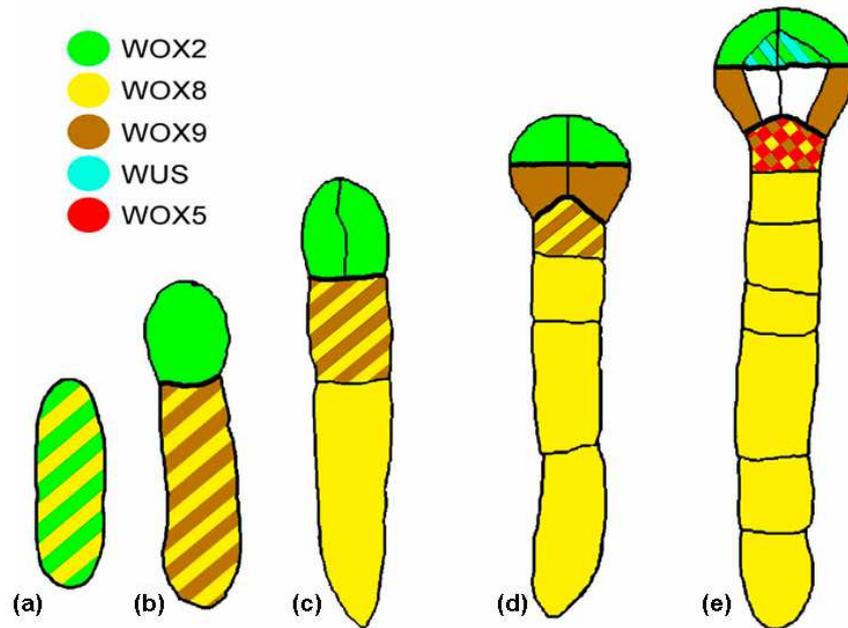


Figure 0.11. Domaines d'expression des gènes *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX (WOX)* selon l'axe apico-basal au cours des premiers stades de l'embryogenèse.

(a) Le zygote exprime *WOX2* (vert) et *WOX8* (jaune). (b) A l'issue de la première division, *WOX2* marquera la cellule fille apicale et *WOX8* la cellule fille basale. *WOX9* est alors exprimé à ce stade dans la cellule basale. (c) Après division de la cellule basale, l'expression de *WOX9* est restreinte à la cellule la plus apicale alors que *WOX8* est exprimé dans les deux cellules filles. (d) Au stade octant, la moitié supérieure de l'embryon est marquée par l'expression de *WOX2* et la moitié inférieure par l'expression de *WOX9*. *WOX8* et *WOX9* sont exprimés dans l'hypophyse. (e) Au stade dermatogène, l'expression de *WOX9* diminue dans l'embryon excepté dans les cellules du protoderme inférieur. Simultanément, l'expression de *WUSCHEL (WUS)* est initiée dans les cellules centrales de la moitié supérieure et *WOX5* s'exprime dans l'hypophyse (Capron et al., 2009).

Cependant, les gènes *WOX* ne sont pas les seuls responsables de la mise en place de cette polarité, l'auxine joue aussi un rôle crucial. L'étude de nombreux mutants comme le mutant *embryo defective30/gnom (emb30/gn)*, chez qui l'embryon ressemble à une balle au sein de laquelle les cellules différenciées sont positionnées de manière aléatoire, a permis de comprendre le rôle de cette hormone dans le développement embryonnaire. *EMB30/GN* code une protéine de type ARF GEF (Adenosyl Ribosylation Factor Guanine nucleotide Exchange Factor) qui contrôle le trafic vésiculaire et en particulier la position de nombreux transporteurs d'auxine membranaires (Steinmann et al., 1999). Les données actuelles semblent indiquer que le rôle de l'auxine dans la mise en place de la polarité apico-basale serait lié à son transport polarisé.

Introduction

A la fin du stade globulaire, quand le nombre de cellules approche de la centaine, l'embryon adopte une forme de triangle aussi appelée « stade cœur » (Figure 0.10e). A ce stade, les ébauches des organes du futur embryon sont discernables : cotylédons et méristème apical caulinaire (MAC), hypocotyle et racine primaire associée au méristème racinaire. Chacune de ces régions va alors évoluer de manière autonome (Figure 0.10f).

2.3.2 La mise en place des méristèmes

2.3.2.1 Le méristème apical caulinaire (MAC)

La mise en place du MAC débute dès le stade globulaire et résulte d'une balance finement régulée entre un pool de cellules souches et un pool de cellules différenciées. Le gène *WUSCHEL* (*WUS*), un régulateur positif du MAC est exprimé dès le stade 16 cellules (stade globulaire) dans 4 cellules apicales sous-épidermiques de la partie supérieure de l'embryon et maintient l'identité des cellules souches (Mayer et *al.*, 1998) (Figure 0.12). Son expression est progressivement restreinte à la région centrale et interne du méristème avec la mise en place d'une boucle de régulation négative impliquant les gènes *CLAVATA* (*CLAVATA1*, *CLAVATA2* et *CLAVATA3*).

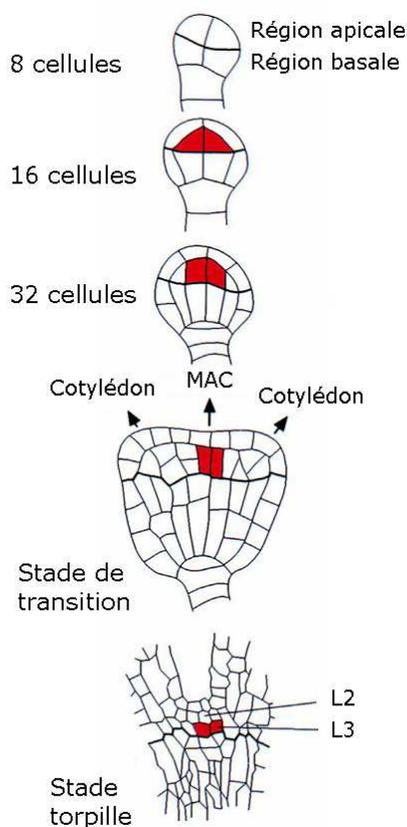


Figure 0.12. Expression embryonnaire de *WUSCHEL* (*WUS*).

Les premiers transcrits de *WUS* sont détectés au stade dermatogène (16 cellules). Les cellules présentant les transcrits de *WUS* sont représentées en rouge. Initialement, *WUS* est exprimé dans les cellules sous-épidermiques puis son expression est progressivement restreinte aux cellules centrales (stade 32 cellules et triangle) puis aux assises profondes (L3 du stade torpille) du méristème apical caulinaire (MAC) en formation (Capron et *al.*, 2009).

Introduction

L'expression des gènes *CUP-SHAPED COTYLEDONS* (*CUC*), *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) et *ASYMMETRIC LEAVES* (*AS*), qui définissent un second réseau de gènes clés du fonctionnement du MAC, est initiée plus tardivement, à la fin du stade globulaire. Les gènes *CUC* régulent positivement l'expression de *STM* dans le domaine central du MAC, et, par un jeu de rétrocontrôle négatif, *STM* inhibe l'expression des gènes *CUC*, permettant la formation d'un anneau correspondant à la zone d'expression des gènes *CUC* autour du MAC en formation (Figure 0.13). Il y a création d'une frontière entre les deux cotylédons et le domaine central du MAC (Aida et al., 1997 ; Aida et al., 1999).

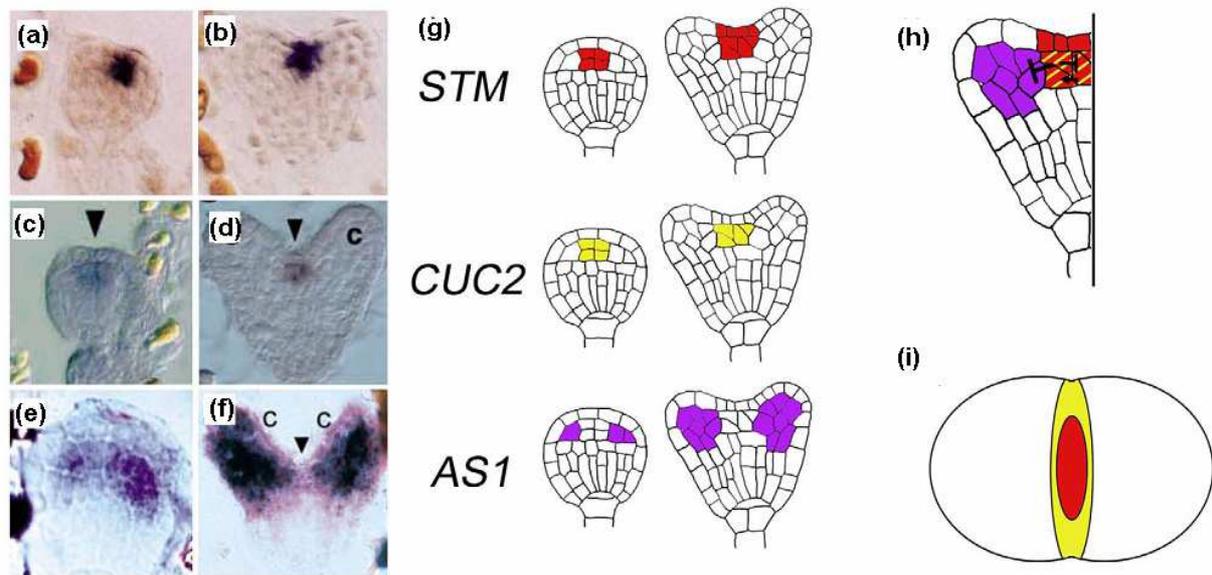


Figure 0.13. Développement du méristème apical caulinaire et réseau de régulation.

(a-f) Hybridation *in situ* de *STM* (a,b), *CUC2* (c,d) et *AS1* (e,f) au stade globulaire (a,c,e) et au stade cœur (b,d,f). Les flèches en (c) et (d) indiquent le protoderme où *CUC2* est absent. La petite flèche de (f) indique les initiales du MAC. (g) Représentation schématique des domaines d'expression présentés en (a-f). (h) Modèle d'interaction entre *STM*, *CUC* et *AS*. Les domaines d'expression de *STM* et *CUC2* (mais aussi des autres *CUC*) sont largement superposés au stade globulaire. Les gènes *CUC* induisent l'expression de *STM* (a, c) et en retour *STM* régule négativement l'expression des *CUC* (b, d). L'activité de *STM* serait responsable de la mise en place et du maintien du MAC. Cette relation antagoniste entre *STM* et *CUC* aboutit à la formation d'un anneau de cellules dans lesquelles *CUC* est exprimé entourant un domaine central gouverné par *STM* et constituant le MAC au stade torpille. (i) Représentation schématique d'une coupe transversale à travers l'apex d'un embryon au stade torpille âgée montrant un domaine central d'expression de *STM* entouré par un domaine gouverné par *CUC2*. MAC, méristème apical caulinaire (Capron et al., 2009).

Enfin, les gènes *AS* exprimés dans les primordia d'organes et les cotylédons répriment *STM* dans ces tissus. *STM* maintiendrait les cellules dans un état indifférencié et serait en ce sens responsable de l'identité du MAC (Byrne et al., 2002).

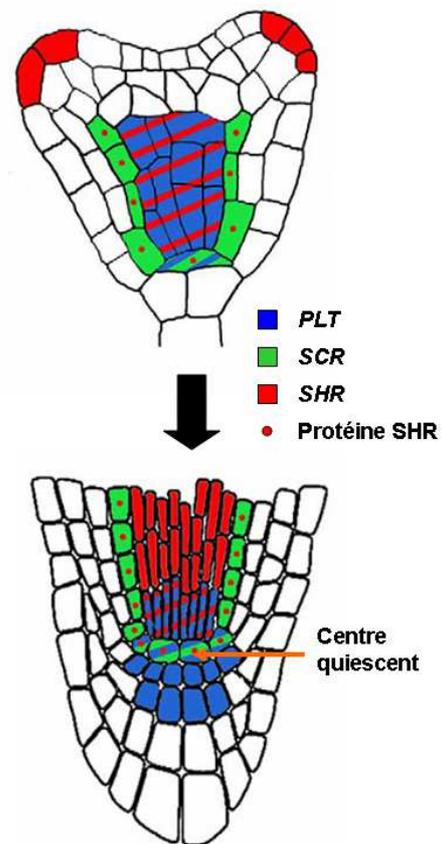
Introduction

2.3.2.2 Le méristème apical racinaire (MAR)

Le MAR présente une organisation en assises concentriques. La partie supérieure du méristème dérive de la cellule apicale via le proto-embryon alors que la partie inférieure (le centre quiescent, la columelle et ses initiales) dérive de la cellule basale via l'hypophyse (Scheres et *al.*, 1994). Le centre quiescent, constitué de quatre cellules mitotiquement inactives situées au cœur du méristème, confère aux cellules l'entourant leur identité de cellules souches (van den Berg et *al.*, 1995). De plus, d'autres signaux de position provenant des cellules du cortex semblent renforcer l'engagement des cellules initiales dans leur voie de différenciation (van den Berg et *al.*, 1995) (Figure 0.14).

Figure 0.14. Mise en place du méristème apical racinaire.

Au stade cœur, les gènes *PLT* sont exprimés dans le futur cylindre vasculaire, ainsi que dans la cellule à l'origine du futur centre quiescent. Les ARNm *SHR* sont présents dans les tissus vasculaires mais la protéine SHR est retrouvée dans les tissus de remplissage entourant les tissus vasculaires et dans la cellule à l'origine du centre quiescent. SHR induit l'expression de *SCR* dans ces tissus. L'expression coordonnée des gènes *SCR* et *PLT* induit la différenciation des cellules du centre quiescent. *PLT*, PLETHORA ; *SCR*, SCARECROW ; *SHR*, SHORT ROOT (Capron et *al.*, 2009).



Le centre quiescent ayant un rôle central dans la mise en place et le maintien de ce méristème, l'étude de sa formation est aujourd'hui bien documentée. Durant les phases précoces du développement de l'embryon, une forte production d'auxine et son transport polarisé vers la base de l'embryon créent une zone dite de réponse maximale à l'auxine au niveau de la cellule apicale du suspenseur permettant la différenciation de cette dernière en hypophyse à l'origine du centre quiescent. Par la suite, un gène de la famille *WOX* (*WOX5*) semble jouer le rôle d'intégrateur d'un certain nombre de voies de signalisation dépendantes de l'auxine, via les gènes *PLETHORA*, ou indépendantes de l'auxine, impliquant le couple *SCARECROW* (*SCR*) et *SHORT-ROOT* (*SHR*), et permettre la spécification et le maintien du centre quiescent (Sarkar et *al.*, 2007) (Figure 0.14).

Introduction

2.3.3 La mise en place des axes de symétrie

2.3.3.1 Mise en place d'une symétrie bilatérale

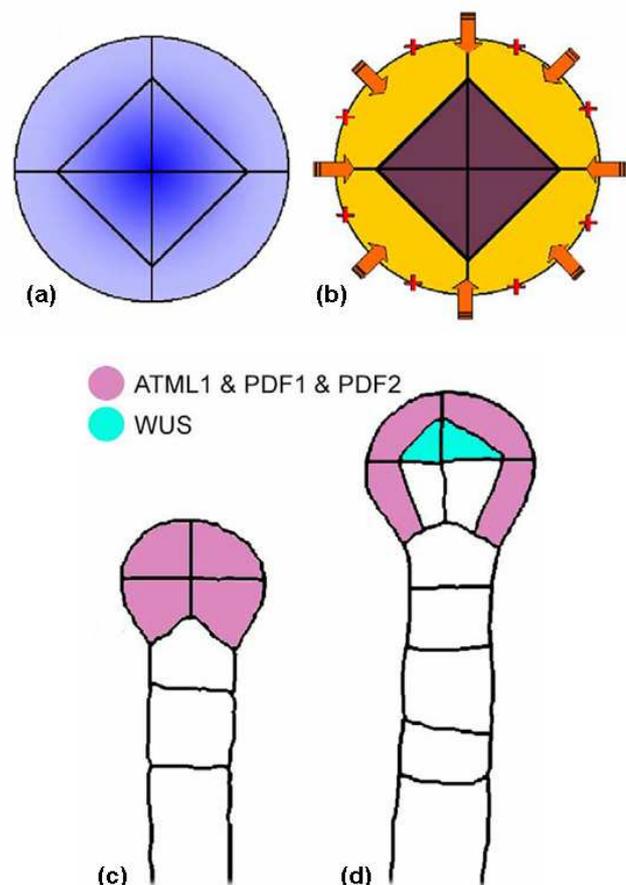
L'apparition des cotylédons marque le passage d'un embryon organisé autour d'une symétrie radiale au stade globulaire vers un embryon possédant une symétrie bilatérale au stade cœur (Figure 0.10d et e). L'initiation et la croissance des primordia de cotylédons semblent contrôlées par un transport épidermique polarisé d'auxine très semblable à ce qui peut être observé lors de la formation des organes végétatifs après germination.

2.3.3.2 Mise en place d'une symétrie radiale et formation de l'axe embryonnaire

La mise en place d'une symétrie radiale est bien visible dans la partie basale de l'embryon à partir du stade globulaire tardif. Elle est essentiellement permise par les nombreuses divisions qui se succèdent dans le plan apico-basal depuis le stade globulaire précoce. L'étude du mutant *monopteros* (*mp/arf5*), qui présente de sévères malformations de l'axe embryonnaire (absence de vaisseaux vasculaires, non différenciation de l'hypocotyle et de la racine) et code un récepteur de l'auxine (ARF5), suggère que cette hormone joue un rôle clé dans la mise en place de cette symétrie (Berleth et Jurgens, 1993 ; Aida et al., 2002 ; Hamann et al., 2002).

Figure 0.15. Mise en place d'une symétrie radiale : le cas de l'épiderme.

(a,b) Mécanismes hypothétiques permettant d'expliquer la formation de l'épiderme. (a) Gradient d'un morphogène stable (bleu) qui, en fonction de sa concentration, induirait la différenciation des cellules selon un patron radial. (b) La différenciation des cellules de l'épiderme (jaune) serait sous le contrôle d'un signal externe provenant de l'albumen (flèches orange) ou de la paroi externe (croix rouges). (c,d) Expression de quelques gènes spécifiques du protoderme au cours de l'embryogenèse. (c) Au stade octant *AtML1*, *PDF1* et *PDF2* sont exprimés dans toutes les cellules apicales. (d) Au stade dermatogène, l'expression de ces gènes est restreinte à la couche cellulaire la plus externe et l'expression d'autres gènes comme *WUSCHEL* (*WUS*) augmente dans les cellules plus internes (Capron et al., 2009).



Introduction

Au stade globulaire, la spécification de l'assise la plus externe, c'est-à-dire l'épiderme, n'est pas encore établie mais l'existence d'un gradient de molécules ou de signaux provenant de l'albumen ou du cœur de l'embryon est envisagée (Figure 0.15). Néanmoins, plusieurs gènes (*MERISTEM LAYER1 (AtML1)*, *PROTODERMAL FACTOR 1 et 2 (PDF1 et 2)*) contrôlant la différenciation des cellules du protoderme en épiderme ont d'ores et déjà été identifiés (Sessions et al., 1999 ; Abe et al., 2003) (Figure 0.15).

Plus tardivement, au stade cœur, la mise en place et la différenciation radiale des tissus vasculaires et centraux semblent sous contrôle des cytokinines via le gène *WOODEN LEG (WOL)*, un récepteur membranaire à cette hormone (Scheres et al., 1994 ; Mähönen et al., 2000).

Au stade torpille, certaines cellules des tissus internes subissent une division périnclinale asymétrique à l'origine de l'endoderme et du parenchyme cortical. Le maintien de l'identité de ces deux types de tissus sera assuré par le MAR via l'action coordonnée de SHR et SCR (Ten Hove et Heidstra, 2008).

2.3.3.2 Mise en place d'une symétrie adaxiale-abaxiale

La mise en place d'une symétrie adaxiale-abaxiale au niveau des cotylédons est sous le contrôle d'interactions antagonistes au sein d'un petit groupe de gènes tels que *REVOLUTA*, responsable de la définition du pôle adaxial/central, et *KANADI1*, responsable de la définition du pôle abaxial/péripérique (Capron et al., 2009). Ces relations antagonistes semblent comparables à celles qui existent entre les gènes régulant la mise en place du méristème apical caulinaire et des primordia d'organes.

En conclusion, le développement de l'embryon d'*Arabidopsis* avec la mise en place de ses différents axes de polarité ainsi que le déterminisme génétique et hormonal de celui-ci sont aujourd'hui relativement bien décrits dans la littérature, même si quelques zones d'ombres subsistent.

Introduction

2.4 L'albumen

2.4.1 Le développement de l'albumen

L'albumen est issu du développement de la cellule centrale du sac embryonnaire fécondée par un des noyaux spermatiques du grain de pollen (Figure 0.3). Comme pour l'embryon, le développement de l'albumen suit un patron précis passant par différents stades : un stade syncytial, un stade de cellularisation, un stade de différenciation et un stade de dégénérescence.

2.4.1.1 Le stade coenocytique

De nombreuses études chez *Arabidopsis* se sont intéressées au développement de l'albumen. L'utilisation du microscope confocal a permis de visualiser plusieurs séries de mitoses qui ponctuent le développement de l'albumen et définissent différents stades de développement avec 2, 4, 8, 12, 16, 24 à 27, 46 à 48 et 90 à 96 noyaux (Figures 0.16 et 0.17 pour la correspondance entre les stades de développement de l'embryon et de l'albumen).

Juste après la fécondation, l'albumen est constitué d'une cellule avec une large vacuole centrale et un gros noyau jouxtant le zygote principal (Boisnard-Lorig et *al.*, 2001). Les trois premiers cycles de divisions nucléaires sans cytotélière sont synchrones, puis différents domaines avec des activités mitotiques asynchrones s'établissent le long de l'axe antéro-postérieur de la graine (Figures 0.16 et 0.17). Cette organisation semble régie par une régulation spatiale fine de l'expression de gènes contrôlant le cycle cellulaire.

2.4.1.2 La cellularisation

La cellularisation de l'albumen débute au pôle micropylaire, à proximité de l'embryon, et se termine au pôle chalazal alors que l'embryon aborde le stade cœur. La mise en place des parois anticlinales n'est pas directement liée à une division nucléaire. Ces cloisons pariétales se mettent en place uniquement en périphérie et compartimentent le syncytium central en alvéoles à la manière d'un nid d'abeille (Figures 0.16 et 0.18). Avant que l'albumen périphérique ne soit entièrement compartimenté en alvéoles, une vague de mitoses avec cytokinèse affecte les alvéoles les plus anciennes à proximité de l'embryon. Il en résulte une série d'alvéoles périphériques entièrement closes et une série d'alvéoles internes dont la croissance de la paroi anticlinale est guidée par des

Introduction

faisceaux de microtubules (Figure 0.16). Par vagues successives de mitoses, l'albumen se cellularise entièrement, excepté au pôle chalazal, au stade cœur (Figures 0.16 et 0.18) (Brown et *al.*, 1999).

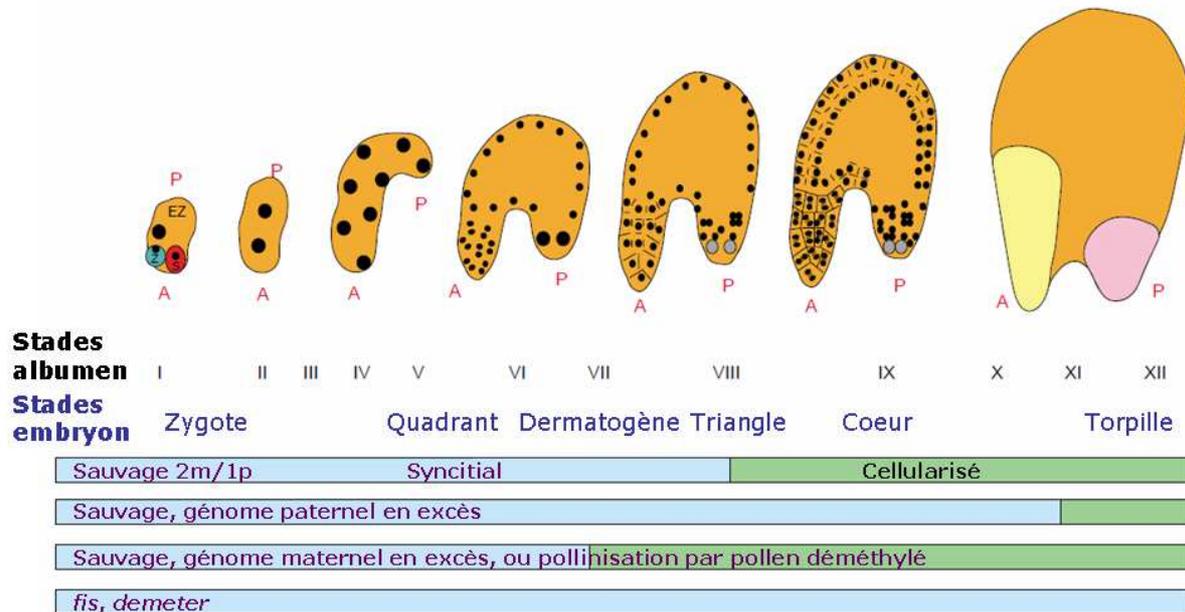


Figure 0.16. Etapes majeures du développement de l'albumen d'Arabidopsis.

La double fécondation du sac embryonnaire par les gamètes mâles donne naissance à deux zygotes : un zygote principal issu de la fécondation de l'oosphère (Z) et un zygote accessoire, l'albumen, dérivant de la fécondation de la cellule centrale diploïde (EZ). Le développement de l'albumen est divisé en deux phases : une phase syncytiale et une phase cellularisée. Les différents stades de développement sont définis par des successions de mitoses pseudo-synchronisées (Figure 0.17). Trois domaines mitotiques sont définis depuis le pôle antérieur (A) jusqu'au pôle postérieur (P) : l'albumen micropylaire (jaune), l'albumen périphérique (orange) et l'albumen chalazal (rose). Les huit cycles mitotiques successifs sont suivis d'une étape de cellularisation de l'albumen périphérique. Cette étape est régulée par des processus épigénétiques.

Dans la partie inférieure de la figure, l'effet de quatre génotypes sur le développement de l'albumen est présenté : (1) le cas sauvage avec un ratio génome maternel (m) sur génome paternel (p) de 2m/1p, (2) le cas sauvage avec un génome paternel en excès conduit à un retard de cellularisation, (3) le cas sauvage avec un génome maternel en excès conduit à une cellularisation précoce, (4) le cas des mutants *fis* ou *demeter* conduit à une absence de cellularisation. Les barres bleues marquent le stade syncytial et les barres vertes le stade cellularisé (Berger et *al.*, 2003).

La cellularisation fait appel à un processus très semblable à la cytokinèse, la dernière étape d'une mitose classique, impliquant des microtubules, des protéines de transport vésiculaire et des enzymes de biosynthèse de la paroi. Cependant, l'étude de plusieurs mutants semble indiquer que ce processus n'implique pas exactement les mêmes acteurs moléculaires (Olsen, 2001). Des études

Introduction

ultrastructurales ont montré qu'au cours de la cellularisation de l'albumen, la mise en place de la paroi faisait intervenir un phragmoplaste et une plaque cellulaire semblables mais non identiques à ce qui a pu être observé pour une cytokinèse conventionnelle (Otegui et Staehelin, 2000 ; Otegui et *al.*, 2001). L'élément déclencheur de cette cellularisation aurait un lien avec le rapport nucléocytoplasmique du syncytium (Sorensen et *al.*, 2002).

Stades	Nombre de noyaux de l'albumen	Stades de développement de l'embryon	Temps après fécondation (h)	Évènements majeurs
I	1	zygote	0	Un gros noyau à proximité du zygote.
II	2	zygote	2-4	Première mitose. Les deux noyaux migrent à des pôles opposés de l'albumen.
III	4	zygote	ND	Seconde mitose. Les plans de divisions sont parallèles à l'axe de polarité de la graine.
IV	6-8	zygote	ND	Troisième mitose. Les plans de divisions sont perpendiculaires à l'axe de polarité de la graine. Un à deux noyaux migrent vers le pôle chalazal, six à sept restent liés à la paroi de l'albumen périphérique.
V	12-16	Zygote, une cellule	ND	Quatrième mitose. Les divisions sont asynchrones et les noyaux du pôle chalazal sont plus gros que ceux de l'albumen périphérique.
VI	24-28	Une à deux cellules	12-18	Cinquième mitose. Le pôle chalazal contient 1 à 4 gros noyaux. Les noyaux du pôle micropylaire se divisent avant ceux situés en périphérie.
VII	44-48	quadrant	24	Sixième mitose. Le délai entre la division des noyaux périphériques et micopylaire s'accroît.
VIII	90	octant	30	Septième mitose. Une couche de noyaux entoure l'embryon sauf l'albumen micropylaire qui présente deux couches.
IX	200	Dermatogène - globulaire	36-60	Huitième mitose restreinte aux noyaux périphériques. Les divisions au pôle micropylaire sont indépendantes des autres. Le pôle chalazal contient de gros et de petits noyaux.

Figure 0.17. Stades de développement de l'albumen d'Arabidopsis. (Boisnard-Lorig et *al.*, 2001).

Introduction

2.4.1.3 La différenciation et la régionalisation de l'albumen selon l'axe antéro-postérieur

Comme l'embryon, l'albumen possède un axe d'organisation antéro-postérieur et une symétrie radiale ; trois domaines peuvent être déterminés (Figure 0.2) : au pôle antérieur, l'albumen micropylaire ; au pôle postérieur, l'albumen chalazal et entre les deux, entourant l'embryon, l'albumen périphérique.

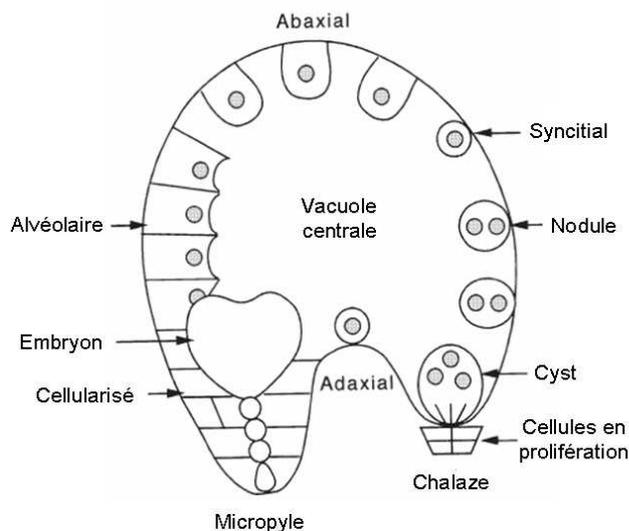


Figure 0.18. Représentation schématique du développement de l'albumen.

Dans des graines au stade embryonnaire (coeur), tous les stades du développement de l'albumen peuvent être observés simultanément : les stades les plus avancés du côté micropylaire et les stades les plus retardés du côté chalazal. L'albumen est d'abord coenocytique et les noyaux se répartissent en une monocouche entourant une vacuole centrale. Les premières divisions péricleinales se déroulent à proximité de l'embryon, puis elles sont suivies par la formation des alvéoles qui, progressivement, gagnent le pôle chalazal et se ferment par dépôt d'une paroi pecto-cellulosique. La chambre chalazale reste coenocytique et accueille les nodules (Brown et *al.*, 1999).

L'albumen micropylaire

L'albumen micropylaire est composé de petites cellules au cytoplasme dense (Figures 0.2 et 0.18). Il est le siège d'une intense activité métabolique comme le suggère la forte densité en réticulum endoplasmique observée dans cette région avant la cellularisation. Les gènes *ESR* (*EMBRYO SURROUNDING REGION*) exprimés dans cette région (chez le maïs) pourraient être impliqués dans le transfert de nutriments vers l'embryon ou des processus de signalisation. Parmi les gènes dits *ESR* chez *Arabidopsis*, nous pouvons citer *AtSUC5*, un transporteur de saccharose (Baud et *al.*, 2005), *ABNORMAL LEAF SHAPE 1*, une protéase subtilisine-like (Tanaka et *al.*, 2001), *ZHOUPI*, un facteur de transcription de type bHLH (Yang et *al.*, 2008) et *MINISEED3* (Luo et *al.*, 2005).

L'albumen périphérique

Au stade où l'embryon prend la forme d'un U retourné, l'albumen périphérique est réduit à une seule assise cellulaire.

Introduction

L'albumen chalazal

La partie postérieure de l'albumen est le siège d'un processus d'endoréplication après les trois premiers cycles de divisions synchrones, laissant apparaître un à quatre noyaux hypertrophiés dont la ploïdie serait supérieure à celle des autres noyaux des cellules de l'albumen (Boisnard-Lorig et *al.*, 2001). Au terme de la phase coenocytique, cette portion de l'albumen, la dernière à se cellulariser, est le siège d'un rassemblement de noyaux, de nodules et de cyste (structure multinucléée formée dans l'albumen périphérique). Elle présente une organisation cytologique comparable à la zone de transfert décrite chez les céréales (Thompson et *al.*, 2001) et pourrait être en ce sens une zone de transport de nutriments depuis les tissus maternels phloémiens vers les tissus de la graine (Olsen, 2004) (Figures 0.17 et 0.18). Enfin, cette zone de l'albumen est particulièrement importante lors de la germination, sécrétant une extensine-like qui modifierait la structure de la paroi et faciliterait l'émergence de la radicule (Dubreucq et *al.*, 2000).

2.4.1.4 La symétrie radiale de l'albumen

Chez *Arabidopsis*, l'organisation selon une symétrie radiale de l'albumen ne peut être observée, ce dernier étant réduit à une assise cellulaire dans le domaine périphérique. Elle est en revanche bien décrite chez les céréales comme le maïs (Figure 0.19). Au sein du caryopse de maïs, l'albumen est organisé en couches concentriques : (i) la couche à aleurones, seule couche dont les cellules restent vivantes chez le grain mature, est la plus externe. Au cours de la germination, elle synthétisera des enzymes capables de remobiliser les réserves des couches les plus internes, (ii) l'albumen central amidonné, (iii) la couche cellulaire entourant l'embryon (Figure 0.19a).

Après la cellularisation, des divisions péricleinales successives initient différentes lignées cellulaires, la plus externe d'entre elles se différenciant en couche à aleurones. *Defective endosperm kernel 1* (*Dek1*), codant une cystéine protéinase, est important pour la différenciation de la couche à aleurones chez le maïs. Chez son mutant, la couche à aleurones est totalement absente (Li et Berger, 2012). L'homologue de *Dek1* chez *Arabidopsis* semble avoir un rôle dans le processus de différenciation de l'albumen en général, sans qu'il soit possible de lui assigner un rôle spécifique dans la différenciation de la couche à aleurones (Lid et *al.*, 2005). Il est donc pour l'instant impossible de déterminer avec certitude si la couche à aleurones de l'albumen des céréales est l'équivalent de la couche la plus externe de l'albumen chez *Arabidopsis*.

Introduction

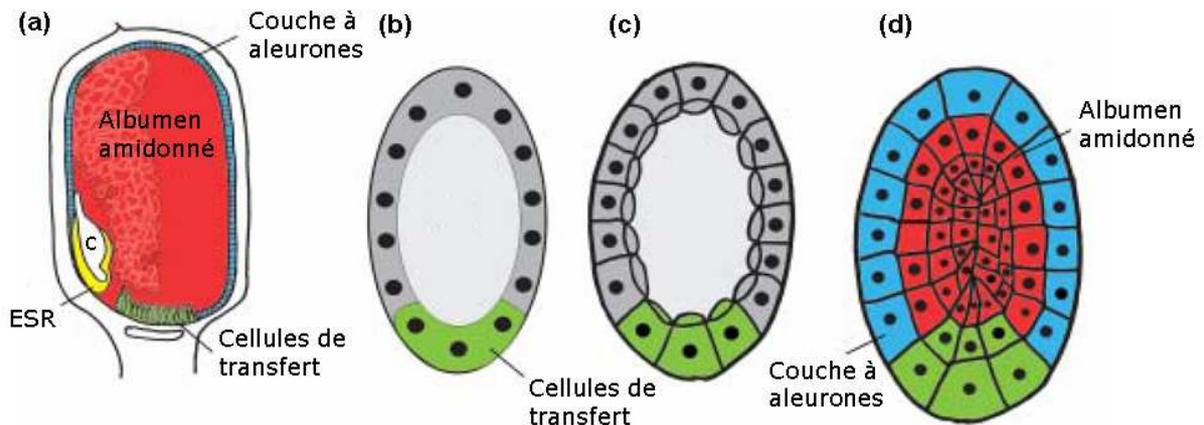


Figure 0.19. Développement de l'albumen des céréales.

(a) Différents types cellulaires de l'albumen de maïs : albumen amidonné, aleurone, cellules de transfert et ESR. (b-d) Mise en place des différents domaines de l'albumen au cours du développement : (b) stade syncytial (c) stade alvéolaire, (d) stade cellularisé. ESR, Embryo Surrounding Region (Olsen, 2004).

De manière très précise, chez les céréales, les futures cellules de la couche à aleurones jouxtant les cellules du nucelle où sont délivrés les nutriments provenant des tissus maternels, se différencient en cellules de transfert (Figure 0.19a à d). Ces cellules sont allongées et expriment des transporteurs de sucres et d'acides aminés. Chez *Arabidopsis*, un tissu maternel situé à la pointe de la chambre chalazale pourrait avoir un rôle similaire aux cellules de transfert des céréales (Olsen, 2004).

2.4.1.5 Le rôle et la dégénérescence de l'albumen

Premièrement, l'albumen occupe une position centrale dans la graine entre l'embryon et les téguments. Une prolifération précoce de l'albumen est associée à une forte croissance de la taille de la graine : le développement de l'albumen détermine en particulier la taille de celle-ci (voir paragraphe 2.4.2.3).

Deuxièmement, l'albumen contribue à la croissance de l'embryon. Au cours des stades précoces de développement, ce rôle semble être en partie assuré par l'albumen chalazal, comme lieu de transit des nutriments (Scott et al., 1998). Plus tardivement, l'albumen se cellularise et commence à accumuler des réserves (Sorensen et al., 2002). Chez *Arabidopsis* et d'autres graines exalbuminées, l'embryon se développe aux dépens de l'albumen et absorbe des réserves dans ses cotylédons (Scott et al., 1998 ; Olsen, 2004). L'albumen se trouve alors réduit à une assise cellulaire.

Introduction

Des études chez le maïs indiquent qu'une mort cellulaire programmée intervient à la fin du développement de l'albumen. En particulier, une dégradation de l'ADN internucléosomal dépendante de la voie de signalisation de l'éthylène est observée. Chez les graines exalbuminées, le caractère autonome ou non-autonome de la disparition d'une fraction de l'albumen est encore discuté. La cosuppression de *FBP7* et *FBP11* dans la graine de pétunia induit une dégénérescence de l'endothélium qui conduit à une dégénérescence de l'albumen : ainsi, la mort de l'albumen pourrait être contrôlée par les téguments (Colombo et *al.*, 1997). Cependant, l'assise cellulaire d'albumen restante chez *Arabidopsis* (Figure 0.2), bien que non homologue de la couche à aleurones des céréales (Figure 0.19), serait très vraisemblablement vivante.

2.4.2 La régulation du développement de l'albumen

La régulation du développement de l'albumen est un processus complexe faisant intervenir de très nombreux acteurs (facteurs de transcription, facteurs de remodelage de la chromatine, marques épigénétiques) encore partiellement identifiés et entretenant de multiples interconnexions. Différents aspects du développement de l'albumen sont ainsi régulés, l'initiation de son développement et de sa prolifération, sa cellularisation, et sa régression même si les mécanismes précis qui les sous-tendent sont encore très mal compris. Ainsi ce paragraphe tentera de dresser d'une part un bilan des différents mécanismes à l'œuvre et d'autre part une vue d'ensemble des différentes étapes contrôlées et des acteurs associés.

2.4.2.1 Les acteurs régulant le développement de l'albumen

Le complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2)

De nombreuses protéines du groupe Polycomb (PcG) proches de celles de la drosophile et des mammifères sont impliquées dans le développement de l'albumen via la formation d'un complexe protéique nommé PRC2 (Chaudhury et *al.*, 1997 ; Ohad et *al.*, 1999 ; Luo et *al.*, 1999). Un complexe PRC2 est composé de quatre protéines : (i) ESC (Extra Sex Comb) avec comme homologue chez les plantes FIE (FIS3) ; (ii) E(Z) (Enhancer of Zeste) avec comme représentants chez les plantes (MEA (FIS1), CLF (CURLY LEAF) et SWN (SWINGER)) ; (iii) SU(Z)12 (Supressor of Zeste 12) représenté par FIS2, EMF2 (EMBRYONIC FLOWER 2) ou encore VRN2 (VERNALIZATION2)

Introduction

et enfin (iv) p55 représenté par MSI1 (MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1). Ce complexe PRC2 agit comme facteur de remodelage de la chromatine qui méthyle la lysine K27 de l'histone H3 (H3K27me3) grâce à l'activité méthyltransférase de MEA (Grossniklaus et *al.*, 1998 ; Kiyosue et *al.*, 1999) pour réprimer la transcription des séquences codantes associées.

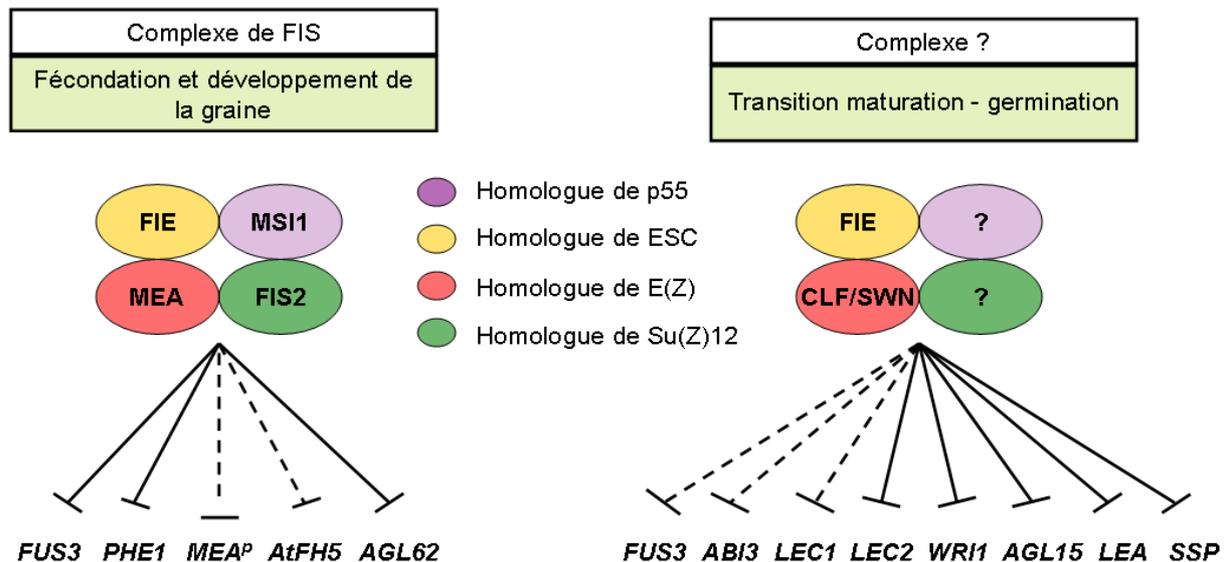


Figure 0.20. Les complexes PRC2 impliqués dans le développement de la graine chez Arabidopsis.

Les deux complexes Polycomb impliqués dans le développement de la graine ainsi que leurs cibles sont présentés. Lorsque la répression des gènes par PRC2 est soutenue uniquement par des données génétiques l'interaction est représentée en pointillés. Lorsque la répression des gènes par PRC2 est soutenue par des données moléculaires l'interaction est présentée en trait plein. ABI3, ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 ; AGL15, AGAMOUS-LIKE 15 ; AGL62, AGAMOUS-LIKE 62 ; AtFH5, Arabidopsis FORMIN HOMOLOGUE PROTEIN5 ; FUS3, FUSCA3 ; LEA, LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT ; LEC1, LEAFY COTYLEDON1 ; LEC2, LEAFY COTYLEDON2 ; MEA, MEDEA ; MEA^P, allèle paternel de MEDEA ; PHE1, PHERES1 ; SSP, protéines de réserve ; WRI1, WRINKLED1 (Pien et Grossniklaus, 2007 ; Bouyer et *al.*, 2011).

Le complexe PRC2 a l'œuvre dans la cellule centrale et dans l'albumen est composé de FIE/MEA/FIS2/MSI1 et est appelé complexe PRC2 de FIS (Figure 0.20). Dans la cellule centrale du sac embryonnaire, ce complexe PRC2 réprime le développement de cette dernière en l'absence de fécondation. Ainsi les mutants *fis* présentent une prolifération de leur cellule centrale à l'origine de l'albumen en l'absence de fécondation (Ohad et *al.*, 1996 ; Chaudhury et *al.*, 1997 ; Grossniklaus et *al.*, 1998 ; Kohler et *al.*, 2003). Cependant la croissance de cette graine n'est pas viable (Chaudhury et *al.*, 1997).

Introduction

Dans l'albumen, ce même complexe PRC2 freinerait la prolifération de celui-ci (Chaudhury et al., 1997 ; Luo et al., 2000). En 2012, Hehenberger et collaborateurs (2012) démontrent que AGL62 est une cible du complexe PRC2 via FIS2 et que AGL62 est activateur de la prolifération et un inhibiteur de la cellularisation de l'albumen (Sorensen et al., 2002 ; Kang et al., 2008) (Voir 2.4.2.2). De même *AtFH5* (*Arabidopsis thaliana* FORMIN HOMOLOGY PROTEIN5) serait aussi une cible de PRC2 (Ingouff et al., 2005).

L'empreinte parentale

L'empreinte parentale est un mécanisme de régulation chromatinien qui permet une expression différentielle des allèles paternels et maternels de différents gènes, en particulier dans l'albumen. Elle fait intervenir des marques chromatinienne qui peuvent être portées par l'ADN et/ou les histones et qui peuvent être reconnues par différents acteurs chromatiniens. Ainsi, la méthylation d'une séquence d'ADN ou des histones associées sera une marque de répression. Les marques chromatiniennes de répression sont éliminées à la fin de la gamétogenèse femelle alors qu'elles sont maintenues dans les gamètes mâles. Après fécondation, la différence de statut chromatinien entre les deux allèles parentaux est maintenue dans l'albumen par des mécanismes semi-conservatifs.

La méthylation des histones

L'allèle parental réprimé voit une méthylation de ses histones (notamment la lysine K27 de l'histone H3, H3K27me3). Cette marque chromatinienne répressive est déposée par le complexe PRC2 de FIS dans la cellule centrale et l'albumen ; elle est maintenue durant tout le développement de l'albumen par ce même complexe PRC2 (Gehring et al., 2006 ; Jullien et al., 2006).

La méthylation de l'ADN

En plus de la méthylation des histones, la répression de l'expression de nombreux gènes soumis à une empreinte parentale est maintenue par méthylation de l'ADN, notamment les cytosines des sites CpG, par la METHYLTRANSFERASE1 (MET1), homologue de Dnmt1 chez les mammifères (Huh et al., 2007). A l'inverse, DEMETER (DME) permet la déméthylation spécifique de certains gènes soumis à cette empreinte (Choi et al., 2009 ; Bauer et al., 2011). Ainsi, chez *Arabidopsis*, l'action antagoniste et coordonnée de MET1 et DME est à l'origine de l'expression différentielle des gènes

Introduction

soumis à une empreinte : MET1 maintient la méthylation de l'ADN des gènes cibles dans le gamète mâle alors que DME permet une déméthylation active de ces derniers dans le gamète femelle. En effet, l'expression de *DME* est restreinte à la cellule centrale du sac embryonnaire spatialement et temporellement (Figure 0.21), ce qui permet d'activer spécifiquement dans cette cellule les gènes soumis à une empreinte avant la fécondation (Li et Berger, 2012).

Les gènes maternels

Pour déterminer le rôle des gènes soumis à une empreinte dans le développement de l'albumen, Xiao et collaborateurs (2006) ont levé la répression de l'ensemble des gènes du génome paternel grâce à un mutant perte de fonction de *MET1* chez le parent mâle. Ainsi, les gènes dont seul l'allèle maternel est exprimé en temps normal chez le sauvage se retrouvent exprimés par les deux allèles parentaux. Cette mutation inhibe le développement de l'albumen conduisant à la formation de petites graines (Fitzgerald et al., 2008 ; Xiao et al., 2006). Inversement, la perte de fonction de *MET1* chez le parent femelle n'a aucun effet sur le développement de l'albumen et de la graine, *MET1* n'y étant que faiblement exprimé en temps normal (Jullien et al., 2006). L'ensemble de ces résultats suggère que les gènes soumis à l'empreinte (réprimés chez le mâle) et exprimés par le génome maternel répriment le développement de l'albumen.

Parmi les gènes soumis à une empreinte parentale, *FIS2* et *MEA* font partie du complexe PRC2 mais de nombreux gènes n'ont, à l'heure actuelle, pas de fonction précise connue dans l'albumen comme *FLOWERING WAGENINGEN A (FWA)*, *MATERNALLY EXPRESSED PAB C TERMINAL (MPC)* ou *AGL36 (AGAMOUS LIKE 36)* (Xiao et al., 2003 ; Li et Berger, 2012). Selon Shirzadi et collaborateurs (2011), *AGL36* pourrait avoir un rôle dans le développement de l'albumen via ses nombreuses interactions avec d'autres facteurs de transcription à MADS box (Paragraphe 2.4.2.2).

Ainsi *FIS2* et *MEA* sont à la fois des gènes soumis à l'empreinte parentale et des gènes impliqués dans le maintien de cette empreinte parentale via leur rôle dans le complexe PRC2 de FIS. Ce sont des gènes maternels, c'est à dire que seuls les allèles maternels de ces gènes s'expriment dans l'albumen. Leur expression permet la formation du complexe PRC2 de FIS qui va réprimer leur propre allèle paternel dans l'albumen (Figure 0.21) (Gehring et al., 2006).

Introduction

Les gènes paternels

Tous les gènes soumis à une empreinte parentale ne sont pas des gènes maternels. *PHERES1* (*PHE1*) est un autre gène exprimé dans l'albumen d'*Arabidopsis* soumis à une empreinte parentale : c'est un gène paternel, seule sa copie paternelle s'exprime, l'allèle maternel étant maintenu silencieux par l'intervention du complexe PRC2 de FIS (Köhler et al., 2003) (Figure 0.21). Cependant, le mécanisme permettant la levée de l'inhibition (marque H3K27me3) dans les cellules spermatiques n'est pour l'instant pas décrit, la méthylation d'une région située à 2,6 kb de l'extrémité 3' de *PHE1* par MET1 semble essentielle.

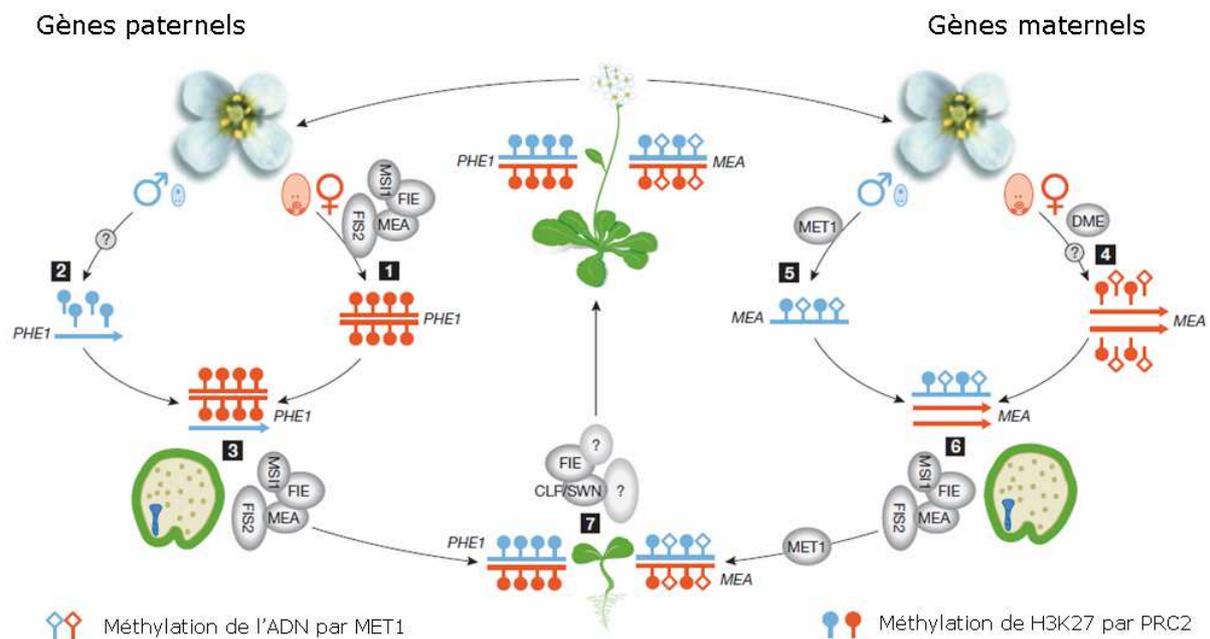


Figure 0.21. Modèle présentant les mécanismes moléculaires contrôlant l'expression maternelle ou paternelle des gènes soumis à une empreinte parentale.

1. Le gène paternel *PHERES1* (*PHE1*; rouge) est réprimé dans le gamétophyte femelle par le complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) de FIS (FERTILIZATION INDEPENDENT SEED) (qui comprend MEDEA (MEA), FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE), FIS2 and MULTI-COPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1)). Ce complexe méthyle la lysine K27 de l'histone H3 (H3K27) **2.** La méthylation de H3K27 de la copie paternelle de *PHE1* (bleue) est supprimée pour que le gène puisse s'exprimer. Cependant, le processus exact mis en jeu est encore inconnu. **3.** La répression de la copie maternelle de *PHE1* dans l'albumen est maintenue par le complexe PRC2 de FIS. **4.** Dans la cellule centrale du gamétophyte femelle, DEMETER (DME) déméthyle l'ADN des allèles maternels (rouge) des gènes *MEA*, *FIS2* et *FWA*. **5.** Nous ne savons pas à l'heure actuelle si la méthylation de H3K27 de ces gènes est aussi éliminée des allèles maternels. L'allèle paternel de *MEA* (bleu) est méthylation par MET1 (DNA METHYLTRANSFERASE 1). De même, nous ne savons pas si la méthylation de H3K27 est maintenue sur l'allèle paternel. **6.** La répression de l'allèle paternel de *MEA*, *FIS2* et *FWA* dans l'albumen est maintenue par le complexe PRC2 de FIS. **7.** Dans les tissus végétaux, les gènes maternels (*MEA*, *FIS2*, *FWA*) et paternels (*PHE1*) sont réduits au silence par la méthylation de l'ADN et de H3K27 via un complexe PRC2 comprenant CURLY LEAF (CLF), SWINGER (SWN) et FIE. FWA, FLOWERING WAGENINGEN A (Köhler et al., 2003).

Introduction

Les facteurs de transcription

AGL80 (AGAMOUS-LIKE 80) est un facteur de transcription à MADS box exprimé dans la cellule centrale du gamétophyte femelle et dans l'albumen syncytial. Dans la cellule centrale, il permet l'expression de *DME* et ainsi la dérepression de nombreux gènes maternels (Portereiko et al., 2006). Associé à *AGL61/DIANA*, exprimé lui aussi dans la cellule centrale, il régulerait l'expression de gènes impliqués dans le développement de cette dernière (De Folter et al., 2005 ; Bermer et al., 2008 ; Steffen et al., 2008). L'association de *AGL61* et *AGL80* permet leur translocation dans le noyau. De plus, il semble que *AGL80* interagisse avec *AGL62* dans l'albumen (Kang et al., 2008 ; Li et Berger, 2012).

L'importance du dosage des génomes parentaux : le ratio m/p

Chez la plupart des plantes, le ratio génome maternel (m) sur génome paternel (p) dans l'albumen est de 2m pour 1p car la cellule centrale avant fécondation est homodiploïde. Une augmentation de la contribution maternelle à 6m pour 1p induit une cellularisation précoce de l'albumen conduisant à un avortement de la graine (Figure 0.16). A l'inverse, une diminution du rapport à 2m pour 3p induit un retard dans la cellularisation et produit une graine plus grosse (Figure 0.16). Ces résultats ont été interprétés à la lumière de la théorie des conflits parentaux : lorsque plusieurs embryons de pères différents se développent au sein d'une même plante mère, la composante paternelle de chaque embryon tend à capter le maximum de nutriments maternels possible pour sa progéniture alors que la composante maternelle favorise une distribution identique de la ration alimentaire à chaque embryon (Li et Berger, 2012 ; Berger, 1999 ; Berger et al., 2006).

Ces données sont à mettre en relation avec l'empreinte parentale, qui régule elle aussi le dosage d'un certain nombre de gènes de chaque génome. Ainsi les mutants *fis* ou *dme* présentent artificiellement une diminution du rapport m/p et par conséquent un retard dans la cellularisation (Figure 0.16) (Berger et al., 2003).

2.4.2.2 La régulation des grandes étapes du développement de l'albumen

Chacune des étapes du développement de l'albumen semble finement régulée, même si les données à ce sujet demeurent parcellaires.

Introduction

La prolifération de l'albumen

De nombreux gènes seraient impliqués dans le contrôle de la prolifération de l'albumen. La plupart des mutants correspondants présentent des noyaux hypertrophiés comme les mutants *titans* (*ttn*) (Liu et Meinke, 1998, Tzafrir et al., 2002) ou *prolifera* (Springer et al., 2000). *PROLIFERA* code une protéine MCM7 qui contrôle l'initiation de la réplication de l'ADN. Les mutants *titans* semblent quant à eux affectés dans l'organisation du fuseau mitotique.

La transition de la phase de prolifération coenocytique à la phase cellularisée

Comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe précédent, le complexe PRC2 réprime la prolifération de l'albumen. Divers mutants des gènes codant des protéines appartenant à ce complexe, comme *MEA* et *FIS2*, présentent une absence de cellularisation de l'albumen (Figure 0.16). Leur action serait médiée par *AGL62* et *AtFH5*, un gène codant une protéine impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine (Ingouff et al., 2005 ; Kang et al., 2008). *AtFH5* serait importante pour le processus de cellularisation de l'albumen et la morphogenèse du pôle postérieur de celui-ci (Ingouff et al., 2005).

De plus, les gènes *HAIKU* (*IKU*) seraient également impliqués dans la transition albumen coenocytique - albumen cellularisé. L'étude des mutants *iku* montre que le volume de l'albumen syncytial est réduit chez ceux-ci mais que son activité mitotique n'est pas affectée. Par conséquent, le rapport nucléo-cytoplasmique, facteur seuil déclenchant le processus de cytokinèse, est plus rapidement atteint, aboutissant à une cellularisation précoce (Sorensen et al., 2002). Le mutant *spätzle* est caractérisé par une absence de cellularisation de l'albumen sans impact sur la cytokinèse dans l'embryon. *SPÄTZLE* serait impliqué spécifiquement dans le processus de cellularisation de l'albumen (Sorensen et al., 2002). De même, le mutant *ede1* (*endosperm defective 1*) est affecté dans la cellularisation de l'albumen, mais de manière moins sévère (Pignocchi et al., 2009). Le rôle de *EDE1* dans ce processus n'est pas encore clairement établi.

La régionalisation de l'axe antéro-postérieur de l'albumen

La mise en place du pôle postérieur de l'albumen (albumen chalazal) est dépendante de la migration des « noyaux » vers cette extrémité de l'albumen pour former les nodules et cyste. Chez les mutants *fie*, *fis2* et *mea*, la migration de ces « noyaux » est non orientée et aléatoire suggérant que le complexe PRC2 comprenant ces trois protéines régule la migration de ces noyaux *via* la mise

Introduction

en place du cytosquelette, et par conséquent la régionalisation antéro-postérieure de l'albumen (Guitton et *al.*, 2004). De plus, le patron d'expression de ces trois gènes, d'abord largement distribué dans l'albumen, se trouve progressivement restreint à l'albumen chalazal au stade coeur, dernière portion de l'albumen encore non cellularisée (Luo et *al.*, 2000). Cette régionalisation progressive de l'expression de *FIS2*, *MEA* et *FIE* participerait à la mise en place de sa polarité antéro-postérieure. Ainsi, la différenciation de l'albumen serait due à une répartition non uniforme des ARNm du syncytium au cours de la phase de cellularisation (Berger, 1999).

La dégénérescence de l'albumen

Chez *Arabidopsis*, le facteur de transcription ZHOUP1 (ZOU) contrôlerait la dégénérescence de l'albumen (Yang et *al.*, 2008). Chez les mutants *zou*, l'albumen ne dégénère pas. Il persiste, perturbant par voie de conséquence le développement de l'embryon (Kondou et *al.*, 2008 ; Yang et *al.*, 2008).

2.4.2.3 Les interactions entre l'albumen et les autres tissus durant le développement : le contrôle de la taille de la graine

Les facteurs de transcription

La caractérisation de nombreux mutants montre que l'albumen contrôle la taille de la graine, de concert avec les assises tégumentaires (Berger et *al.*, 2006). Premièrement, des croisements entre accessions de ploïdies différentes montrent que la balance entre les génomes maternel et paternel est essentielle au développement normal de la graine (Dilkes et *al.* 2008) (Voir ci-dessus).

Deuxièmement, l'étude de mutants pour le gène *HAIKU2* (*IKU2*), gène exprimé dans l'albumen, révèle qu'en plus d'une croissance réduite de l'albumen syncytial due à une cellularisation précoce, ces mutants présentent une réduction de l'élongation des cellules de la testa : les graines du mutant sont au final plus petites que la moyenne (Garcia et *al.*, 2003 ; Garcia et *al.*, 2005). *IKU2* code un récepteur kinase de type LRR (Leucine-rich repeat). De même, les mutants *mini3* présentent une cellularisation précoce de l'albumen. *MINI3* code un facteur de transcription de type WRKY exprimé dans l'albumen et l'embryon et qui agirait en amont de *IKU2* (Luo et *al.*, 2005). L'expression de *MINI3* et *IKU2* est réduite dans les mutants *iku1-1* (Luo et *al.*, 2005). *IKU1* est une

Introduction

protéine à motif VQ localisée dans les noyaux de l'albumen et qui interagirait avec *MINI3* (Wang et *al.*, 2010) (Figure 0.22).

Récemment, Zhou et collaborateurs (2009) ont pu montrer par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine que *SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1* (*SHB1*) s'associe aux promoteurs de *MINI3* et *IKU2* pour favoriser la prolifération et la croissance de l'albumen au cours des stades précoces du développement de la graine, assurant ainsi une croissance importante de la taille de la graine (Figure 0.22). *SHB1* ne possédant pas de domaine de liaison à l'ADN, il agirait au sein d'un complexe protéique qui reste à élucider (Kang et *al.*, 2006 ; Zhou et *al.*, 2009). Dans un second temps, *SHB1* régulerait la prolifération des cellules embryonnaires par un mécanisme indépendant de *IKU2* (Zhou et *al.*, 2009). La fonction des gènes *IKU* ne montre pas de relation directe avec le phénotype observé, à savoir la croissance cellulaire. Le mécanisme par lequel ces gènes régulent le développement de l'albumen syncytial reste encore inconnu. De plus, les relations entre ces quatre gènes doivent être encore approfondies, de manière à déterminer s'ils agissent dans la même voie ou dans des voies de régulations parallèles convergeant vers des cibles similaires (Li et Berger, 2012).

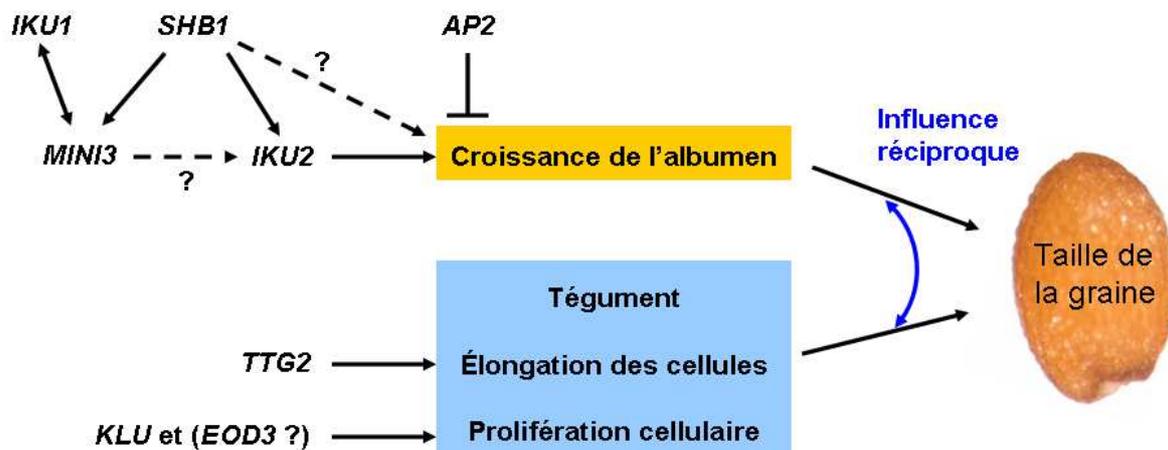


Figure 0.22. Modèle du contrôle de la taille de la graine chez *Arabidopsis*.

La détermination de la taille de la graine implique un contrôle de la croissance de l'albumen via les gènes *IKU1* (*HAIKU1*), *IKU2* (*HAIKU2*), *MINI3* (*MINISEED3*), *SHB1* (*SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1*) et *AP2* (*APETALA2*) et un contrôle maternel de l'élongation des cellules du tégument via *TTG2* (*TRANSPARENT TESTA GLABRA 2*), *KLU* (*KLUH*) et *EOD3*. Ces deux voies interagissent (flèche bleue) et déterminent la taille finale de la graine. Les flèches et barre T noires indiquent des activations et répressions respectivement (Garcia et *al.*, 2005 ; Jofuku et *al.*, 2005 ; Ohto et *al.*, 2009 ; Adamski et *al.*, 2009 ; Li et Berger, 2012).

Introduction

De même, une mutation perte de fonction du gène *TRANSPARENT TESTA GLABRA2 (TTG2)*, qui code un facteur de transcription WRKY, entraîne une réduction de l'élongation cellulaire du tégument et donc limite la croissance de l'albumen (Garcia et al., 2005 ; Dilkes et al., 2008) (Figure 0.22).

Le gène homéotique *APETALA2 (AP2)* contrôle aussi la taille et la masse de la graine chez *Arabidopsis* via le nombre et la taille des cellules de l'embryon (Jofuku et al., 2005 ; Ohto et al., 2009). Par des analyses génétiques, les auteurs montrent qu'AP2 régulerait ces paramètres à travers son activité au sein de l'albumen et des tissus maternels. Les graines du mutant *ap2* sont plus grosses que celles sauvages, la croissance de l'albumen est plus rapide et sa cellularisation retardée (Figure 0.20).

KLUH (KLU) est un gène codant un cytochrome P450 qui s'exprime dans les téguments de l'ovule, où il stimule la prolifération cellulaire et ainsi la taille de la graine (Adamski et al., 2009). Son action serait indépendante de AP2 (Figure 0.22). De plus, des études récentes montrent que CYP78A9/EOD3, un autre cytochrome P450 proche de KLU aurait une action similaire sur le développement des graines (Sun et al., 2010 ; Fang et al., 2012). De même, *AUXIN RESPONSE FACTOR2 (ARF2)* (Schruff et al., 2006) contrôle aussi la taille de la graine.

Les hormones

Des études transcriptomiques utilisant la microdissection laser ont permis de dresser un inventaire des gènes préférentiellement exprimés dans l'albumen au tout début du développement de la graine (Day et al., 2008). Parmi eux, de nombreux gènes impliqués dans la signalisation par les cytokinines ont été identifiés. Un triple mutant de récepteurs aux cytokinines, *ahk2 ahk3 ahk4*, produit des graines deux fois plus larges que le sauvage tout comme les surexprimeurs de cytokinines oxydases (Li et Berger, 2012). Cependant les mutations impliquant la voie des cytokinines ont de multiples effets pléiotropes et leur implication dans le développement de l'albumen n'est pour l'instant pas clairement établie (Li et Berger, 2012).

De plus, les gènes *GASA (GIBBERELLIC ACID-STIMULATED ARABIDOPSIS)*, dont l'expression est activée par les gibbérellines, seraient impliqués dans le contrôle du développement de la graine : le mutant *gasa4* présente de petites graines (Sun et al., 2010).

Introduction

2.4.2.4 Coordination de la croissance de l'albumen et de l'embryon

Etant donné que les trois compartiments de la graine (téguments, albumen et embryon) ont des origines génétiques différentes, le contrôle du développement de la graine est beaucoup plus complexe que celui de toute autre structure au sein de la plante. L'embryon est diploïde avec une copie du génome maternel et une copie du génome paternel. L'albumen est triploïde avec deux copies du génome maternel et une copie du génome paternel. Enfin, les téguments sont diploïdes avec une origine purement maternelle.

Pour assurer un développement harmonieux de la graine, une coordination temporelle et spatiale du développement de l'embryon, de l'albumen et de la testa est requise. Récemment, Fiume et Fletcher (2012) ont montré que *CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED8 (CLE8)*, un facteur de transcription exprimé dans l'embryon et dans l'albumen régulerait la division et la prolifération cellulaire chez l'embryon et l'albumen mais aussi la différenciation de ce dernier. CLE8 régulerait l'expression d'un facteur de transcription nommé *WUSCHEL-LIKE HOMEODOMAIN8 (WOX8)* (Fiume et Fletcher, 2012). Certains auteurs proposent que CLE8, sécrété en dehors de l'albumen, activerait la voie IKU décrite dans le paragraphe précédent à travers la reconnaissance du récepteur kinase IKU2 (Li et Berger, 2012).

En 2008, Kondou et collaborateurs (2008) démontrent que *RETARDED GROWTH OF EMBRYO1 (RGE1)*, aussi appelé *ZHOUP1 (ZOU)*, régule le développement de l'embryon après le stade cœur. Après fécondation, l'expression de *ZOU* est uniformément répartie dans l'ensemble de l'albumen puis devient restreinte à la région entourant l'embryon. Chez les mutants *zou*, la formation de la cuticule de l'embryon est altérée tout comme l'adhésion des cellules épidermiques. ZOU agirait donc à distance depuis l'albumen sur les cellules de l'épiderme de l'embryon (Yang et al., 2008). ZOU est nécessaire à l'expression d'*ALE1*, ces deux gènes constituant un système de régulation de la différenciation de l'épiderme de l'embryon (Tanaka et al., 2002). Ils agiraient de concert pour réguler la formation de la cuticule de l'embryon via deux récepteurs kinase nommés *GHASSO1* et *GHASSO2* exprimés dans l'embryon (Xing et al., 2013). Ainsi, l'albumen et les signaux qui en dérivent semblent essentiels au développement de l'embryon.

Introduction

En 2012, Hehenberger et collaborateurs (2012) observent qu'un défaut de cellularisation de l'albumen dans les mutants *fis2* et *ede1* conduit aussi à un défaut de développement de l'embryon. Selon les auteurs, une absence de cellularisation de l'albumen corrélant avec une augmentation de la quantité d'hexoses dans ce tissu suggère que l'arrêt du développement de l'embryon est la conséquence d'un manque d'apport nutritionnel (Hehenberger et *al.*, 2012).

Cependant, si l'albumen joue un rôle crucial dans le développement de l'embryon, le développement de l'albumen lui-même semble être indépendant des interactions avec l'embryon. Des expériences de fécondation *in vitro* de la cellule centrale isolée montrent que le développement de l'albumen ainsi formé suit les mêmes étapes qu'*in vivo*. De même, chez les mutants *fis* et *fie* dont la graine se développe sans fécondation et donc sans embryon, l'albumen achève sa cellularisation dans les temps.

Si, aujourd'hui, les étapes du développement de l'albumen semblent bien décrites, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent sa mise en place commencent à être élucidés mais demeurent parcellaires. Les différents mécanismes et les voies de signalisation impliqués dans la coordination du développement des trois compartiments de la graine font aussi l'objet d'intenses recherches.

III – La deuxième étape du développement de la graine chez Arabidopsis : la maturation

L'étape de maturation constitue un avantage évolutif acquis par une majeure partie des végétaux terrestres qui permet à ces derniers de stopper leur cycle de vie lorsque les conditions sont défavorables et de reprendre leur croissance lorsque les conditions deviennent meilleures (Bewley, 1997 ; Koorneef et *al.*, 2002).

L'étape de maturation de la graine est marquée par l'accumulation de composés de réserve, essentiellement des triacylglycérols (TAG) et des protéines de réserve chez *Arabidopsis*, et l'acquisition de la dormance et de la capacité à se dessécher.

Entre 7 et 10 jours après floraison, l'embryon termine sa croissance et remplit presque totalement la graine, le rapport des volumes entre embryon et albumen s'inverse progressivement jusqu'à ce

Introduction

que l'albumen ne représente plus qu'une seule couche cellulaire (Raz et *al.*, 2001). L'embryon photosynthétique accumule de l'amidon et les métabolismes lipidique et protéique sont activés (Baud et *al.*, 2002, Baud et Graham, 2006 ; Hills, 2004) (Figure 0.3).

Entre 11 et 16 jours après floraison, la quantité d'amidon décroît régulièrement alors que le taux de synthèse des acides gras et des protéines augmente progressivement (Baud et *al.*, 2002) (Figure 0.23).

Entre 17 et 20 jours après floraison, l'accumulation de composés de réserves cesse, l'embryon entre en dormance et devient tolérant à la dessiccation. La teneur en eau de la graine chute jusqu'à 10%, du stachyose et du raffinose mais aussi du saccharose s'accumulent contribuant à l'acquisition de la tolérance à la dessiccation (Bailly et *al.*, 2001 ; Baud et *al.*, 2002) (Figure 0.23).

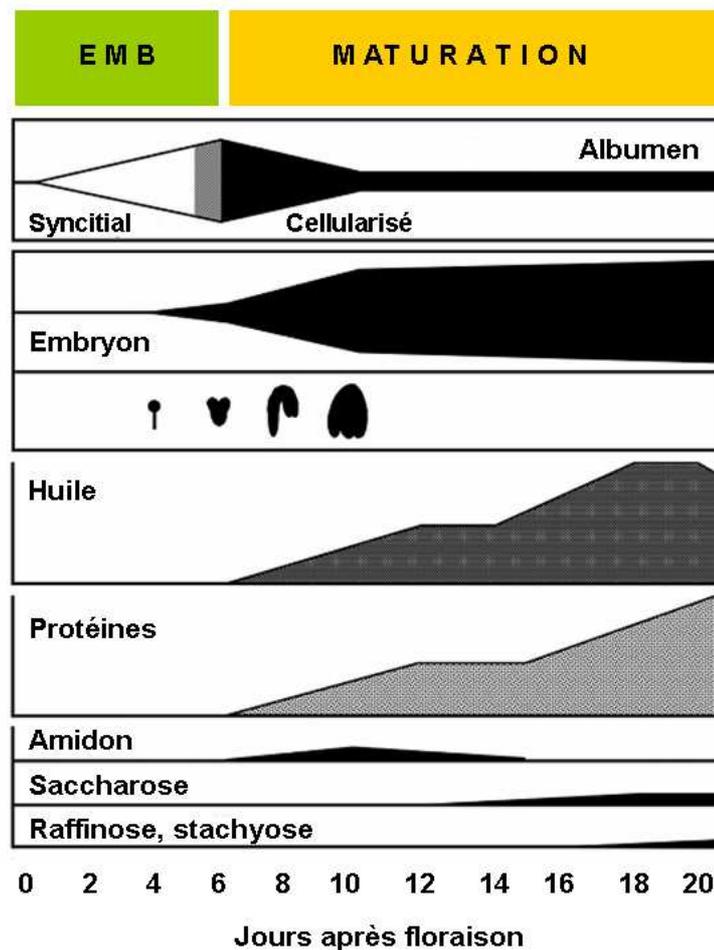


Figure 0.23. Représentation schématique du développement de la graine chez *Arabidopsis*.

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 cotylédons retournés en U. Une cinétique de l'accumulation des sucres, de l'huile et des protéines de réserve est présentée en parallèle. EMB, embryogenèse (Baud et *al.*, 2002, 2008).

Introduction

3.1 L'accumulation de composés de réserve au cours de la maturation

La graine accumule deux classes majeures de composés de réserve : des TAG dans des corps lipidiques et des protéines de réserve dans des corps protéiques, représentant chacun 30% de sa masse sèche. Les TAG sont utilisés lors de la germination comme source d'énergie et de carbone, les protéines comme source d'azote. Des analyses transcriptomiques, biochimiques, et cytologiques suggèrent que l'albumen, à l'instar de l'embryon, connaît un processus de maturation également marqué par une accumulation de composés de réserve (Belmonte et *al.*, 2012).

3.1.1 Origine des nutriments

Les graines sont des organes partiellement hétérotrophes dépendant des nutriments fournis par la plante mère pour leur croissance. Les nutriments sont apportés jusqu'à la graine via le phloème. Le tissu vasculaire se termine à l'extrémité du funicule, la graine en elle-même n'en possède pas (Figure 0.6). Les téguments externes permettraient le passage des nutriments sortant du phloème *via* les plasmodesmes : il s'agit d'une extension symplasmique du phloème funiculaire. Inversement, le transfert entre les téguments externes, les téguments internes, l'albumen et enfin l'embryon semble être apoplastique (Kim et Zambryski, 2005).

Durant les premiers stades de développement (stade globulaire), le suspenseur interviendrait dans la nutrition du jeune embryon (Yeung et Meinke, 1993). A partir du stade cœur, avec la différenciation de l'hypophyse, la liaison symplasmique au suspenseur est rompue et celui-ci commence à dégénérer.

Le transport entre différents tissus sans liaison symplasmique nécessite des transporteurs : un mécanisme d'export dans l'apoplasme et un mécanisme d'import dans le symplasme suivant. Les mécanismes impliqués dans les processus d'export ne sont pas bien élucidés. En revanche, les systèmes d'import semblent fonctionner en symport avec des protons (Schmidt et *al.*, 2007).

La position de l'albumen entre l'embryon et les tissus maternels suggère que celui-ci joue un rôle dans le transfert des nutriments de la plante mère vers l'embryon. Des études menées chez *Brassica rapa* montrent que chez les dicotylédones, espèces chez lesquelles les réserves sont souvent stockées majoritairement dans l'embryon, l'albumen servirait transitoirement de centre de stockage pour les nutriments (acides aminés et sucres) provenant des tissus maternels (Hill et *al.*, 2003 ; Weber et *al.*, 2005). L'albumen accumulerait des nutriments lors des stades précoces de

Introduction

développement puis deviendrait à son tour une source de nutriments pour l'embryon en fin de maturation (Hill et *al.*, 2003).

Le saccharose est la forme majeure de transport du carbone au sein de la plante. Trois des neuf transporteurs de saccharose (AtSUC) connus dans le génome d'*Arabidopsis* sont exprimés dans la graine. *AtSUC3* et *AtSUC2* sont exprimés dans l'albumen et *AtSUC5* est exprimé à la fois dans l'albumen et dans l'épiderme des cotylédons de l'embryon durant la phase d'embryogenèse et au début de la phase de maturation (Baud et *al.*, 2005 ; Pommerrenig et *al.*, 2012).

En ce qui concerne l'apport d'azote, trois transporteurs, les perméases d'acides aminés *AtAAP1* et *AtAAP8* et le transporteur de peptides *AtPRT2*, sont exprimés dans la graine. *AtAAP1* est exprimé durant les phases d'embryogenèse et de maturation (Hirner et *al.*, 1998). *AtAAP8*, exprimé dans les graines en maturation, intervient dans l'import d'acides aminés tels que l'aspartate et le glutamate (Schmidt et *al.*, 2007). *AtPRT2* participerait à l'import de composés organiques azotés réduits (Song et *al.*, 1997). Une famille de cinq transporteurs de sulfate (*SULTR3*) exprimés dans les tissus entourant l'embryon a aussi été caractérisée dans la graine (Zuber et *al.*, 2010).

3.1.2 Le métabolisme carboné primaire

Chez le colza (*Brassica napus*) et *Arabidopsis*, les nutriments fournis à l'embryon sont essentiellement du saccharose, du glucose, ou des acides aminés (Gln, Glu et Ala) (Schwender et Ohlrogge, 2002 ; Schwender et *al.*, 2006).

3.1.2.1 Le devenir des nutriments importés

Le saccharose entrant peut être clivé en glucose et fructose selon deux voies : *via* l'invertase (EC 2.4.1.13) ou *via* la voie de la saccharose synthase (SUS ; EC 3.2.1.26). Parmi les six membres de la famille des saccharose synthases (SUS) d'*Arabidopsis*, deux isoformes sont induites au cours de la maturation de la graine : SUS2 et SUS3 (Baud et *al.*, 2004).

Les hexoses phosphates résultant de ce clivage peuvent intégrer trois voies métaboliques différentes : (i) la voie de biosynthèse de l'amidon dans le plaste, (ii) la voie des pentoses phosphate et (iii) la voie de la glycolyse plastidiale ou cytosolique.

Introduction

La majorité des hexoses phosphate sont métabolisés par la voie glycolytique, fournissant ainsi des précurseurs à la synthèse d'acides gras. L'importance des deux voies, plastidiale ou cytosolique, est encore débattue. Cependant, les données transcriptomiques disponibles et l'analyse de mutants *pkpa-pkpβ1* semblent indiquer que la majorité des hexoses phosphate empruntent la voie glycolytique cytosolique jusqu'au phosphoenolpyruvate (PEP), qui pénètre alors dans le plaste *via* des transporteurs spécifiques appelés AtPPT1 et AtPPT2, pour être converti en pyruvate par la pyruvate kinase (PK ; EC .7.1.40) plastidiale (Figure 0.24).

L'étape suivante de décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA, CO₂ et NADH est catalysée par le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDC). Le PDC est une structure composée de trois enzymes, la pyruvate déshydrogénase (PDH, ou composant E1, EC1.2.4.1), la dihydrolipoamide acétyl-transférase (E2, EC2.3.1.12) et la dihydrolipoamide déshydrogénase (E3 ; EC1.8.1.4). Lors de la transformation du pyruvate en acétyl-CoA, un tiers du carbone est relargué sous forme de CO₂ (Figure 0.24).

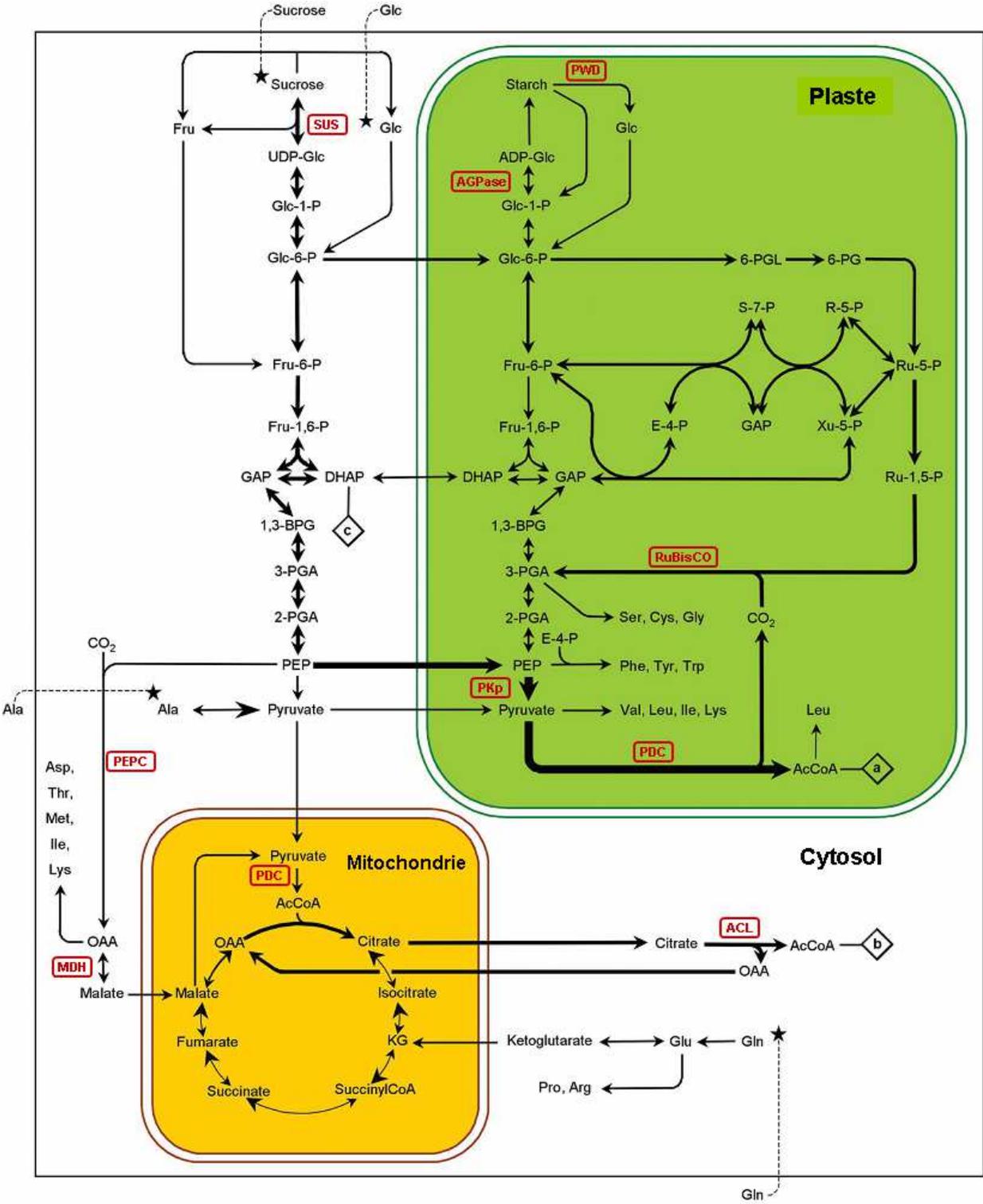
La Ribulose 1,5-Biphosphate Carboxylase/Oxygénase (RuBisCO) est capable de refixer ce CO₂ indépendamment du cycle de Calvin, augmentant l'efficacité d'utilisation du carbone dans les embryons en cours de maturation (Schwender et *al.*, 2004).

Une part importante du flux de carbone mitochondrial est destinée à la synthèse d'acétyl-CoA cytosolique par l'ATP citrate lyase (ACL). Cet acétyl-CoA sert de précurseur à l'élongation cytosolique des acides gras à très longues chaînes (Figure 0.24) (Baud et *al.*, 2008).

3.1.2.2 La mise en réserve transitoire d'amidon

L'accumulation d'amidon dans la graine atteint un pic environ 10 jours après floraison puis décroît graduellement au cours de la phase de maturation ; l'amidon est quasiment absent dans la graine sèche (Figure 0.23). Dans le plaste, le glucose-6-phosphate (Glc-6-P) est converti en glucose-1-phosphate (Glc-1-P) par la phosphoglucomutase (EC 2.7.5.1) puis en adénosine diphosphoglucose (ADP-Glc) par l'ADP-Glc pyrophosphorylase (AGPase, EC 2.7.7.27), une enzyme clé de cette voie de biosynthèse. L'incorporation d'unités de glucose dans les grains d'amidon est alors catalysée par l'amidon synthase. Inversement, le déstockage d'amidon est réalisé par les formes plastidiales d' α (EC 3.2.1.1) et β -amylase (EC 3.2.1.2) et par des phosphorylases (EC 2.4.1.1). L'équilibre entre synthèse et dégradation de l'amidon est le reflet du niveau d'expression des enzymes de chaque voie (Baud et *al.*, 2008) (Figure 0.24).

Introduction



Introduction

Figure 0.24. Schéma simplifié du métabolisme primaire dans des embryons au cours de la maturation chez *Arabidopsis*.

L'épaisseur des flèches est proportionnelle au flux net de carbone d'après les données biochimiques et transcriptomiques obtenues sur des graines en maturation. Les étoiles indiquent les métabolites directement importés de l'apoplasme. Quelques enzymes sont indiquées dans des boîtes rouges. Les lettres a, b, c marquent les liens avec les voies métaboliques présentées dans les figures suivantes (0.26 et 0.27). ACL, ATP citrate lyase ; ADP-Glc, adénosine diphosphoglucose ; AcCoA, acétyl-coenzyme A ; AGPase, ADP-glucose pyrophosphorylase ; 1,3-BPG, 1,3-bisphosphoglycérate ; DHAP, dihydroxyacétone-3-phosphate ; E-4-P, érythrose-4-phosphate ; Fru, fructose ; Fru-1,6-P, fructose-1,6-bisphosphate ; Fru-6-P, fructose-6-phosphate ; GAP, glycéraldéhyde-3-phosphate ; Glc, glucose ; Glc-1-P, glucose-1-phosphate ; Glc-6-P, glucose-6-phosphate ; KG, α -kétoglutarate ; MDH, malate déshydrogénase ; OAA, oxaloacétate ; PDC, complexe de la pyruvate déshydrogénase ; PEP, phosphoénolpyruvate ; PEPC, PEP carboxylase ; 6-PG, phosphogluconate ; 6-PGL, 6-phosphogluconolactone ; 2-PGA, 2-phosphoglycérate ; 3-PGA, 3-phosphoglycérate ; PKp, pyruvate kinase plastidiale ; PWD, phosphoglucane water dikinase ; R-5-P, ribose-5-phosphate ; RuBisCO, ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase ; Ru-1,5-P, ribulose-1,5-bisphosphate ; Ru-5-P, ribulose-5-phosphate ; SUS, saccharose synthase ; S-7-P, sédoheptulose-7-phosphate ; UDP-Glc, uridine diphosphoglucose ; Xu-5-P, xylulose-5-phosphate (Baud *et al.*, 2008).

L'intérêt de cette accumulation transitoire d'amidon est encore largement débattu. Plusieurs rôles lui sont attribués : (i) il pourrait contribuer à favoriser la synthèse de lipides en fournissant rapidement du carbone (Norton et Harris, 1975), (ii) il pourrait fournir des précurseurs à la synthèse de stachyose et raffinose en fin de maturation, (iii) il contribuerait à faire de l'embryon, un organe puits avant l'initiation du métabolisme lipidique (da Silva *et al.*, 1997).

3.1.3 Le métabolisme lipidique et les triacylglycérols

Les TAG sont des esters de glycérol et d'acides gras : un acide gras est estérifié sur chacune des trois fonctions alcool du glycérol. Ils sont stockés sous forme de gouttelettes lipidiques appelées oléosomes. Le métabolisme des TAG comprend trois grandes étapes : (1) la synthèse du squelette de glycérol et des acides gras, (2) l'assemblage des acides gras sur le squelette de glycérol et (3) la mise en réserve des TAG dans les oléosomes.

Huit acides gras sont retrouvés en proportions importantes dans la graine d'*Arabidopsis* : 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:0, 20:1, 22:1 (Voir l'annexe 6 pour des précisions sur la nomenclature des acides gras). Les acides gras possédant plus d'une insaturation dans leur chaîne aliphatique sont appelés PUFA (PolyUnsaturated Fatty Acids : 18:2 et 18:3). Ils représentent 53 à 66% des

Introduction

acides gras de la graine d'*Arabidopsis* selon l'écotype considéré (O'Neill et *al.*, 2003). Les acides gras à plus de 18 atomes de carbone sont appelés VLCFA (Very Long Chain Fatty Acids : 20:0, 20:1 ou 22:1). Ils représentent 15 à 25% des acides gras de la graine selon l'écotype considéré (Figure 0.25).

Les acides gras sont répartis de la manière suivante dans la graine : à 60% dans les cotylédons, 30% dans la radicule et l'hypocotyle et 10% dans l'albumen (O'Neill et *al.*, 2003 ; Penfield et *al.*, 2004 ; Li et *al.*, 2006). En comparant la composition en acides gras de ces différents tissus, on s'aperçoit que les mêmes espèces sont présentes partout (Penfield et *al.*, 2004). Cependant, l'hypocotyle et la radicule renferment plus de 16:0, 18:2 et 18:3 que les cotylédons (Li et *al.*, 2006).

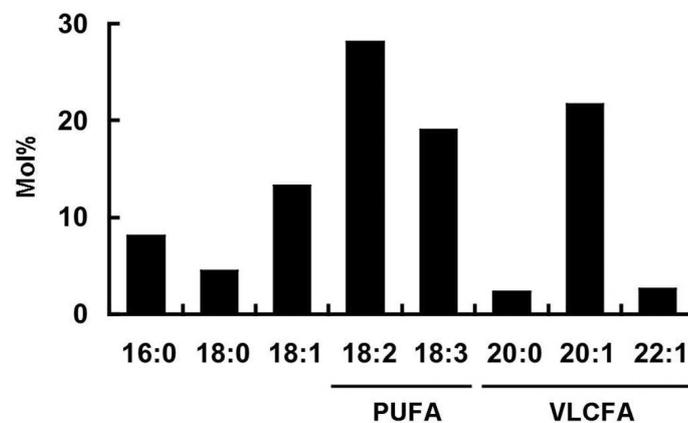


Figure 0.25. Composition en acides gras d'une graine d'*Arabidopsis* (écotype Ws).

PUFA, acides gras polyinsaturés; VLCFA, acides gras à très longue chaîne. (Nomenclature des acides gras présentée en annexe 6) (Baud et *al.*, 2002, 2008).

3.1.3.1 La synthèse du squelette de glycérol

Le glycérol-3-phosphate (Gly-3-P) constitue le squelette des molécules de TAG. Il peut être synthétisé par deux enzymes différentes chez les plantes : (i) la glycérol kinase (GlyK ; EC 2.7.1.30), une enzyme cytosolique qui convertit le glycérol en Gly-3-P, et (ii) la Gly-3-P déshydrogénase (Gly3PDH ; EC 1.2.1.12), qui convertit la dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et le NADH en Gly-3-P et NAD⁺ (Baud et *al.*, 2008).

3.1.3.2 La synthèse des acides gras

Les acides gras sont synthétisés dans le plaste à partir d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA. L'acétyl-CoA carboxylase hétéromérique (ACCase, EC 6.4.1.2) catalyse la formation de malonyl-CoA à partir

Introduction

d'acétyl-CoA et de bicarbonate (Figure 0.26). C'est une étape clé du processus de synthèse des acides gras (Thelen et Ohlrogge, 2002). L'ACCase catalyse une réaction en deux temps : (i) la carboxylation d'une biotine liée au domaine central du complexe enzymatique (BCCP) à partir de bicarbonate par son domaine biotine carboxylase (BC), (ii) le transfert du groupe carboxyl de la biotine sur l'acétyl-CoA par son domaine carboxyltransférase (CT).

Le malonyl-CoA ainsi produit constitue la molécule utilisée pour l'allongement des acides gras. Avant d'entrer dans la voie de biosynthèse des acides gras proprement dite, le malonyl est transféré du Coenzyme A à une protéine porteuse d'acyl (ACP) par la malonyl-CoA:ACP transacylase (EC 2.3.1.39) (Figure 0.26).

La synthèse *de novo* d'acides gras est réalisée selon un processus cyclique faisant intervenir le complexe de l'acide gras synthase qui comprend : la 3-kétoacyl-ACP synthase (KAS, EC 2.3.1.41), la 3-kétoacyl-ACP réductase (EC 1.1.1.100), la 3-hydroxyacyl-ACP déshydratase (EC 4.2.1.?) et l'énoyl-ACP réductase (MOD1, EC 1.3.1.9). L'acétyl-CoA sert à initier le cycle de production et d'élongation de la chaîne acylée, le malonyl-CoA fournit les carbones permettant l'élongation de l'acide gras. Le malonyl-CoA est d'abord condensé sur l'acétyl-CoA par KASIII, puis successivement sur les différents acyl-ACP par KASI (4:0-ACP à 16:0-ACP) et KASII (16:0-ACP à 18:0-ACP). Chaque étape de condensation est suivie d'une étape de réduction du groupement carbonyle, d'une étape de déshydratation et enfin d'une seconde étape de réduction de la double liaison en *trans* pour aboutir à un acide gras saturé avec deux atomes de carbone supplémentaires (Figure 0.26).

Quelques molécules de 16:0-ACP sortent du complexe tandis que d'autres sont allongées jusqu'au 18:0-ACP. La majeure partie des 18:0-ACP produits sont désaturés par une stéaroyl-ACP désaturase (SAD, EC 1.14.19.2) plastidiale en 18:1 *cis*- Δ^9 (Figure 0.27). Les SAD constituent une famille multigénique composée de sept membres chez *Arabidopsis*. *FAB2* est le gène prépondérant codant l'enzyme responsable de la production de la majorité des acides gras monoinsaturés de la graine (la structure et l'activité catalytique des enzymes de la famille des SAD seront détaillées dans le premier paragraphe du chapitre IV). Ainsi, le 16:0-ACP et le 18:1-ACP constituent les deux produits majoritaires de la voie de biosynthèse des acides gras dans le plaste (Figures 0.26 et 0.27).

Ces acyl-ACP sont alors hydrolysés par une acyl-ACP thioestérase (FAT) libérant des acides gras libres. Sur la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste, ces acides gras libres se voient fixer un groupement Coenzyme A (CoA) par une acyl-CoA synthase (Figure 0.27).

Introduction

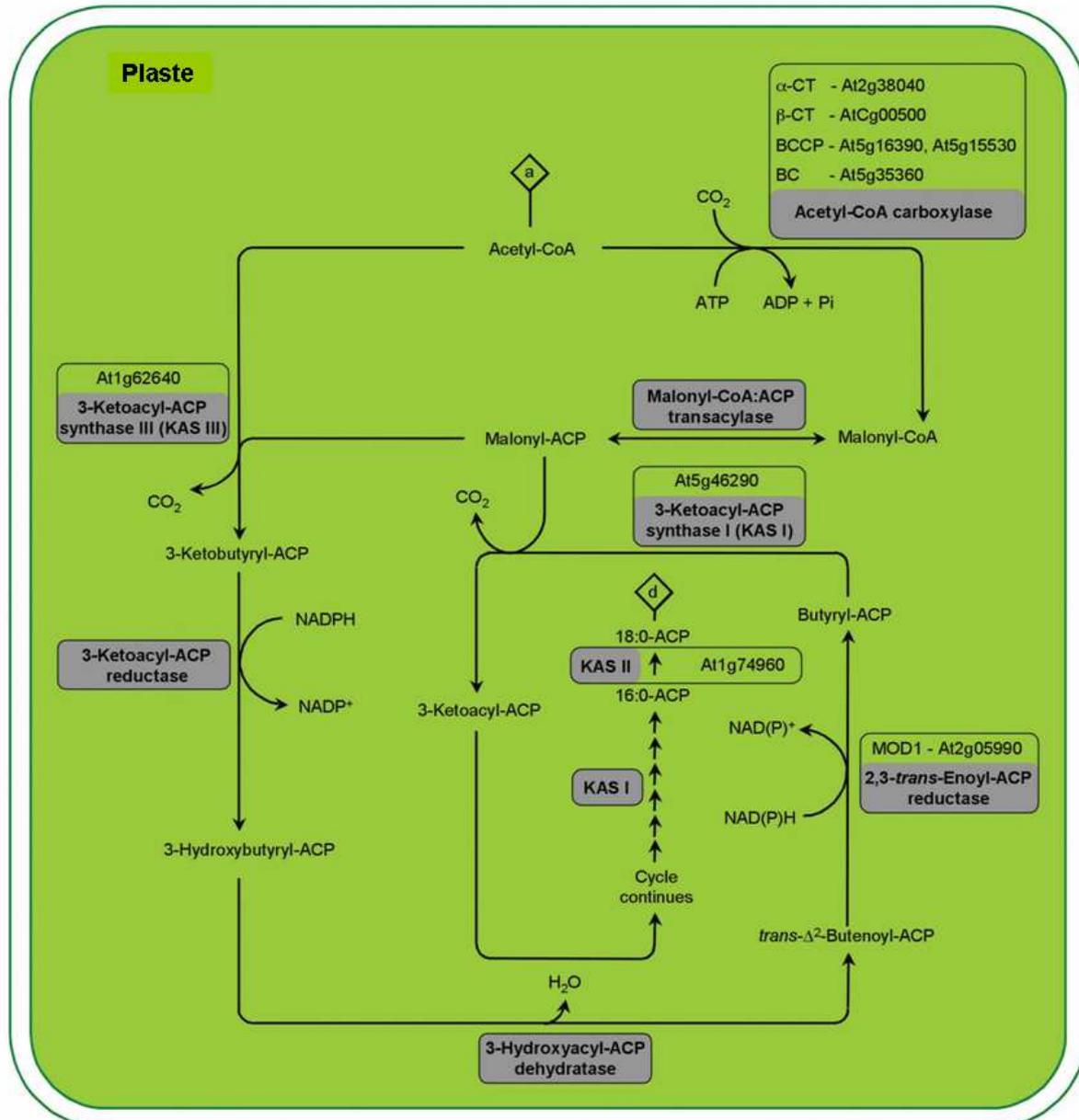


Figure 0.26. Synthèse des acides gras dans le plaste d'embryons en maturation chez Arabidopsis.

Les acides gras sont synthétisés par ajout séquentiel de deux carbones sur une chaîne acylée. La première réaction de condensation est catalysée par la kétoacyl-ACP synthase III (KASIII). Au cours des cycles suivants, les réactions de condensation sont catalysées par KASI. Finalement, la conversion du 16:0 en 18:0 est catalysée par KASII. ACP, protéine porteuse d'acyl ; CoA, Coenzyme A. Les lettres a et d marquent les liens avec les voies métaboliques présentées dans les figures 0.24 et 0.27 (Baud et al., 2008).

Introduction

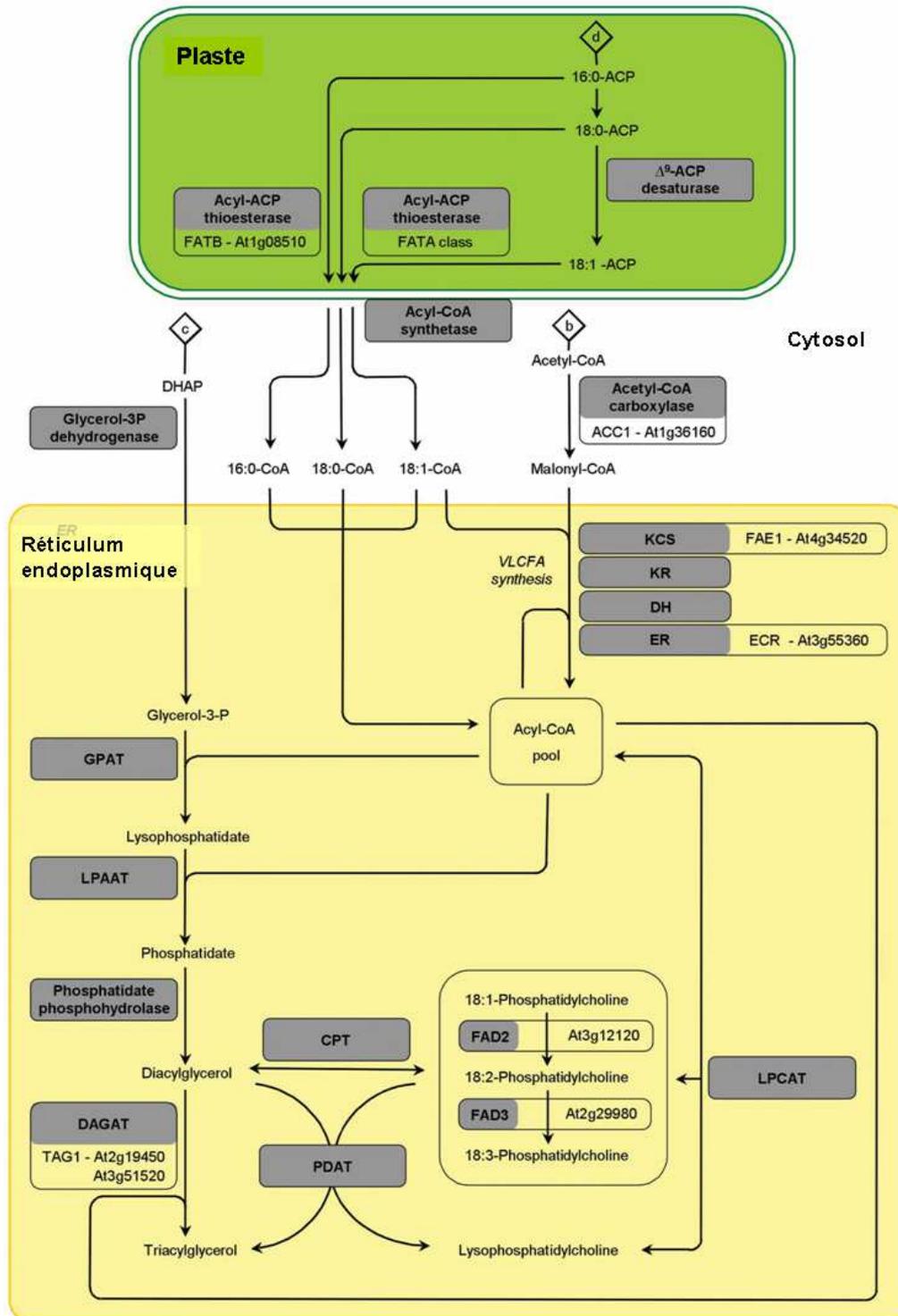


Figure 0.27. Schéma simplifié des réactions impliquées dans l'assemblage des triacylglycérols dans les graines d'Arabidopsis.

Les acides gras sont synthétisés dans le plaste et exportés vers le cytosol. Les squelettes de glycérol sont issus de la dihydroxyacétone phosphate (DHAP) cytosolique grâce à l'action de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase. Les enzymes de la voie de Kennedy catalysent l'assemblage de triacylglycérols (TAG) dans le réticulum endoplasmique. Le rôle de la PDAT (acyl-CoA indépendante phospholipides:diacylglycérol acyltransférase) est présenté. FAD2, oléoyl désaturase ; FAD3, linoléoyl désaturase. Les lettres b, c et d marquent les liens avec les voies métaboliques présentées dans les figures 0.24 et 0.26 (Baud et *al.*, 2008).

Introduction

3.1.3.3 La modification des acides gras

Les acides gras à très longue chaîne (VLCFA)

Ils représentent approximativement 25% des acides gras totaux de la graine d'Arabidopsis (écotype Col-0). Leur synthèse se déroule dans le réticulum endoplasmique grâce à l'action du complexe de l'élongase de manière analogue à la synthèse *de novo* des acides gras : (i) condensation du malonyl-CoA sur une chaîne d'acyl-CoA par la 3-kéto-acyl-CoA synthase (KCS), (ii) réduction en β -hydroxyacyl-CoA par la 3-kétoacyl-CoA réductase, (iii) déshydratation en énoyl-CoA par la 3-hydroxyacyl-CoA déshydratase et (iv) réduction de l'énoyl-CoA en acyl-CoA par l'énoyl-CoA réductase (Figure 0.27). La première étape du processus catalysée par la KCS est l'étape limitante du processus, elle assurerait la spécificité de l'acide gras allongé en sélectionnant la longueur de la chaîne acylée entrant dans le complexe (Millar et Kunst, 1997 ; Blacklock et Jaworski, 2006). Le malonyl-CoA utilisé pour l'élongation des acides gras a une origine cytosolique : du citrate est converti en acétyl-CoA et oxaloacétate par l'ATP citrate lyase (ACL, EC 4.1.3.8), puis l'ACCase cytosolique homomérique catalyse la formation de malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA formé et de bicarbonate (Figures 0.26 et 0.27).

Les acides gras polyinsaturés (PUFA)

Ils représentent approximativement 50% des acides gras totaux de la graine d'Arabidopsis (écotype Col-0). On trouve essentiellement l'acide linoléique (18:2 *cis*- $\Delta^{9,12}$) et l'acide linoléique (18:3 *cis*- $\Delta^{9,12,15}$). La synthèse de ces deux acides gras est issue d'une désaturation séquentielle de l'acide oléique (18:1 *cis*- Δ^9) en acide linoléique par la *cis*- Δ^{12} oléate désaturase (FAD2), puis en acide linoléique par la *cis*- Δ^{15} linoléate désaturase (FAD3). Toutes deux adressées au réticulum endoplasmique, ces enzymes, ancrées dans la membrane, agissent sur des acides gras estérifiés le plus souvent sur une molécule de phosphatidylcholine (PC) et utilisent les électrons provenant du cytochrome b5 (Figure 0.27).

Introduction

3.1.3.4 L'assemblage des triacylglycérols

L'assemblage des TAG est réalisé dans le réticulum endoplasmique à partir du Gly-3-P et des chaînes acylées produites dans le plaste. Plusieurs voies partiellement redondantes ont été décrites qui participent à la synthèse des TAG. La plus anciennement caractérisée est la voie de Kennedy (Figure 0.27) : les acides gras sont séquentiellement estérifiés sur les positions *sn-1* et *sn-2* du Gly-3-P. La première acylation est catalysée par la Gly-3-P acyltransférase (GPAT ; EC 2.3.1.15) pour former de l'acide lysophosphatidique (LPA) qui est à son tour acylé par la LPA acyltransférase (LPAAT ; EC 2.3.1.51) pour former de l'acide phosphatidique (PA). La déphosphorylation du PA par la PA phosphorylase (PAP ; EC 3.1.3.4) libère du 1,2 *sn*-diacylglycérol (DAG). Enfin, un troisième acide gras est estérifié en position *sn-3* du DAG par la DAG acyl-transférase (DGAT ; EC 2.3.1.20). Le glycérol est une molécule asymétrique, ses différents groupes alcool ne sont donc pas équivalents. Des analyses stéréochimiques montrent que les acides gras saturés sont préférentiellement estérifiés en *sn-1* et *sn-3* alors que les acides gras insaturés sont principalement estérifiés en *sn-2*.

La CDP-choline:DAG choline phosphotransférase (CPT ; EC 2.7.8.2 ; CDP, cytosine diphosphate) permet d'échanger des chaînes acylées entre le DAG et la PC. Comme mentionné dans le paragraphe précédent, les PUFA sont synthétisés à partir de la PC, la CPT favoriserait ainsi leur incorporation dans les TAG (Figure 0.27).

Récemment, un second mécanisme de synthèse des TAG a été décrit. La phospholipides:DAG acyltransférase (PDAT ; EC 2.3.1.158) catalyse la synthèse de TAG à partir de DAG en prélevant un acide gras sur la PC ou la phosphatidyléthanolamine (PE). Un sous-produit de cette réaction, la lysophosphatidylcholine est reconverti en PC ou PE par l'acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransférase (LPCAT ; EC 2.3.1.23) en utilisant un acyl-CoA (Figure 0.27).

3.1.3.5 Stockage des triacylglycérols dans les oléosomes

Les TAG s'accumulent dans des structures subcellulaires de 0,2 à 2,5 μm de diamètre appelées oléosomes. Ils sont composés d'une matrice de TAG entourée par une monocouche de phospholipides dont la chaîne aliphatique est orientée vers la matrice de TAG et le groupement phosphate vers la face cytosolique. Les oléosomes sont générés à partir du réticulum endoplasmique mais le mécanisme précis de leur formation reste encore discuté. Les TAG s'accumuleraient au milieu de la bicouche lipidique de la membrane du réticulum, formant un

Introduction

bourgeon qui s'individualise du réticulum grâce à l'intervention de protéines insérées dans la bicouche de phospholipides (Figure 0.28) (Napier et al., 1996). Ces protéines représentent 1 à 4% du poids des oléosomes.

Le protéome des oléosomes d'*Arabidopsis* comprend par ordre décroissant d'abondance cinq oléosines : S1/OLEO5, S2/OLEO4, S3/OLEO1, S4/OLEO2 et S5/OLEO3, une caléosine (CLO1), une stéréoléosine (HSD1), une aquaporine (TIP3.2) et une protéine liée au glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Jolivet et al., 2004 ; Jolivet et al., 2009). Récemment, trois oléosines supplémentaires et minoritaires ont été identifiées chez *Arabidopsis*. Kim et collaborateurs (2002) ont classé ces oléosines en deux groupes : (i) le premier correspondant au cinq oléosines déjà citées, (ii) le second comprenant des oléosines exprimées dans les graines en développement et les microspores, SM1, SM2 et SM3.

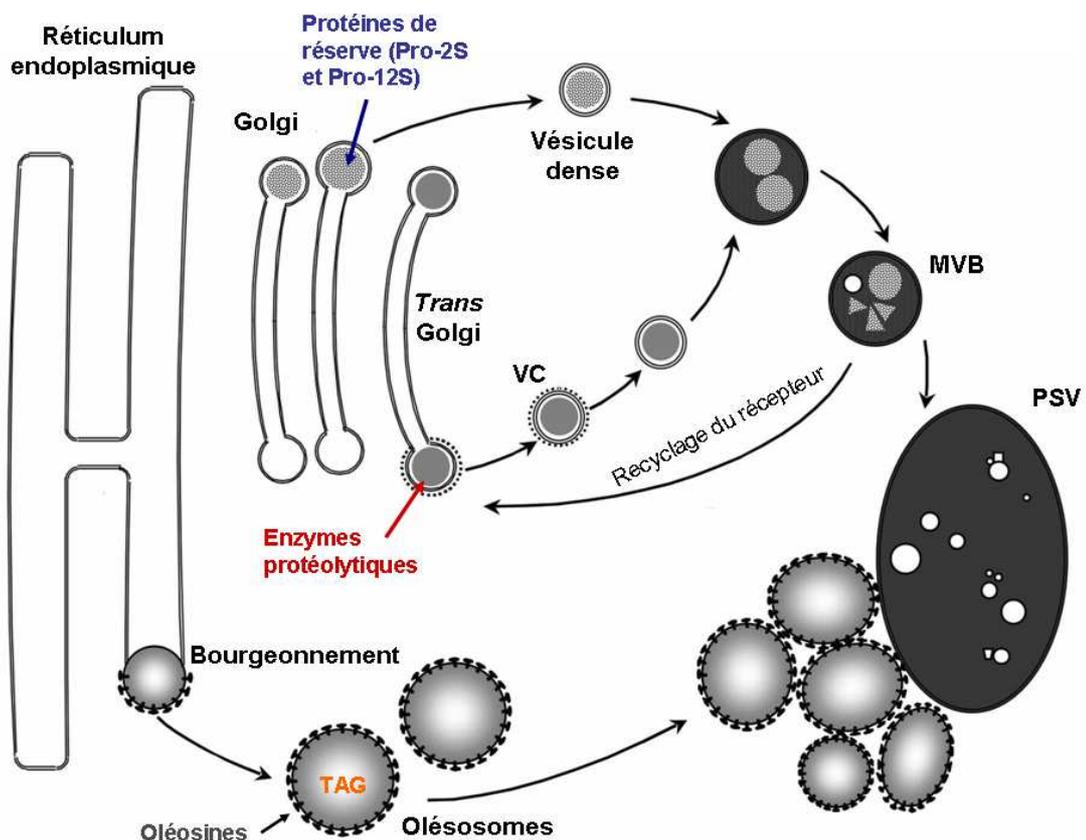


Figure 0.28. Biogenèse et trafic vésiculaire des structures de réserve dans les graines d'*Arabidopsis* en cours de maturation.

VC, Vésicules recouvertes de clathrine ; MVB, corps multivésiculaire ; PSV, vacuoles de stockage des protéines ; TAG, triacylglycérols (Otegui et al., 2006 ; Baud et al., 2008).

Introduction

Les oléosines sont les protéines majoritaires des oléosomes. Amphiphiles, elles contiennent trois domaines structuraux : un domaine central hydrophobe très conservé inséré dans la matrice de TAG des oléosomes et des domaines N-ter et C-ter hydrophiles positionnés à la surface des oléosomes (Huang et *al.*, 1996 ; Abell et *al.*, 1997 ; Frandsen et *al.*, 2001). L'accumulation des oléosines au cours du processus de maturation détermine la taille des oléosomes. En fin de maturation, les oléosines assurent la stabilité des oléosomes par des phénomènes de répulsions électrostatiques, empêchant leur coalescence au cours de la phase de dessiccation de la graine (Tzen et *al.*, 1992) (Figure 0.28). Ainsi, les oléosomes présentent un rapport surface/volume élevé optimisant l'accès des lipases lors de la phase de remobilisation des réserves durant la germination (Leprince et *al.*, 1998).

3.1.4 Le métabolisme protéique et les protéines de réserve

Une partie du métabolisme carboné mitochondrial permet la synthèse d'aspartate et des acides aminés qui en dérivent *via* l'oxaloacétate. De plus, l'embryon en croissance importe des acides aminés, glutamine et alanine, utilisés directement pour la synthèse de protéines de réserve ou pour la synthèse d'autres acides aminés par transamination et désamination (Schwender et *al.*, 2006).

3.1.4.1 Diversité

Dans les graines d'*Arabidopsis*, il existe deux grands types de protéines de réserve : les cruciférines ou globulines de type 12S (Sjodahl et *al.*, 1991 ; Li et *al.*, 2007) et les napines ou albumines de type 2S (Krebbes et *al.*, 1988 ; van der Klei et *al.*, 1993). Les cruciférines s'accumulent sous forme de complexes comprenant six sous-unités α et six sous-unités β liées par des ponts disulfures. Chez *Arabidopsis*, quatre gènes codent des précurseurs de cruciférines, *CRA1*, *CRB*, *CRC* et *At1g03890*. Ces précurseurs subissent une maturation par clivage protéolytique.

Les napines s'accumulent sous forme d'hétérodimères constitués de deux sous-unités, une petite et une grande, générées par clivage d'un précurseur et liées par des ponts disulfures (Krebbes et *al.*, 1988 ; Guerche et *al.*, 1990). Cinq gènes codent des précurseurs de napines chez *Arabidopsis*, *At2S1*, *At2S2*, *At2S3*, *At2S4* et *At2S5/At2S-like*. A cela s'ajoute des protéines de réserve minoritaires codées par un gène proche des vicilines et deux gènes proches des globulines (Fujiwara et *al.*, 2002).

Introduction

3.1.4.2 Synthèse et stockage

Les précurseurs des protéines de réserve sont insérés au cours de leur synthèse dans le réticulum endoplasmique puis transitent par l'appareil de Golgi (Figure 0.28). Lorsqu'elles sont insérées dans le réticulum endoplasmique, les cruciférines sont clivées par une asparaginyl endopeptidase pour donner leurs formes matures constituées d'une chaîne lourde α et d'une chaîne légère β liées par des ponts disulfures. L'hétérogénéité des assemblages hexamériques rend la détermination de leur structure quaternaire difficile (Whithana-Gamage et al., 2011). La protéolyse des napines est plus complexe et nécessite le clivage de trois propeptides pour générer les deux polypeptides matures liés par des ponts disulfures (Krebbes et al., 1988) (Figure 0.29).

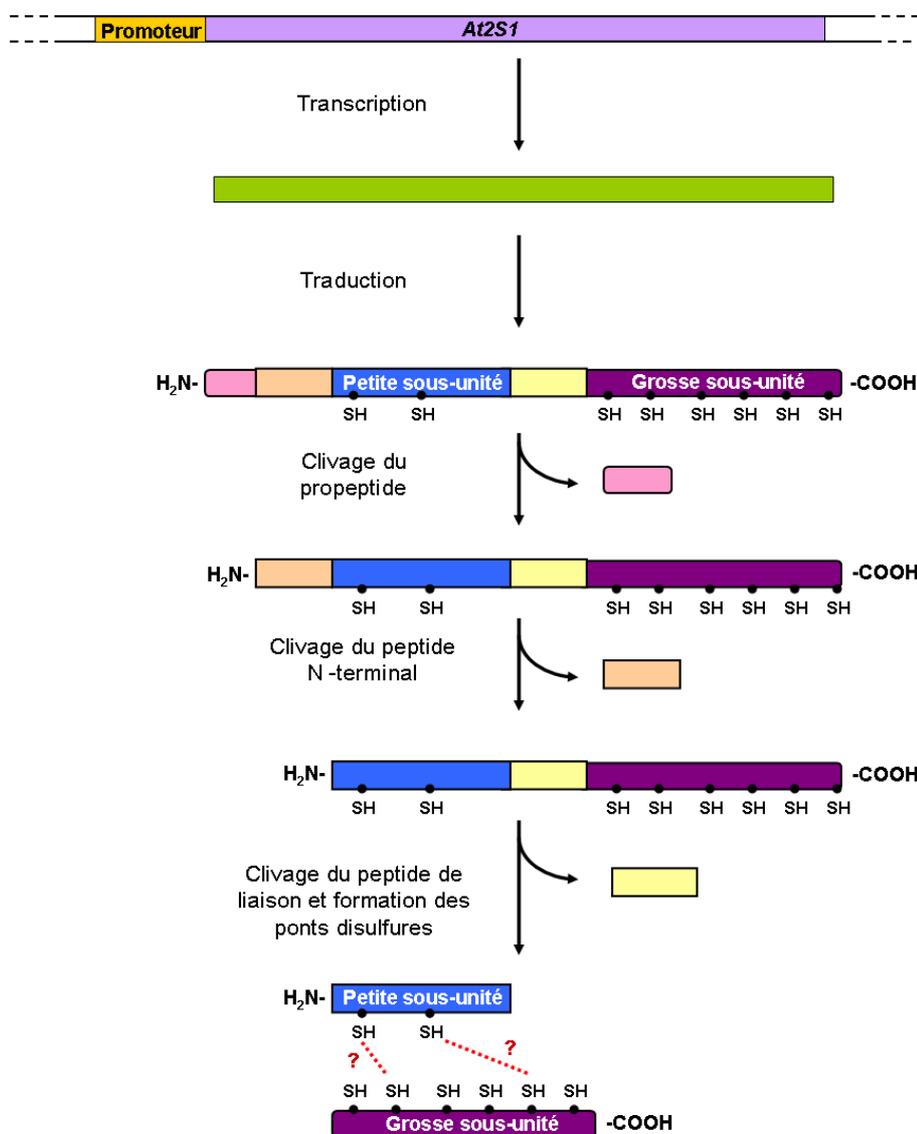


Figure 0.29. Schéma simplifié de la maturation des protéines de réserve de type napine. (Krebbes et al., 1988).

Introduction

Dans l'appareil de Golgi, les protéines de réserve en cours de maturation s'accumulent à la marge des citernes du *cis*-Golgi et donnent naissance à des vésicules denses (DV) lorsqu'elles atteignent le réseau *trans*-golgien. En parallèle, les enzymes protéolytiques nécessaires à la remobilisation de ces protéines lors de la germination sont empaquetées dans des vésicules recouvertes de clathrines qui finissent par fusionner avec les DV pour former des corps multivésiculaires (MVB) qui sont en réalité des compartiments prévacuolaires (Otegui et *al.*, 2006) (Figure 0.28). Ces MVB finissent par se transformer en vacuoles de stockage (PSV) renfermant les protéines de réserve solubles et des globoïdes (Gillespie et *al.*, 2005) (Figure 0.28).

Si les mécanismes protéolytiques de maturation sont aujourd'hui bien connus, le rôle de cette étape demeure incertain. Le changement de conformation protéique qui en résulte pourrait favoriser le compactage de ces protéines et leur stockage à long terme dans les vacuoles appropriées, un compartiment qui contient aussi les protéases nécessaires à leur remobilisation durant la germination (Gruis et *al.*, 2004).

3.2 Les processus de la maturation tardive : La dessiccation et l'entrée en dormance

La fin de la maturation est marquée par une diminution progressive de la teneur en eau de la graine, processus nommé dessiccation, et son entrée en dormance, c'est à dire l'entrée en vie ralentie. Le processus de dessiccation consiste en la perte progressive du contenu en eau de la cellule puis de la sphère d'hydratation des molécules. L'acquisition de la tolérance à la dessiccation est associée à de nombreux processus cellulaires : le stockage de disaccharides tels que du raffinose, la synthèse de protéines de réserve, de protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant), de protéines de choc thermique, l'activation de systèmes antioxydants, la modification structurale de la cellule. A mesure que la graine perd son contenu en eau, le cytosol des cellules se densifie et sa viscosité augmente, ressemblant à une matrice compacte et vitreuse (Hoekstra et *al.*, 2001 ; Angelovici et *al.*, 2010). Le processus de dessiccation est sous contrôle de la balance hormonale ABA/GA, des voies de signalisation impliquant les sucres et de facteurs de remodelage de la chromatine. Des études transcriptomiques et métabolomiques semblent montrer qu'au cours du processus de dessiccation, la graine se prépare à germer, transformant radicalement son activité d'un régime de maturation à un régime de germination.

Introduction

La dormance se définit comme l'incapacité d'une graine viable et saine à germer dans des conditions pourtant optimales. La dormance dite primaire est induite durant le développement de la graine et peut être levée par stratification au froid humide. La dormance dite secondaire apparaît lorsque des graines imbibées non dormantes rencontrent des conditions défavorables. La dormance est donc influencée à la fois par des facteurs endogènes et environnementaux. Les graines fraîchement récoltées sont profondément dormantes, dormance levée progressivement au cours de leur stockage à sec (Figure 0.30).

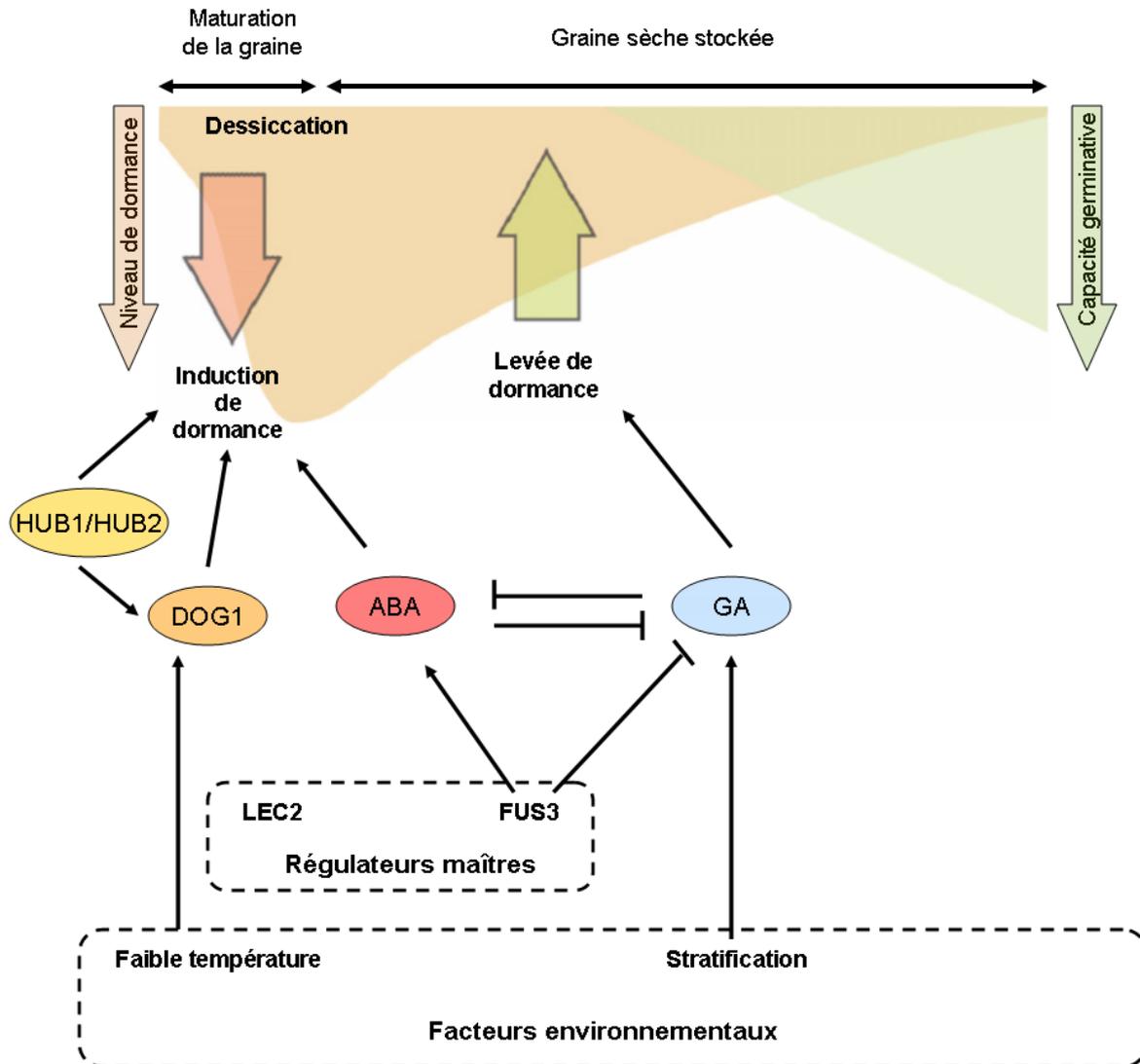


Figure 0.30. Modèle hypothétique de régulation du processus d'entrée en dormance.

Le niveau de dormance (beige) augmente au cours de la maturation de la graine et diminue au cours de la période de stockage des graines aboutissant à une fenêtre où la germination devient possible. Les facteurs majeurs induisant la dormance sont l'ABA (acide abscissique), DOG1 et HUB1/HUB2. Les gibbérellines (GA) sont nécessaires à la germination et les voies de signalisation de ces deux hormones agissent de manière antagoniste. DOG1, DELAY OF GERMINATION 1 ; FUS3, FUSCA3 ; HUB1/HUB2, MONOUBIQUITINATION1 ; LEC2, LEAFY COTYLEDON2 (Graeber et al., 2012).

Introduction

L'ensemble des processus de maturation se met progressivement en place à la suite de la phase d'embryogenèse. Cette étape du développement de la graine tout comme les transitions qui la sépare de l'embryogenèse, d'une part, et de la germination, d'autre part, sont finement régulées.

3.3 La régulation de la maturation de la graine

La régulation de la maturation de la graine est un processus complexe mettant en jeu de très nombreux régulateurs, hormonaux, transcriptionnels ou chromatinien.

3.3.1 Les régulateurs maîtres

L'isolement et la caractérisation de mutants n'entrant pas en phase de maturation et présentant des phénotypes de viviparité a permis l'identification des gènes clefs régulant le processus de maturation appelés régulateurs maîtres (Wobus et Weber, 1999 ; Vicente-Carbajosa et Carbonero, 2005). Les régulateurs maîtres sont au nombre de cinq chez *Arabidopsis*, FUSCA3 (FUS3), ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (ABI3), LEAFY COTYLEDON1 (LEC1), LEAFY COTYLEDON1-LIKE (L1L) et LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) (Santos-Mendoza et *al.*, 2008).

3.3.1.1 Les mutants des régulateurs maîtres

Les mutants *lec*

Les mutants *lec* (pour *leafy cotyledon*) ont été isolés il y a près de 20 ans par Meinke et collaborateurs (1994). Leurs cotylédons présentent des caractéristiques foliaires comme la présence de trichomes ainsi qu'une coloration pourpre résultat de l'accumulation d'anthocyanes.

Les embryons mutants *lec1* ont un phénotype prononcé. En plus de ceux décrits ci-dessus, leurs cotylédons portent des stomates, leurs méristèmes apicaux caulinaires sont élargis et ils sont intolérants à la dessiccation (Meinke et *al.*, 1992 ; West et *al.*, 1994 ; Lotan et *al.*, 1998). Enfin, les embryons mutants *lec1* accumulent moins de réserves lipidiques et protéiques (Meinke et *al.*, 1992) (Figures 0.31a et d et 0.32).

Le phénotype des mutants *lec2* est beaucoup plus faible que celui des mutants *lec1* (Figure 0.31c et f et 0.32). Les embryons *lec2* présentent un défaut d'accumulation de composés de réserve

Introduction

essentiellement dans les cotylédons et non dans l'hypocotyle (Meinke et *al.*, 1994 ; Stone et *al.*, 2001 ; To et *al.*, 2006) (Figure 0.32). Le phénotype des mutants *lec2* est peu marqué, peu pénétrant et très variable par rapport à celui des autres mutants des régulateurs maîtres.

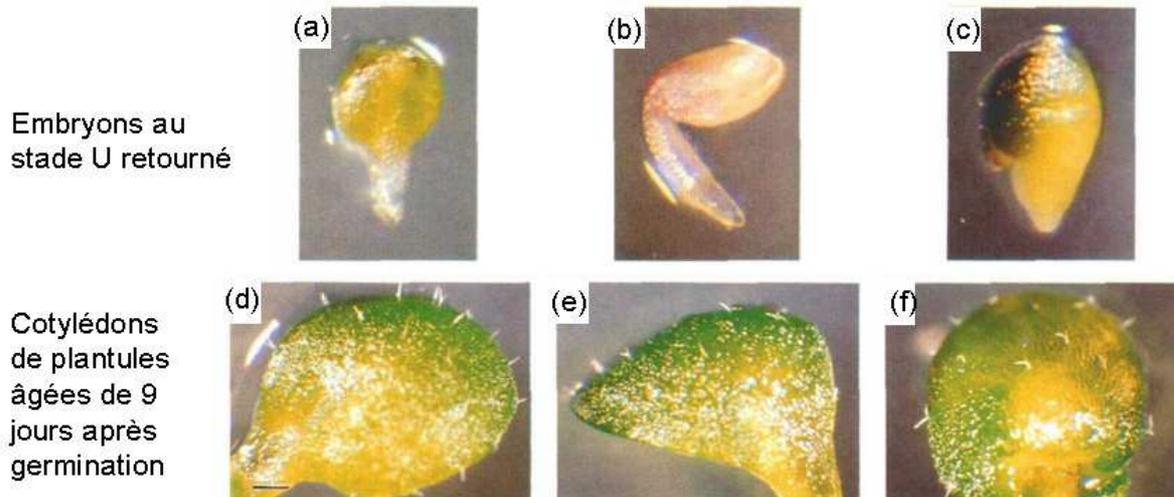


Figure 0.31. Quelques phénotypes des mutants *lec1*, *lec2* et *fus3*.

Des embryons au stade cotylédons retournés (a-c) et des cotylédons de plantules de 9 jours présentant des trichomes (d-f) chez les mutants *lec1* (a et d), *fus3* (b et e) et *lec2* (c et f) sont présentés (Meinke et *al.*, 1994).

Les mutants *fus3*

Comme les mutants *lec*, les mutants *fus3* présentent un défaut d'accumulation de composés de réserve (protéines et lipides) et des cotylédons pourpres aux caractéristiques foliaires (trichomes) (Baumlein et *al.*, 1994 ; Keith et *al.*, 1994 ; Luerksen et *al.*, 1998 ; Gazzarrini et *al.*, 2004) (Figures 0.31b et e et 0.32).

Les mutants *abi3*

Les mutants *abi3* sont résistants à l'ABA. Par voie de conséquence, leurs graines sont intolérantes à la dessiccation mais non affectées dans l'identité des cotylédons (Koornneef et *al.*, 1984 ; Koornneef et *al.*, 1989 ; Giraudat et *al.*, 1992 ; Meinke et *al.*, 1992 ; Nambara et *al.*, 2000). De plus, la mutation *abi3* semble affecter la quantité et la qualité des lipides et protéines mis en réserve (Parcy et *al.*, 1994 ; Nambara et *al.*, 1995 ; Parcy et *al.*, 1997). Les graines des mutants *abi3* sont aisément identifiables par leur absence de dégradation de la chlorophylle à l'état mature (Figure 0.32).

Introduction

	Sauvage	<i>abi3</i>	<i>fus3</i>	<i>lec2</i>	<i>lec1</i>	<i>l1l</i>
Accumulation de chlorophylle dans les graines sèches	Non	Oui	Non	Oui, partiellement	Oui	Non
Anthocyanes dans les cotylédons	Non	Non	Oui	Oui, partiellement	Oui	Non
Expression des protéines de réserve	Normal	Réduite	Réduite	Réduite	Réduite	?
Contenu en TAG	Normal	Réduite	Réduite	Réduite	Réduite	Normal*
Trichomes	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Non
Tolérance à la dessiccation	Oui	Non	Non	Oui	Non	Oui

Figure 0.32. Tableau récapitulatif des principaux phénotypes des mutants des régulateurs maîtres.

* Barthole et *al.*, données non publiées. TAG, triacylglycérol (Meinke et *al.*, 1994 ; To et *al.*, 2006 ; Yamamoto et *al.*, 2009).

Tous les mutants des AFL (*ABI3/FUS3/LEC2*), excepté *l1l*, dont il n'a pas été fait mention ici, présentent un défaut d'accumulation des composés de réserve au sein de la graine plus ou moins prononcé et une identité cellulaire modifiée, suggérant une transition directe de l'embryogenèse à la germination sans maturation préalable (Figure 0.32).

3.3.1.2 Les protéines

Les facteurs de type B3

FUS3, *ABI3* et *LEC2* codent des facteurs de transcription de la famille B3 (Giraudat et *al.*, 1992 ; Meinke et *al.*, 1994 ; Luerssen et *al.*, 1998 ; Gazzarrini et *al.*, 2004 ; Stone et *al.*, 2001). Cette famille est divisée en cinq sous-groupes : les facteurs de type ARF (Auxin Response Factor), le sous-groupe REM (REproductive Meristem), le sous-groupe RAV (Related to *ABI3/VP1* ; Kagaya et *al.*, 1999), le sous-groupe HSI/VAL (High level expression of Sucrose Inducible gene/*VP1/ABI3*-Like ; Suzuki et *al.*, 2007) et enfin les facteurs de type *ABI3* (Figure 0.33a) (Romanel et *al.*, 2009). Historiquement, le domaine de liaison à l'ADN des facteurs de transcription B3, constitué de 120 acides aminés, a été identifié chez l'homologue d'*ABI3* du maïs, appelé *VP1* (Suzuki et *al.*, 1997).

Introduction

Le domaine B3 de RAV1 a été le premier à être cristallisé. Il présente sept feuillets β suivis de deux hélices α . Ces données ont permis par la suite de déterminer par modélisation la structure des domaines B3 des autres protéines de la famille (Yamasaki et al., 2004 ; Romanel et al., 2009) (Figure 0.33b). FUS3, ABI3 et LEC2 appartiennent au sous-groupe de ABI3 qui reconnaît les éléments *cis* de type SpH/Ry (CATGCA).

La protéine ABI3 contient un domaine acide A1 en N-ter et trois domaines basiques B1, B2 et B3. B1 et B2 sont impliqués dans des interactions protéiques, par exemple avec ABI5 (Finkelstein et Lynch, 2000) (Figure 0.33c). FUS3 contient à la fois un domaine B3 et un domaine B2 (Luerssen et al., 1998). LEC2 contient uniquement un domaine B3 (Figure 0.33c).

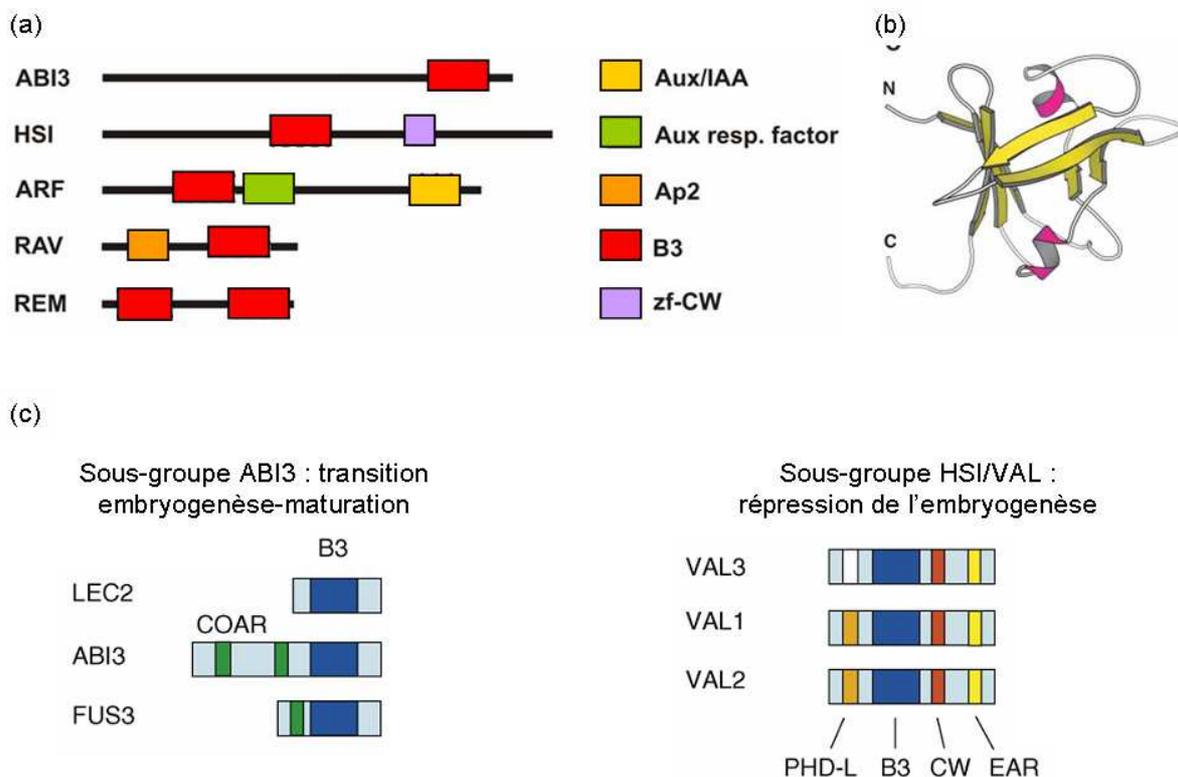


Figure 0.33. Diagramme présentant l'organisation en domaines des différents sous-groupes de la famille B3 chez Arabidopsis et structure tridimensionnelle de ABI3.

(a) Les diagrammes présentés sont basés sur la séquence de ABI3, HSI2/VAL, ARF1, RAV1, VRN1 (REM). Les protéines de la famille REM contiennent de 1 à 11 domaines B3. (b) La structure de ABI3 comprend sept feuillets β (jaunes) et deux hélices α (roses). (c) Détail de la structure des protéines du sous-groupe ABI3 et HSI/VAL. Domaine B3 (bleu), domaines B1 et B2 (verts), domaine PHD-like (orange), domaine CW (rouge), et motif EAR (jaune). ABI3 a en plus un domaine CO-Activateur/co-Répresseur (COAR). VAL3 possède un domaine PHD-like incomplet (blanc). EAR, ERF Associated amphiphilic Repression; PHD, Plant Homeo Domain (Yamasaki et al., 2004 ; Suzuki et al., 2007 ; Romanel et al., 2009).

Introduction

LEC1 et LEC1L

LEC1 code une protéine homologue à la sous-unité HAP3 des facteurs de levure liant les boîtes CCAAT, encore nommés NF-Y (Lotan et *al.*, 1998 ; Lee et *al.*, 2003). Ces complexes sont constitués de plusieurs sous-unités différentes chez les mammifères et les levures. *LEC1* est composé de trois domaines : le domaine A, le domaine B liant vraisemblablement l'ADN, et le domaine C.

L1L est considéré comme le cinquième régulateur maître de la graine en raison de sa forte identité avec *LEC1*. Sur la base de la similarité de séquence de leurs domaines B, tous deux appartiennent à la même classe de sous-unités HAP3 dite de type *LEC1*.

3.3.1.3 Patron d'expression des régulateurs maîtres

Le patron d'expression de ces cinq gènes maîtres a été caractérisé essentiellement par l'utilisation de gènes rapporteurs fusionnés au promoteur natif et par RT-PCR, leur faible niveau d'expression rendant l'utilisation des approches d'hybridation *in situ* particulièrement difficile (Figure 0.34).

LEC1 est détecté dans l'embryon et l'albumen au début de la morphogenèse précoce de l'embryon (Lotan et *al.*, 1998 ; Lee et *al.*, 2003). *LEC1L* est exprimé majoritairement dans l'embryon et faiblement dans l'albumen aux stades précoces, avec un pic d'expression 8 jours après floraison (Kwong et *al.*, 2003 ; Yamamoto et *al.*, 2009). *LEC2* est majoritairement exprimé de manière précoce dans l'embryon et faiblement dans l'albumen à 12 jours après floraison (Stone et *al.*, 2001 ; Kroj et *al.*, 2003) (Figure 0.34). L'expression de *FUS3* est restreinte au protoderme de l'embryon (Gazzarrini et *al.*, 2004). Son expression spécifique dans cette couche (sous contrôle du promoteur d'*ATML1*) restaure d'ailleurs la quasi totalité du phénotype des mutants *fus3* (Gazzarrini et *al.*, 2004). *ABI3* est exprimé dans l'ensemble de l'embryon à partir de 10 jours après floraison et dans quelques organes végétatifs, notamment les méristèmes latéraux (Rohde et *al.*, 2000 ; To et *al.*, 2006) (Figure 0.34).

Introduction

	<i>LEC2</i>	<i>FUS3</i>	<i>ABI3</i>	<i>LEC1</i>
	Santos <i>et al.</i> unpubl. To <i>et al.</i> , 2006	Gazzarini <i>et al.</i> , 2004	To <i>et al.</i> , 2006	Lotan <i>et al.</i> , 1998
Coeur				 + albumen
Torpille				 + albumen
U-retourné	 + albumen			 + albumen

Figure 0.34. Patron d'expression des gènes des régulateurs maîtres au cours du développement de la graine d'Arabidopsis.

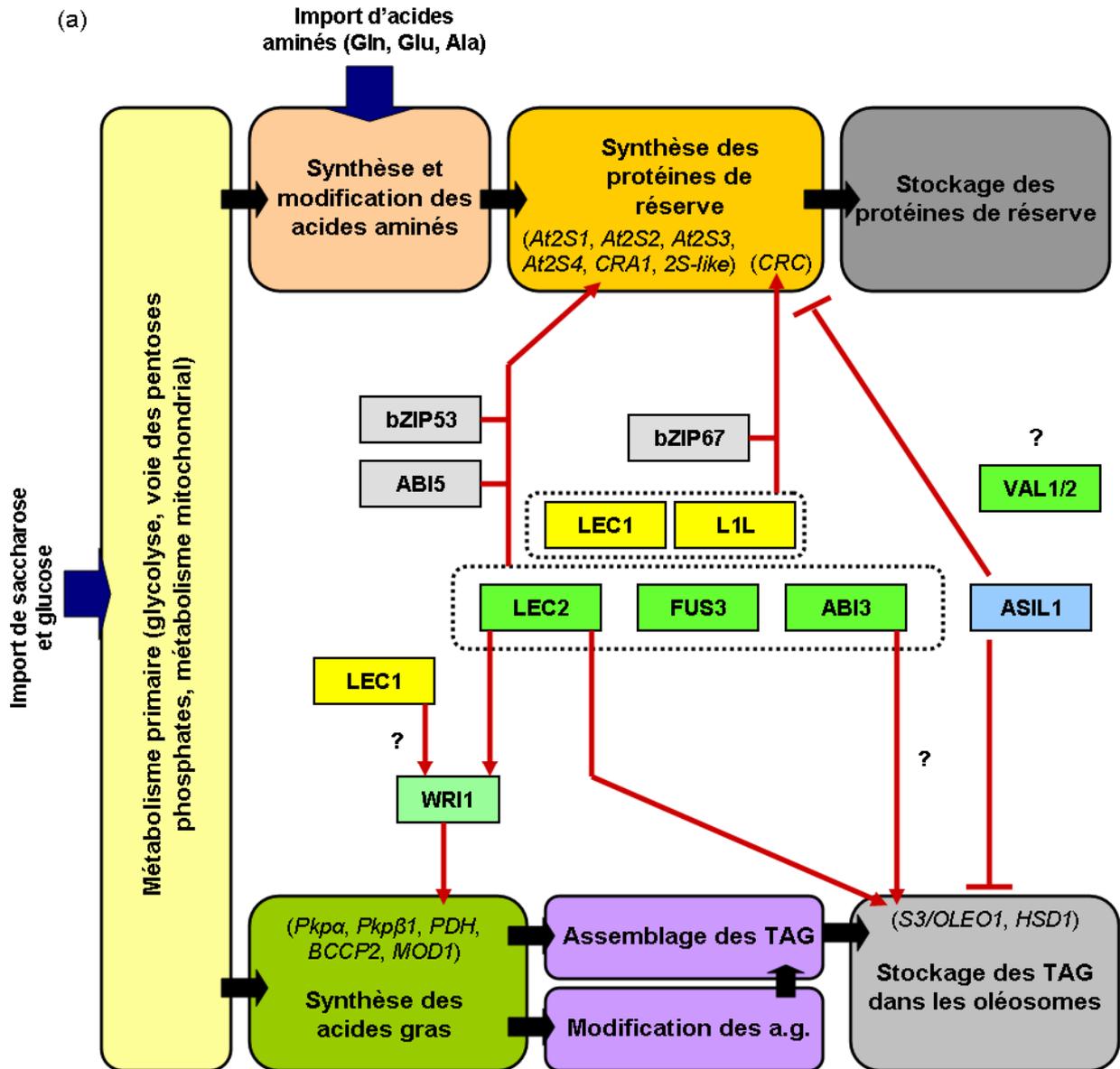
La zone d'expression des différents gènes est marquée en rouge. Le patron d'expression a été déterminé grâce à une fusion du promoteur avec le gène rapporteur *uidA* pour *LEC2*, un promoteur et l'ADNc fusionnés à la GFP pour *FUS3*, et par hybridation *in situ* pour *ABI3* et *LEC1* (Kroj *et al.*, 2003 ; Santos-Mendoza *et al.*, 2008).

3.3.1.4 Mode d'action et cibles des régulateurs maîtres

Au tout début du processus d'embryogenèse, *LEC1*, *LEC2* et *FUS3* maintiennent l'identité des cotylédons. Ces mêmes gènes, associés à *ABI3*, sont impliqués dans le contrôle de la transition embryogenèse-maturation et plus particulièrement dans la régulation de l'expression des gènes codant des protéines de réserve ou des acteurs du métabolisme des TAG (comme les oléosines) (Figures 0.35 et 0.36).

LEC1 peut induire l'expression de gènes codant des protéines de réserve (*CRC*) directement, en interagissant avec des facteurs comme bZIP67 (Yamamoto *et al.*, 2009), ou indirectement, en induisant *FUS3* et *ABI3* (Kagaya *et al.*, 2005). Il serait aussi impliqué dans la régulation de la biosynthèse des acides gras via *FUS3*, *ABI3* et *WRINKLED1* (*WRI1*) (Mu *et al.*, 2008) (Figure 0.35).

Introduction



(b)

Facteurs de transcription			Famille	Élément <i>cis</i> reconnu
ABI5	bZIP67	bZIP53	Facteur bZIP	Boîte G
VAL1/2	ABI3	FUS3	Facteur B3	Boîte RY
	LEC1L	LEC1	Sous-unité HAP3 de CBF	CCAAT
		WRI1	Facteur AP2-EREBP	Motif AW
		ASIL1	Arabidopsis 6b-interacting protein1-like1	Boîte GT

Introduction

Figure 0.35. Modèle du contrôle de la synthèse et de l'accumulation des composés de réserve au sein de la graine d'Arabidopsis au cours de la maturation.

Les précurseurs d'acides gras dérivent du saccharose *via* la glycolyse ou la voie des pentoses phosphates. Les acides gras sont synthétisés dans les plastides et exportés dans le cytosol sous forme d'acyl-CoA, acylés sur un squelette de glycérol pour former les triglycérides (TAG), lesquels sont stockés dans les oléosomes. Les acides aminés importés, synthétisés ou modifiés, sont utilisés pour produire des protéines de réserve. Les flèches rouges et les barres T représentent les régulations transcriptionnelles positives et négatives, respectivement. Les gènes cibles codant les enzymes participant aux différentes voies métaboliques sont indiqués sur le schéma. ABI3, ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 ; a.g., acides gras ; AP2-EREBP, APETALA2-ethylene responsive element-binding protein ; ASIL1, ARABIDOPSIS 6B-INTERACTING PROTEIN 1-LIKE1 ; BCCP2, BIOTIN CARBOXYL CARRIER PROTEIN2 ; bZIP, basic leucine zipper ; CBF, CAAT box-binding factor ; FUS3, FUSCA3 ; HSD1, HydroxyStéroïde Déshydrogénase1 ; LEC1, LEAFY COTYLEDON1 ; L1L, LEAFY COTYLEDON1-LIKE ; LEC2, LEAFY COTYLEDON2 ; MOD1, enoyl-ACP réductase ; PDHp, Pyruvate DésHydrogenase plastidiale ; PKp, Pyruvate Kinase plastidiale ; S3/OLEO1, Oléosine S3 ; VAL, VP1/ABI3-LIKE ; WRI1, WRINKLED1 (Baud et *al.*, 2008, Baud et *al.*, 2010).

L1L complémente le mutant *lec1* sous contrôle du promoteur de *LEC1*. Comme *LEC1*, il est capable d'activer l'expression de *CRC* mais aussi de la *SUCROSE SYNTHASE2 (SUS2)* en présence d'ABA ou d'un facteur de transcription liant les ABA Responsive Elements (ABRE) (Yamamoto et *al.*, 2009). Enfin, Yamamoto et collaborateurs (2009) ont pu montrer par co-immunoprécipitation que *L1L* et *bZIP67* (un facteur liant les ABRE) forment un complexe protéique *in vivo*.

Des données transcriptomiques, de RT-PCR quantitative mais aussi l'utilisation de systèmes inductibles montrent que *LEC2* contrôlerait directement l'expression de gènes de protéines de réserve tels que *At2S1*, *At2S2*, *At2S3*, *At2S4*, *At2S5/2S-like* et *CRA1* mais aussi d'oléosines telles que *S3/OLEO1* et *HSD1* (HydroxyStéroïde Déshydrogénase1) ou encore de *WRI1* en se liant aux séquences régulatrices de type Sph/RV (Kroj et *al.*, 2003 ; Santos Mendoza et *al.*, 2005 ; Braybrook et *al.*, 2006 ; Baud et *al.*, 2007 ; Baud et *al.*, 2009) (Figure 0.35). De plus, *LEC2* agirait probablement sur le métabolisme des GA en réprimant l'expression de *AtGA3ox2*, une enzyme clef de la biosynthèse des GA (Curaba et *al.*, 2004).

Introduction

FUS3 régulerait aussi l'expression de gènes de protéines de réserve (comme *At2S3*) directement *via* les éléments RY (Reidt et *al.*, 2000) et indirectement *via* l'ABA (Kagaya et *al.*, 2005). De récentes analyses d'immunoprécipitation de la chromatine couplées à de la transcriptomique confirment ces données et montrent que FUS3 régule l'expression de différents miARN, et de *VAL1/HSI2*, un répresseur de la transcription (Wang et Perry, 2013). Enfin, FUS3 réprimerait comme LEC2 la biosynthèse des GA *via* *AtGA3ox2* (Curaba et *al.*, 2004) (Figures 0.35 et 0.36).

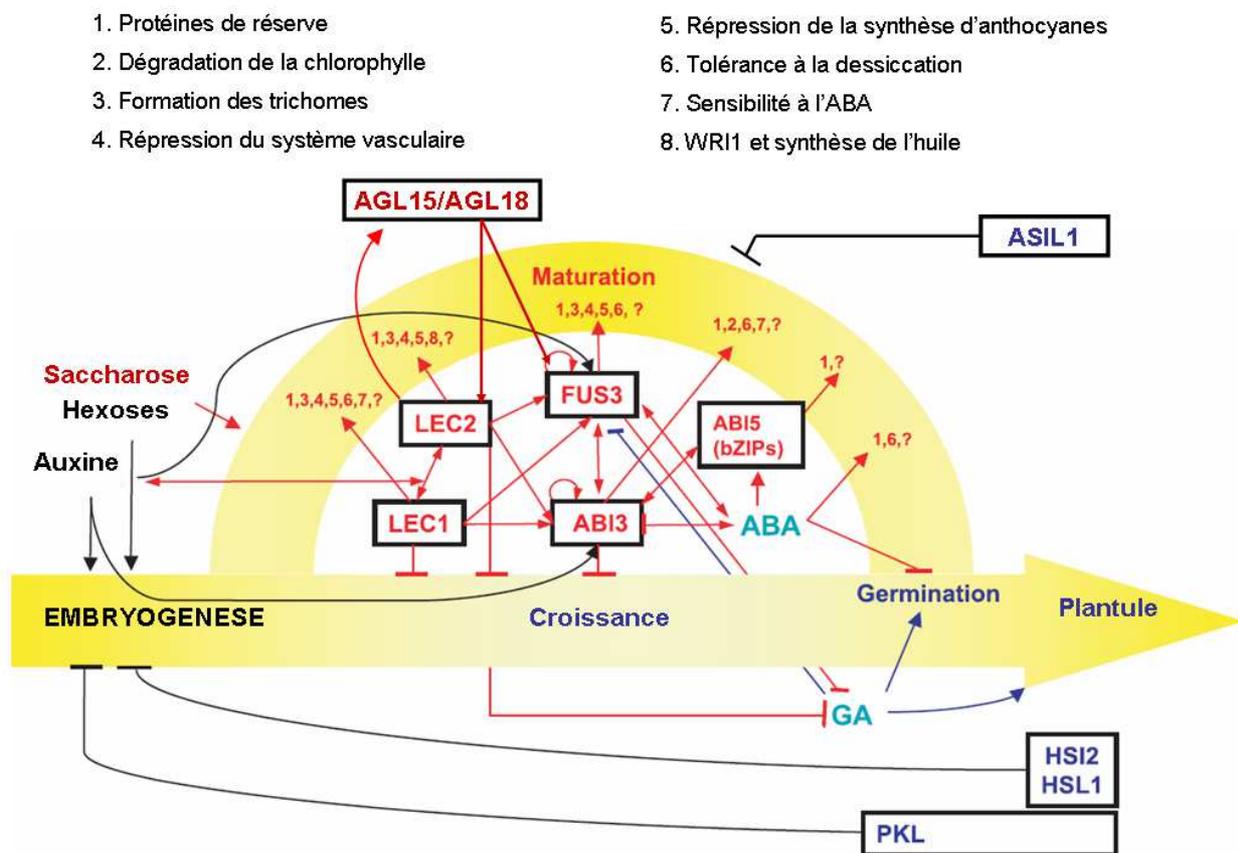


Figure 0.36. Modèle présentant les interactions génétiques et moléculaires entre les acteurs du réseau de régulation du processus de maturation de la graine d'Arabidopsis.

Les flèches et les barres T indiquent des effets positifs et négatifs, respectivement. Les facteurs qui induisent ou maintiennent la maturation sont indiqués en rouge. Les facteurs qui répriment le processus de maturation sont indiqués en bleu. Les chiffres indiquent les différents processus régulés par ces facteurs. ABA, acide abscissique ; ABI3, ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 ; ABI5, ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 ; AGL15/18, AGAMOUS-LIKE 15/18 ; ASIL1, ARABIDOPSIS 6B-INTERACTING PROTEIN 1-LIKE1 ; bZIP, basic leucine zipper ; FUS3, FUSCA3 ; GA, acide gibbérellique ; HSI2/HSL1, High level expression of Sucrose Inducible gene/HSI2-like1 ; LEC1, LEAFY COTYLEDON1 ; L1L, LEAFY COTYLEDON1-LIKE ; LEC2, LEAFY COTYLEDON2 ; PKL, PICKLE ; WRI1, WRINKLED1 (Santos Mendoza et *al.*, 2008).

Introduction

Enfin ABI3, comme tous les autres régulateurs maîtres cités au préalable, activerait directement l'expression de gènes de protéines de réserve comme le gène *napA* de *B. napus* (Ezcurra et al., 1999 ; Reidt et al., 2000). De même, une étude combinant des approches d'immunoprécipitation de la chromatine, de transcriptomique, de RT-PCR quantitative et d'expression transitoire a permis d'identifier 98 cibles putatives de ABI3 (Mönke et al., 2012). Les auteurs proposent ainsi une liste exhaustive des gènes pouvant être régulés par ABI3, essentiellement des gènes codant des napines, des cruciférines, des oléosines, ou des LEA (Figure 0.35). Outre son implication dans la maturation en tant que telle, ABI3 serait impliqué dans la régulation de la maturation tardive, des phénomènes de dormance et de germination, mais aussi dans le développement des racines latérales (Santos-Mendoza et al., 2008 ; Khandelwal et al., 2010).

Des approches de type simple hybride, des expériences réalisées *in vitro* et *in vivo* montrent que les facteurs de transcription de type B3 encore nommés AFL (ABI3, FUS3 et LEC2) reconnaissent les éléments RY (CATGCA) présents dans les promoteurs de leurs gènes cibles (Reidt et al., 2000 ; Kroj et al., 2003 ; Mönke et al., 2004 ; Braybrook et al., 2006 ; Mönke et al., 2012). Parfois, les boîtes RY ne sont pas suffisantes pour activer la transcription des gènes cibles en question et des éléments *cis* de type boîte G (CACGTG) liés par des facteurs de transcription de type bZIP tels que bZIP10, bZIP25 ou bZIP53 contribuent à l'activation de ces gènes cibles, en particulier de ceux codant les protéines de réserve (Lara et al., 2003 ; Alonso et al., 2009 ; Mönke et al., 2012).

Ainsi le domaine B3 de ABI3 interagirait avec les éléments RY/G quand son domaine B2 entreprendrait des liens avec les protéines du complexe liant le motif ABRE (une boîte de type G). Par exemple, ABI5 (bZIP) se fixe sur les éléments de réponse à l'ABA (ABRE) présents dans les promoteurs de nombreux gènes codant des protéines LEA comme *AtEM1* et *AtEM6* (Finkelstein et Lynch, 2000). Il a été montré que ABI3 induit l'expression de *ABI5* et que les protéines ABI3 et ABI5 agissent en tandem sur les promoteurs de leurs gènes cibles (Nakamura et al., 2001 ; Lopez-molina et al., 2002 ; Sakata et al., 2010) (Figure 0.37). Enfin, ABI4, un facteur de transcription de la famille APETALA2 (AP2) agirait dans le même complexe que ABI3 et ABI5 (Brocard-Gifford et al., 2003 ; Finkelstein et al., 2008).

Introduction

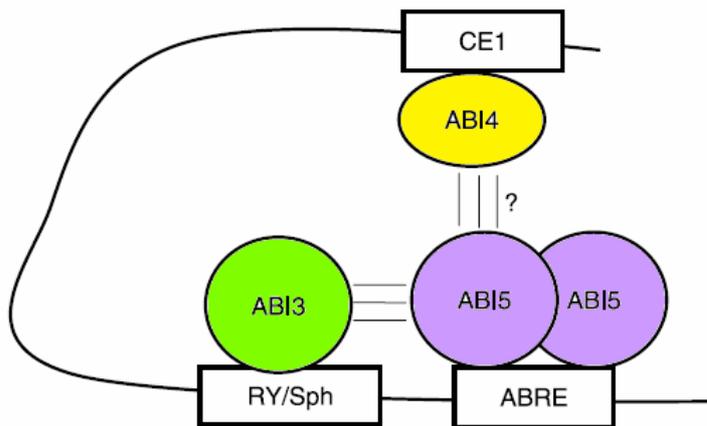


Figure 0.37. Complexe d'activation de la transcription du facteur ABI3.

ABI5 est un facteur de transcription de type bZIP qui se fixe sur les boîtes ACGT contenant l'élément de réponse à l'ABA (ABRE). ABI3 et ABI4 se fixent respectivement sur les éléments RY/Sph et l'élément de couplage 1 (CE1). ABA, Acide abscissique ; ABI, ABSCISIC ACID INSENSITIVE (Nambara et al., 2010).

3.3.1.5 Un réseau complexe de relations au sein des régulateurs maîtres

Les mutants *lec2*, *fus3* et *abi3* présentent à la fois des phénotypes similaires et spécifiques. De nombreuses études génétiques ont été conduites pour déterminer les interactions existant entre ces différents gènes (Parcy et al., 1997 ; Raz et al., 2001 ; Nambara et al., 2003). L'introduction des promoteurs des différents AFL fusionnés à un gène rapporteur dans différents fonds mutants *abl* a permis d'entrevoir la complexité des relations qui les unissent (To et al., 2006). Par exemple, l'expression de *FUS3* est régulée à la fois par LEC2 et *FUS3* lui-même dans la pointe racinaire, par LEC2 et ABI3 dans l'hypocotyle, et par les trois AFL et LEC1 dans les cotylédons. L'expression d'*ABI3* est aussi contrôlée par les quatre AFL dans les cotylédons. Ces modèles sont en accord avec les données d'expression ectopiques montrant que LEC1 et LEC2 sont capables d'activer l'expression de *FUS3* et *ABI3* dans des feuilles de rosette (Santos Mendoza et al., 2005). LEC1 et LEC2 semblent agir en amont de ce réseau et pourraient être considérés comme les éléments déclencheurs du processus de maturation (Figure 0.36).

3.3.2 WRINKLED1 et la synthèse des acides gras

WRI1 est un facteur de transcription de la famille AP2-EREBP (APETALA2-Ethylene Responsive Element-Binding Protein) qui, contrairement à LEC1 ou LEC2, contrôle de manière spécifique la mise en réserve de l'huile au sein de la graine sans affecter d'autres aspects du processus de maturation (Cernac et Benning, 2004). Les graines du mutant *wri1* sont ridées et présentent un

Introduction

contenu en TAG fortement réduit (Focks et benning, 1998 ; Cernac et Benning, 2004 ; Baud et al., 2007). Des données transcriptomiques confortées par des analyses en RT-PCR quantitative et l'utilisation de lignées surexprimant *WRI1* ont permis d'isoler plusieurs cibles putatives de *WRI1* (Ruuska et al., 2002 ; Baud et al., 2007). Parmi elles, on trouve plusieurs gènes codant des enzymes de la glycolyse (*PKp-β1*, *PKp-a*) ou de la synthèse *de novo* des acides gras (*BCCP2*, *PDH-E1a*, *MOD1*). De plus, des résultats récents montrent que *WRI1* est régulé par *LEC2* et probablement par *LEC1* (Casson et Lindsey, 2006 ; Baud et al., 2007). *LEC2* activerait directement l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des TAG et leur stockage alors que *WRI1* activerait transcriptionnellement certains gènes de la synthèse *de novo* des acides gras (Figure 0.38). De manière plus précise, Baud et collaborateurs (2009) ont pu montrer par des approches de type simple hybride et de retard sur gel que *WRI1* se lie au promoteur de *BCCP2*. Une séquence consensus de fixation nommée AW-box (CnTnG(n)₇CG) a ainsi été déterminée (Maeo et al., 2009) (Figure 0.38).

Régulateurs maîtres

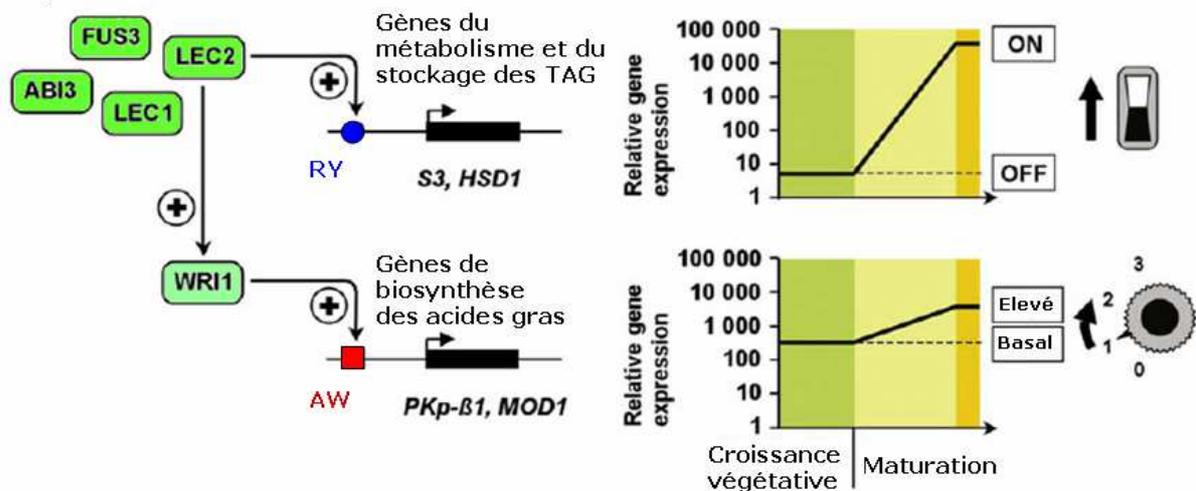


Figure 0.38. Modèle de régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans la biosynthèse des triacylglycérols dans les embryons d'Arabidopsis.

Les facteurs qui induisent la maturation ou la biosynthèse des lipides de réserve sont représentés. Les flèches noires représentent des régulations transcriptionnelles positives. Les gènes cibles codant les acteurs du réseau métabolique considéré sont indiqués en italique. ABI3, ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 ; BCCP2, BIOTIN CARBOXYL CARRIER PROTEIN2 ; FUS3, FUSCA3 ; HSD1, HydroxyStéroïde Déshydrogénase1 ; LEC1, LEAFY COTYLEDON1; L1L, LEAFY COTYLEDON1-LIKE ; LEC2, LEAFY COTYLEDON2 ; MOD1, enoyl-ACP réductase ; PKp, pyruvate kinase plastidiale ; S3/OLEO1, oléosine S3 ; TAG, triacylglycerol ; WRI1, WRINKLED1 (Baud et al., 2009).

Introduction

3.3.3 La régulation des régulateurs maîtres

Comme nous l'avons montré dans le paragraphe 3.3.1.5, les régulateurs maîtres s'autorégulent mutuellement.

3.3.3.1 Via *AGL15* et *AGL18*

Les données concernant le contrôle de l'expression des régulateurs maîtres au cours de la maturation est un sujet encore peu exploré. Le double mutant *agl15 agl18* présente une diminution de l'expression de *LEC2* et *ABI3* dans les graines en développement (Zheng et al., 2009). La simple mutation de l'un ou l'autre de ces gènes n'induit pas de phénotype. A l'inverse, une surexpression d'*AGL15* induit une augmentation de l'expression de *LEC2* et de *FUS3*. *AGL15* se lierait aux promoteurs de *LEC2*, *FUS3* et *ABI3* d'après les expériences de ChIP réalisées par Zheng et collaborateurs (2009). *AGL15*, exprimé dans l'embryon tout au long du développement de la graine, agirait de manière redondante avec *AGL18* pour activer les *AFL* (Perry et al., 1999).

Cependant la relation entre *AGL15* et les *AFL* est complexe, *LEC2* étant en effet capable d'induire l'expression d'*AGL15* (Braybrook et al., 2006), créant une boucle de rétroaction positive. Ces données restent à confirmer, le niveau des transcrits d'*AGL15* n'étant pas modifié en fond mutant *lec2* (Perry et al., 1996).

3.3.3.2 Régulation de *LEC2* par des facteurs chromatiniens et non chromatiniens

Par des approches de dissection de promoteurs et d'analyse fonctionnelle en levure et *in planta*, Berger et collaborateurs (2011) ont pu caractériser une boîte de répression nommée RLE (*cis*-repressive element) nécessaire à la triméthylation de H3K27 par PRC2 dans le promoteur de *LEC2* (Figure 0.39). De plus, l'introduction de ce motif de 50 pb dans un autre promoteur est suffisant pour entraîner le dépôt de la marque H3K27me3 et par conséquent la répression du gène associé. Au cours de cette étude, deux autres éléments *cis* activateurs ont été identifiés, l'un permettant potentiellement la fixation d'un facteur de transcription de type MADS et l'autre permettant la liaison de protéines BPC (BASIC PENTACYSTEINE) (Berger et al., 2011). Enfin, d'après des données d'immunoprécipitation de la chromatine, des facteurs de type HD-ZIPIII, PHAVOLUTA (PHV) et PHABULOSA (PHB) se fixeraient sur le promoteur de *LEC2* via des séquences du type GTAAT(G/C)ATTAC et activeraient son expression (Tang et al., 2012) (Figure 0.39).

Introduction

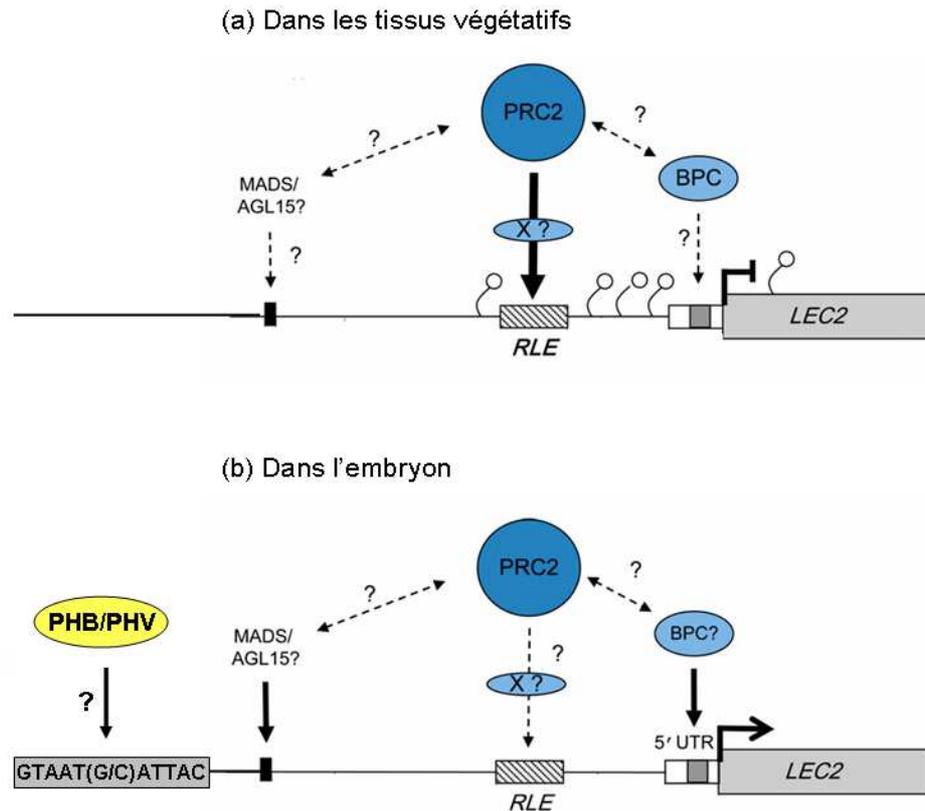


Figure 0.39. Représentation schématique du promoteur de *LEC2* et de sa régulation.

Un modèle putatif présentant la régulation de *LEC2* dans les tissus végétatifs (a) et dans l'embryon (b) est présenté. Les sites de liaison d'un facteur MADS et des BPC ainsi que le RLE (*Cis*-repressive element) sont représentés. L'épaisseur des simples flèches noires est proportionnelle à la probabilité de fixation des différents facteurs. Les doubles flèches représentent des interactions protéiques putatives. *LEC2*, *LEAFY COTYLEDON2*; BPC, BASIC PENTACYSSTEINE; PHB, PHABULOSA; PHV, PHAVOLUTA; PRC2, Polycomb Repressive Complex 2 (Tang et al., 2012; Berger et al., 2011).

3.3.4 Des activateurs de l'entrée en dormance et de la dessiccation

Une étude récente présente la protéine DELAY OF GERMINATION1 (DOG1) comme un régulateur du processus de dormance. DOG1 s'accumule au cours de la maturation et serait en partie responsable du niveau d'ABA accumulé au sein de la graine (Voir paragraphe 3.3.6) (Bentsink et al., 2006; Nakabayashi et al., 2012) (Figure 0.30).

Un second facteur, monoubiquitinant l'histone H2B, appelé REDUCED DORMANCY4 (RDO4)/MONOUBIQUITINATION1 (HUB1) contrôlerait aussi le processus de dormance. Associé à RDO2 (REDUCED DORMANCY2), un facteur d'élongation de la transcription, il régulerait la phase d'élongation de la transcription lorsque l'efficacité de celle-ci diminue avec la dessiccation de la graine en fin de maturation (Graeber et al., 2012) (Figure 0.30).

Introduction

Enfin, le gène *KRYPTONITE (KYP)/SUVH4* code une histone méthyltransférase qui catalyse la diméthylation de H3K9 et réduit la dormance. L'expression de *KYP/SUVH4* serait sous contrôle de la balance hormonale ABA/GA, mais ses cibles ne sont, pour l'heure, pas encore connues (Zheng et *al.*, 2012).

3.3.5 Des répresseurs de la maturation

Deux types d'acteurs réprimant l'expression des gènes de maturation ont été caractérisés : des facteurs de transcription et des facteurs de remodelage de la chromatine. Bien souvent, pour des raisons pratiques, la majorité des études ont été conduites sur des plantules, cependant, il semble que ces processus soient à l'œuvre dès la fin de la maturation dans la graine.

3.3.5.1 Les facteurs de transcription

HSI/VAL1 et HSL1/VAL2

VAL1/HSI2 (High level expression of Sugar Inducible gene 2) et VAL2/HSL1 (HSI2-like 1) sont deux facteurs de transcription de la famille B3 et de la sous-famille HSI (Romanel et *al.*, 2009) (Figure 33a et c). Ils possèdent un domaine EAR (ERF-associated Amphiphilic Repression). Ils agissent de concert avec la voie de signalisation par les sucres pour réprimer l'expression des gènes de maturation en fin de maturation, en début de germination, et dans les plantules : ils sont nécessaires à la transition maturation-germination (Tsukagoshi et *al.*, 2005 ; Suzuki et *al.*, 2006 ; Suzuki et *al.*, 2008). Chez les doubles mutants *val1 val2*, l'expression de *LEC1*, *FUS3* et *ABI3* est déréprimée dans les plantules. Inversement, l'expression de *LEC2* ne serait pas régulée par VAL1 et VAL2 (Suzuki et *al.*, 2006). Enfin, VAL1 et VAL2 réguleraient positivement mais de manière indirecte la synthèse de GA au cours du développement de la graine *via* FUS3.

Ainsi, VAL1 et VAL2 se fixeraient sur les éléments Sph/RV de leurs cibles grâce à leur domaine B3 et inhiberaient leur transcription grâce à leur domaine EAR. Ils réguleraient négativement le processus de maturation soit en entrant en compétition avec les AFL (en reconnaissant les mêmes promoteurs), soit en réprimant directement l'expression des gènes codant les facteurs B3 activateurs et de *LEC1*. En 2012, Veerappan et collaborateurs (2012) démontrent que HSI2 réprime des gènes codant des cruciférines, des napines, des oléosines, des LEA dans les plantules.

Introduction

Selon les auteurs, cette répression associée à une importante triméthylation de H3K27 pourrait être médiée par le domaine PHD-like de HSI2.

ASIL1

Le facteur de transcription ASIL1 (*Arabidopsis* 6b-interacting protein1-like1) réprime l'expression des gènes de la maturation de la graine dans les tissus végétatifs. Les plantules du mutant *asil1* présentent un profil d'expression génique semblable à celui normalement observé dans des embryons en fin de maturation : *LEC1* et *LEC2*, comme de nombreux gènes de maturation, sont dérprimés. Ainsi, ces plantules accumulent de l'huile et des protéines de réserve (Gao et al., 2009). En plus de son rôle répresseur dans les plantules, ASIL1 pourrait aussi réguler l'expression temporelle des *AFL* pendant la maturation de la graine. En fond mutant *asil1*, *LEC2*, *FUS3* et *ABI3* s'expriment plus tôt au cours du développement de la graine, tout comme les gènes impliqués dans l'accumulation des réserves (*CRC*, *OLEO2/S4*, *At2S3*) (Gao et al., 2011).

ASIL1 a été isolé sur la base de son interaction avec le promoteur du gène *At2S3* *in vitro*. ASIL1 appartient à la famille des facteurs de transcription à trois hélices. Plus précisément, il semble qu'ASIL1 se fixe sur des éléments GT (GTGATT) qui recouvrent partiellement des boîtes G à proximité des boîtes RY des promoteurs des gènes de napines. Ainsi, les auteurs suggèrent qu'ASIL1 réprimerait l'expression de ses gènes cibles en entrant en compétition avec des facteurs de transcription activateurs tels que ABI5 (bZIP) (Gao et al., 2009) (Figure 0.40).

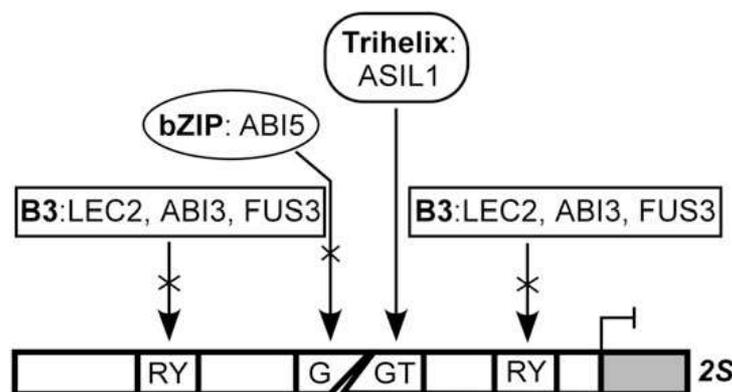


Figure 0.40. Modèle putatif de régulation négative des gènes codant des napines (2S) par ASIL1 via les boîtes GT.

Les différents éléments *cis* dans le promoteur d'un gène codant une napine (2S) sont représentés (RY, G et GT). Les flèches indiquent la fixation des différents facteurs de transcription sur leurs boîtes respectives. La fixation de ASIL1 sur les boîtes GT empêcherait la fixation des autres facteurs de type B3 et de type bZIP, réprimant ainsi l'expression des gènes des napines (Gao et al., 2009).

Introduction

3.3.5.2 Les acteurs chromatinien

Histones déacétylases (HDA)

Peu de données sont disponibles sur le contrôle de la maturation de la graine par des facteurs de remodelage de la chromatine. Tanaka et collaborateurs (2008) montrent que des histones déacétylases, HDA6 et HDA19, régulent négativement les caractères embryonnaires et les gènes de maturation (*At2S2*, *CRA1*) au cours de la germination *via* la répression de *ABI3*, *FUS3* et *LEC1*. Chez les mutants *hda19*, la dérégulation de gènes de maturation est associée à une augmentation des marques d'activation de la chromatine (acétylation des histones H3 et H4, triméthylation de H3K4). De plus, les auteurs montrent que HDA19 interagit avec HSL1. De manière intéressante, les doubles mutants *hsl1 hda19* présentent une létalité embryonnaire suggérant que ces deux gènes jouent un rôle crucial dans le développement de la graine (Zhou et al., 2013).

PICKLE et BRAHMA

PICKLE (PKL) et BRAHMA (BRM) sont des facteurs de remodelage de la chromatine qui reconnaissent les marques H3K4me grâce à leurs chromodomaines.

En partenariat avec les GA, PICKLE réprime les caractères embryonnaires pendant et après la germination, notamment l'expression de *LEC1*, *LEC2* et *FUS3* ou encore *ABI3* et *AGL15* (Ogas et al., 1999 ; Henderson et al., 2004 ; Rider et al., 2004 ; Li et al., 2005 ; Perruc et al., 2007 ; Aichinger et al., 2011). De plus, *PKL* est exprimé dans les jeunes siliques en développement, en particulier dans l'embryon, mais son rôle au sein de la graine est encore incertain (Li et al., 2005). Dans le mutant *brm*, l'expression de *FUS3* et des gènes de protéines de réserve (*At2S2*) est détectée dans les plantules en germination (Tang et al., 2008). Ces données d'expression sont confirmées par des interactions moléculaires, notamment des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine indiquant que BRM serait un répresseur du processus de maturation au cours de la germination. De plus, BRM est exprimé tout au long du développement de la graine, à des niveaux bien supérieurs à ceux des tissus végétatifs suggérant qu'il pourrait avoir un rôle dans le contrôle du processus de maturation sans que celui-ci soit prouvé (Farrona et al., 2004 ; Tang et al., 2008)

Introduction

Le complexe PRC2

D'autres auteurs suggèrent que les régulateurs maîtres pourraient être régulés par des complexes PRC2. Au début du développement de la graine, le complexe PRC2 présent est composé de FIE/MSI1/MEA/FIS2 (Figure 0.20). Comme présenté au paragraphe 2.4.2.1, il assure le maintien de l'empreinte parentale en réprimant la copie paternelle de *MEA* et maternelle de *PHE1* et réprimerait aussi *FUS3*. En fond mutant *mea*, l'activité du promoteur de *FUS3* peut être détectée à la fois dans l'embryon et l'albumen au stade cœur alors que chez le sauvage, elle est restreinte à l'embryon. De plus, des expériences de ChIP confirment la liaison de MEA au locus *FUS3* (Jullien et al., 2006 ; Makarevich et al., 2006). Des expériences similaires révèlent que ni *LEC1* ni *LEC2* ne seraient régulés par MEA au cours du développement de la graine (Makarevich et al., 2006).

A la transition maturation-germination, un autre complexe PRC2 non encore caractérisé pourrait réprimer les différents régulateurs maîtres mais aussi *AGL15*, *WRI1* ou encore les gènes de protéines de réserve (*CRA1*, *CRC*), de LEA ou d'oléosines (Makarevich et al., 2006 ; Bouyer et al., 2011) (Figure 0.20). Makarevitch et collaborateurs (2006) ont détecté une expression ectopique de *FUS3*, *LEC2* et *LEC1* dans des plantules en fond mutant *clf swn* (*curly leaf swinger*) et de *ABI3*, *FUS3*, *LEC1* et *LEC2* et de leurs gènes cibles dans des plantules *fie*.

Les microARN

Des embryons surexprimant *DICER-LIKE*, une des enzymes responsable de la biogenèse des miARN, entrent plus rapidement en phase de maturation qu'un embryon sauvage. Les auteurs montrent que ces miARN agissent en réprimant *LEC2*, *LEC1* et *FUS3* mais aussi *ASIL1* ou *HDA6* (Willmann et al., 2011).

En 2012, Tang et collaborateurs (2012) décrivent une voie de régulation permettant la répression des gènes de maturation dans les tissus végétatifs et impliquant un miARN. Selon leurs conclusions, miR166, exprimé en particulier dans les feuilles, aurait pour cibles *PHAVOLUTA* (*PHV*) et *PHABULOSA* (*PHB*). Ces deux gènes exprimés dans la graine activent l'expression des gènes de maturation, via *LEC2* (Tang et al., 2012). Ainsi l'inhibition de cette voie par miR166 maintiendrait le processus de maturation silencieux dans les organes végétatifs (Figure 0.41).

Introduction

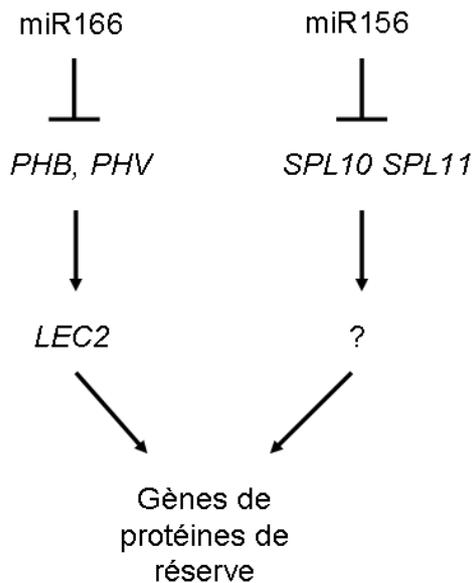


Figure 0.41. Modèle de répression des gènes de maturation dans les feuilles par des miARN.

AGO1 (Argonaute 1) et miR166 répriment l'expression de *PHABULOSA* (*PHB*) et *PHAVOLUTA* (*PHV*), qui activent le programme de maturation *via* l'expression de *LEAFY COTYLEDON2* (*LEC2*) ; *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE10/11* (*SPL10/11*) , (Nodine et Bartel, 2010 ; Willmann et *al.*, 2011 ; Tang et *al.*, 2012).

L'ensemble de ces mécanismes de régulation est toujours en cours d'élucidation. Leur inventaire devrait permettre à terme de dresser un réseau de régulation plus précis du processus de maturation (Figure 0.36) et de mieux comprendre comment ce processus s'insère dans le développement de la graine dans son ensemble.

3.3.6 Le rôle des hormones : la balance ABA/GA

La balance ABA/GA est la balance hormonale prépondérante régulant le processus de maturation, l'entrée en dormance et la germination (Giraudat et *al.*, 1994 ; Koorneef et *al.*, 2002 ; Finkelstein et *al.*, 2002 ; Ogawa et *al.*, 2003).

L'ABA est une hormone végétale dérivant des caroténoïdes. Son niveau d'accumulation est finement régulé *via* des voies de biosynthèse et de dégradation. Seul l'ABA produit par les tissus zygotiques (embryon et albumen) est capable d'induire la dormance (Finkelstein et *al.*, 2008). En l'absence d'ABA, la PP2C (protéine phosphatase 2C) inhibe par phosphorylation la kinase snRK2 (SNF1-related protein kinase subfamily 2) et la voie de signalisation en aval. En présence d'ABA, le récepteur à l'ABA, PYR/PYL/RCAR séquestre la PP2C, libérant snRK2 qui active des facteurs de transcription de type bZIP liant les motifs ABRE. Le complexe transcriptionnel activant les gènes de réponse à l'ABA comprendrait un facteur de transcription de type bZIP liant les motifs ABRE comme ABI5, un facteur de type B3 liant les éléments RY/Sph comme ABI3 et un facteur de type AP2 liant les éléments CE1 (élément de couplage 1) comme ABI4 (Figure 0.37).

Introduction

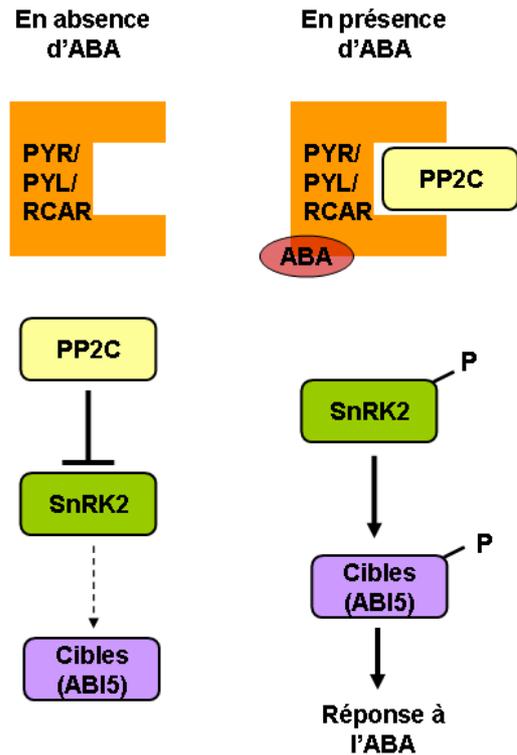


Figure 0.42. Mode d'action de l'ABA dans les graines.

Voie de signalisation de l'ABA impliquant le récepteur PYR/PYL/RCAR. En l'absence d'ABA, la kinase SnRK2 est inactivée par la protéine phosphatase 2C (PP2C) et par conséquent ABI5 est lui aussi inactif. En présence d'ABA, la conformation du récepteur PYR/PYL/RCAR sur lequel elle se fixe est modifiée lui permettant d'inhiber la PP2C. Cette séquestration de la PP2C dérègle la kinase SnRK2 qui active sa cible (ABI5). ABA, Acide abscissique (Nambara et al., 2010).

Les GA sont une classe d'hormones végétales dérivant des phénylpropanoïdes et favorisant la germination des graines. La voie de signalisation des GA implique des régulateurs négatifs appelés protéines DELLA : la fixation de GA sur le récepteur GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF (GID1) entraîne la dégradation des protéines DELLA par le protéasome et ainsi l'expression des gènes de réponse aux GA (Daviere et al., 2008).

Au cours de la phase de maturation, la teneur en ABA de la graine croît progressivement. Ce rapport ABA/GA élevé induit la dormance et la dessiccation de la graine et inhibe la croissance de l'embryon ainsi que la germination (Gazzarrini et al., 2001). Ce processus est soutenu par l'action de LEC2 et FUS3 qui répriment les gènes de la voie de biosynthèse des GA (Curaba et al., 2004 ; Gazzarrini et al., 2004). Inversement la balance ABA/GA pourrait réguler la stabilité de FUS3 (Gazzarrini et al., 2004) (Figure 0.36) dans la graine.

À l'issue de la maturation, la graine a accumulé des réserves, perdu la majorité de son eau, son activité métabolique est quasi nulle. Elle est dormante, prête à être disséminée et à germer lorsque les conditions environnementales le permettront.

Le Projet

1. L'étude de la maturation de la graine chez Arabidopsis

L'une des thématiques développées dans l'équipe 'Développement et qualité de la graine' de l'Institut Jean-Pierre Bourgin concerne l'identification et la caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans le processus de maturation de la graine. Les efforts de l'équipe sont concentrés essentiellement sur l'étude de la plante modèle Arabidopsis, dont le génome relativement petit (120 Mb pour 5 chromosomes) a été séquencé en 2000 (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). En outre, un temps de génération assez bref (3 mois), une descendance abondante (10 000 graines par plante) et le développement d'outils génétiques variés (banques d'EST, collections de mutants d'insertion, données de transcriptomiques nombreuses (Alonso et al., 1993 ; Bechtold et al., 1993 ; Le et al., 2010)) font de cette « mauvaise herbe » un bon modèle.

Un des axes de recherche de l'équipe consiste à étudier la régulation de la mise en réserve des huiles au cours du processus de maturation. En dépit de la petite taille de sa graine (environ 20 µg), Arabidopsis s'avère être particulièrement adaptée à ce type d'approche. (i) Les huiles de réserve représentent près d'un tiers de la masse de sa graine à l'état sec. (ii) Arabidopsis est une espèce appartenant à la famille des Brassicacées ; elle est donc phylogénétiquement proche du colza (*Brassica napus*), une oléagineuse de grande culture largement répandue en Europe. (iii) La plupart des données moléculaires obtenues chez Arabidopsis peuvent être transposées chez des espèces d'intérêt agronomique telles que le colza via la recherche d'homologues voire d'autres plantes plus éloignées phylogénétiquement (Shen et al., 2010 ; Pouvreau et al., 2011).

2. Le projet SOLAR

Le projet de thèse s'inscrit au cœur du programme SOLAR ('Seed Oil yield in Arabidopsis') impliquant diverses équipes de l'Institut Jean-Pierre Bourgin et financé par l'Agence Nationale pour la Recherche. L'objectif principal de ce programme est d'identifier et de caractériser de nouveaux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la biosynthèse des huiles de réserve chez Arabidopsis.

Le Projet

Une première approche de type double hybride, qui permet d'identifier des partenaires protéiques, a été réalisée en utilisant WRI1 comme appât. En criblant une banque d'ADNc préparée à partir de divers organes d'*Arabidopsis*, quatre interactants ne codant pas des facteurs de transcription ont pu être identifiés.

Une seconde approche de type simple hybride a été réalisée en utilisant la séquence du promoteur de *BCCP2* (une cible avérée de WRI1) comme appât. A partir du crible de la banque de facteurs de transcription REGIA (Paz-Ares *et al.*, 2002), quatre candidats ont pu être identifiés. Nous avons pu montrer que deux d'entre eux, nommés WRI3 et WRI4, appartiennent à la famille AP2 et sont fortement apparentés à WRI1 (To *et al.*, 2012 ; annexe 11).

Contrairement à *WRI1*, *WRI3* et *WRI4* sont exprimés majoritairement dans les grains de pollen et très faiblement dans les autres organes de la plante. Ils sont capables d'activer spécifiquement la transcription des gènes codant les enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides gras et complètent le phénotype mutant *wri1* lorsqu'ils sont exprimés dans la graine de ce dernier. Cependant, ces trois facteurs n'ont pas des rôles équivalents *in planta*. Premièrement, une étude fine a montré que leurs patrons d'expressions étaient différents : seul *WRI1* est induit dans la graine en cours de maturation. Deuxièmement, l'analyse de simples, doubles et triples mutants pour ces trois gènes a confirmé que seul WRI1 active la synthèse d'acides gras pour la production de TAG dans la graine, alors que les trois facteurs WRI collaborent pour activer la synthèse d'acides gras dans les organes floraux. Dans ces tissus, une quantité abondante d'acides gras est nécessaire à l'élaboration de la cuticule des organes en formation pour éviter leur adhérence. Les doubles et triples mutants présentent une fusion de leurs organes floraux et sont partiellement stériles (To *et al.*, 2012).

Enfin, une troisième approche a eu pour but d'identifier des facteurs de transcription co-exprimés avec *WRI1* et les gènes codant les enzymes de la voie de biosynthèse des acides gras. L'utilisation des données transcriptomiques disponibles a permis d'isoler douze candidats. Le phénotypage de mutants d'insertion pour ces différents gènes a ensuite permis de réduire le nombre de candidats de cette première liste à deux gènes d'intérêt, gènes dont la mutation entraîne une modification de la quantité ou de la qualité des huiles dans la graine. Le premier gène issu de ce crible, *MYB118*, a constitué le projet principal de cette thèse. L'étude du second candidat, *WB3*, a été simplement amorcée.

Le Projet

3. Un candidat d'intérêt : MYB118

D'après les données transcriptomiques disponibles sur le site AtGenExpress (<http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp>), le patron d'expression du gène *MYB118* (*At3g27785*) est très semblable à celui de *WRI1* dans la graine (Figure 0.43). De plus, des résultats préliminaires indiquent une modification de la composition en acides gras dans les graines du mutant *myb118*, ce qui fait de *MYB118* un candidat de choix pour ce projet

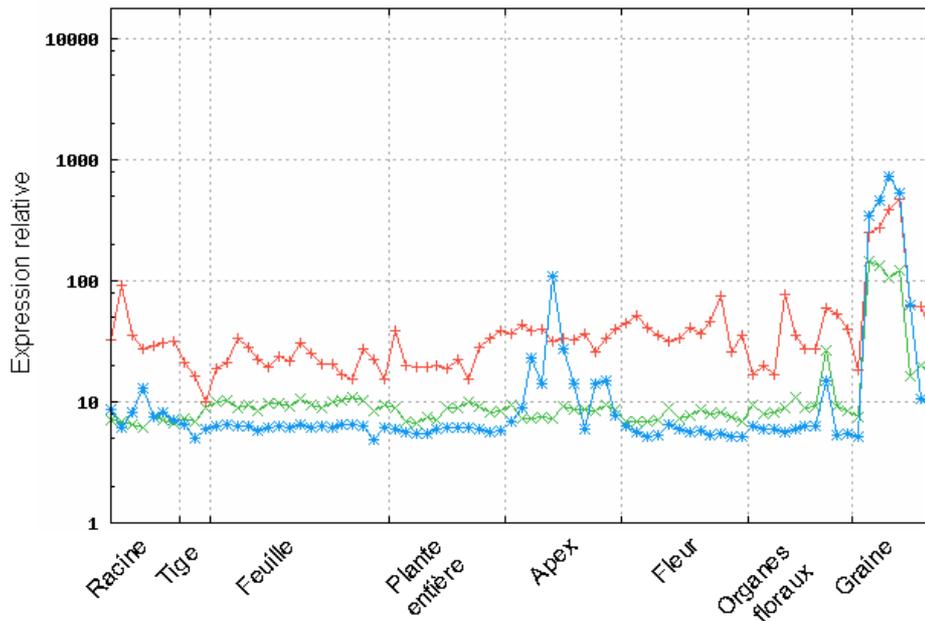


Figure 0.43. Profil d'expression des gènes *WRI1*, *MYB118* et *WB3* d'après AtGenExpress.

Le profil d'expression de *MYB118* est représenté en vert, celui de *WRI1* en rouge et enfin celui de *WB3* en bleu. Les différents échantillons végétaux analysés sont reportés en abscisse.

Les facteurs de transcription R2R3-MYB

MYB118 fait partie de la superfamille des facteurs de transcription de type MYB et plus précisément de la famille des R2R3-MYB qui, chez *Arabidopsis*, comprend 126 membres. Les R2R3-MYB sont définis par leur site de fixation à l'ADN très conservé, constitué d'un domaine R2 et d'un domaine R3 (Figure 0.44) qui reconnaissent des séquences *cis* riches en A et C. Chaque domaine R est composé d'une cinquantaine d'acides aminés formant trois hélices α . La deuxième et troisième hélices se replient pour former une structure tridimensionnelle de type hélice-tour-hélice (HTH) et la dernière est impliquée dans la reconnaissance et la fixation à l'ADN *via* le grand sillon de l'ADN (Ogata et al., 1996).

Le Projet

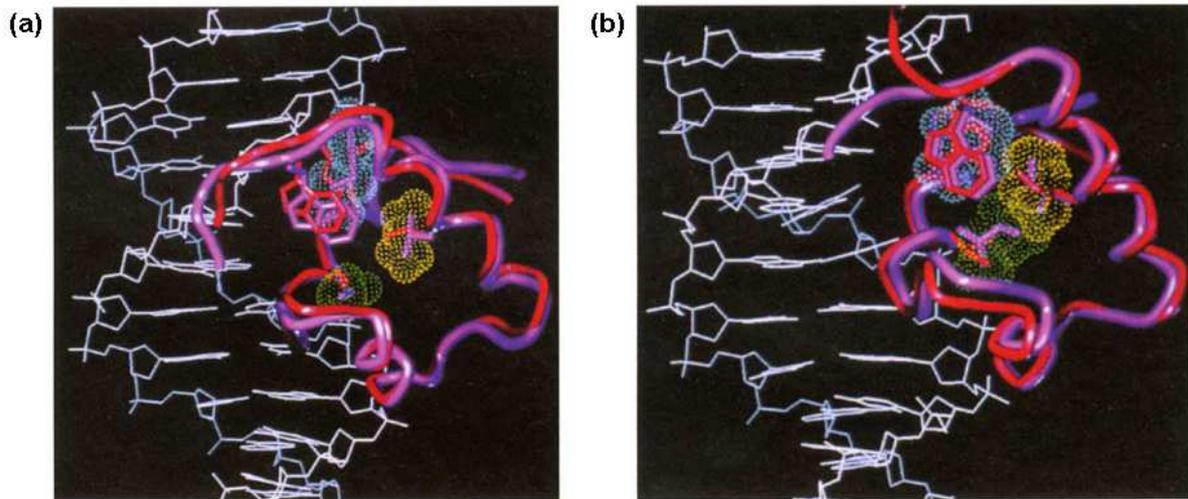


Figure 0.44. Représentation schématique des formes libres et complexées à l'ADN du domaine R2 (a) et R3 (b) des facteurs R2R3-MYB.

Les formes libres sont représentées en rouge alors que les formes complexées à l'ADN sont représentées en violet. Les nuages bleus, jaunes et verts représentent la surface de Van der Waals des différents acides aminés développés (Ogata et *al.*, 1996).

De manière générale, les R2R3-MYB ont une structure modulaire avec une région N-terminale très conservée permettant la liaison à l'ADN (domaine MYB) et une région C-terminale transactivatrice (activatrice ou répresseur) extrêmement variable. Ils sont classés en sous-groupes, numérotés de 1 à 25, d'après l'analyse de leur séquence C-terminale (Stracke et *al.*, 2001 ; Dubos et *al.*, 2010). *MYB118* fait partie du sous-groupe 25 caractérisé par une région C-terminale de type LxxYIxx[I/V]N[N/D]. Il est très proche d'un autre R2R3-MYB appelé *MYB115* (*At5g40360*) (Figures 0.45 et 0.46).

Le Projet

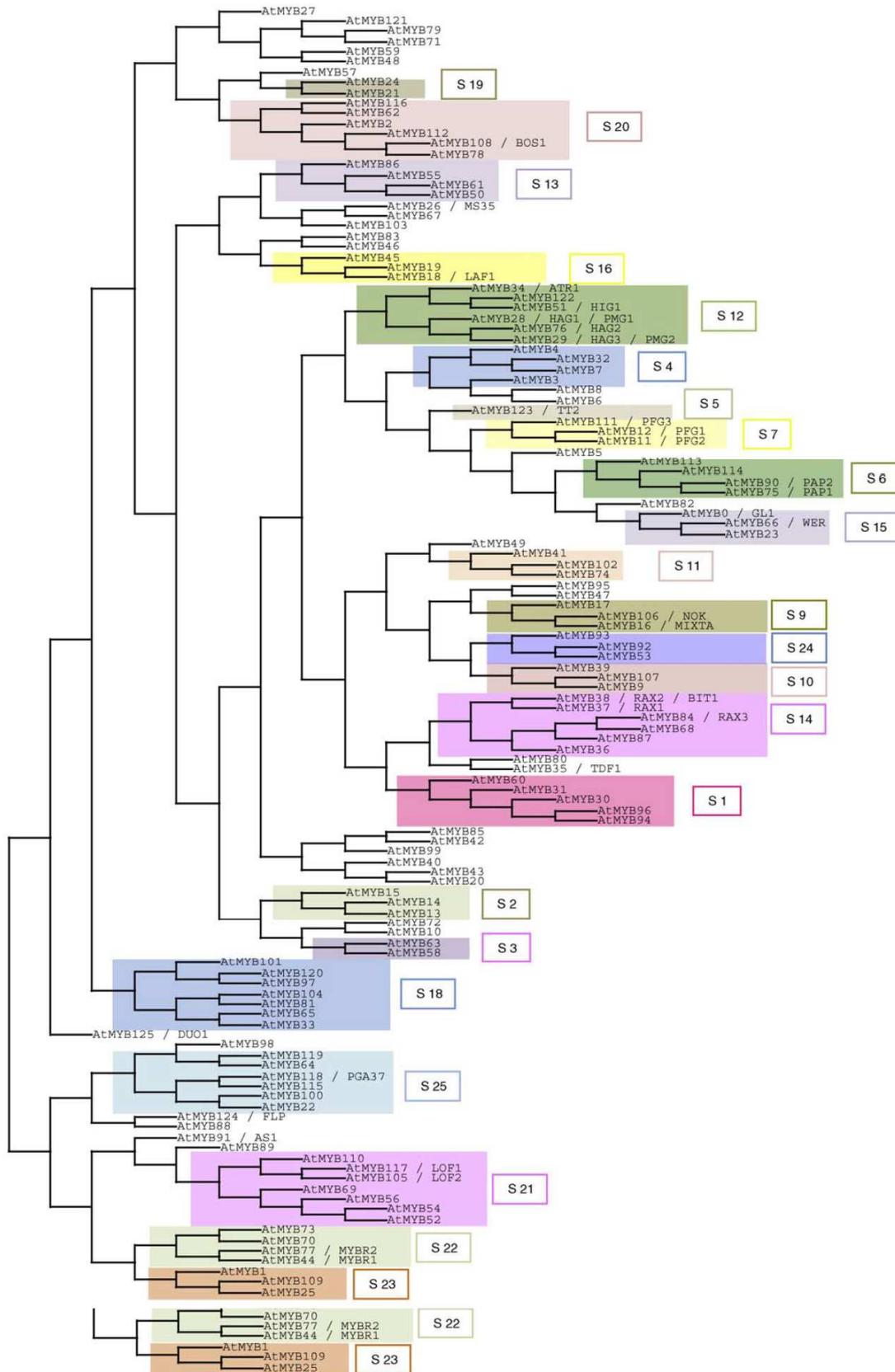
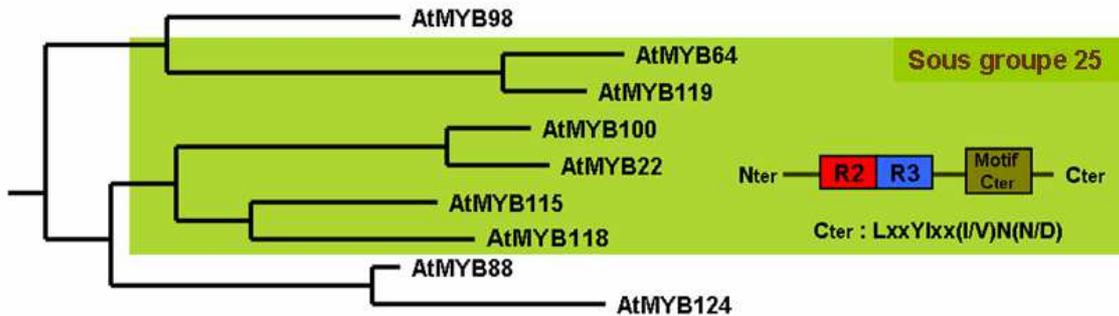


Figure 0.45. Représentation schématique des relations entre les différents sous-groupes de R2R3-MYB chez Arabidopsis.

MYB118 appartient au sous-groupe 25 (Dubos *et al.*, 2010).

Le Projet



R2 : ..+G#WT.eED..L#.Y#..hG.G.W..##+.aGL.RcgKSCRLRW#NyLrp

R3 : #+rG.#..E-.#li.Lh..IGN+Ws.iA..IPgRTDNeiKNyWnt+#.++

Figure 0.46. Représentation schématique des relations entre les différents R2R3-MYB du sous-groupe numéro 25 chez Arabidopsis.

Ce schéma représente un détail de la phylogénie des R2R3-MYB d'Arabidopsis obtenue à partir des séquences protéiques (longueur maximale de 320 acides aminés) par la méthode de neighbor-joining. Les différents sous-groupes ont été constitués sur la base de motifs conservés dans la région extérieure au domaine R2R3 (Motif C-terminal pour le sous-groupe 25) (Kranz et *al.*, 1998). La séquence consensus des domaines R2 et R3 est indiquée. Les lettres en majuscule indiquent les résidus conservés à 100% et les lettres en minuscule les résidus conservés à 80%. +, acide aminé basique ; -, acide aminé acide ; #, acide aminé hydrophobe (Avila et *al.*, 1993 ; Stracke et *al.*, 2001).

Bilan des données disponibles sur MYB118 au début de la thèse

Le facteur de transcription MYB118 a été initialement étudié dans une autre équipe pour ses capacités à induire l'embryogenèse somatique. En utilisant un système inductible à l'oestradiol dans des lignées de type « enhancer trap », Wang et collaborateurs (2008) ont isolé des mutants gain de fonction, nommés « *plant growth activators* » (*pga*) en cultivant des fragments de racines transfectées avec l'ADN-T porteur d'un système inductible sur du milieu MS. L'observation du phénotype mutant (i.e. formation d'embryons somatiques) était conditionnée à l'ajout de la molécule inductrice, l'oestradiol (Figure 0.47). C'est ainsi que fut isolé le mutant nommé *pga37*, en réalité un surexpresseur inductible du gène *MYB118* (Figure 0.47). Chez le mutant *pga37*, l'expression de *LEC1* est augmentée et des données génétiques suggèrent que l'embryogenèse somatique induite impliquerait une voie indépendante du gène *WUS*, un gène déjà connu pour induire la transition entre état végétatif et état embryonnaire.

Le Projet

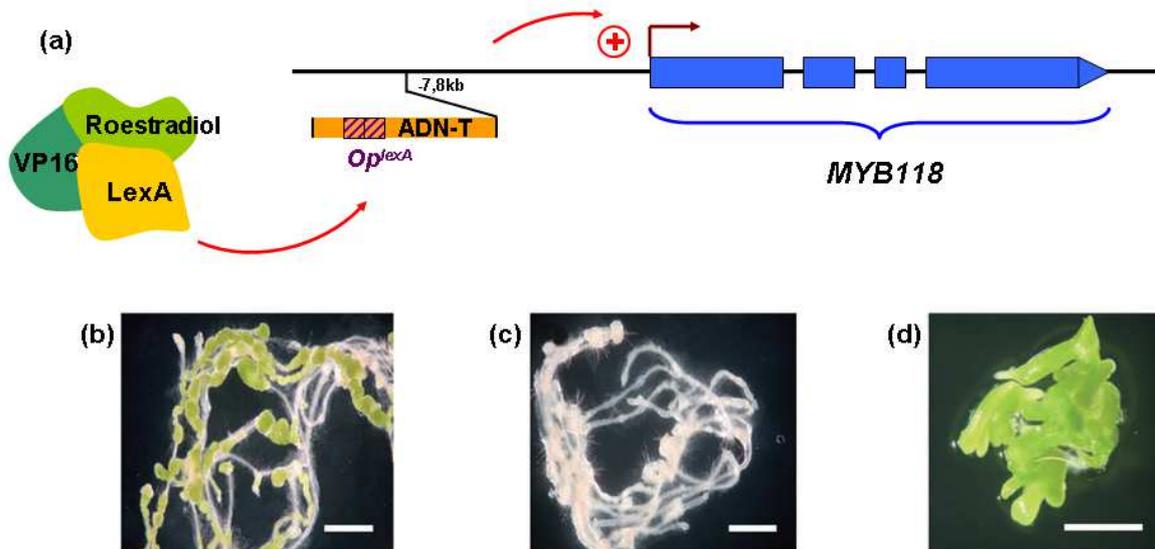


Figure 0.47. Le mutant *pga37*, un activateur de l'embryogenèse somatique.

(a) Représentation schématique du mutant *pga37* et principe du crible utilisé. Des plantes sauvages sont transfectées avec un ADN-T contenant une séquence promotrice appelée *Op^{lexA}* et un système inductible comprenant une fusion de trois protéines, le récepteur à l'oestradiol (Roestradiol), LexA et VP16 sous contrôle d'un promoteur 35S. Lorsque de l'oestradiol est ajouté, le récepteur à l'oestradiol fixe son substrat, il est transloqué dans le noyau de la cellule et la protéine LexA (un facteur de transcription) se lie alors à son promoteur (*Op^{lexA}*). Les séquences en aval sont alors transcrites grâce à l'activité transactivatrice de VP16. Si l'ADN-T inséré est situé à une distance raisonnable d'une quelconque séquence codante, cette dernière sera alors surexprimée. (b) Fragments de racine du mutant *pga37* cultivées pendant 7 jours sur milieu MS en présence d'oestradiol. Des embryons somatiques sont visibles. (c) Fragments de racine du mutant *pga37* cultivées pendant 7 jours sur milieu MS sans oestradiol. (d) Embryons somatiques observés après 5 semaines de culture en présence d'oestradiol. Barre d'échelle = 50 μ m (Wang et al., 2008).

Un an plus tard, Zhang et collaborateurs (2009) ont démontré que MYB118 est une protéine adressée au noyau et que celle-ci possède une activité transactivatrice *via* sa région C-terminale (Figure 0.48). En somme, il s'agit *a priori* d'un facteur de transcription. Pour étudier sa fonction, les auteurs se sont intéressés dans un premier temps au mutant *myb118* mais n'ont pas montré d'altération du développement embryonnaire bien que, d'après leurs données, MYB118 soit exprimé dans l'embryon. Ils ont alors construit des lignées transgéniques dans lesquelles *MYB118* est surexprimé sous contrôle d'un promoteur *CaMV35S*. Les phénotypes de ces lignées sont nombreux et pléiotropiques : nanisme, feuilles enroulées, réduction de la taille de la rosette, réduction de la taille de l'inflorescence, réduction de la taille des organes floraux.

Le Projet

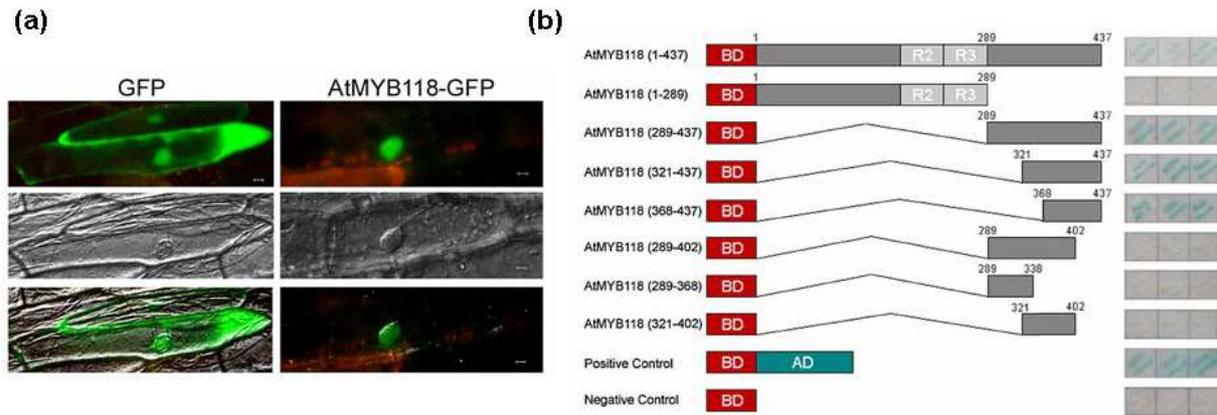


Figure 0.48. MYB118 est un facteur de transcription.

(a) Localisation subcellulaire de MYB118. Observation au microscope à épifluorescence de la localisation de la GFP seule ou de la GFP fusionnée à la protéine MYB118 dans des cellules d'épiderme d'oignon. (b) Test de l'activité transactivatrice du facteur de transcription MYB118 en système levure en utilisant une forme entière ou tronquée de la protéine. La région C-terminale (402-437) semble indispensable à l'activité transactivatrice de MYB118 (Zhang et *al.*, 2009).

4. Un deuxième candidat : WB3

D'après les données transcriptomiques du site AtGenExpress, le patron d'expression du gène *WB3* (*At1g26680*) est très similaire à celui de *WRI1* dans la graine (Figure 0.43). De plus, des analyses préliminaires suggèrent une modification de la teneur en acides gras de la graine des mutants *wb3*.

WB3, encore nommé AtREM17, fait partie de la superfamille des facteurs de transcription de type B3 et plus précisément de la famille REM qui comprend 76 membres chez Arabidopsis (Romanel et *al.*, 2009 ; Swaminathan et *al.*, 2008) (Figure 0.33). Cette famille est divisée en six sous-groupes phylogénétiques notés de A à F. WB3 appartient au sous-groupe C et présente la particularité, comme AtREM13, de comporter un nombre important de domaines B3 (6 ; Figure 0.49a). Il est phylogénétiquement proche de quatre autres AtREM, AtREM7, AtREM10, AtREM14 et AtREM15 dont l'un, AtREM14 présente un patron d'expression proche de celui de WB3 (Swaminathan et *al.*, 2008).

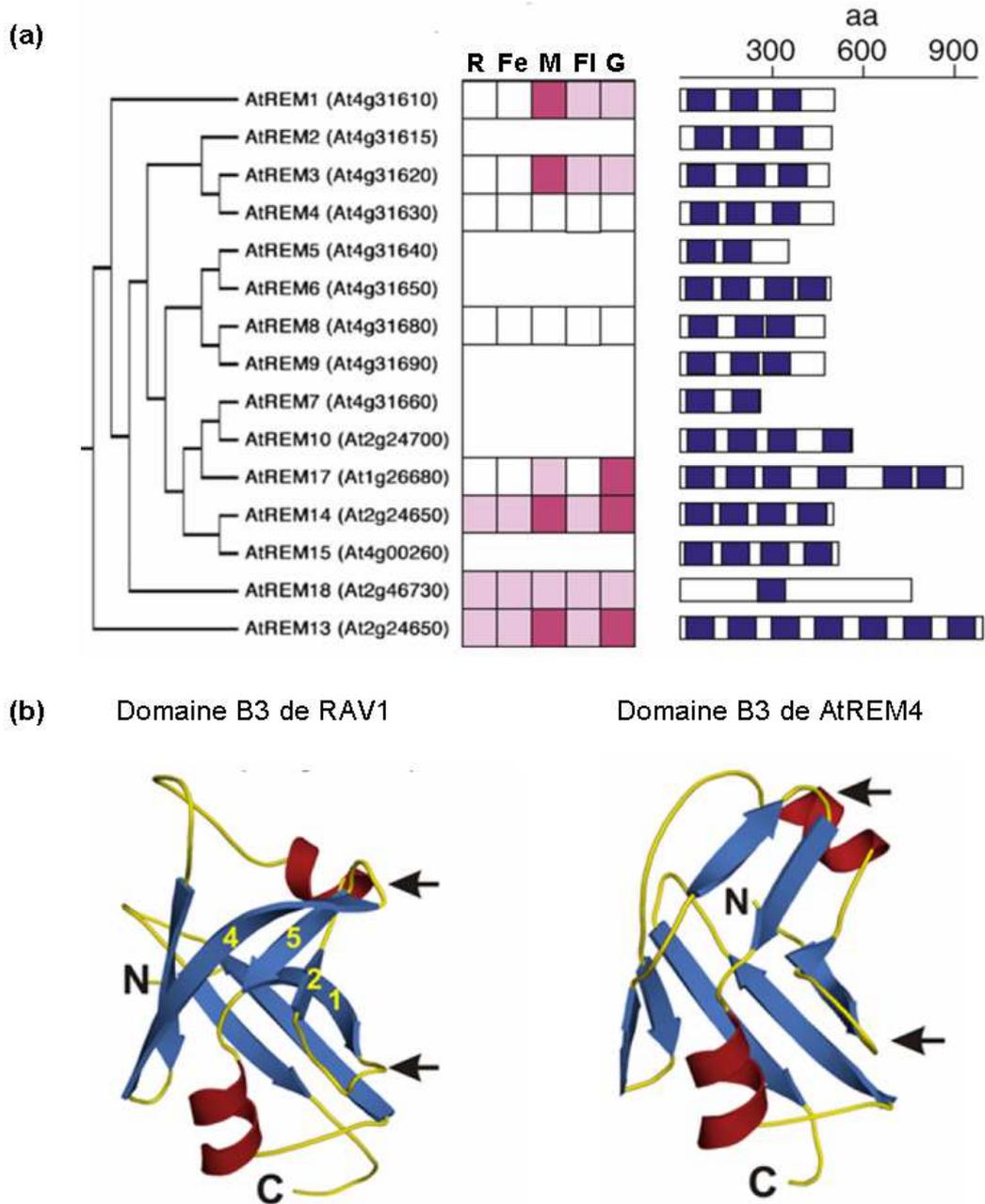


Figure 0.49. Famille REM des facteurs de transcription de type B3.

(a) Arbre phylogénétique des facteurs REM du sous-groupe C (Swaminathan et *al.*, 2008). Les boîtes colorées en rouge présentent le niveau d'expression des gènes correspondants d'après les données d'AtGenExpress : les boîtes blanches indiquent un très faible niveau d'expression et celles en rouge foncé un niveau d'expression élevé. Enfin une représentation schématique de chaque protéine présente les différents domaines B3 sous forme de boîtes bleues foncées (Swaminathan et *al.*, 2008). (b) Structure tridimensionnelle du domaine B3 de RAV1 et AtREM4. La structure tridimensionnelle de AtREM4 a été modélisée à partir de celle de RAV1. Chaque domaine B3 comprend 7 feuillets β en bleu et deux hélices α en rouge. Les boucles liant ces différents domaines sont représentées en jaune. Les flèches indiquent les boucles impliquées dans la liaison à l'ADN. (Fe, feuille ; FI, fleur ; G, graine ; M, méristème ; R, racine) (Romanel et *al.*, 2009).

Le Projet

Deux études, l'une réalisée sur RAV1 et l'autre sur une protéine du sous-groupe AtREM B (codée par *At1g16640*) ont permis de déterminer la structure du domaine B3 (Figure 0.49b). Celle-ci est conservée entre ces deux membres éloignés de la superfamille suggérant qu'elle pourrait être généralisée à l'ensemble des membres. Un domaine B3 est composé de 7 feuillets β ($\beta 1$ à $\beta 7$) qui s'associent entre eux pour former un tonneau β ouvert. Deux petites hélices α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) sont présentes entre les brins 2-3 et 5-6. Des analyses plus précises montrent que N246, S247 et Q249 de RAV1, situés dans la boucle entre les brins 4 et 5 se positionnent dans le grand sillon de l'ADN tandis que K199, L200, K207 et W245 interagissent avec le squelette de pentoses phosphates. Les acides aminés impliqués dans ces interactions restent à déterminer chez les membres de la famille REM. De manière générale, ces protéines contiennent moins de résidus chargés et de plus petites boucles entre les brins β , ce qui ne permet vraisemblablement pas des contacts ADN-protéines spécifiques (Figure 0.49b). Qui plus est, de nombreux membres de la famille possèdent de multiples domaines B3, jusqu'à 7 pour AtREM13 (Swaminathan et *al.*, 2008).

5. Présentation du mémoire

Au cours de ses trois années de thèse, mon axe de travail principal a consisté à caractériser le facteur de transcription MYB118. Son étude a nécessité une description approfondie du processus de maturation de la graine d'*Arabidopsis*, en considérant de manière séparée les deux zygotes constitutifs de la graine, à savoir l'embryon et l'albumen. Le chapitre I du mémoire s'efforcera de décrire ce processus de manière détaillée et constitue un préalable aux chapitres II, III et IV.

Le chapitre II présentera en détails l'étude du facteur de transcription MYB118 et son rôle dans la régulation de la répartition des composés de réserve dans la graine d'*Arabidopsis*. Le chapitre III s'intéressera quant à lui aux paralogues de MYB118. En effet, comme présenté dans la Figure 0.46, MYB118 est très proche de trois autres facteurs de type R2R3-MYB, à savoir MYB115, MYB100 et MYB22, avec lesquels il pourrait présenter une certaine redondance fonctionnelle.

Le Projet

Le chapitre IV se focalisera sur une famille multigénique codant des enzymes du métabolisme des acides gras, les stéaroyl-ACP désaturases (*SAD*), dont deux membres semblent être des cibles de MYB118. Ce chapitre s'intéressera plus particulièrement à la régulation des gènes *SAD* et à la fonction des enzymes qu'ils codent dans la graine d'*Arabidopsis*.

Enfin, le chapitre V dressera un bilan des travaux préliminaires engagés pour l'étude d'un second facteur de transcription nommé WB3. Les premières données concernant son patron d'expression et sa régulation, ainsi que le phénotype du mutant correspondant, en font un candidat très prometteur de la régulation de la maturation de la graine.

Chapitre I – Etude comparée de la maturation de l'embryon et de l'albumen dans la graine d'Arabidopsis

La maturation de la graine chez *Arabidopsis* a fait l'objet de nombreuses études tant sur le plan développemental que sur un plan métabolique (Santos-Mendoza et *al.*, 2008 ; Baud et *al.*, 2008). Cependant, à quelques rares exceptions près (Li et *al.*, 2006 ; Penfield et *al.*, 2004), la graine a généralement été considérée comme une entité cohérente dominée par l'embryon en croissance qui occupe la majeure partie de celle-ci.

Ce chapitre s'attache à décrire le processus de maturation en considérant d'une part l'embryon et d'autre part l'albumen. L'ensemble des données présentées dans ce chapitre a été obtenu sur des graines sauvages de l'écotype Col-0. Dans ce chapitre et ceux qui vont suivre, nous appellerons par convention « fraction albumen » la partie de la graine comprenant les téguments et l'albumen, par opposition à l'embryon.

I – Cinétique d'accumulation des composés de réserve

L'accumulation de composés de réserve est un élément central du processus de maturation. Deux classes de composés majoritaires sont stockés dans la graine d'*Arabidopsis* : les triacylglycérols (TAG) et les protéines de réserve.

1.1 La mise en réserve des triacylglycérols

1.1.1 Répartition du contenu en huile dans la graine sèche

Les acides gras totaux d'une graine sèche entière, de son embryon et de sa fraction albumen ont été extraits et analysés par chromatographie en phase gazeuse. D'après ces données, dans une graine sauvage (Col-0), 88% des acides gras sont stockés dans l'embryon et seulement 12% dans la fraction albumen (Figure 1.1). Ces données sont cohérentes avec les précédentes études publiées par Li et collaborateurs (2006) ou Penfield et collaborateurs (2004).

Chapitre I

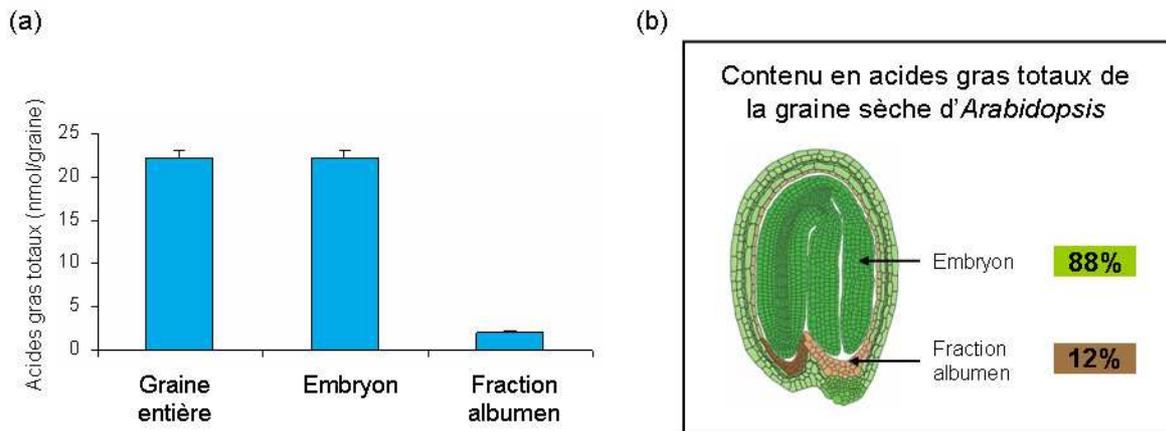


Figure 1.1. Contenu en acides gras d'une graine sèche sauvage (Col-0) d'Arabidopsis.

(a) Teneur en acides gras totaux d'une graine sèche, de l'embryon et de la fraction albumen chez une plante sauvage. Chaque point correspond à la moyenne de cinq répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. (b) Représentation schématique du contenu en acides gras d'une graine d'Arabidopsis à partir des données présentées en (a).

1.1.2 Cinétique d'accumulation des huiles de réserve

De manière globale, dans la graine ou l'embryon, la cinétique d'accumulation des acides gras est de type sigmoïde alors qu'elle est de type affine dans l'albumen, avant d'atteindre un plateau à 15 jours après floraison (JAF) (Figure 1.2). La teneur en huile commence à croître fortement à partir de 9 JAF dans les deux fractions. Cependant la vitesse d'accumulation dans l'embryon est 7,5 fois plus rapide que celle dans la fraction albumen (Figure 1.2). De plus, la période pendant laquelle les TAG sont accumulés s'étale sur 7 jours (9 à 16 JAF) dans l'embryon alors qu'elle est réduite à 5 jours (9 à 14 JAF) dans la fraction albumen.

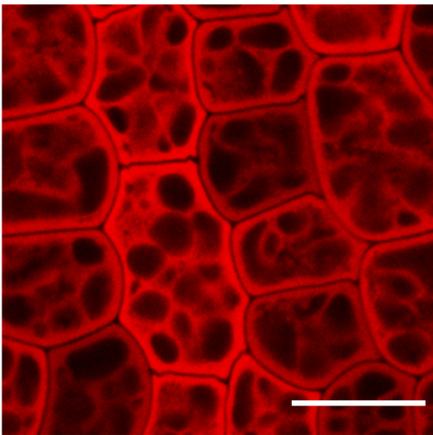
Pour compléter ces données, des cellules d'embryon ou d'albumen, âgées de 10 JAF, ont été colorées au Rouge Nile et observées en microscopie confocale (Figure 1.3). La coloration rouge marque la présence de lipides neutres (TAG) et donc d'oléosomes. Ceux-ci sont présents à la fois dans les cellules de l'embryon et de l'albumen confirmant l'accumulation de TAG dans les deux tissus.

Chapitre I

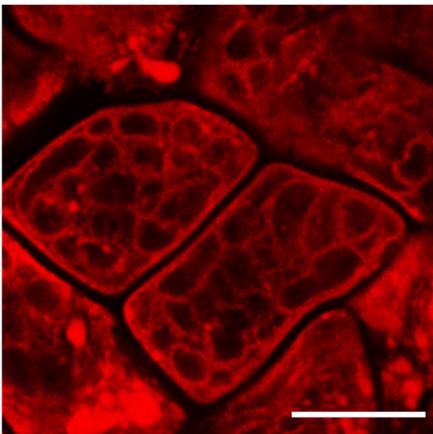
Figure 1.2. Cinétique d'accumulation de l'acide eicosanoïque (20:1) dans la graine (a), l'embryon (b) ou la fraction albumen (c).

Le contenu en acides gras totaux a été analysé par chromatographie en phase gazeuse. L'évolution du contenu en 20:1 est présentée ; celui-ci est un marqueur des triacylglycérols. Chaque point correspond à la moyenne de cinq répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. JAF, Jours après floraison.

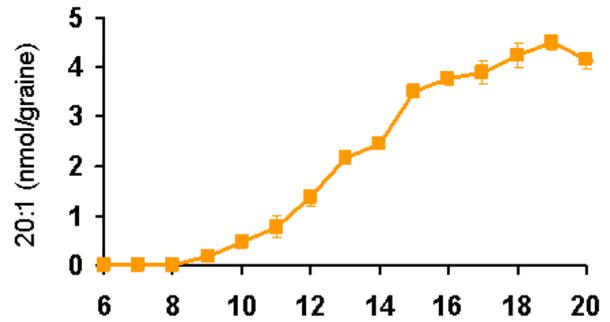
(a) Embryon



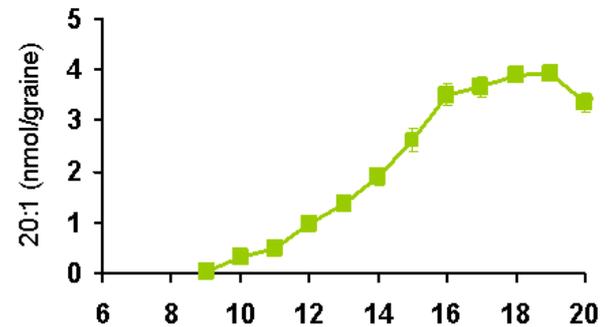
(b) Albumen



(a) Graine entière



(b) Embryon



(c) Fraction albumen

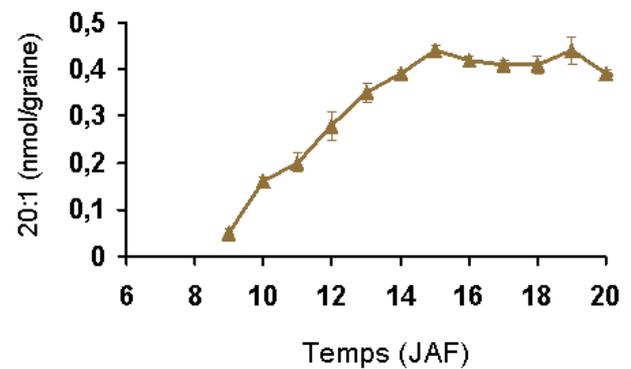


Figure 1.3. Observation au microscope confocal de cellules d'embryon (a) ou d'albumen (b) d'Arabidopsis colorées au Rouge Nile.

Des graines sauvages (Col-0) âgées de 10 jours après floraison sont incubées 30 min dans une solution gélosée contenant du Rouge Nile (dilution 1:1000) et montées entre lame et lamelle après dissection. Barre d'échelle = 10 μ m.

Chapitre I

D'après ces analyses biochimiques, le processus d'accumulation des TAG se déroule parallèlement dans l'embryon et l'albumen, mais chez ce dernier, l'ampleur du phénomène semble réduite. Cependant, la taille des deux compartiments est très inégale. D'après les données publiées par Li et collaborateurs (2006), la fraction albumen représente 34% du poids d'une graine mature d'*Arabidopsis* quand l'embryon en représente 66%. De plus, au sein de la fraction albumen, seul l'albumen à proprement parler accumule des TAG, et pas les téguments. L'écart important de teneur finale en TAG et de leur vitesse d'accumulation entre les deux fractions serait pour partie dû à une différence de taille entre les deux compartiments, le compartiment albumen étant environ quatre fois plus petit que le compartiment embryon. Cependant, cette simple explication ne suffit pas. En effet, d'après les données de microscopie électronique à transmission, il semblerait que le taux de remplissage des cellules de chaque fraction diffère, les cellules de l'albumen étant moins remplies que celles de l'embryon (Penfield et *al.*, 2004).

1.1.3 Composition en acides gras des huiles de réserve

De la même manière, la composition en acides gras d'une graine sèche, de l'embryon excisé et de la fraction albumen a été analysée par chromatographie en phase gazeuse (Figure 1.4). Les profils en acides gras de la graine entière et de l'embryon sont similaires, ce qui témoigne de la prépondérance de ce dernier dans la graine. Les acides gras majoritaires sont le 18:2 et le 18:3, deux acides gras polyinsaturés, avec une proportion respective de 28 et 23 mol%, et les formes monoinsaturées en n-9 du 18:1 et du 20:1, avec respectivement 13 et 18 mol%.

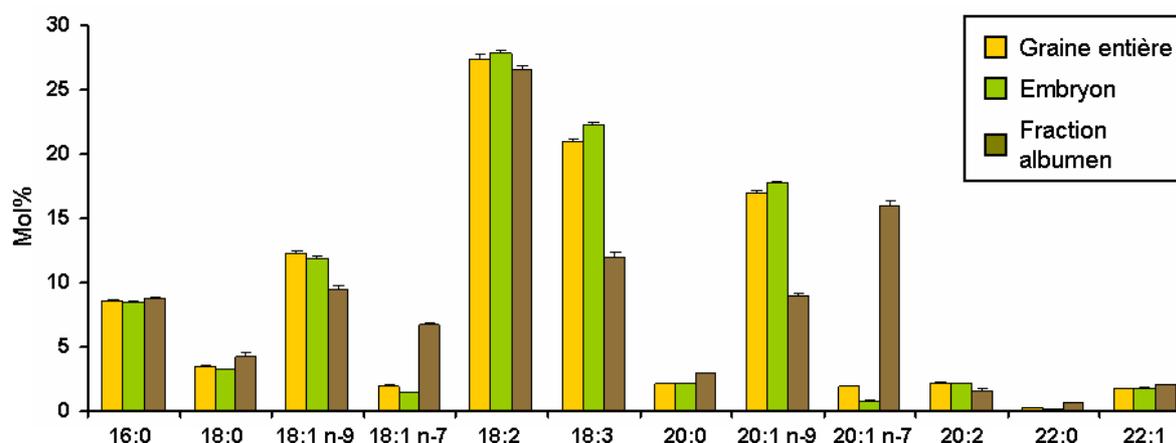


Figure 1.4. Composition en acides gras d'une graine sèche entière, de l'embryon et de la fraction albumen d'une plante sauvage (Col-0) d'*Arabidopsis*.

La composition en acides gras a été analysée par chromatographie en phase gazeuse. Chaque point correspond à la moyenne de cinq répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée.

Chapitre I

En comparaison, le profil de l'albumen diffère avec une diminution de la proportion de 18:3 passant de 23 à 12 mol% et une répartition à peu près égale entre formes monoinsaturées en n-9 et n-7 du 18:1 et du 20:1. Cette proportion différente des deux isomères d'acides gras monoinsaturés constitue une des caractéristiques majeures distinguant les profils lipidiques de l'embryon et de l'albumen (Figure 1.4). Ce point sera développé dans le chapitre IV.

Au cours de la phase de maturation, les acides gras à très longue chaîne (VLCFA) voient leur proportion augmenter, passant d'environ 5% à 9 JAF à 25-30% à 16 JAF, que ce soit dans l'embryon ou dans la fraction albumen (Figure 1.5).

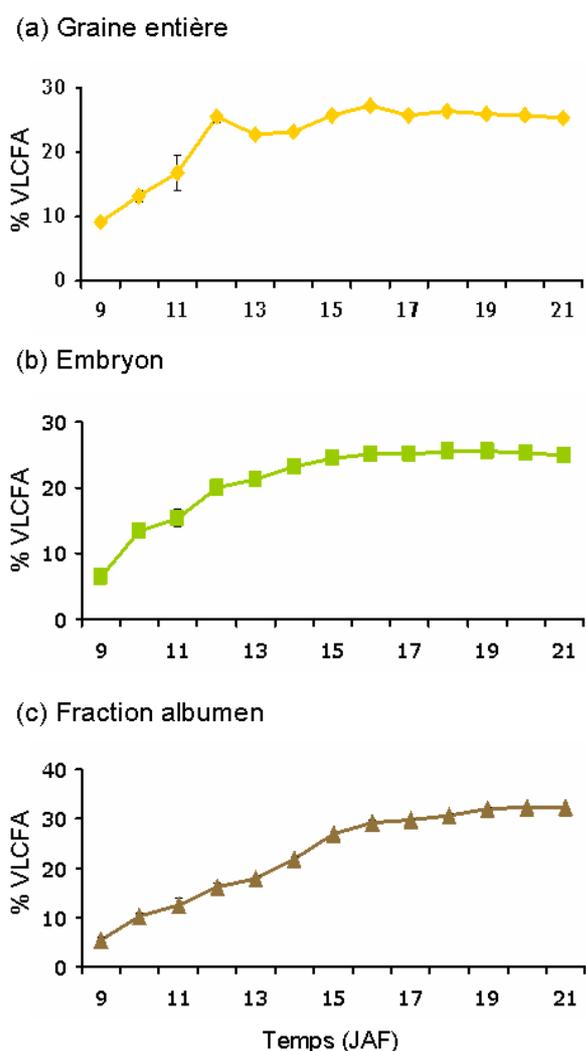


Figure 1.5. Evolution de la proportion en acides gras à très longue chaîne (VLCFA) dans la graine (a), l'embryon (b) ou la fraction albumen (c) au cours de la maturation de la graine.

Le contenu en acides gras a été analysé par chromatographie en phase gazeuse. Chaque point correspond à la moyenne de cinq répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. JAF, Jours après floraison.

Dans la graine entière, les acides gras monoinsaturés en n-7 et en n-9 suivent la même évolution avec une augmentation continue de leur teneur de 9 à 19 JAF (Figure 1.6). Dans l'embryon, la teneur en acides gras de type n-9 croît fortement entre 9 et 16 JAF avant d'atteindre un plateau. De la même manière, la teneur en acides gras de type n-7 atteint un plateau à environ 17 JAF,

Chapitre I

mais leur accumulation débute bien plus tardivement que pour les acides gras de type n-9, à 11 JAF. Ce point sera également abordé dans le chapitre IV. Dans la fraction albumen, la tendance est radicalement différente : la teneur en acides gras de type n-9 commence par augmenter pour atteindre un pic (passant de 10 $\mu\text{g}/\text{graine}$ à 9 JAF à 20 $\mu\text{g}/\text{graine}$ à 13 JAF) puis décroît lentement pour retrouver sa valeur initiale à 21 JAF. En ce qui concerne les acides gras de type n-7, leur teneur croît rapidement de 9 à 10 JAF passant de 2 à 8 $\mu\text{g}/\text{graine}$ avant de se stabiliser entre 9 et 11 $\mu\text{g}/\text{graine}$ (Figure 1.6).

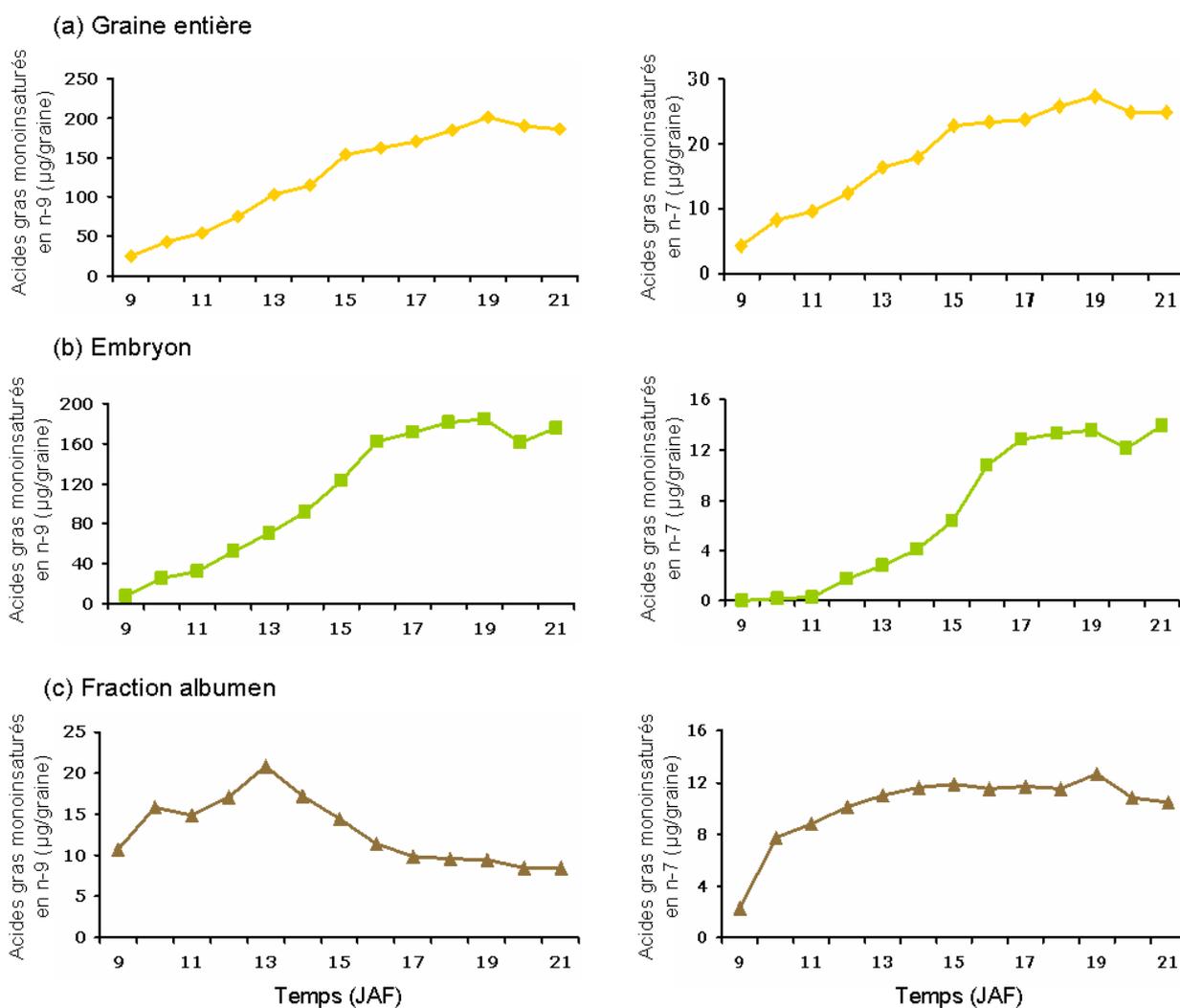


Figure 1.6. Cinétiques d'accumulation des acides gras monoinsaturés en n-9 ou en n-7 dans la graine (a), l'embryon (b) ou la fraction albumen (c).

Le contenu en acides gras a été analysé par chromatographie en phase gazeuse. Les acides gras monoinsaturés en n-9 correspondent au 18:1 n-9 et au 20:1 n-9 et les acides gras monoinsaturés en n-7 correspondent au 18:1 n-7 et au 20:1 n-7. Chaque point correspond à la moyenne de cinq répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. JAF, Jours après floraison.

Chapitre I

En conclusion, le processus d'accumulation des TAG semble se dérouler parallèlement dans les deux compartiments, mais leurs cinétiques de mise en réserve et leurs compositions en acides gras diffèrent.

1.2. La mise en réserve des protéines

Il existe chez *Arabidopsis*, deux grands groupes de protéines de réserve : les napines (2S) et les cruciférines (12S). Elles sont très abondantes et facilement distinguables après séparation sur gel SDS-PAGE (Fujiwara et al., 2002 ; Jolivet et al., 2004 ; D'andrea et al., 2007). Leurs cinétiques

d'accumulation ont donc été suivies selon cette technique sur graine entière et sur tissus disséqués (Figure 1.7).

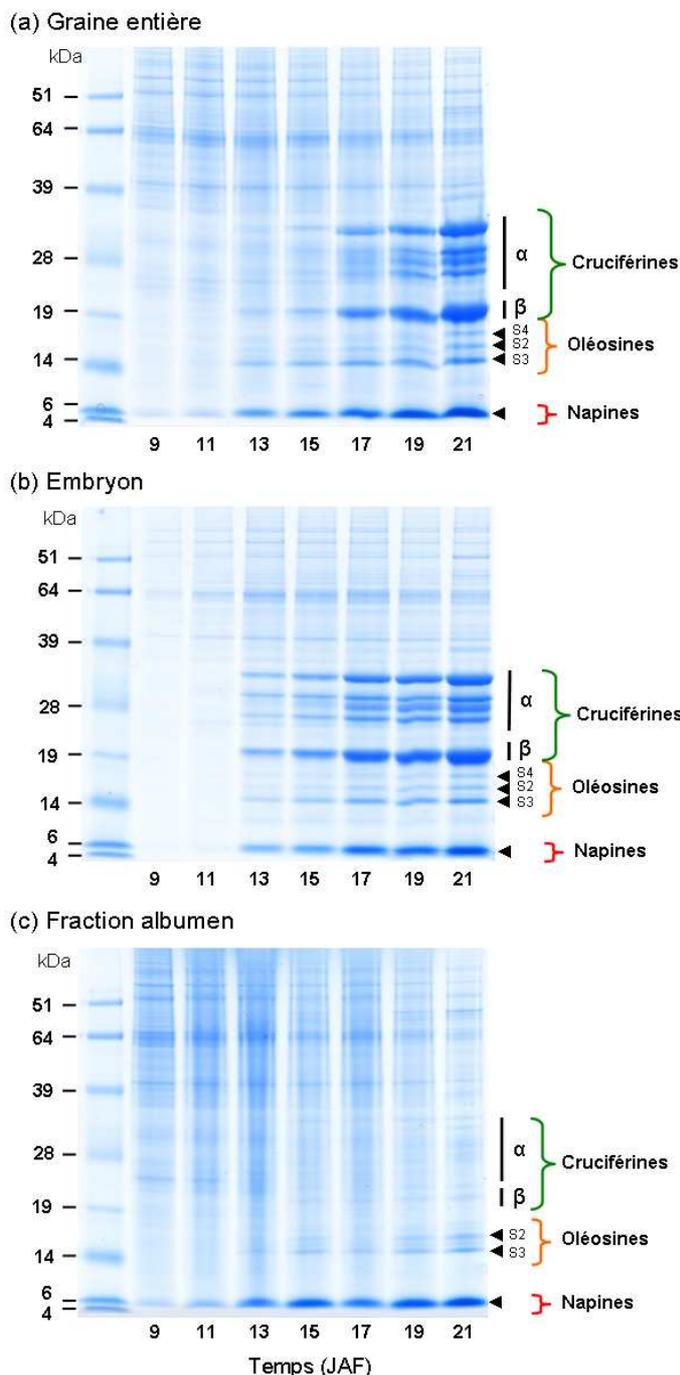


Figure 1.7. Cinétique d'accumulation des protéines de réserve dans la graine (a) l'embryon (b) ou la fraction albumen (c) analysée par SDS-PAGE.

Le contenu en protéines de quatre graines, quatre embryons ou seize fractions albumen a été déposé dans chaque puits. Les protéines ont été séparées sur gel NuPAGE 12% puis colorées au bleu de Coomassie G250. Le marqueur de poids moléculaire Seeblyue a été utilisé. Les cruciférines α et β correspondant aux gènes *CRA1* (At5g44120), *CRB* (At1g03880) et *CRC* (At4g28520), les napines correspondant aux gènes *At2S1* (At4g27140), *At2S2* (At4g27150), *At2S3* (At4g27160), *At2S4* (At4g27170) et *At2S5* (At5g54740) ainsi que les oléosines *S2/OLEO3* (At3g27660 ; 20,3 kDa), *S3/OLEO1* (At4g25140 ; 18,6 kDa) et *S4/OLEO2* (At5g40420 ; 21,1 kDa) sont identifiables (D'andrea et al., 2007 ; Jolivet et al., 2011). JAF, Jours après floraison.

Chapitre I

Dans les graines entières ou les embryons, les cruciférines α et β ainsi que les napines commencent à être détectées à partir de 13 JAF, leur teneur augmentant régulièrement jusqu'à 21 JAF. Les profils protéiques contrastés observés à 11 et 13 JAF, dans l'embryon indiquent, notamment, le début de la phase de maturation et l'initiation du processus d'accumulation de réserves à cette date. Ces données sont confirmées par les analyses en western blot (Figure 1.8). Néanmoins, toutes les isoformes de cruciférines n'ont pas exactement la même cinétique d'accumulation. Ainsi les isoformes α sont les premières à s'accumuler et sont visibles dès 13 JAF, suivies par les isoformes β à partir de 15 JAF (Figure 1.8).

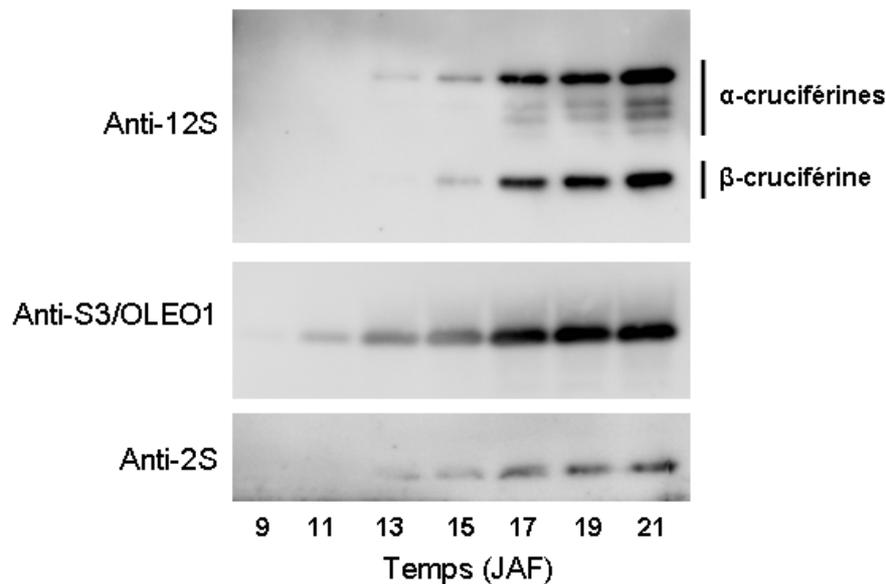


Figure 1.8. Immunodétection des cruciférines (12S), des napines (2S) et de l'oléosine S3 sur des embryons en développement d'une graine sauvage (Col-0).

Le contenu en protéines de 0,05 embryon (Anti-2S et Anti-12S) ou 0,01 embryon (Anti-S3) a été déposé dans chaque puits. Les protéines ont été séparées sur gel NuPAGE 12% puis transférées sur membrane PVDF et hybridées avec des anticorps anti-12S (dilution 1:5000), anti-2S (dilution 1:2000) ou anti-S3 (dilution 1:5000). Un anticorps secondaire couplé à la Horse Radish Peroxidase (HRP) permet la détection par chemiluminescence. JAF, Jours après floraison.

Dans la fraction albumen, le patron d'accumulation des protéines de réserve est différent. Les cruciférines sont à peine détectables sur gel SDS-PAGE, alors que les napines sont bien présentes à partir de 11 JAF (Figure 1.7). Les analyses en western blot nous précisent que les quelques cruciférines présentes sont principalement les isoformes α qui apparaissent à partir de 13 JAF, les isoformes β étant tout juste détectées à partir de 15 JAF (Figure 1.9).

Chapitre I

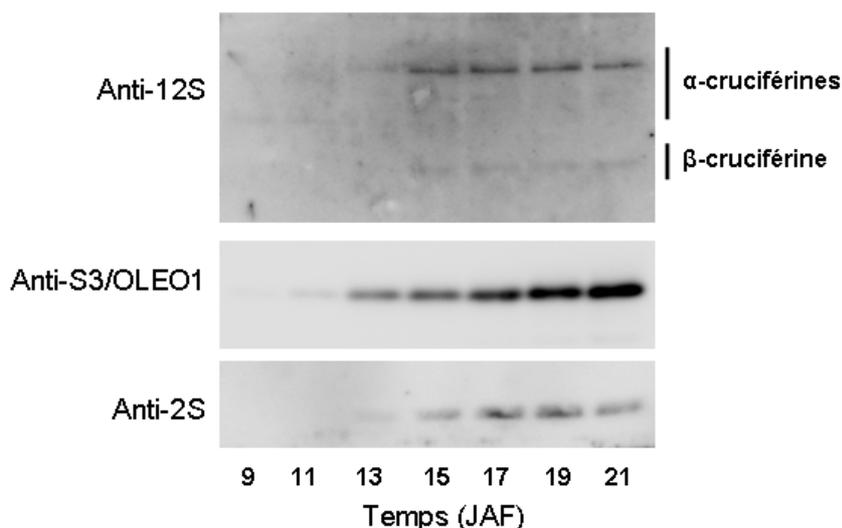


Figure 1.9. Immunodétection des cruciférines (12S), des napines (2S) et de l'oléosine S3 sur la fraction albumen au cours du développement d'une graine sauvage (Col-0).

Le contenu en protéines de 0,2 fraction albumen (Anti-2S et Anti-12S) ou 0,04 fraction albumen (Anti-S3) a été déposé dans chaque puits. Les protéines ont été séparées sur gel NuPAGE 12% puis transférées sur membrane PVDF et hybridées avec des anticorps anti-12S (dilution 1:5000), anti-2S (dilution 1:2000) ou anti-S3 (dilution 1:5000). Un anticorps secondaire couplé à la Horse Radish Peroxidase (HRP) permet la détection par chimiluminescence. JAF, Jours après floraison.

Pour conclure, albumen et embryon accumulent tout deux des protéines de réserve au cours de la maturation, l'embryon stockant des napines et des cruciférines, l'albumen stockant préférentiellement des napines.

II – Expression des gènes du métabolisme

Comme nous venons de le voir précédemment, embryon et albumen stockent des composés de réserve. Pour conforter et compléter les données présentées dans la première partie, la cinétique d'accumulation des transcrits de quelques gènes impliqués dans le métabolisme des TAG ou des protéines de réserve a été suivie dans l'embryon et dans la fraction albumen entre 10 et 16 JAF (Figure 1.11 et 10.12). Pour ce faire, des ARN ont été extraits à partir de graines en développement disséquées : fraction embryon *versus* fraction albumen. Ils ont ensuite été rétrotranscrits en ADNc et analysés en RT-PCR quantitative. La quantité de transcrits de ces gènes est alors présentée comme une proportion relative par rapport à la quantité de transcrits d'un gène de ménage, *EF1aA4 (EF)* (Nesi et al., 2000).

Chapitre I

Pour vérifier la « pureté » de chaque échantillon d'ARNm, l'expression de gènes connus pour être spécifiquement exprimés dans l'albumen (*ZHOUP1*, *At1g49770* Yang et al., 2008) ou dans l'embryon (gène codant une terpène cyclase, *At2g23230*, Le et al., 2010) a été mesurée (Figure 1.10). Le gène *ZHOUP1*, un régulateur de la dégénérescence de l'albumen, exprimé spécifiquement dans ce dernier (Yang et al., 2008), est dix mille fois plus abondant dans la fraction albumen que dans la fraction embryon (Figure 1.10a). Inversement, les ARNm de la terpène cyclase codée par *At2g23230*, un des 9 gènes reconnus comme étant exprimés spécifiquement dans l'embryon (Le et al., 2010), ne sont pas détectés dans la fraction albumen par RT-PCR quantitative (Figure 1.10b). Les extraits d'ARNm de chaque fraction sont donc purs, et les contaminations entre fractions seront donc considérées comme négligeables par la suite.

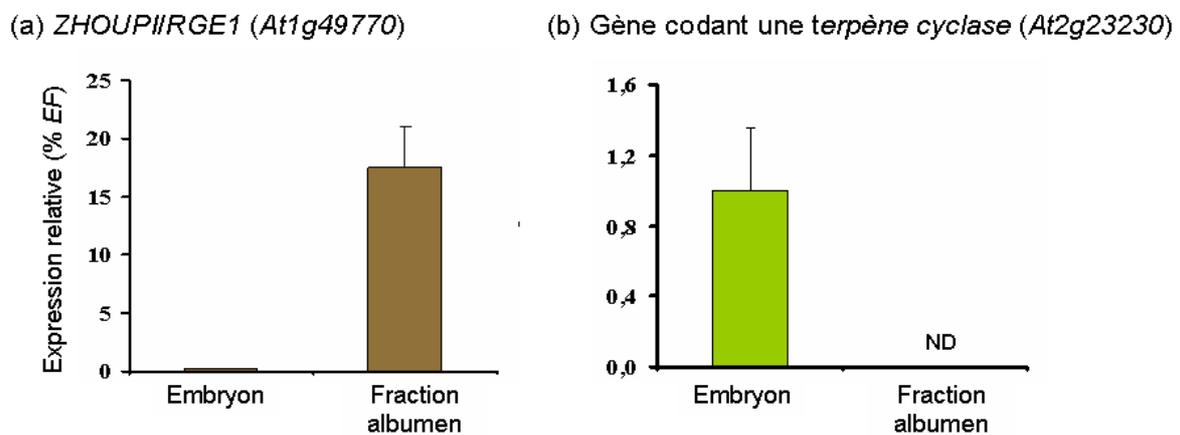


Figure 1.10. Évaluation de la « pureté » des d'ARNm extraits de la fraction albumen ou de l'embryon.

Le gène *ZHOUP1* (*At1g49770*) (a) est exprimé spécifiquement dans l'albumen et constitue donc un marqueur de ce tissu (Kondou et al., 2008). Le gène de la terpène cyclase (*At2g23230*) (b) est exprimé spécifiquement dans l'embryon (Le et al., 2010). Les mesures ont été réalisées sur des graines âgées de 12 jours après floraison. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée.

2.1 Les acteurs du métabolisme lipidique

La mise en réserve des TAG peut être schématiquement divisée en trois étapes : (i) la synthèse des acides gras dans le plaste, (ii) leur assemblage dans le réticulum endoplasmique, (iii) leur stockage dans les oléosomes, gouttelettes remplies de TAG et entourées par des phospholipides et des protéines, les oléosines (Baud et al., 2008). La cinétique d'accumulation des transcrits d'un gène clef de chaque étape précédemment citée a été établie (Figure 1.11).

Chapitre I

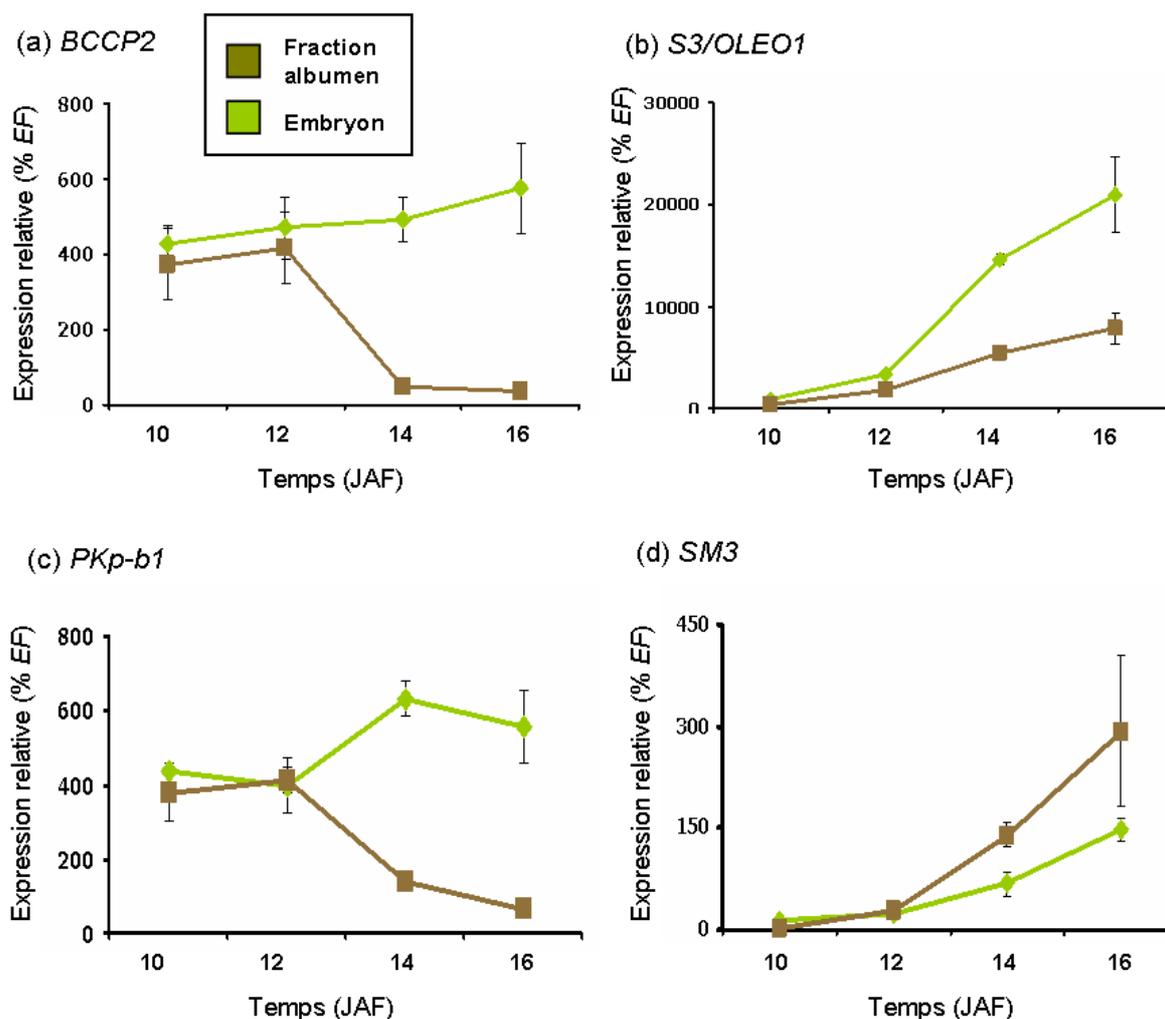


Figure 1.11. Cinétiques d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des TAG dans la fraction albumen et dans l'embryon entre 10 et 16 JAF.

Les cinétiques d'expression de deux gènes de la biosynthèse des acides gras, *BCCP2* (*At5g15530*) (a) et *PKp-b2* (*At5g52920*) (c) ainsi que celles de deux gènes codant des oléosines *S3/OLEO1* (*At4g25140*) (b) et *SM3* (*At2g25890*) (d) sont présentées. Les oligonucléotides utilisés sont présentés dans l'annexe 10. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. *BCCP2*, BIOTIN CARBOXYL CARRIER PROTEIN2 ; JAF, Jours après floraison; *PKp-b1*, gène codant la sous unité $\beta 1$ de la PYRUVATE KINASE plastidial.

Les gènes codant la sous-unité $\beta 1$ de la pyruvate kinase plastidiale (*PKp-b1* ; Andre et al., 2007) et la sous unité *BCCP2* (biotin carboxyl carrier protein2) de l'acétyl-CoA carboxylase hétéromérique (Thelen et Ohlrogge, 2002), deux enzymes participant à la synthèse *de novo* d'acides gras, sont exprimés à la fois dans l'embryon et la fraction albumen (Figure 1.11a et c). De plus, la cinétique d'expression de ces deux gènes dans chaque compartiment est globalement superposable en début

Chapitre I

de maturation. Dans l'embryon, la quantité relative de transcrits pour ces deux gènes demeure importante entre 10 et 16 JAF alors que dans la fraction albumen, elle chute brusquement à partir de 14 JAF. Ces données sont à mettre en relation avec la cinétique d'accumulation des TAG présentée dans le paragraphe 1.1.2 montrant une diminution de leur vitesse d'accumulation plus précoce dans l'albumen par rapport à l'embryon.

Les oléosines S3/OLEO1 et SM3 sont quant à elles impliquées dans le stockage des TAG dans les oléosomes (Kim et *al.*, 2002 ; Jolivet et *al.*, 2004 ; D'Andrea et *al.*, 2007). Les niveaux de transcrits correspondant connaissent une forte croissance à partir de 12 JAF qui se poursuit jusqu'à 16 JAF. Le gène codant l'oléosine S3/OLEO1, avec des niveaux d'expression dont l'ordre de grandeur avoisine 10⁴% de *EF*, est une oléosine importante de la graine (D'Andrea et *al.*, 2007). La cinétique d'accumulation de ses transcrits ressemble à une sigmoïde dans l'embryon avec un point d'inflexion proche de 13 JAF alors qu'elle est plutôt de type affine dans la fraction albumen. A 14 et 16 JAF, son niveau d'expression dans la fraction albumen est environ trois fois plus faible que celui dans l'embryon (Figure 1.11b). Au niveau protéique, l'oléosine S3/OLEO1 s'accumule de manière continue dans l'embryon et dans la fraction albumen à partir de 11 JAF (Figures 1.7, 1.8 et 1.9). A l'inverse, *SM3* est plus exprimé dans l'albumen que dans l'embryon. C'est une oléosine encore très peu étudiée et minoritaire dans la graine d'*Arabidopsis* (Figure 1.11d).

Tous les gènes du métabolisme des TAG testés sont exprimés à la fois dans l'embryon et dans la fraction albumen. Ces résultats sont confirmés par les données transcriptomiques publiées par Le et collaborateurs (2010) et Belmonte et collaborateurs (2012). L'utilisation de ces données disponibles sur le site *Arabidopsis* eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) permet d'étendre cette conclusion à l'ensemble des acteurs de la voie de biosynthèse des TAG, attestant du fonctionnement de cette voie métabolique et de l'accumulation de TAG (Figures 1.1, 1.2, et 1.3) dans les deux compartiments (Figures 0.24, 0.26, 0.27 et Annexe 1). Néanmoins, des différences notables d'expression sont observables entre embryon et albumen (Figure 1.11) pouvant expliquer les variations d'accumulation des TAG observées entre les deux compartiments (Figure 1.2 et 1.4).

2.2 Les gènes codant les protéines de réserve

De manière globale, le niveau d'expression de tous les gènes codant des protéines de réserve analysés connaît une croissance importante à partir de 12 JAF, c'est-à-dire depuis le début de la maturation de la graine. Celle-ci se poursuit au moins jusqu'à 16 JAF (Figure 1.12).

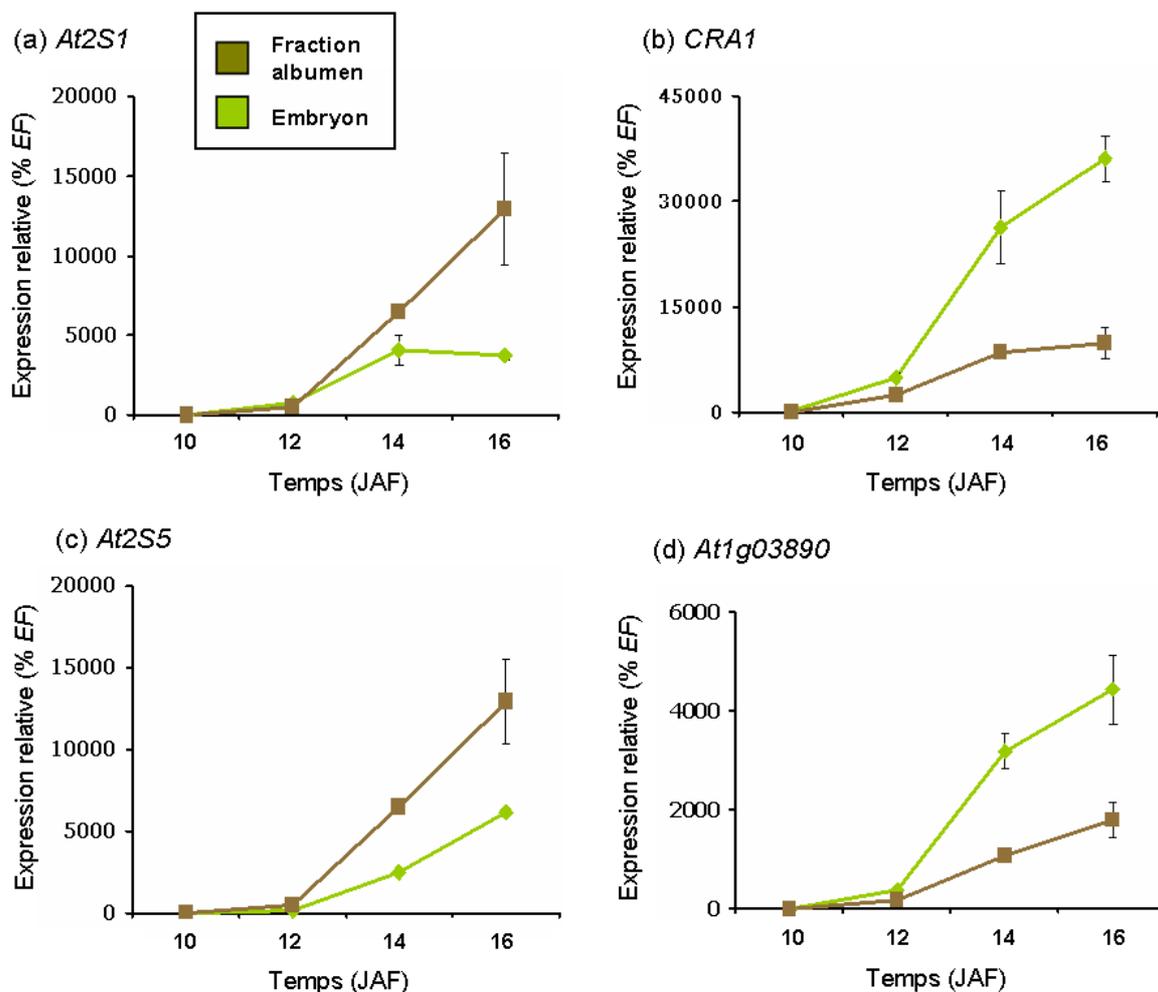


Figure 1.12. Cinétiques d'expression de gènes codant des protéines de réserve dans la fraction albumen et dans l'embryon entre 10 et 16 JAF.

Les cinétiques d'expression de deux gènes codant des cruciférines, *CRA1* (*At5g44120*) (b) et *At1g03890* (d) ainsi que celle de deux gènes codant des napines *At2S1* (*At4g27140*) (a) et *At2S5* (*At5g54740*) (c) sont présentées. Les oligonucléotides utilisés sont présentés dans l'annexe 10. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. JAF, Jours après floraison.

Chapitre I

Les gènes codant les napines (*At2S1* et *At2S5*) voient leur niveau d'expression relatif augmenter plus rapidement dans la fraction albumen ($3.10^3\%$ de *EF* par jour) que dans l'embryon ($1,5.10^3\%$ de *EF*). Elles seraient donc exprimées à un niveau plus important dans ce compartiment que dans l'embryon (Figure 1.12a et c). A contrario, le niveau de transcrits des gènes codant les cruciférines (*CRA1* et *At1g03890*) augmente trois fois plus rapidement dans l'embryon que dans la fraction albumen, augmentation qui suit une cinétique de type sigmoïde avec un point d'inflexion à environ 13 JAF (Figure 1.12b et d).

L'utilisation des données transcriptomiques publiées par Le et collaborateurs (2010) et disponibles sur le site Arabidopsis eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) permet d'affirmer que l'ensemble des gènes codant des protéines de réserve de la graine d'Arabidopsis sont exprimés à la fois dans l'embryon et l'albumen, à des niveaux variables. En prenant en compte l'ensemble des données biochimiques et transcriptomiques (Figures 1.7, 1.8, 1.9 et 1.12), il apparaît que les protéines de réserve de l'albumen sont dominées par le groupe des napines alors que celles de l'embryon semblent légèrement dominées par les cruciférines.

III – Expression des régulateurs transcriptionnels de la maturation de la graine

3.1 Les régulateurs maîtres de la maturation de la graine

Les régulateurs maîtres du développement de la graine que nous avons considérés sont au nombre de cinq : LEAFY COTYLEDON2 (*LEC2*), LEAFY COTYLEDON1 (*LEC1*), FUSCA3 (*FUS3*), ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (*ABI3*) et LEAFY COTYLEDON1-LIKE (*L1L*). L'abondante littérature dont ils font l'objet s'est concentrée sur leur rôle dans l'embryon (Santos-Mendoza et al., 2008). Or, comme nous venons de le montrer précédemment, l'albumen, à l'instar de l'embryon, connaît lui aussi une phase de maturation notamment caractérisée par l'accumulation de composés de réserve. Ce processus de maturation pourrait-il être contrôlé par les régulateurs maîtres ? Ces derniers sont-ils exprimés dans l'albumen ? Pour répondre à ces questions, le niveau d'expression des gènes correspondants a été étudié dans l'embryon et dans la fraction albumen au cours du processus de maturation (Figure 1.13).

Chapitre I

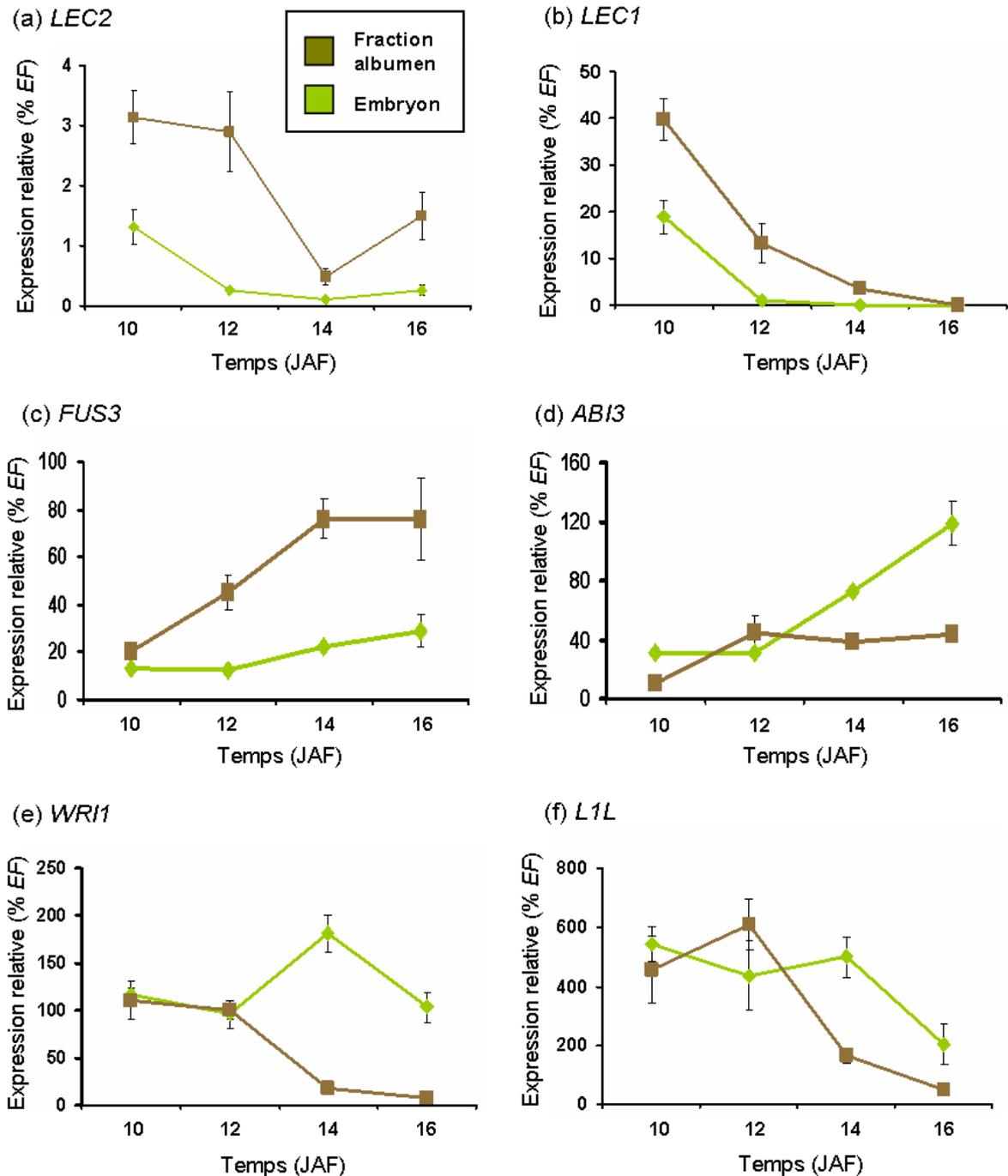


Figure 1.13. Cinétiques d'expression des régulateurs maîtres du développement de la graine et de *WRI1* dans la fraction albumen et dans l'embryon entre 10 et 16 JAF.

Les cinétiques d'expression de *LEC2* (At1g28300) (a), *LEC1* (At1g21970) (b), *FUS3* (At3g26790) (c), *ABI3* (At3g24650) (d), *L1L* (At5g47670) (f) et *WRI1* (At3g54320) (e) sont présentées. Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. *ABI3*, *ABCISSIC ACID INSENSITIVE3* ; *FUS3*, *FUSCA3* ; *JAF*, Jours après floraison ; *LEC1*, *LEAFY COTYLEDON1* ; *L1L*, *LEAFY COTYLEDON1-LIKE* ; *LEC2*, *LEAFY COTYLEDON2* ; *WRI1*, *WRINKLED1*.

Chapitre I

La quantité relative d'ARNm de *LEC2* et *LEC1* décroît dans l'embryon et dans la fraction albumen entre 10 et 16 JAF. L'expression relative de *LEC2*, assez faible (moins de 3% de *EF*), est tout de même plus importante dans la fraction albumen que dans l'embryon. De même, *LEC1* semble plus exprimé dans la fraction albumen que dans l'embryon et de manière générale à des niveaux plus élevés que *LEC2* (jusqu'à 40% de *EF*) (Figure 1.13a et b).

En ce qui concerne *FUS3* et *ABI3*, deux gènes dont l'expression croît au cours de la phase de maturation, leurs patrons divergent avec une expression de *FUS3* plus importante dans la fraction albumen et une expression d'*ABI3* qui devient prépondérante dans l'embryon à partir de 12 JAF (Figure 1.13c et d).

Enfin, *L1L* présente un patron d'expression original par rapport aux autres régulateurs maîtres, avec des niveaux d'accumulation de transcrits très importants (jusqu'à 500% de *EF*) comparables dans les deux compartiments et qui décroissent au cours de la maturation de la graine (Figure 1.13f).

L'ensemble de ces résultats est concordant avec ceux publiés par Le et collaborateurs (2010). Tous les régulateurs maîtres sont donc exprimés à la fois dans l'embryon et dans la fraction albumen à des niveaux comparables, régulant probablement le processus de maturation dans ces deux compartiments. Cependant, il n'est pour l'instant pas possible d'expliquer de manière simple les différences observées préalablement en termes d'accumulation de transcrits pour les gènes du métabolisme et en termes d'accumulation de composés de réserve (Figures 1.11 et 1.12) par les variations des patrons d'expression des régulateurs maîtres (Figure 1.13).

3.2 Un régulateur secondaire de la maturation de la graine : *WRI1*

LEC2 régule positivement l'accumulation des TAG, à la fois de manière directe et de manière indirecte *via* un régulateur secondaire appelé *WRI1* ciblant des gènes de biosynthèse des acides gras comme *BCCP2* et *PKp-b1*. D'après les données de RT-PCR quantitative, *WRI1* est exprimé dans l'embryon et dans la fraction albumen (Figure 1.13e). Entre 10 et 12 JAF, le niveau d'expression de *WRI1* est identique dans les deux compartiments puis il chute dans la fraction albumen entre 12 et 16 JAF. Le profil d'expression de *WRI1* dans ces deux fractions est parfaitement superposable à ceux de *BCCP2* et *PKp-b1*, deux gènes qu'il régule (Figure 1.11a et c et 1.13e).

Conclusion et perspectives

Au vu de ces résultats et de ceux récemment publiés par Belmonte et collaborateurs (2012), le processus de maturation semble se dérouler parallèlement dans l'embryon et dans l'albumen avec notamment l'accumulation de composés de réserve (TAG et protéines de réserve) dans les deux tissus. Si ce processus est comparable dans les grandes lignes, il diffère dans la proportion des différents types de protéines ou d'acides gras mis en réserve ainsi que dans leurs cinétiques d'accumulation (Figure 1.14).

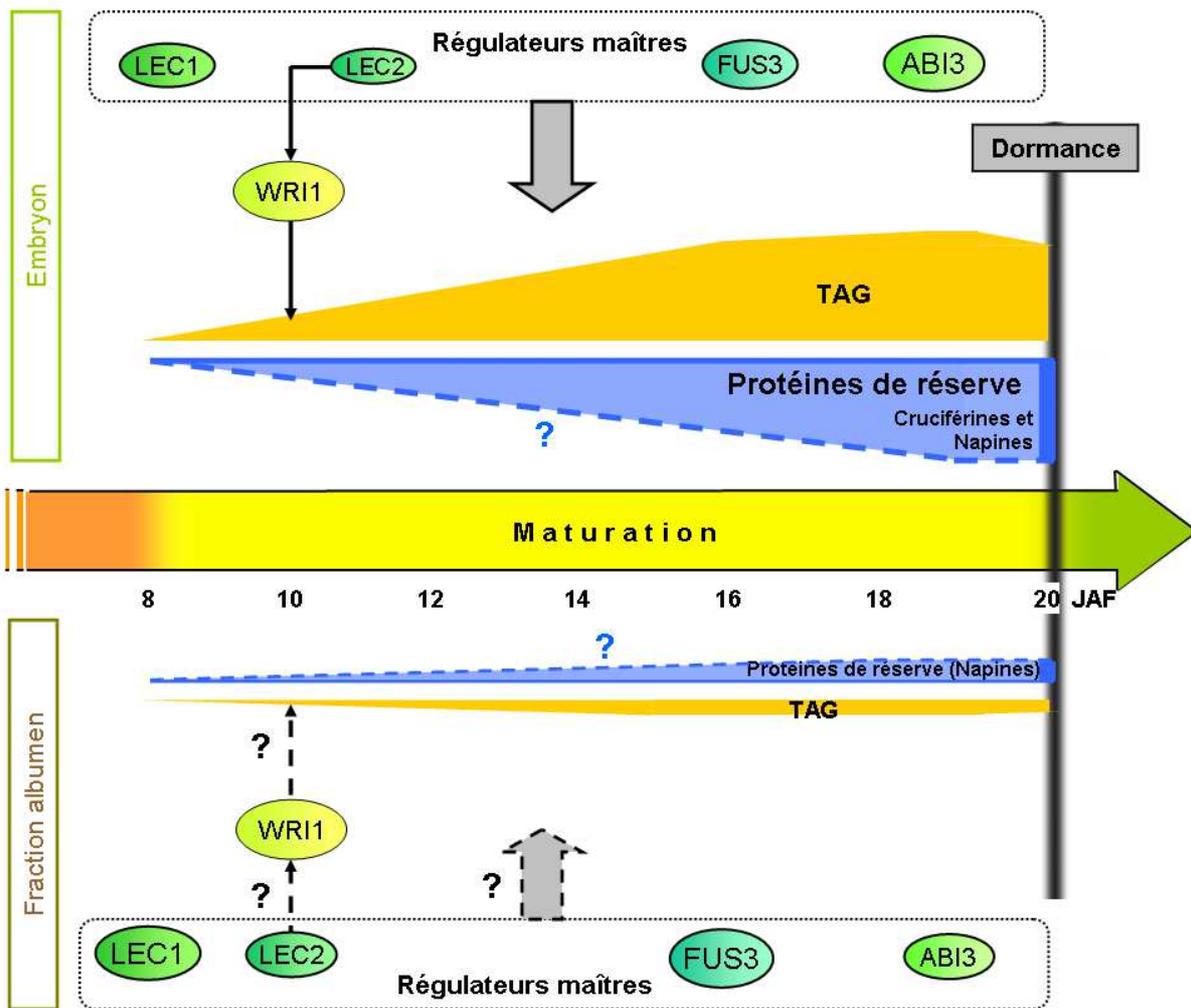


Figure 1.14. Schéma interprétatif présentant le processus de maturation et sa régulation dans l'embryon et l'albumen.

Les cinétiques d'accumulation des TAG et des protéines de réserve déduites des figures 1.2, 1.4, 1.5, 1.6, 2.27 et 2.29 sont présentées dans les deux compartiments. Les régulateurs maîtres exprimés dans chaque tissu ont été représentés. Les flèches pleines indiquent une régulation positive démontrée, les flèches en pointillés indiquent une régulation positive hypothétique du processus de maturation. ABI3, ABICISSIC ACID INSENSITIVE3 ; FUS3, FUSCA3 ; JAF, Jours après floraison ; LEC1, LEAFY COTYLEDON1 ; LEC1L, LEAFY COTYLEDON1-LIKE ; LEC2, LEAFY COTYLEDON2 ; TAG, Triacylglycérols ; WRI1, WRINKLED1.

Chapitre I

Les cinq régulateurs maîtres que nous avons considérés sont présents dans les deux compartiments, même si l'abondance relative de leurs transcrits diffère dans chaque fraction. De même, le régulateur secondaire WRI1, contrôlant la synthèse *de novo* d'acides gras, est présent dans les deux compartiments. Ces données nous poussent à émettre l'hypothèse selon laquelle des mécanismes comparables d'activation du processus de maturation seraient à l'oeuvre dans les deux compartiments.

Les résultats présentés dans ce chapitre correspondent à des données d'expression, il faudrait dans un premier temps quantifier les protéines correspondantes dans chaque fraction en utilisant par exemple une approche de type western blot. Des anticorps anti-LEC2 et anti-ABI3 sont en cours de test au laboratoire et devraient être prochainement disponibles. Afin de déterminer si les mécanismes de régulation déjà connus (et impliquant les régulateurs cités ci-dessus) sont actifs dans l'albumen comme dans l'embryon, il serait intéressant de reprendre les études menées sur l'embryon en se focalisant sur l'albumen. En ce qui concerne la régulation des gènes de biosynthèse des acides gras impliquant LEC2 et WRI1, il faudrait valider *in planta* les interactions déjà mises au jour dans l'embryon (les preuves obtenues *in vitro* restant valables). Par exemple, il serait intéressant d'étudier l'activité du promoteur de *WRI1* ou l'accumulation de ses transcrits dans la fraction albumen de type sauvage ou en fond mutant *lec2*, ou l'activité des promoteurs de *BCCP2* et de *PKP-b2* et l'accumulation de leurs transcrits dans la fraction albumen de type sauvage ou en fond mutant *wri1*.

Les analyses biochimiques et les analyses d'expression réalisées sur des graines entières de mutants *lec2*, *lec1*, *fus3*, *abi3*, *l1l* (To et al., 2006) devraient être reprises en considérant d'une part l'embryon et d'autre part la fraction albumen pour *in fine* comparer les effets dans les deux tissus. Selon les résultats qui seront obtenus, deux hypothèses sont envisageables : (i) soit ces nouvelles données permettent d'expliquer les variations en terme de proportions et de nature des composés mis en réserves dans les deux compartiments, (ii) soit elles ne le permettent pas et il faudra invoquer l'existence d'autres régulateurs transcriptionnelles spécifiques de l'embryon ou de l'albumen.

Chapitre II – MYB118, un facteur de transcription régulant la répartition des composés de réserve dans la graine d'*Arabidopsis*

Ce chapitre présente l'étude détaillée du facteur de transcription MYB118. Après une description précise du patron d'expression de *MYB118*, il s'intéressera aux éléments susceptibles de réguler son expression, avant de laisser une large place à sa caractérisation fonctionnelle *via* l'étude de mutants et la recherche de cibles.

I - Patron d'expression de *MYB118*

MYB118 a été isolé à partir d'un crible exploitant les données transcriptomiques disponibles dans les bases publiques et visant à identifier des candidats co-régulés avec les gènes codant les enzymes de la voie de biosynthèse des acides gras et avec *WRI1* dans la graine, c'est-à-dire présentant un pic d'expression en début de maturation (Baud et Lepiniec, 2010). Les grandes lignes du patron d'expression de *MYB118* étant ainsi établies, l'objectif de cette première partie est de confirmer et de préciser ces données préliminaires. Pour réaliser une étude extensive et quantitative de l'expression de *MYB118* dans les différents tissus de la plante, l'utilisation de la technique de RT-PCR quantitative a été choisie.

1.1 Etude de l'expression de *MYB118* par RT-PCR quantitative

Dans un premier temps, l'accumulation des transcrits de *MYB118* a été analysée dans différents organes d'une plante sauvage de l'écotype Col-0 (Figure 2.1). Aucune amplification n'a pu être détectée dans les racines, les tiges, les feuilles ou encore dans les fleurs. L'expression de *MYB118* semble restreinte aux siliques en cours de développement avec une accumulation encore très faible 4 JAF, qui atteint un maximum 8 JAF (5,5% de *EF*) avant de décroître jusqu'à 16 JAF. En conclusion, *MYB118* est exprimé spécifiquement dans les siliques en développement avec un pic d'expression au début de la phase de maturation de la graine.

Chapitre II

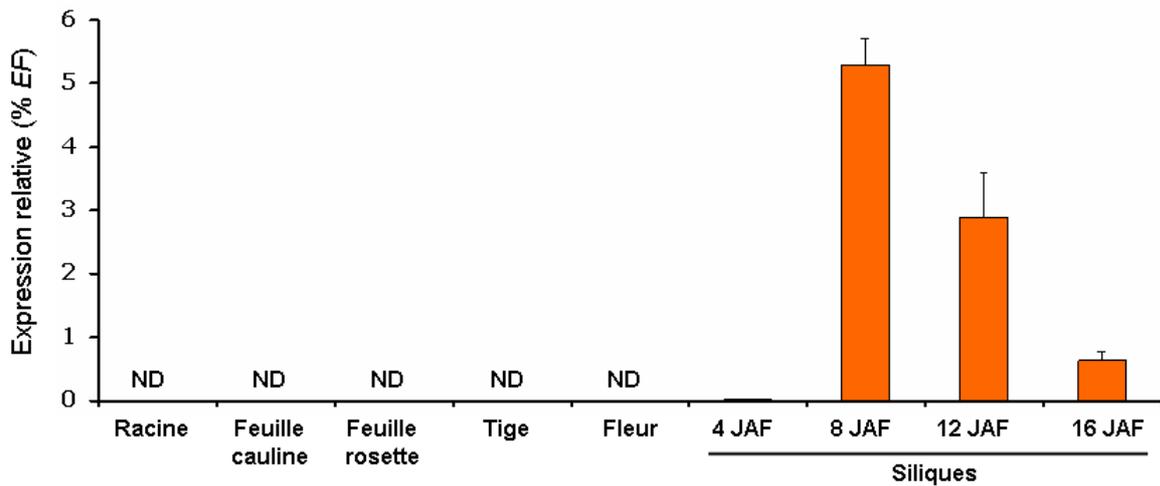


Figure 2.1. Expression relative de *MYB118* dans différents organes d'une plante sauvage (Col-0) étudiée par RT-PCR quantitative.

Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. JAF, Jours après floraison ; ND : non détecté.

Pour aller plus loin dans la caractérisation du patron d'expression, une cinétique d'accumulation des transcrits *MYB118* a été menée sur des ADNc provenant de graines en développement isolées des siliques (Figure 2.2). L'expression de *MYB118* augmente entre 4 et 10 JAF, passant de 0,5 à près de 11% de *EF*, avant de décroître d'abord fortement jusqu'à 18 JAF (1% de *EF*), puis plus modérément jusqu'à 22 JAF (0,5% de *EF*). L'expression de *MYB118* atteint donc un pic 10 JAF, au début de la phase de maturation de la graine.

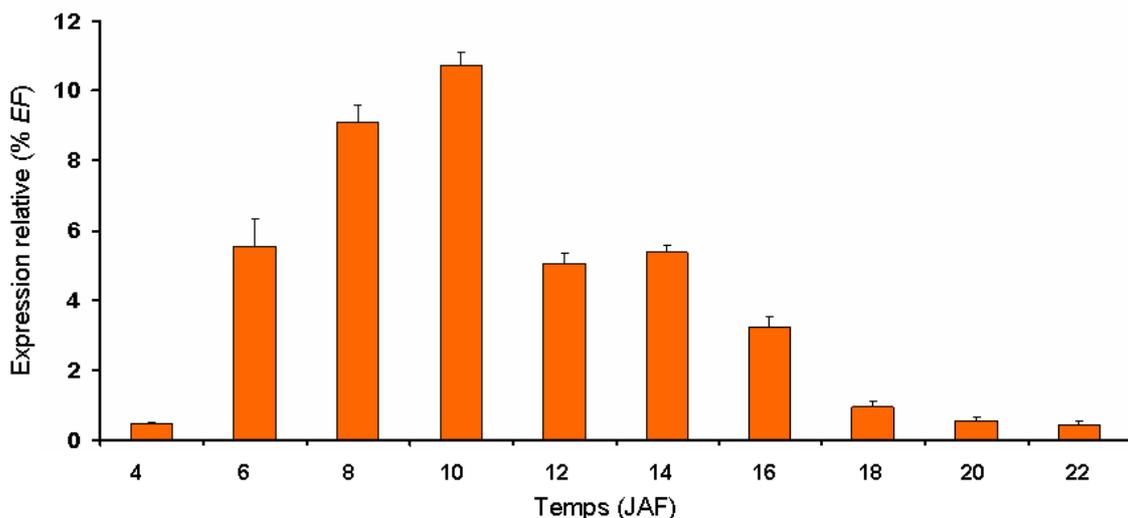


Figure 2.2. Cinétique d'accumulation des transcrits de *MYB118* dans des graines en développement d'une plante sauvage (Col-0) analysée par RT-PCR quantitative.

Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. JAF, Jours après floraison.

Chapitre II

Ces données confirment la grande similarité des patrons d'expression de *MYB118*, de *WRI1* et de deux de ses cibles, *BCCP2* et *PKp-b1* (Baud et al., 2007).

1.2 Activité du promoteur de *MYB118*

L'activité d'un promoteur peut être détectée en utilisant un gène rapporteur comme le gène *uidA* qui code une enzyme appelée β -glucuronidase dont l'activité peut être quantifiée *in vitro* en utilisant un composé métabolisé par celle-ci, le X-Gluc. La mesure de l'activité d'un promoteur n'est pas toujours strictement équivalente à la mesure du niveau de transcrits du gène se trouvant sous contrôle dudit promoteur ; néanmoins, elle constitue une méthode d'investigation complémentaire qui peut fournir des données intéressantes concernant l'expression du gène considéré.

Partant du constat empirique que la majorité des éléments *cis*-régulateurs nécessaires à l'expression d'un gène se situe la plupart du temps dans une région promotrice de moins de 1 kb chez *Arabidopsis*, l'étude du promoteur de *MYB118* a été initiée en fusionnant au gène *uidA* les 970 premières paires de bases de son promoteur (en amont du site d'initiation de la traduction). Pour ce faire, le promoteur de *MYB118* a été amplifié à partir d'ADN génomique extrait d'une plante sauvage (Col-0) puis cloné dans le vecteur d'entrée *pDONR207* (Annexe 9). Par recombinaison de type LR, le promoteur a été cloné en amont du gène rapporteur *uidA* dans le vecteur *pBI101 Gateway*.

20 transformants primaires indépendants ont été générés et analysés. Des tests de coloration GUS effectués sur les différents organes de la plante se sont avérés négatifs, confirmant ainsi les données de RT-PCR quantitative : l'expression de *MYB118* ne peut être détectée ni dans les organes végétatifs de la plante, ni dans les gamétophytes, ni dans la « paroi » des siliques. Les tests de coloration GUS effectués sur les graines sont présentés en Figure 2.3 (a à d). Ces données suggèrent que *MYB118* est exprimé dans l'albumen entre 6 et 8 JAF tandis qu'aucune coloration n'a pu être observée dans l'embryon entre 8 et 12 JAF. *MYB118* serait donc un gène exprimé spécifiquement dans la graine et plus précisément dans l'albumen.

Chapitre II

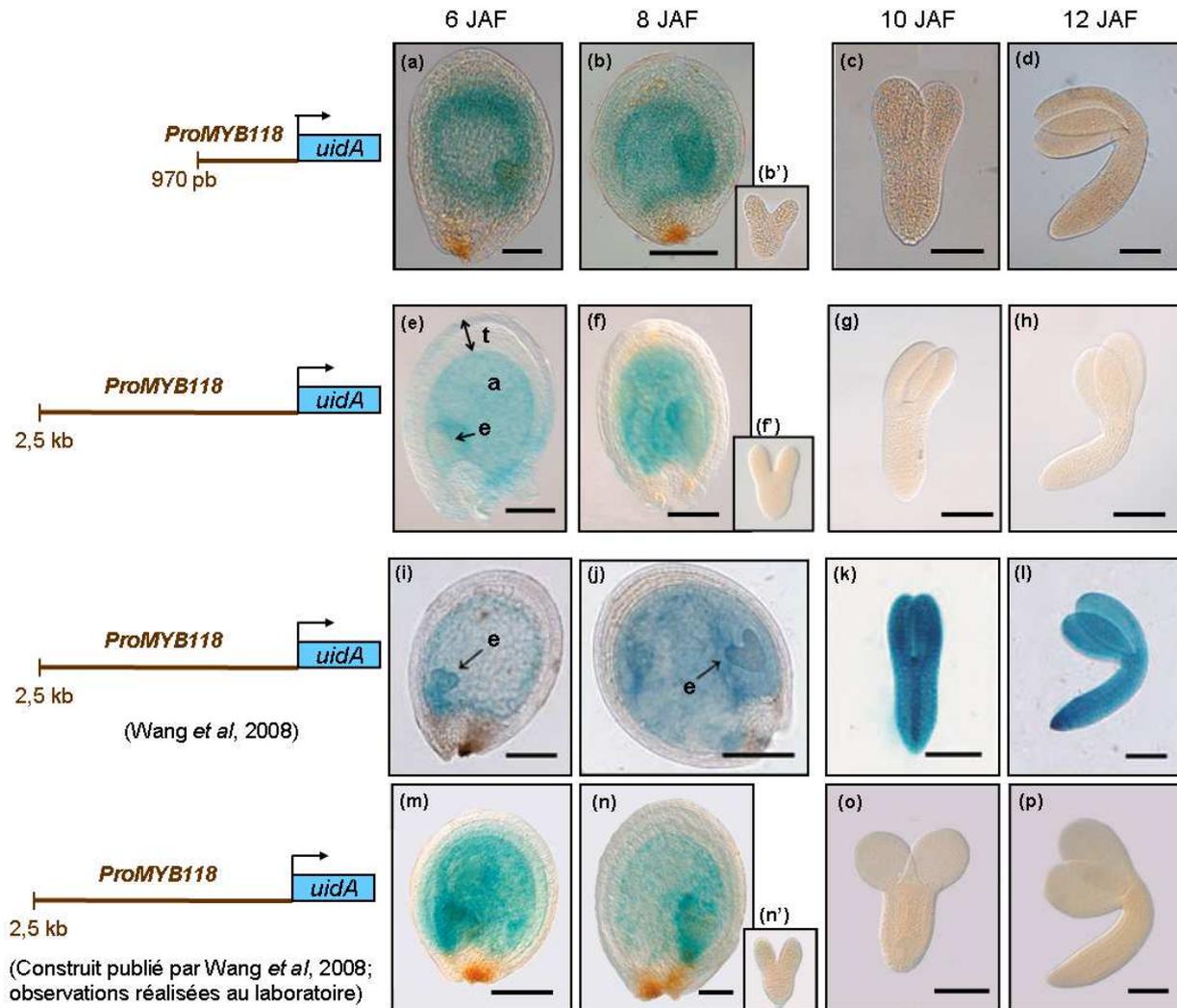


Figure 2.3. Analyse de l'activité β -glucuronidase (GUS) chez des plantes transgéniques *ProMYB118:uidA*.

Les graines âgées de 6 JAF (a, e, i et m) et 8 JAF (b, f, j et n) et les embryons âgés de 8 JAF (b', f' et n'), 10 JAF (c, g, k et o) et 12 JAF (d, h, l et p) ont été incubés une nuit dans un tampon phosphate contenant 2 mM de X-Gluc et 0,2 mM de ferrocyanure/ferricyanure de potassium, puis 3 h dans un liquide de montage éclaircissant. Les observations microscopiques ont été réalisées à l'aide d'objectifs Nomarski. Les photographies (a, b, b', c et d) présentées ont été obtenues en considérant un promoteur de 970 pb en amont de l'ATG et sont représentatives des observations effectuées sur 15 lignées transgéniques indépendantes. Les photographies (e, f, f', g et h) ont été obtenues en considérant un promoteur de 2535 pb en amont de l'ATG et sont représentative des observations effectuées sur 27 lignées transgéniques indépendantes. Les photographies (i, j, k et l) ont été publiées par Wang *et al.* (2008) en utilisant un promoteur de *MYB118* correspondant aux 2535 pb en amont de l'ATG. Les photographies (m, n, n', o et p) ont été obtenues à partir des lignées transgéniques publiées par Wang *et al.* (2008) mais le protocole de coloration GUS a été mis en œuvre au laboratoire dans les mêmes conditions que pour les photographies (a à h). a, albumen ; e, embryon ; JAF, Jours après floraison ; t, tégument. Barre = 100 μ m.

Chapitre II

Ces données sont apparemment contradictoires avec les résultats publiés par Wang et collaborateurs (2008), qui présentent une coloration GUS à la fois dans l'albumen aux stades précoces de développement (6 à 8 JAF) mais aussi dans l'embryon aux stades plus avancés (10-12 JAF) (Figure 1.3i à l). Le promoteur de *MYB118* utilisé pour réaliser ces tests d'activité GUS étant de 2535 pb (en amont de l'ATG), nous avons voulu vérifier que le promoteur que nous avons choisi n'était pas incomplet : il peut manquer des séquences *cis*-régulatrices situées entre 970 et 2535 pb en amont de l'ATG permettant l'expression de *MYB118* dans l'embryon.

De nouvelles analyses ont donc été entreprises en utilisant une séquence promotrice de 2535 pb amplifiée et fusionnée au gène rapporteur *uidA* dans le vecteur *pBI101 Gateway*. Les résultats des tests de coloration ainsi obtenus (Figure 1.3e à h) sont en tous points comparables à ceux obtenus avec le promoteur court de *MYB118* (970 pb). Ils ne sont pas concordants avec ceux publiés précédemment avec un promoteur de la même taille (Wang et *al.*, 2008). Devant cette apparente contradiction, deux hypothèses peuvent être avancées : (1) soit le vecteur et la méthode de clonage utilisés au laboratoire, différents de ceux utilisés par Wang et collaborateurs (2008), peuvent influencer l'activité du promoteur, (2) soit les protocoles de coloration GUS (tampon, temps d'incubation,...) n'étant pas identiques dans les deux cas, ils peuvent biaiser les observations.

Afin de tester ces deux hypothèses, des observations ont été réalisées sur les lignées publiées par Wang et collaborateurs (2008) et sur les lignées construites au laboratoire, dans des conditions rigoureusement identiques (Figure 1.3m à p). Pour les deux types de matériels biologiques considérés, aucune activité n'est détectée dans l'embryon, alors qu'une intense coloration bleue est bien visible dans l'albumen. Ces observations permettent de rejeter l'hypothèse selon laquelle les différences de coloration sont inhérentes aux vecteurs utilisés. L'origine des différences est à chercher au niveau de la réalisation du test d'activité GUS. En effet, selon le protocole utilisé au laboratoire, les graines sont préalablement disséquées afin de séparer l'embryon de la fraction albumen avant d'être incubées dans le tampon GUS, afin d'éviter toute diffusion entre les deux tissus zygotiques. Les photographies présentées par Wang et collaborateurs ont été obtenues à partir de graines entières incubées dans le tampon GUS puis disséquées et décolorées. Dans ces conditions, malgré la présence de ferricyanure/ferrocyanure, les composés colorés produits par la réaction enzymatique peuvent diffuser depuis l'albumen vers l'embryon, amenant

Chapitre II

l'expérimentateur à observer une coloration bleue dans un tissu qui en réalité n'exprime pas la β -glucuronidase.

En résumé, l'ensemble de ces résultats permet de présenter deux conclusions majeures : (i) l'activité du promoteur de *MYB118* est restreinte à l'albumen et (ii) une séquence promotrice de 970 pb en amont de l'ATG semble suffisante pour induire l'expression de *MYB118* dans ce tissu.

1.3 Localisation de l'accumulation des transcrits *MYB118* dans les différents tissus de la graine

Fort de ces nouvelles données, il est apparu important de les confirmer par une seconde méthode. Pour ce faire, les ADNc obtenus sur des graines disséquées âgées de 10 à 16 JAF et présentés dans le chapitre I ont été utilisés pour étudier l'accumulation des transcrits *MYB118*. D'un point de vue global, les ARNm de *MYB118* semblent presque exclusivement présents dans la fraction albumen même si une faible quantité a pu être détectée dans l'embryon (jusqu'à 2% de *EF*). De manière plus précise, l'expression de *MYB118* dans l'albumen atteint un pic 12 JAF (68% de *EF*) puis décroît progressivement jusqu'à 16 JAF (10% de *EF*) (Figure 2.4). Ces résultats sont en accord avec les données transcriptomiques publiées par Le et collaborateurs (2010) et disponibles sur le site eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) : *MYB118* est exprimé spécifiquement dans l'ensemble de l'albumen du stade globulaire au stade cotylédons retournés.

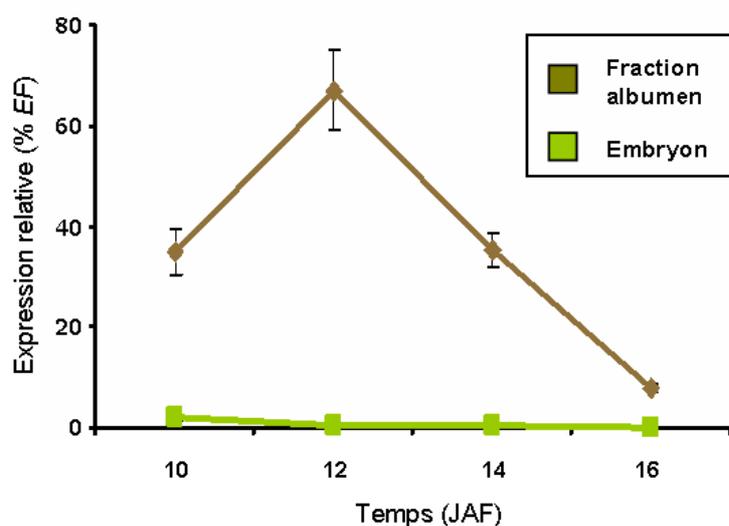


Figure 2.4. Cinétique d'accumulation des transcrits *MYB118* dans les différentes fractions de la graine d'une plante sauvage (Col-0) étudiée par RT-PCR quantitative.

Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. JAF, Jours après floraison.

Chapitre II

L'ensemble des données présentées ci-dessus permet d'affirmer que *MYB118* est exprimé spécifiquement dans la graine d'Arabidopsis, majoritairement dans l'albumen et que son expression atteint un maximum en début de maturation.

Nous avons voulu confirmer ces données d'expression au niveau protéique. Comme nous ne disposions pas d'anticorps dirigés contre MYB118, des plantes transgéniques exprimant une version étiquetée de MYB118 (HA, FLAG ou GFP) sous contrôle du promoteur endogène en fond mutant *myb118-1* ont été générées. Pour chacune de ces constructions, entre 10 et 17 lignées complémentées furent sélectionnées. Malheureusement, ni par microscopie (pour les lignées GFP), ni par immunodétection en utilisant des anticorps adaptés, nous n'avons pu détecter la protéine MYB118, et ceci malgré l'efficacité de la complémentation du phénotype mutant.

II - Régulation de l'expression de *MYB118* par LEC2

Le patron d'expression de *MYB118* dans la graine étant établi de manière précise, autant sur le plan spatial que temporel, l'étape suivante a été d'identifier des régulateurs potentiels de son expression. Il est aujourd'hui clairement établi qu'une classe de facteurs de transcription appelés régulateurs maîtres contrôle la transition entre la phase d'embryogenèse et la phase de maturation. Leur action est soit directe, soit relayée par des acteurs plus spécifiques comme WRI1, le régulateur secondaire de la biosynthèse des acides gras dont le patron d'expression a été utilisé comme base pour le crible transcriptomique. Nous avons donc fait l'hypothèse qu'ils pouvaient constituer des candidats privilégiés régulant l'expression de *MYB118*.

2.1 Le contrôle de l'expression de *MYB118* par les régulateurs maîtres de la maturation de la graine.

Une approche génétique a été retenue pour tester l'implication d'un des régulateurs maîtres connus du développement de la graine dans le contrôle de l'expression de *MYB118*. Elle a consisté à analyser systématiquement le contenu de la graine en ARNm *MYB118* en fond mutant. Pour cela, une collection d'allèles mutants *lec2*, *fus3*, *abi3*, *lec1* et *l1l* en fond Col-0 a été générée.

Chapitre II

2.1.1 Obtention d'une collection de mutants pour les régulateurs maîtres de la maturation de la graine

En utilisant les informations disponibles sur les bases de données (<http://signal.salk.edu/>), des mutants ADN-T générés en fond Col-0 pour les cinq régulateurs maîtres de la maturation de la graine ont été commandés. Pour chaque lignée, la séquence flanquante de l'ADN-T a été recherchée par PCR grâce à des oligonucléotides s'hybridant avec les bordures de l'ADN-T et la séquence génomique du gène considéré. Chez les lignées pour lesquelles la ou les séquences flanquante(s) a/ont pu être amplifiée(s), celles-ci ont été séquencées afin de déterminer de manière précise l'ancrage des ADN-T correspondants dans les génomes considérés.

Pour les lignées dans lesquelles l'insertion ADN-T a pu être confirmée, une étape de génotypage a été menée pour rechercher des plantes homozygotes pour l'insertion ADN-T. Un couple d'amorces déjà utilisé pour amplifier une séquence flanquante permet de s'assurer de la présence de l'ADN-T et un couple d'amorces positionnées dans la séquence génomique, de part et d'autre de l'ADN-T, permet ensuite de repérer les lignées homozygotes. En effet, ce second couple ne permet d'amplifier qu'une copie sauvage du gène ; si l'ADN-T est présent, la distance séparant les oligonucléotides est trop grande (souvent plusieurs milliers de paires de bases) pour que la polymérase puisse copier ce fragment. Chez un homozygote, il n'y aura donc pas d'amplification avec ce second couple d'amorces.

Lorsqu'une lignée mutante est obtenue à l'état homozygote, l'expression du gène considéré est étudiée en RT-PCR semi-quantitative en fond sauvage et en fond mutant. Si aucun ARNm pleine longueur ne peut être détecté, l'allèle est considéré comme fort. Si l'ARNm pleine longueur peut être détecté, mais dans des proportions moindres que chez le sauvage, il s'agit d'un allèle faible.

Les paragraphes suivants récapitulent les différents allèles mutants sélectionnés pour les régulateurs maîtres considérés et présentent leur caractérisation moléculaire, ainsi que certains phénotypes de leurs graines.

2.1.1.1 Caractérisation d'allèles mutants *lec2*

En ce qui concerne le gène *LEC2*, sur les trois lignées ADN-T disponibles, nous n'avons pu amplifier la séquence flanquante de l'ADN-T et caractériser l'insertion au niveau moléculaire que chez deux d'entre elles. La lignée SALK_015228, appelée *lec2-10*, possède un ADN-T inséré dans le sixième intron du gène et seule la bordure droite a pu être amplifiée et séquencée (Figure 2.5a). La lignée

Chapitre II

SAIL_390_D06, appelée *lec2-11*, possède quant à elle une insertion dans le deuxième intron du gène et seule la bordure gauche a pu être séquencée (Figure 2.5a). L'analyse en RT-PCR semi-quantitative de l'expression de *LEC2* dans des graines âgées de 10 JAF ne permet de détecter aucun ARNm pleine longueur pour les deux allèles mutants (contrairement au sauvage Col-0) (Figure 2.5b). Les allèles *lec2-10* et *lec2-11* sont donc deux allèles mutants forts. Par ailleurs, la Figure 2.5c présente le phénotype des graines et des embryons de *lec2-10* et *lec2-11* : des cotylédons violets accumulant des anthocyanes à leurs extrémités et un hypocotyle blanc verdâtre réduit comparable à celui décrit précédemment par Meinke et collaborateurs (1994) pour d'autres allèles. La pénétrance de ce phénotype est partielle. Le phénotype décrit n'est retrouvé que chez 10% à 12% des graines des mutants *lec2-10* et *lec2-11*. Des croisements réalisés entre *lec2-10* ou *lec2-11* et le mutant *lec2-4* déjà caractérisé (Stone *et al.*, 2001) confirment que ces trois mutations sont bien alléliques.

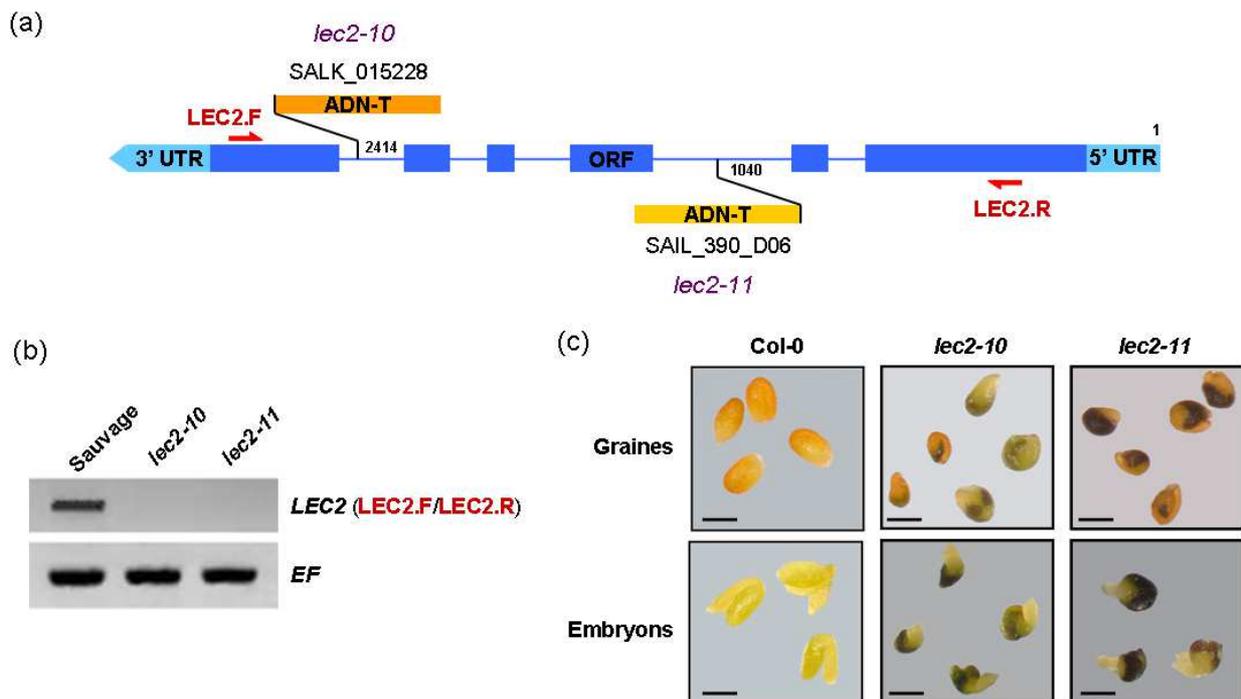


Figure 2.5. Caractérisation de mutants *lec2* (en fond Col-0).

(a) Représentation schématique de la structure intron (trait)/exon (barre) du gène *LEC2* (*At1g28300*) avec la position des insertions ADN-T du mutant SALK_015228 (*lec2-10*) et du mutant SAIL_390_D06 (*lec2-11*). LEC2.F et LEC2.R représentent la position des amorces utilisées en RT-PCR (b). La séquence de ces amorces est présentée dans l'annexe 10. Les positions exactes des insertions ADN-T au sein de la séquence codante sont indiquées par rapport au site d'initiation de la transcription. (b) Analyse en RT-PCR de l'expression de *LEC2* sur des graines âgées de 10 jours après floraison chez le contrôle sauvage (Col-0) et chez les deux mutants *lec2*. Les amorces utilisées, LEC2.F et LEC2.R, font référence au schéma (a). Le gène *EF1aA4* (*EF*) est utilisé comme contrôle. (c) Phénotype des graines et des embryons des mutants *lec2-10* et *lec2-11* par comparaison au contrôle sauvage (Col-0). Barre = 0,5 mm.

Chapitre II

2.1.1.2 Caractérisation d'allèles mutants *fus3*

Trois lignées ADN-T étaient disponibles pour le gène *FUS3* mais seule la lignée provenant du centre GABI a pu être caractérisée. Une deuxième lignée issue d'une mutagenèse EMS et déjà publiée, *fus3-3* (Kelth et al., 1994) a également été considérée. La lignée GABI_612_E06, appelée *fus3-10*, possède une insertion dans le troisième intron du gène (Figure 2.6a). En RT-PCR semi-quantitative, l'expression de *FUS3* est fortement réduite chez l'allèle *fus3-10* par rapport au sauvage (Figure 2.6b). En outre, le phénotype des allèles *fus3-10* et *fus3-3* est tout à fait comparable à celui des allèles *fus3-1* (Meinke et al., 1994) et *fus3-2* (Bäumlein et al., 1994), avec une coloration pourpre prononcée de l'ensemble des cotylédons et un hypocotyle plus ou moins réduit (Figure 2.6c). La pénétrance de ce phénotype est totale pour les deux allèles. Enfin, des croisements réalisés entre l'allèle *fus3-10* et ceux précédemment publiés confirment que ces trois mutations sont bien alléliques.

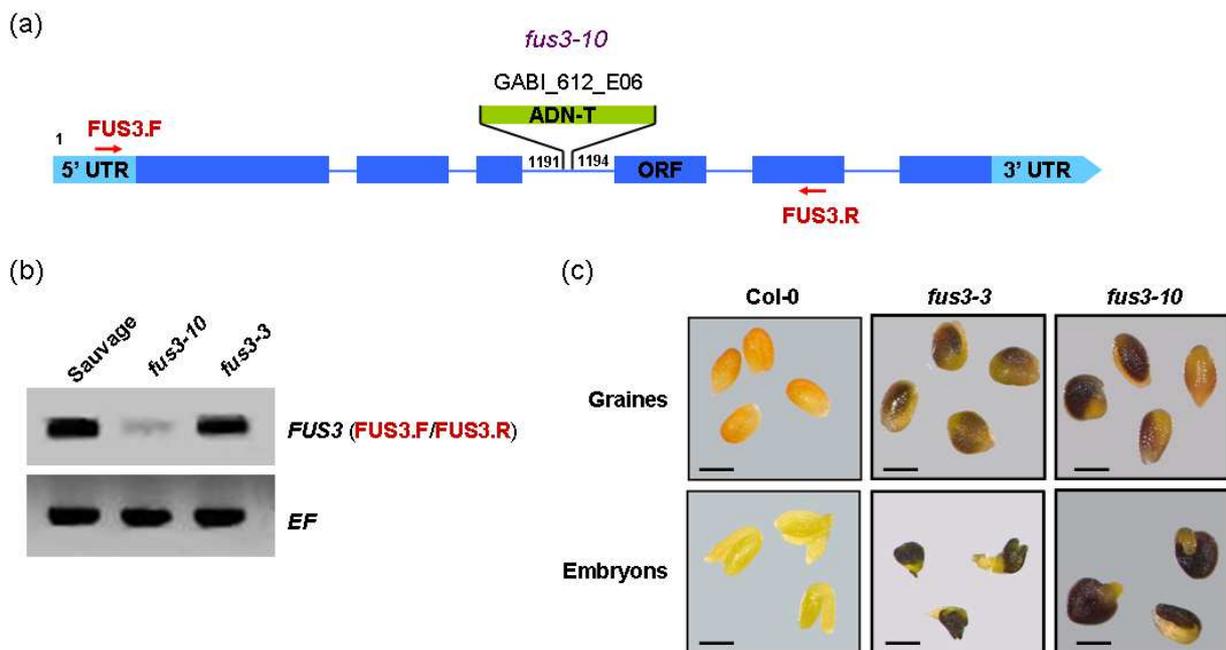


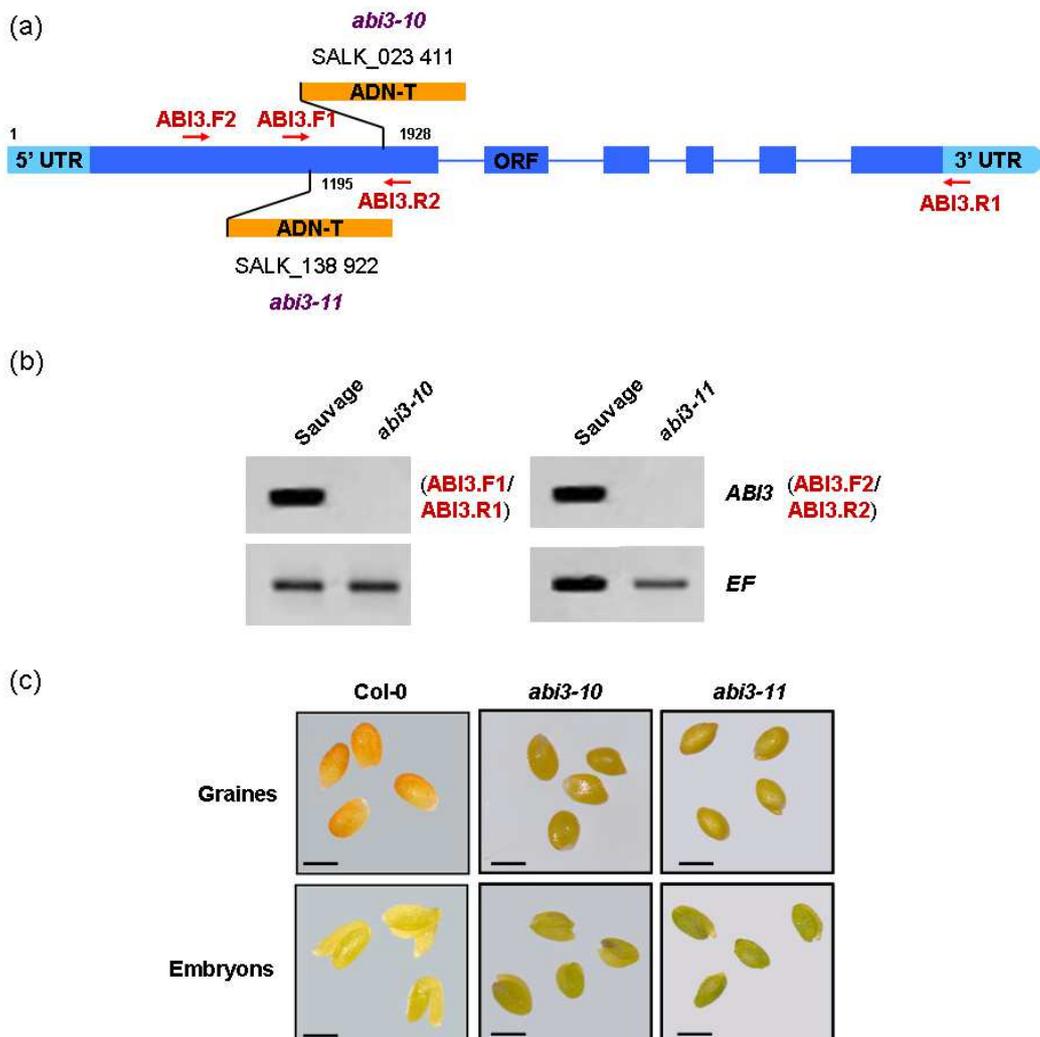
Figure 2.6. Caractérisation de mutants *fus3* (en fond Col-0).

(a) Représentation schématique de la structure intron (trait)/exon (barre) du gène *FUS3* (At3g26790) avec la position de l'insertion ADN-T du mutant GABI_612_E06 (*fus3-10*). FUS3.F et FUS3.R représentent la position des amorces utilisées en RT-PCR (b). La séquence de ces amorces est présentée dans l'annexe 10. La position exacte de l'insertions ADN-T au sein de la séquence codante est indiquée par rapport au site d'initiation de la transcription. (b) Analyse en RT-PCR de l'expression de *FUS3* sur des graines âgées de 10 jours après floraison chez le contrôle sauvage (Col-0) et chez les deux mutants *fus3*. Les amorces utilisées, FUS3.F et FUS3.R, font référence au schéma (a). Le gène *EF1aA4* (*EF*) est utilisé comme contrôle. (c) Phénotype des graines et des embryons des mutants *fus3-3* (Keith et al., 1994) et *fus3-10* par comparaison au contrôle sauvage (Col-0). Barre = 0,5 mm.

Chapitre II

2.1.1.3 Caractérisation d'allèles mutants *abi3*

Sur trois lignées ADN-T commandées, nous n'avons pu amplifier la séquence flanquante de l'ADN-T et caractériser l'insertion au niveau moléculaire que chez deux d'entre elles. La lignée SALK_023411, appelée *abi3-10*, présente un ADN-T inséré dans le premier exon du gène (Figure 2.7a). La lignée SALK_138922, nommée *abi3-11*, possède elle aussi une insertion ADN-T dans le premier exon, mais à une position différente (Figure 2.7a). Analysée en RT-PCR semi-quantitative, l'expression de *ABI3* est indétectable chez les deux allèles mutants : *abi3-10* et *abi3-11* sont donc *a priori* deux allèles mutant forts (Figure 2.7b). Le phénotype des mutants *abi3-10* et *abi3-11* est similaire à celui observé chez un mutant préalablement caractérisé (*abi3* (CIV) Korneef et al., 1989), à savoir la persistance d'une coloration vert foncé des graines et des embryons en fin de maturation (Figure 2.7c). La pénétrance de ce phénotype est variable. Le phénotype est retrouvé chez 35% et 100% des graines *abi3-10* et *abi3-11*, respectivement. Des croisements réalisés entre ces deux allèles d'une part, et *abi3-4* et *abi3-5* (Ooms et al., 1993) d'autre part, confirment que ces mutations sont bien alléliques.



Chapitre II

Figure 2.7. Caractérisation de mutants *abi3* (en fond Col-0).

(a) Représentation schématique de la structure intron (trait)/exon (barre) du gène *ABI3* (*At3g24650*) avec la position des insertions ADN-T du mutant SALK_023411 (*abi3-10*) et du mutant SALK_138922 (*abi3-11*). ABI3.F1 et ABI3.R1 représentent la position des amorces utilisées en RT-PCR pour caractériser le mutant *abi3-10*, ABI3.F2 et ABI3.R2 celle des amorces utilisées pour caractériser le mutant *abi3-11* (b). La séquence de ces amorces est présentée dans l'annexe 10. Les positions exactes des insertions ADN-T au sein de la séquence codante sont indiquées par rapport au site d'initiation de la transcription. (b) Analyse en RT-PCR de l'expression de *ABI3* sur des graines âgées de 10 jours après floraison chez le contrôle sauvage (Col-0) et chez les deux mutants *abi3*. Les amorces utilisées, ABI3.F1, ABI3.R1, ABI3.F2 et ABI3.R2, font référence au schéma (a). Le gène *EF1aA4* (*EF*) est utilisé comme contrôle. (c) Phénotype des graines et des embryons des mutants *abi3-10* et *abi3-11* par comparaison au contrôle sauvage (Col-0). Barre = 0,5 mm.

2.1.1.4 Caractérisation d'allèles mutants *lec1*

En ce qui concerne le gène *LEC1*, les bases de données recensaient sept lignées ADN-T en fond Col-0, mais seules les séquences flanquantes de l'ADN-T de quatre d'entre elles ont pu être ré-amplifiées. La lignée SAIL_45_A06, nommée *lec1-10*, présente une insertion ADN-T dans le deuxième exon du gène ; la lignée SALK_095699, appelée *lec1-11*, possède un ADN-T inséré dans l'intron du gène, tout comme la lignée SALK_131219, encore appelée *lec1-12*, et la lignée SALK_000450, nommée *lec1-13* (Figure 2.8a). L'analyse en RT-PCR semi-quantitative de l'expression de *LEC1* permet d'affirmer que ces quatre mutants d'insertion sont *a priori* des allèles forts (Figure 2.8b). Le phénotype des graines et des embryons des quatre lignées caractérisées est présenté dans la Figure 2.8c. Les quatre allèles possèdent des cotylédons arrondis et sombres à leurs extrémités ; deux d'entre eux, *lec1-10* et *lec1-13*, ont des hypocotyles de taille réduite. Ces observations sont concordantes avec celles réalisées sur d'autres allèles *lec1* (Meinke et al., 1994). La pénétrance du phénotype est totale pour les 4 allèles étudiés. Par ailleurs, un test d'allélisme réalisé entre les quatre lignées décrites ici et des allèles publiés précédemment (Meinke et al., 1994) confirme que toutes ces mutations sont alléliques.

Chapitre II

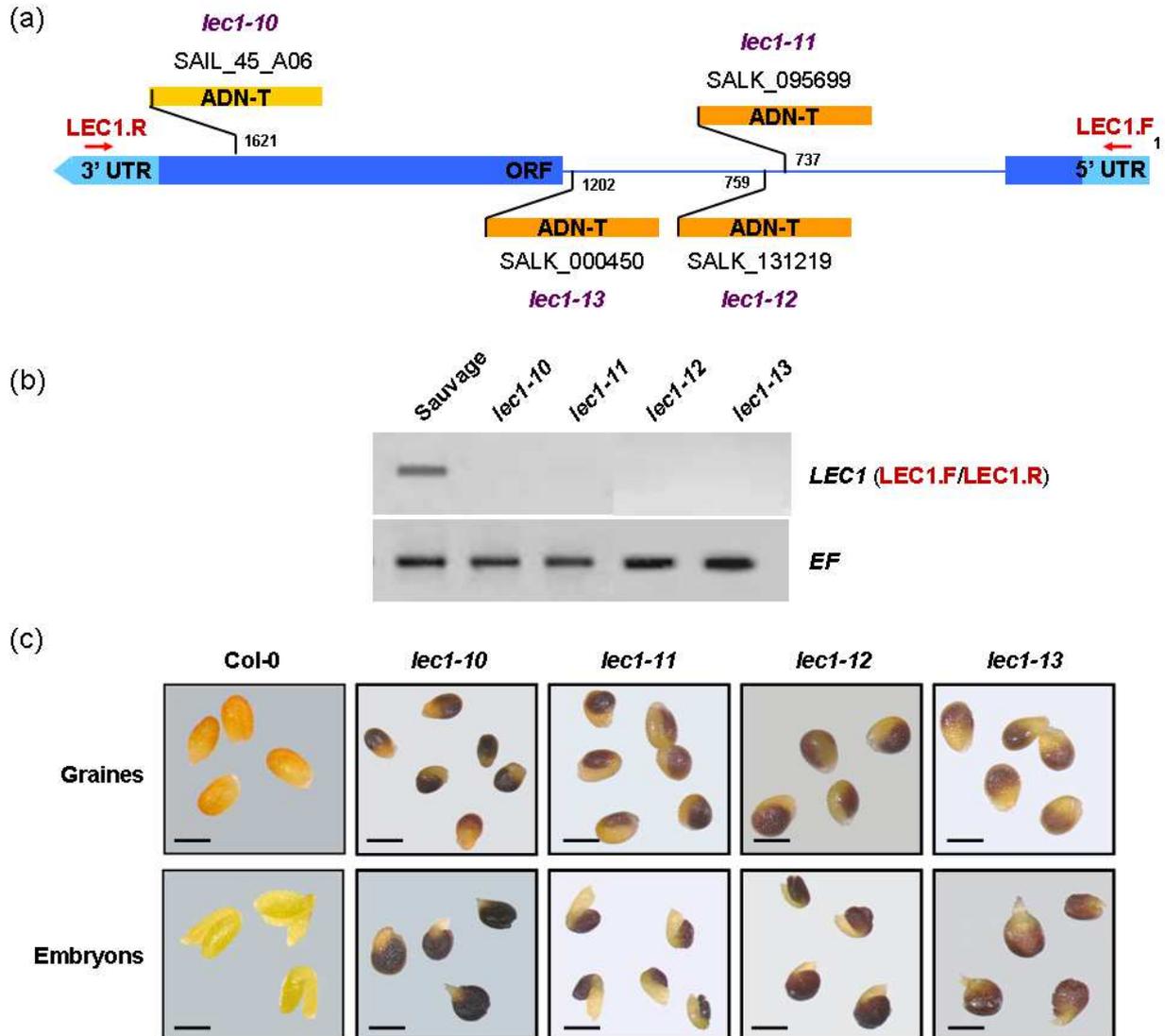


Figure 2.8. Caractérisation de mutants *lec1* (en fond Col-0).

(a) Représentation schématique de la structure intron (trait)/exon (barre) du gène *LEC1* (*At1g21970*) avec la position des insertions ADN-T du mutant SAIL_45_A06 (*lec1-10*), du mutant SALK_095699 (*lec1-11*), du mutant SALK_131219 (*lec1-12*) et du mutant SALK_000450 (*lec1-13*). LEC1.F et LEC1.R représentent la position des amorces utilisées en RT-PCR (b). La séquence de ces amorces est présentée dans l'annexe 10. Les positions exactes des insertions ADN-T au sein de la séquence codante sont indiquées par rapport au site d'initiation de la transcription. (b) Analyse en RT-PCR de l'expression de *LEC1* sur des graines âgées de 10 jours après floraison chez le contrôle sauvage (Col-0) et chez les quatre mutants *lec1*. Les amorces utilisées, LEC1.F et LEC1.R, font référence au schéma (a). Le gène *EF1aA4* (*EF*) est utilisé comme contrôle. (c) Phénotype des graines et des embryons des mutants *lec1-10*, *lec1-11*, *lec1-12* et *lec1-13* par comparaison au contrôle sauvage (Col-0). Barre = 0,5 mm.

Chapitre II

2.1.1.5 Caractérisation d'un allèle mutant *l1l*

Pour le gène *L1L*, quatre lignées ADN-T étaient disponibles mais la position exacte de l'insertion de l'ADN-T n'a pu être déterminée que pour deux d'entre elles (SALK_618238 et SALK_618236), qui se sont avérées correspondre au même évènement de transformation. Cette lignée, appelée *l1l-1*, a déjà été décrite par Yamamoto et collaborateurs (2009). Elle possède un ADN-T inséré dans le second exon du gène *L1L* (Figure 2.9a). Aucun transcrit entier n'a pu être détecté en RT-PCR quantitative, il s'agit donc *a priori* d'un allèle fort (Figure 2.9b). Enfin, comme présenté dans la Figure 2.9c, ce mutant de *L1L* ne possède pas de phénotype graine visible, ce qui concorde avec les données déjà publiées (Yamamoto et al., 2009).

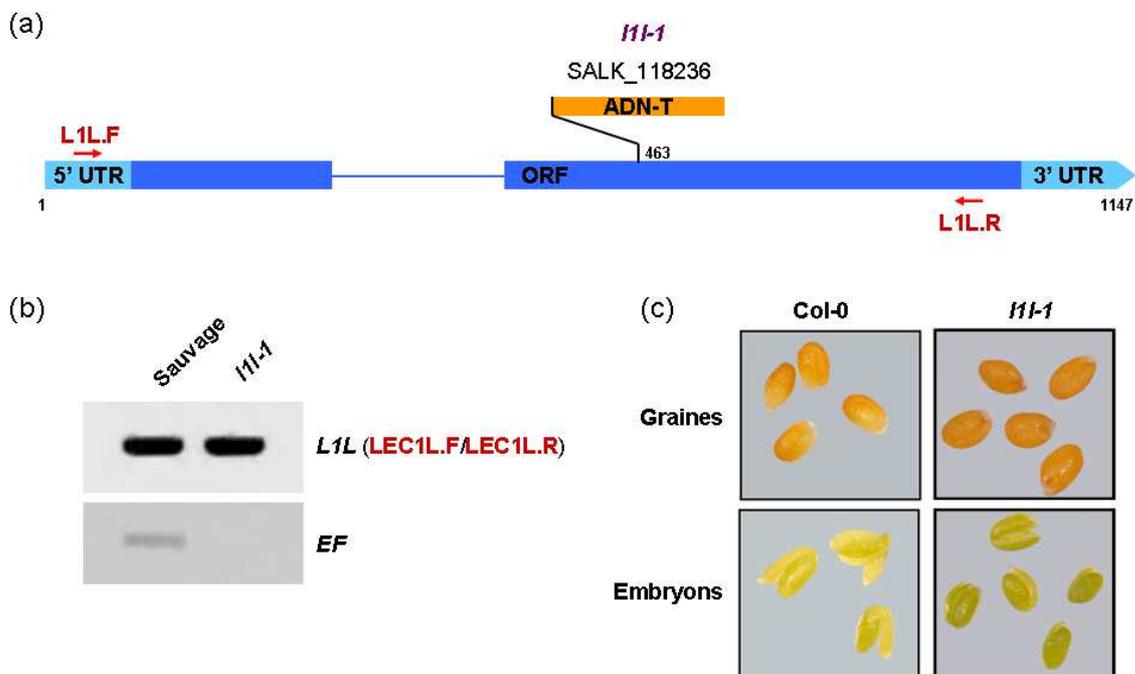


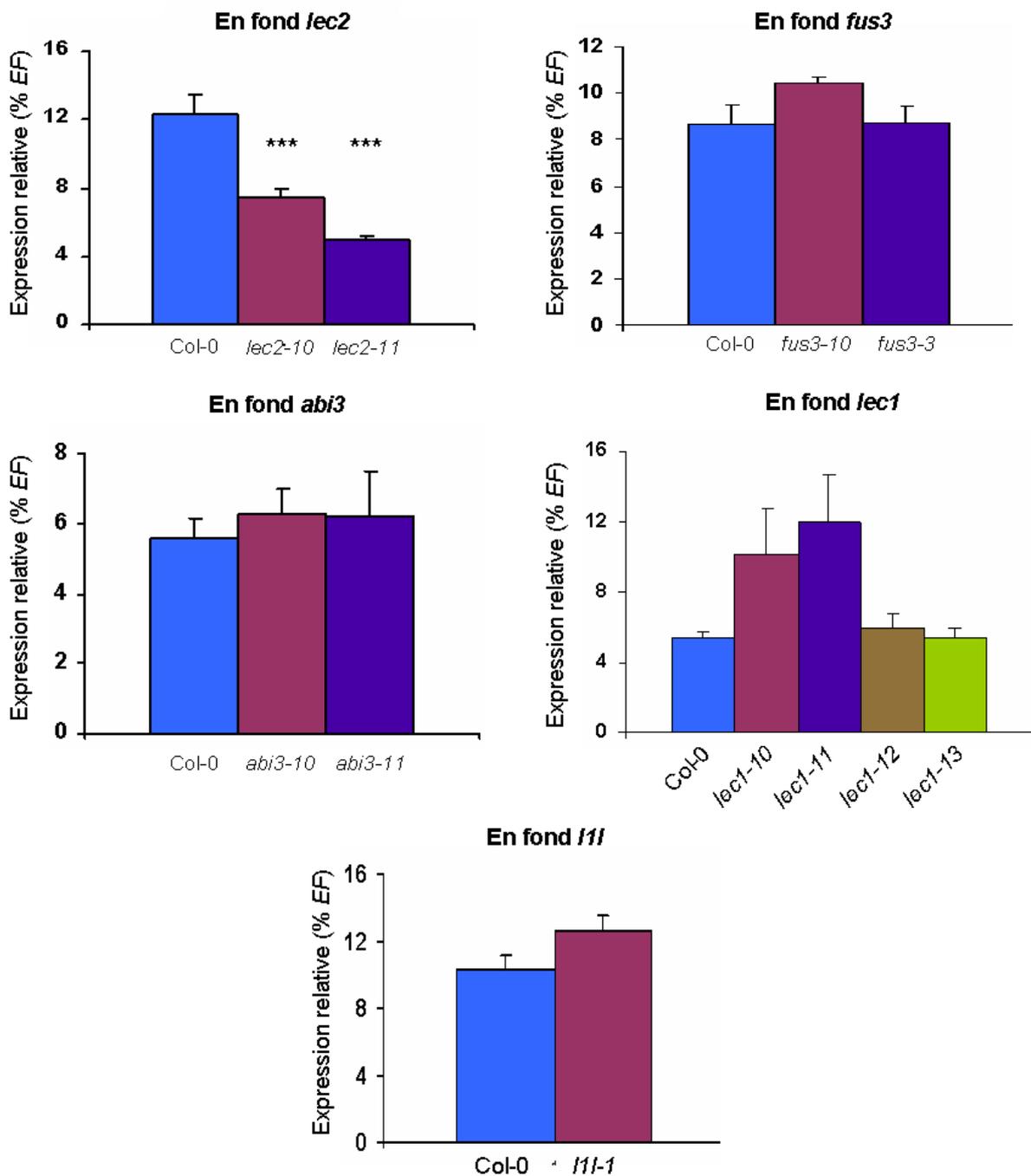
Figure 2.9. Caractérisation du mutant *l1l-1* (SALK_118236 ; N667131) (Yamamoto et al., 2009) en fond Col-0.

(a) Représentation schématique de la structure intron (trait)/exon (barre) du gène *L1L* (*At5g47670*) avec la position de l'insertion ADN-T du mutant SALK_118236 (N667131). L1L.F et L1L.R représentent la position des amorces utilisées en RT-PCR (b). La séquence de ces amorces est présentée dans l'annexe 10. La position exacte de l'insertion ADN-T au sein de la séquence codante est indiquée par rapport au site d'initiation de la transcription. (b) Analyse en RT-PCR de l'expression de *L1L* sur des graines âgées de 10 jours après floraison, chez le contrôle sauvage (Col-0) et chez le mutant *l1l-1*. Les amorces utilisées, L1L.F et L1L.R, font référence au schéma (a). Le gène *EF1aA4* (*EF*) est utilisé comme contrôle. (c) Phénotype des graines et des embryons du mutant *l1l-1* par comparaison au contrôle sauvage (Col-0). Barre = 0,5 mm.

Chapitre II

2.1.2 Crible pour l'expression de *MYB118* en fonds mutants

Une fois la collection de mutants des régulateurs maîtres constituée, le niveau d'accumulation des transcrits *MYB118* a été systématiquement mesuré sur des graines entières âgées de 10 JAF pour chacune des lignées et comparé au contrôle sauvage (Figure 2.10). L'expression de *MYB118* se trouve altérée uniquement en fond mutant *lec2*, avec un niveau de transcrits deux (*lec2-10*) à trois (*lec2-11*) fois inférieur au sauvage. LEC2 serait donc un activateur de l'expression de *MYB118*.



Chapitre II

Figure 2.10. Expression relative de *MYB118* dans des graines âgées de 10 JAF chez des mutants des régulateurs maîtres *LEC2*, *LEC1*, *FUS3*, *ABI3* et *L1L* étudiée par RT-PCR quantitative.

Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. *** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 0,1%.

2.2 *LEC2*, activateur de l'expression de *MYB118*

Pour conforter ces résultats, plusieurs expériences ont été entreprises.

2.2.1 Etude de l'activité du promoteur de *MYB118* en fond mutant *lec2*

Si *LEC2* est bien un activateur transcriptionnel de l'expression de *MYB118*, alors il doit être capable de moduler l'activité de son promoteur, dans l'albumen en particulier. Pour vérifier cette hypothèse, une étude de l'activité du promoteur de *MYB118* a été menée parallèlement en fond sauvage (*Col-0*) et en fond mutant *lec2* (Figure 2.11). Pour cela, une des lignées GUS (transformant 9) publiées par Wang et collaborateurs (2008) a été croisée avec les allèles *lec2-10* et *lec2-11*. Après propagation, des plantes F2 présentant le transgène d'intérêt à l'état hétérozygote (sélection sur kanamycine) ont été génotypées pour la mutation *lec2*. Des analyses d'activité GUS en fond sauvage ou *lec2* ont alors été réalisées à l'issue du même nombre de générations (après croisement), évitant tout biais lié à une extinction de l'expression par silencing au fil des générations. Les graines F3 ont alors été soumises à un test de coloration GUS.

Parmi une population de graines issues d'une même plante, l'intensité de la coloration GUS est inhomogène. Ce phénomène est dû tant à une ségrégation du construit gène rapporteur qu'à l'inactivation progressive de celui-ci. Cependant, nous observons que 34 à 55% des graines sont colorées en bleu chez le contrôle sauvage alors que seulement 5 à 22% des graines le sont en fonds mutants *lec2-10* et *lec2-11*, respectivement. Nous constatons donc une forte diminution de la proportion de graines colorées en fond mutant *lec2* par rapport au contrôle sauvage. Ces données soutiennent l'hypothèse selon laquelle *LEC2* est un activateur transcriptionnel de *MYB118*.

Chapitre II

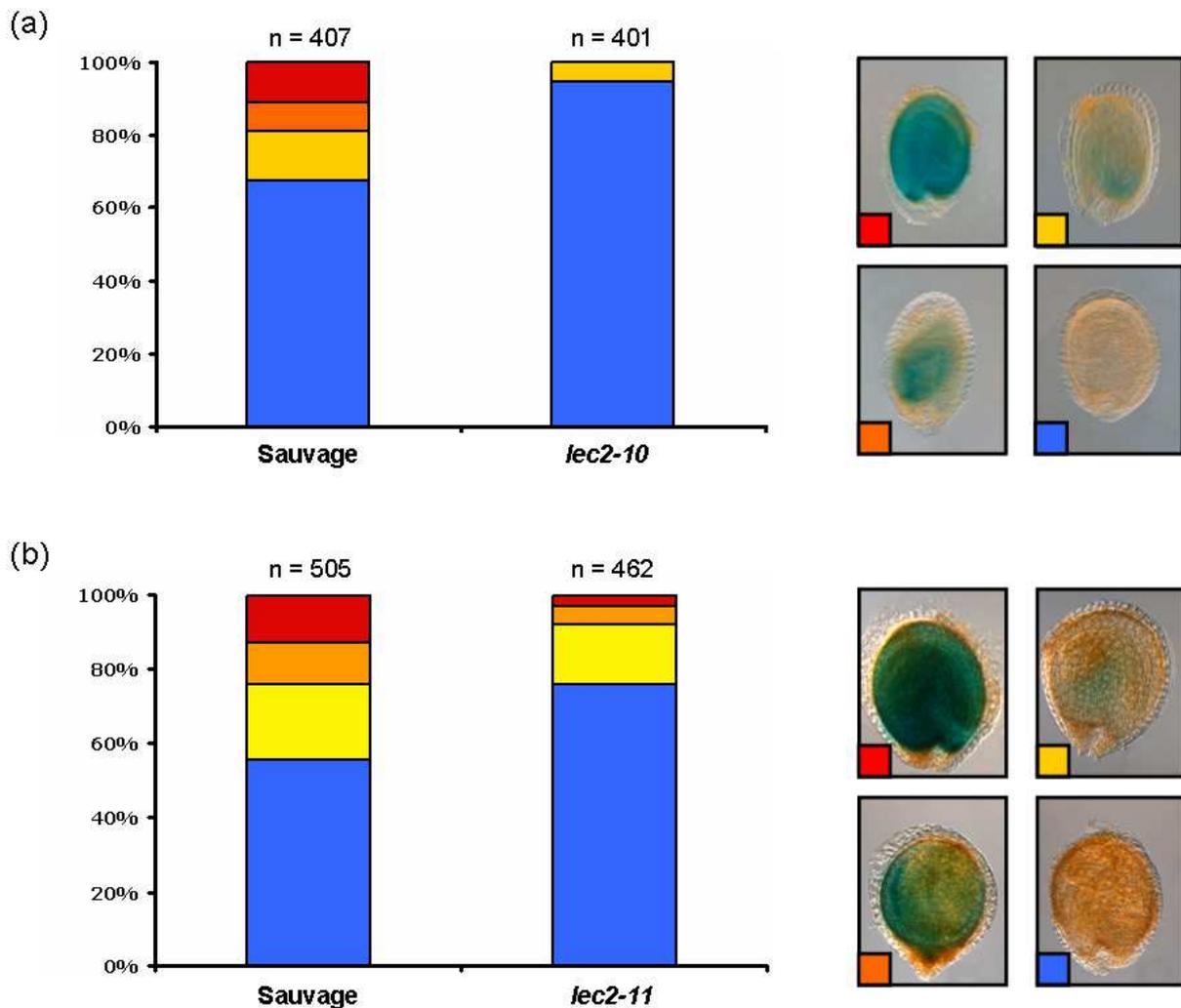


Figure 2.11. Activité du promoteur de *MYB118* dans des graines âgées de 10 jours après floraison en fond sauvage ou en fond mutant *lec2*.

Comparaison de l'activité du promoteur de *MYB118* en fond sauvage et en fond mutant *lec2-10* (a) ou *lec2-11* (b). Les plantes utilisées sont hétérozygotes pour le construit *Pro_{MYB118.2535pb}:uidA*, homozygotes pour la mutation *lec2*. Les graines ont été incubées une nuit dans un tampon phosphate contenant 2 mM de X-Gluc et 1 mM de ferrocyanure/ferricyanure de potassium puis 3 h dans un liquide de montage éclaircissant. Les observations microscopiques ont été réalisées à l'aide d'objectifs Nomarski. Le panel de droite représente les différentes catégories de colorations observées : bleu, aucune coloration décelable; jaune, une très faible coloration bleue pâle; orange, une coloration bleue homogène; rouge, une coloration bleue intense. Le graphique de gauche représente la proportion des différentes catégories de colorations pour chaque génotype (sauvage ou *lec2*).

Chapitre II

2.2.2 Activation de l'expression de *MYB118* par *LEC2* de manière ectopique

Pour aller plus loin dans la caractérisation de cette relation, nous avons étudié l'expression de *MYB118* dans des lignées inductibles surexprimant *LEC2*.

2.2.2.1 Utilisation de lignées *Pro*_{35S}:*LEC2*:: Δ GR

Nous avons choisi d'utiliser des lignées inductibles mises au point au laboratoire (Santos-Mendoza et al., 2005). Dans ces plantes, le gène *LEC2*, sous contrôle d'un promoteur 35S, est fusionné à un fragment du récepteur aux glucocorticoïdes de rat capable de lier la dexaméthasone (analogue de glucocorticoïdes). Après dix jours de croissance sur milieu MS (Annexe 8), les plantules sont transférées sur un milieu additionné de dexaméthasone (ou pour le cas contrôle sur milieu MS seul) pour deux semaines supplémentaires de culture. Les feuilles de rosette sont alors prélevées pour en extraire les ARNm.

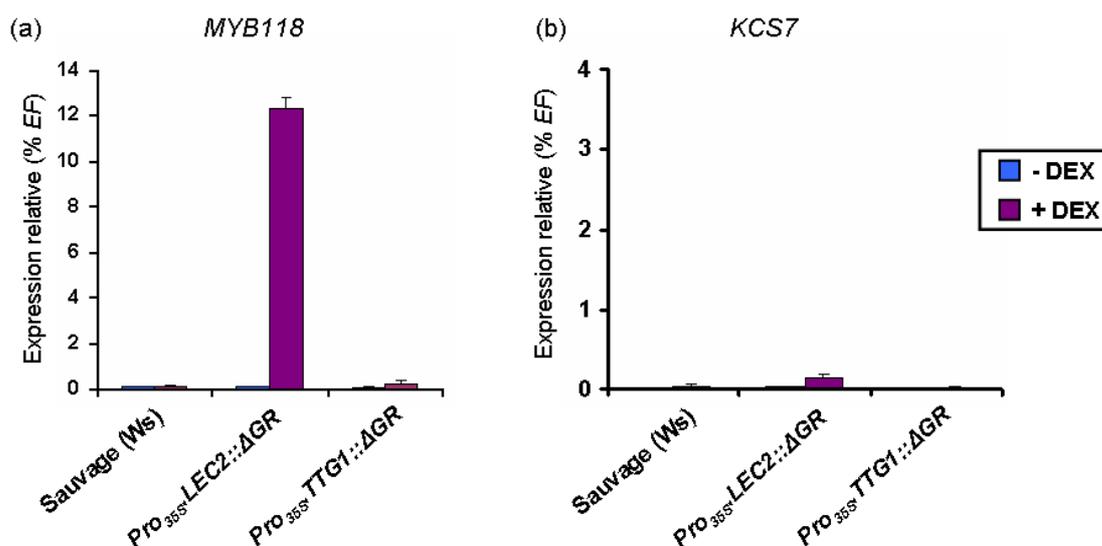


Figure 2.12. Induction ectopique de *MYB118* à l'aide du système *Pro*_{35S}:*LEC2*:: Δ GR dans des feuilles de rosette.

Trois géotypes différents ont été soumis à un test d'induction à la dexaméthasone : la lignée *Pro*_{35S}:*LEC2*:: Δ GR et deux contrôles, l'écotype sauvage de référence (Ws) ainsi qu'une seconde lignée exprimant un facteur de transcription (TTG1) lié à un fragment du récepteur aux glucocorticoïdes (*Pro*_{35S}:*TTG1*:: Δ GR ; Baudry et al., 2004). Des plantules de 10 jours ont été repiquées sur milieu MS (Annexe 8) avec (violet) ou sans (bleu) dexaméthasone (DEX) à 10^{-5} M et cultivées ainsi *in vitro* pendant deux semaines. Les ARNm ont alors été extraits des feuilles de rosette et l'accumulation des transcrits de *MYB118* (a) ou de *KCS7* (b) a été mesurée en RT-PCR quantitative. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Le gène *KCS7* a été utilisé comme contrôle négatif (non induit). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée.

Chapitre II

Pour les plantules sauvages, aucune induction de *MYB118* n'est observée après 14 jours de culture sur dexaméthasone (Figure 2.12). De même, dans les lignées transgéniques *Pro_{35S}:TTG1::ΔGR* (Baudry et al., 2004), exprimant le gène *TTG1* couplé au récepteur de glucocorticoïdes, aucune induction de l'expression de *MYB118* n'a pu être détectée non plus. Seul le construit *Pro_{35S}:LEC2::ΔGR* dans des plantes traitées à la dexaméthasone est capable d'induire l'expression de *MYB118* de manière ectopique (Figure 2.12). En outre, cette induction est spécifique, dans la mesure où le gène *KCS7*, contrôle négatif, n'est pas induit dans ces conditions (Figure 2.12).

2.2.2.2 Cinétique d'induction de l'expression de *MYB118* par le système *Pro_{35S}:LEC2::ΔGR*

Pour compléter et affiner ces premiers résultats, le niveau d'expression de *MYB118* a été suivi au cours de la période d'induction dans la lignée *Pro_{35S}:LEC2::ΔGR* (Figure 2.13). Des plantules ont été prélevées tous les deux ou trois jours au cours de la période d'induction. Puis les ARNm de leurs feuilles de rosette ont été extraits, rétrotranscrits et analysés en RT-PCR quantitative. Le gène *KCS7* constitue un contrôle négatif, non induit. L'expression de *MYB118* est induite au cours des deux semaines de culture sur dexaméthasone et passe de 0,05% de EF à 10% de EF en 14 jours. Plus précisément, la cinétique d'induction montre que l'accumulation des transcrits *MYB118* augmente fortement à partir de trois jours d'induction (Figure 2.13).

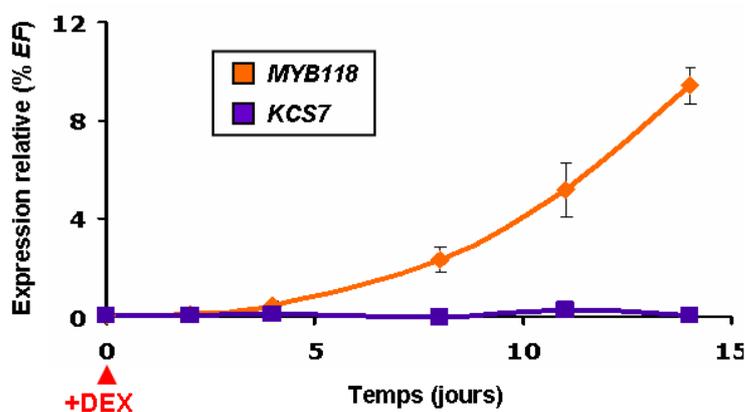


Figure 2.13. Cinétique d'induction de *MYB118* à l'aide du système *Pro_{35S}:LEC2::ΔGR* dans des feuilles de rosette.

Des plantules de 10 jours de la lignée *Pro_{35S}:LEC2::ΔGR* présentée dans la Figure 2.12 ont été repiquées sur milieu MS (Annexe 8) contenant de la dexaméthasone (DEX) à 10^{-5} M au temps $t = 0$ et cultivées ainsi *in vitro* pendant deux semaines. Des lots de 5 plantules ont été prélevés à $t = 0, 2, 4, 8, 11$ et 14 jours. Les ARNm ont alors été extraits des feuilles de rosette et l'accumulation des transcrits de *MYB118* (orange) ou de *KCS7* (violet) a été mesurée en RT-PCR quantitative. Le gène *KCS7* a été utilisé comme contrôle négatif (non induit). Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (EF). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée.

Chapitre II

L'avantage d'un système inductible utilisant un récepteur aux hormones liposolubles est qu'il permet en théorie de tester la nature directe ou indirecte de l'activation. Pour cela, le système *Pro_{35S}:LEC2::ΔGR* est utilisé en présence d'un inhibiteur de la traduction, la cycloheximide. Si un gène cible est activé dans ces conditions, il peut alors être considéré comme une cible directe de LEC2 (gène activé sans néosynthèse d'un facteur intermédiaire). Mais l'inhibition de toute synthèse protéique par la cycloheximide est rapidement toxique pour la cellule et ne permet pas de tester des temps d'induction supérieurs à 6 h. Or, d'après la cinétique présentée en figure 2.13, une induction de 6 h ne permet pas d'obtenir un niveau d'induction significatif de *MYB118*. Nous n'avons donc pas été en mesure de tester la nature directe ou indirecte de la régulation de *MYB118* par LEC2.

2.2.2.3 Activation du promoteur de *MYB118* par le système *Pro_{35S}:LEC2::ΔGR*

Pour étudier l'activation ectopique du promoteur de *MYB118*, le transgène *Pro_{MYB118(2535pb)}:uidA* a été introgressé dans la lignée *Pro_{35S}:LEC2::ΔGR*. Après 10 jours de croissance sur milieu sélectif, les plantules ont été repiquées sur milieu MS (Annexe 8) additionné de dexaméthasone (ou sur milieu MS seul ; cas du contrôle) pour deux semaines de culture supplémentaires. Deux feuilles de rosette ont alors été prélevées et incubées 12 h dans une solution de coloration GUS. Le reste de la plantule congelé a été utilisé pour vérifier la présence des deux transgènes par génotypage.

En l'absence de dexaméthasone, aucune activité GUS n'est observée ; en revanche, en sa présence, une intense coloration bleue est détectée dans les feuilles prélevées (Figure 2.14). LEC2 est donc capable d'induire l'activité du promoteur de *MYB118* de manière spécifique et ectopique dans les feuilles de rosette.

A partir de l'ensemble de ces données, nous pouvons affirmer que LEC2 est un régulateur positif de l'expression de *MYB118* dans l'albumen. Cependant, l'expression de *MYB118* n'est pas nulle chez les mutants *lec2*, suggérant l'existence d'autres activateurs transcriptionnels de son expression dans l'albumen. Inversement, *LEC2* étant exprimé dans les deux tissus zygotiques et *MYB118* étant presque exclusivement exprimé dans l'albumen, (i) soit il existe des répresseurs de l'expression de *MYB118* spécifiques de l'embryon, (ii) soit l'induction de l'expression de *MYB118* par LEC2 dans l'albumen nécessite l'intervention de cofacteurs spécifiques de l'albumen.

Chapitre II

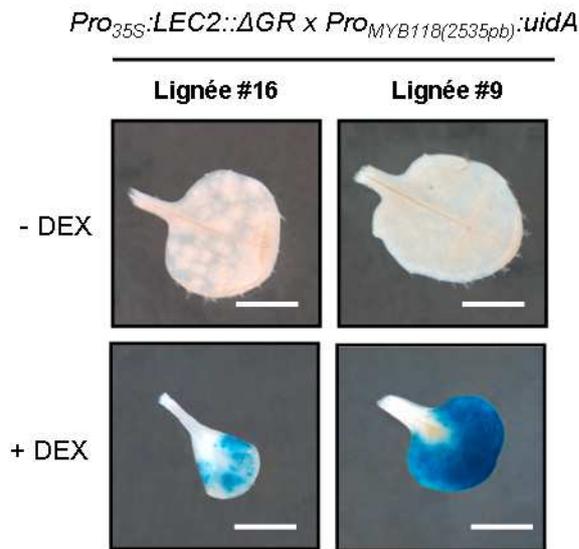


Figure 2.14. Activation du gène rapporteur *uidA* placé sous le contrôle du promoteur de *MYB118* par le système *Pro_{35S}:LEC2::ΔGR* dans des feuilles de rosette.

La cassette $Pro_{MYB118(2535pb)}:uidA$ a été introduite dans un contexte $Pro_{35S}:LEC2::\Delta GR$. Des plantules portant les deux transgènes ont été cultivées sur milieu MS (Annexe 8) avec ou sans dexaméthasone (DEX) à 10^{-5} M pendant deux semaines. Leurs feuilles de rosette ont ensuite été incubées une nuit dans un tampon phosphate contenant 2 mM de X-Gluc et 0,2 mM de ferrocyanure/ferricyanure de potassium. Entre 3 et 4 plantules ont été analysées pour chaque condition et chaque génotype. Barre = 0,3 cm.

III - Caractérisation fonctionnelle de MYB118

Pour étudier la fonction de MYB118 dans la graine, une approche de génétique inverse a été mise en oeuvre.

3.1 Caractérisation moléculaire de mutants *myb118* et de surexpressseurs de *MYB118*

3.3.1 Caractérisation d'un mutant d'insertion ADN-T

Pour réaliser cette étude, différentes lignées ADN-T disponibles ont été commandés. Sur les trois lignées disponibles, seule une a pu être confirmée : la lignée SALK_111812, appelée par la suite *myb118-1*, possède un ADN-T inséré dans le troisième exon du gène *MYB118* (Figure 2.15a). Elle a été caractérisée par RT-PCR quantitative et non quantitative (Figure 2.15b et c). En utilisant les amorces positionnées de part et d'autre de l'ADN-T, aucun amplicon n'est détecté : le mutant *myb118-1* ne présente pas de transcrits pleine longueur de *MYB118*. Les données de RT-PCR quantitative quant à elles montrent une très forte réduction de l'expression de *MYB118*. En conclusion, l'ADN-T inséré dans le domaine R2R3 de *MYB118* abolit la synthèse d'un ARNm pleine longueur du gène *MYB118* : le mutant *myb118-1* est donc un allèle fort.

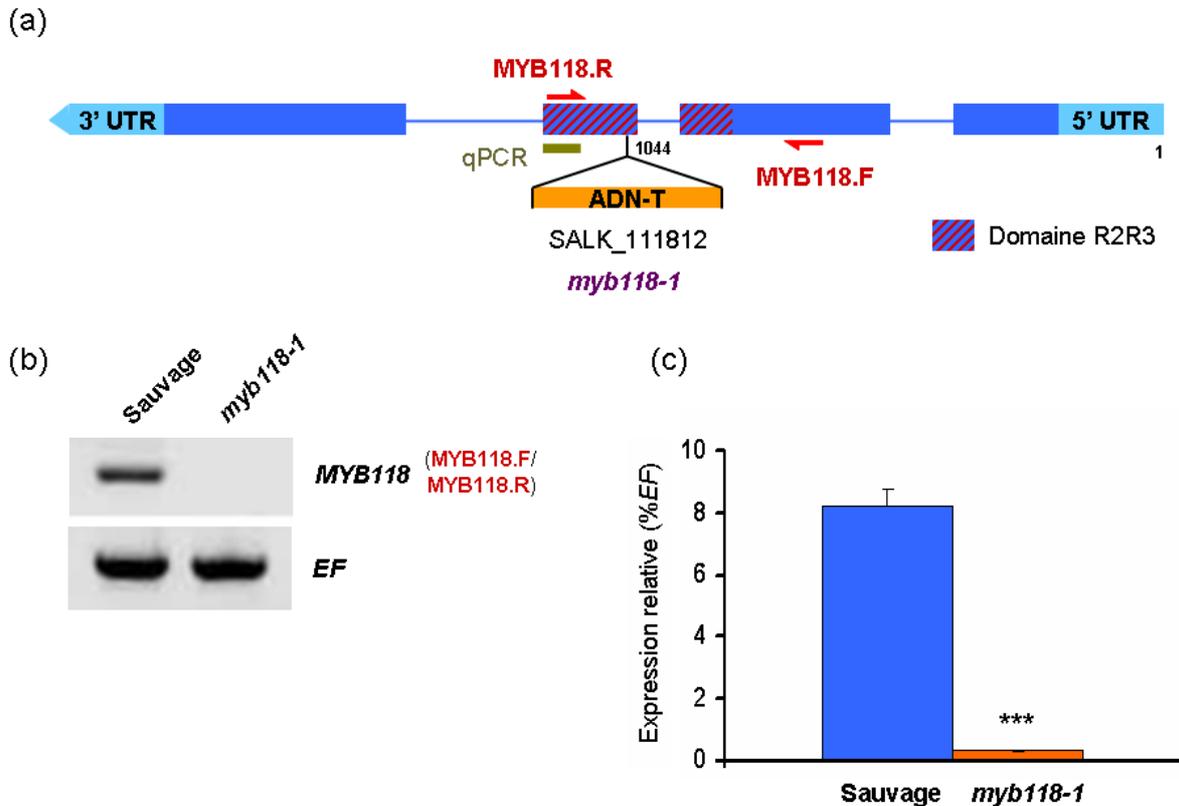


Figure 2.15. Caractérisation du mutant *myb118-1* (en fond Col-0).

(a) Représentation schématique de la structure intron (trait)/exon (barre) du gène *MYB118* (*At3g27785*) avec la position de l'insertion ADN-T du mutant SALK_111812, appelé *myb118-1*. Les amorces représentées font référence aux analyses de RT-PCR (b). La position exacte de l'insertion ADN-T au sein de la séquence codante est indiquée par rapport au site d'initiation de la transcription. La barre marron représente la région amplifiée avec les amorces de RT-PCR quantitative (c). La séquence des amorces utilisées est présentée dans l'annexe 10. (b) Analyse en RT-PCR de l'expression de *MYB118* sur des graines âgées de 10 jours après floraison, chez le contrôle sauvage (Col-0) et chez le mutant *myb118-1*. Les amorces utilisées font référence au schéma (a). Le gène *EF1aA4* (*EF*) est utilisé comme contrôle. (c) Analyse en RT-PCR quantitative de l'accumulation des transcrits de *MYB118* dans des graines récoltées 10 jours après floraison, chez le contrôle sauvage (Col-0) et le mutant *myb118-1*. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Chaque barre représente la moyenne de trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. *** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 0,1%.

Chapitre II

3.3.2. Obtention et caractérisation d'une lignée antisens

Aucun autre allèle *myb118* n'étant disponible dans les banques de mutants d'insertion, la préparation de lignées antisens a donc été engagée. L'ADNc de *MYB118* a été cloné dans le vecteur *pMDC32* (Annexe 9 ; Curtis et Grossniklaus, 2003) en orientation inversée.

Parmi les 13 lignées ainsi générées, seule l'une d'entre-elle, T16, présente un niveau d'expression de *MYB118* légèrement réduit par rapport au contrôle sauvage (Figure 2.16). Une quantité non négligeable de transcrits *MYB118* est cependant détectable chez T16. T16 est une lignée transgénique légèrement affectée dans l'expression de *MYB118*.

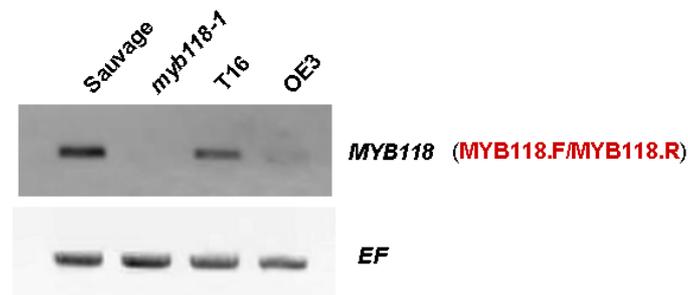


Figure 2.16. Caractérisation de lignées transgéniques affectées dans l'expression de *MYB118*.

Analyse en RT-PCR de l'expression de *MYB118* sur des graines âgées de 10 jours après floraison, chez le contrôle sauvage (Col-0), le mutant *myb118-1* et deux lignées transgéniques nommées T16 et OE3. La lignée T16 porte un transgène *Pro_{35S}:MYB118*(antisens) et la lignée OE3 porte un transgène *Pro_{35S}:MYB118*(sens) qui conduit à l'extinction de l'expression du gène *MYB118*. Les amorces utilisées font référence au schéma (a) de la figure 2.15. Le gène *EF1aA4* (*EF*) est utilisé comme contrôle.

3.3.3 Obtention et caractérisation de surexpressseurs

Pour compléter les études menées sur le mutant *myb118*, une stratégie de surexpression de *MYB118* (sous le contrôle d'un double promoteur *35S* de type *35Sdual*) a été engagée. L'ADNc de *MYB118* a tout d'abord été cloné dans le vecteur *pDONR207* (Annexe 9), puis transféré dans le vecteur binaire *pMDC32*, en aval du promoteur *35Sdual*. 14 transformants primaires (OE1 à OE14, Figure 2.17) ont été sélectionnés sur un milieu contenant de l'hygromycine. Deux semaines après repiquage, 6 d'entre eux présentent une rosette plus compacte associée à un fort enroulement des feuilles (Figure 2.17a à c). A quatre semaines, ce phénotype s'estompe légèrement mais la hampe florale, plus courte que chez le sauvage présente des fleurs stériles à pétales sépaloïdes (Figure 2.17d à f). Une expérience de RT-PCR quantitative, menée sur des feuilles de rosette, a montré que *MYB118* est effectivement surexprimé de manière efficace chez ces lignées (entre 200% et

Chapitre II

400% de *EF*) par rapport au contrôle Col-0 (0,07% de *EF*) (Figure 2.17g). Les plantes étant stériles, il n'a pas été possible d'étudier leurs graines, ni de poursuivre le processus de sélection jusqu'à obtenir des lignées homozygotes.

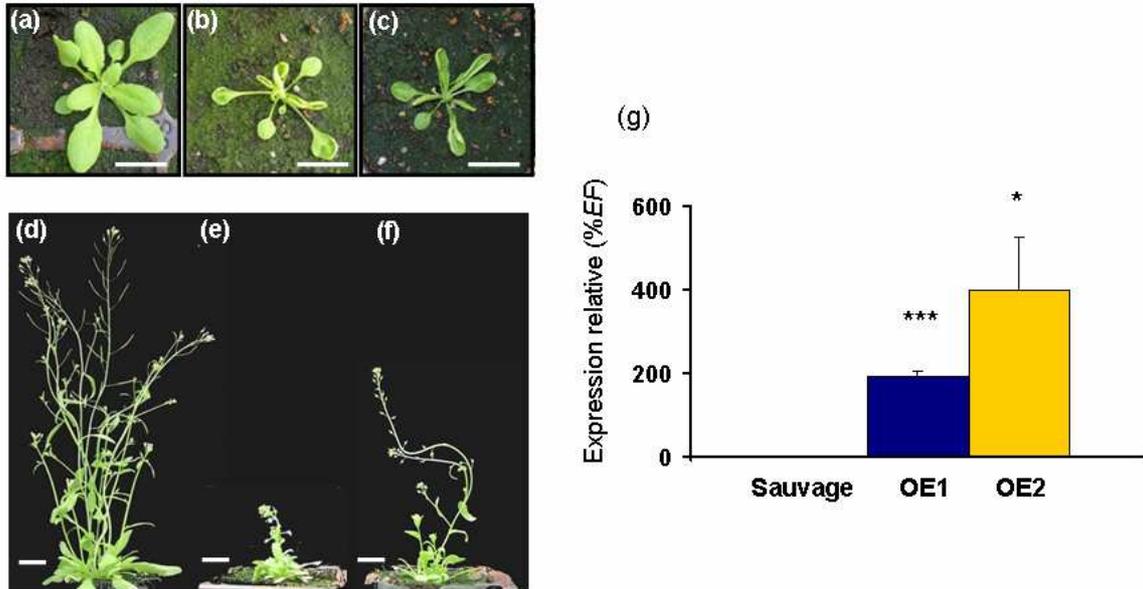


Figure 2.17. Étude de surexpresses de *MYB118*.

Morphologie du contrôle sauvage (a et d) et des lignées transgéniques *Pro_{35S}duai:MYB118* OE1 (b et e) et OE2 (c et f) âgés de deux semaines (a, b et c) ou de quatre semaines (d, e et f). Barre = 2 cm. (g) Analyse en RT-PCR quantitative du niveau d'expression de *MYB118* sur des feuilles de rosettes chez le sauvage et chez les lignées OE1 et OE2. Chaque barre correspond à la moyenne de trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est représentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. * indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 5%. *** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 0,1%.

Cependant, 8 transformants ne présentent pas le phénotype précédemment décrit. Ces lignées produisant des graines, une analyse du niveau d'accumulation des transcrits de *MYB118* dans des graines âgées de 10 JAF a été entreprise. Pour 7 de ces 8 transformants, aucune modification du niveau d'expression de *MYB118* par rapport au contrôle sauvage n'a pu être constatée. En revanche, chez la lignée OE3, le niveau d'expression de *MYB118* chute fortement par rapport au contrôle sauvage (Figure 2.16). Ce résultat pourrait être expliqué par une extinction partielle de l'expression du gène *MYB118* endogène due à la présence du transgène, par un mécanisme dit de cosuppression (Vaucheret et al., 1998). OE3 est donc une lignée transgénique présentant une expression réduite de *MYB118*.

Chapitre II

3.2 Phénotype des mutants *myb118*

3.2.1 Suivi du développement de la graine

Afin de déterminer le rôle de *MYB118* au cours du développement de la graine, le développement de celle-ci a été suivi en microscopie optique chez la lignée *myb118-1* (Figure 2.18). En fond *myb118-1*, ni le développement de la graine dans sa globalité ni celui de ses tissus constitutifs ne présentent d'anomalies (ni malformation, ni retard de développement) par rapport au contrôle sauvage (Col-0).

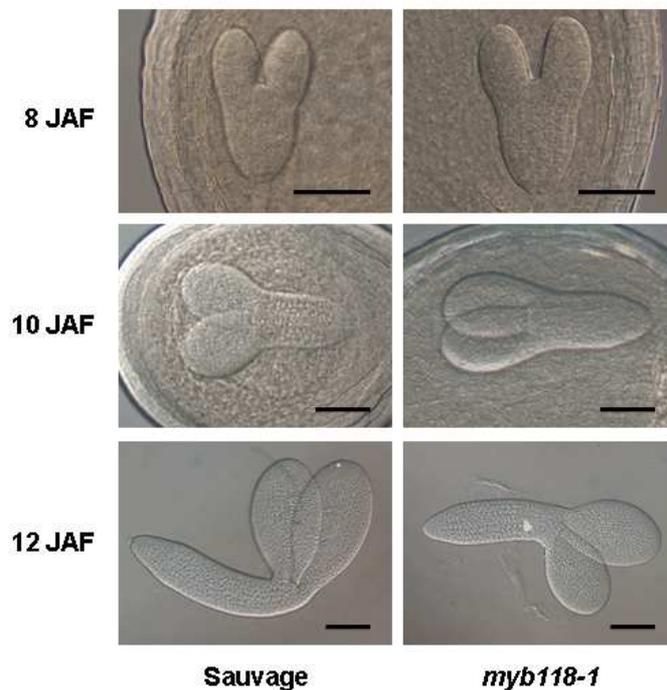


Figure 2.18. Embryons en développement observés à 8, 10 et 12 JAF chez le sauvage (Col-0) et le mutant *myb118-1*.

Chaque observation a été réalisée à l'aide d'objectifs Nomarski après montage des embryons ou des graines dans un liquide éclaircissant. Les photographies présentées sont représentatives des observations effectuées sur une dizaine d'individus. JAF, Jours après floraison. Barre = 100 μ m.

Sur des graines récoltées 14 JAF, la couche cellulaire d'albumen a été observée en microscopie à contraste de phases (Figure 2.19). Chez les plantes sauvages, les cellules sont polyédriques et de taille homogène (20 μ m de largeur environ). La forte réfringence de leur cytoplasme suggère une accumulation de composés stockés dans le cytosol. L'albumen du mutant *myb118-1* semble en tous points comparable à celui du sauvage.

Chapitre II

MYB118 ne semble pas jouer de rôle notable dans le développement de la graine, que ce soit dans l'albumen, ou, par voie indirecte, dans l'embryon ou les téguments, comme cela peut être observé par exemple chez des mutants de facteurs de transcription exprimés spécifiquement dans l'albumen tels que ZHOUP1 (Yang *et al.*, 2008) ou HAIKU (Wang *et al.*, 2010).

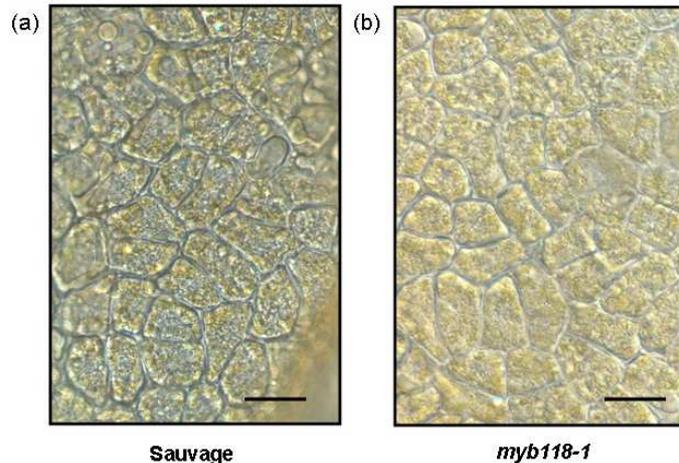


Figure 2.19. Cellules de l'albumen observées à 14 JAF chez le sauvage (Col-0) et le mutant *myb118-1*.

Chaque observation a été réalisée à l'aide d'objectifs Nomarski après montage du tissu entre lame et lamelle. Les photographies présentées sont représentatives des observations effectuées sur une dizaine de graines. JAF, Jours après floraison. Barre = 20 μm .

Afin de tester l'implication de MYB118 dans le processus de maturation de la graine, le contenu en acides gras totaux, qui reflète celui des TAG, et le contenu en protéines de réserve ont été étudiés de manière quantitative et qualitative chez les mutants *myb118*.

3.2.2 Contenu en acides gras totaux de la graine

3.2.2.1 Teneur en acides gras de la graine

Les acides gras totaux de la graine sèche entière, de l'embryon et de la fraction albumen ont été extraits et analysés par chromatographie en phase gazeuse chez le sauvage et chez les mutants *myb118*. Sur graine entière, la quantité d'acides gras par graine ne varie pas de manière significative entre le sauvage et les trois lignées mutantes *myb118* (Figure 2.20a). En revanche, dans la fraction albumen, la quantité d'acides gras est multipliée par deux chez le mutant *myb118-1* et chez la lignée OE3 (et légèrement augmentée chez la lignée T16) (Figure 2.20c). Au contraire, dans l'embryon de ces mutants, le contenu en acides gras est réduit par rapport au contrôle, ce qui explique probablement la très faible variation observée au niveau de la graine entière (Figure 2.20b). La mutation *myb118* aurait donc pour effet de favoriser l'accumulation de TAG dans l'albumen au détriment de l'embryon.

Chapitre II

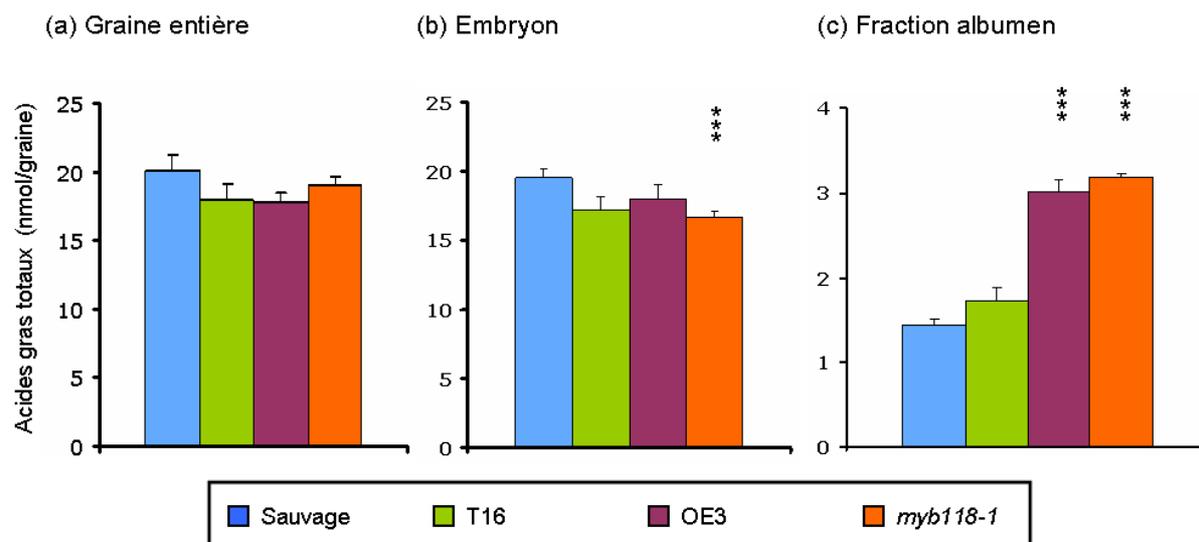


Figure 2.20. Contenu en acides gras totaux d'une graine sèche chez le sauvage (Col-0), *myb118-1*, T16 et OE3.

La teneur en acides gras totaux a été analysée sur des graines entières (a), des embryons excisés (b) et des fractions albumen disséquées (c) par chromatographie en phase gazeuse. Chaque point correspond à la moyenne de cinq répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. *** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 0,1%.

Pour confirmer ces données et renforcer le lien entre la mutation *myb118* et ce phénotype, le mutant *myb118-1* a été transfecté avec le transgène *Pro_{MYB118(2535pb)}:MYB118g*. Le fragment génomique comprenant le promoteur et le gène *MYB118* (Col-0) a été cloné par recombinaison BP dans le vecteur d'entrée *pDONR207* (Annexe 9). Le transgène a ensuite été introduit dans le plasmide *pBIB-HYG* (Annexe 9) par recombinaison LR. Le construit obtenu a permis de transfecter des plantes *myb118-1*. Des T2 homozygotes pour le transgène ont été sélectionnées sur hygromycine et phénotypées (Figure 2.21) : la teneur totale en acides gras des lignées retenues a été analysée par chromatographie en phase gazeuse (Figure 2.22). Dans l'albumen des cinq lignées indépendantes étudiées, la teneur en acides gras est exactement identique (voire inférieure) à celle du sauvage (Figure 2.22c). L'introduction du transgène *Pro_{MYB118(2535pb)}:MYB118g* dans le fond mutant *myb118-1* permet de restaurer le phénotype sauvage, ce qui démontre que l'inactivation de *MYB118* est bien responsable du phénotype décrit (Figure 2.22).

Chapitre II

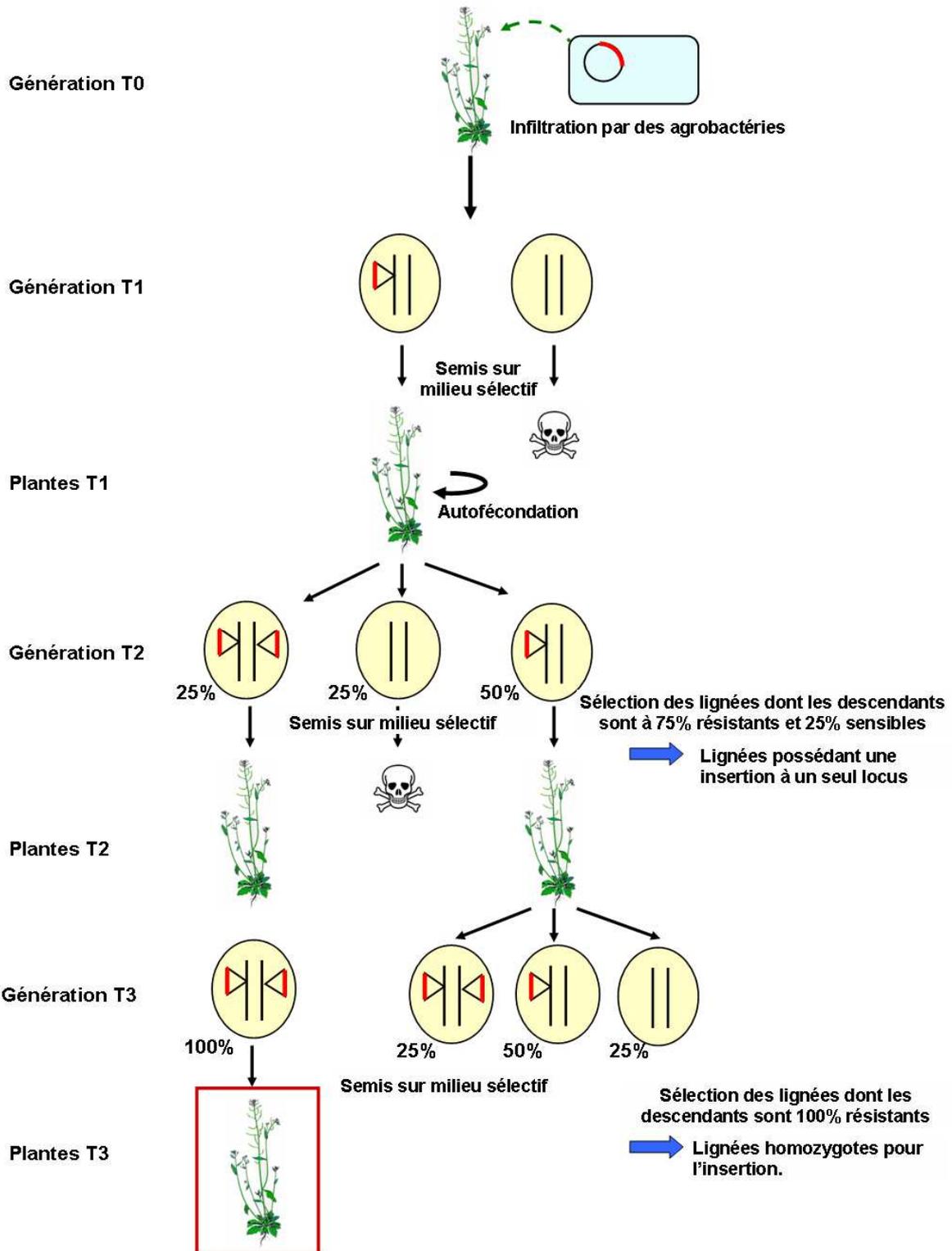


Figure 2.21. Génération de lignées transgéniques par insertion d'un ADN-T.

Les graines des plantes transfectées sont semées *in vitro* sur milieu sélectif (génération T1). Seules les plantules résistantes à l'agent de sélection sont repiquées en serre. Leurs descendants T2 obtenus par autofécondation sont à leur tour sélectionnés *in vitro* et seuls les lignées dont 75% des descendants sont résistants sont retenues : ces lignées sont porteuses d'une insertion monolocus de l'ADN-T. Finalement les graines T3 sont semées une dernière fois sur milieu sélectif et seules les lignées dont 100% des descendants sont résistants sont conservées : ces lignées sont alors homozygotes pour l'insertion.

Chapitre II

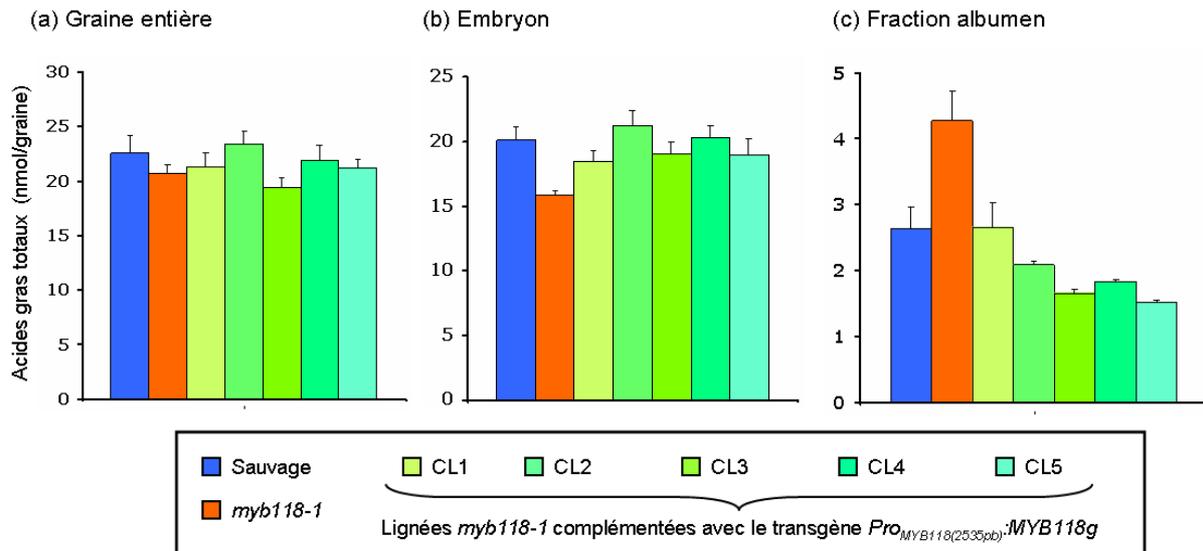


Figure 2.22. Contenu en acides gras totaux d'une graine sèche chez le sauvage (Col-0), *myb118-1* et chez cinq lignées *myb118-1* complémentées par le transgène *Pro_{MYB118(2535pb)}:MYB118g*.

La teneur en acides gras totaux a été analysée sur des graines sèches entières (a), des embryons excisés (b) et des fractions albumen disséquées (c) par chromatographie en phase gazeuse. Chaque point correspond à la moyenne de cinq répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée.

3.2.2.2 Composition en acides gras de la graine

Outre l'accroissement de la teneur totale en acides gras de l'albumen au détriment de l'embryon, la mutation *myb118* entraîne aussi une modification de la composition en acides gras (c'est d'ailleurs sur ce critère que MYB118 a été retenu lors de la phase de crible initiale). Sur graine entière, en fond mutant *myb118*, les proportions relatives de 18:1 n-7 et 20:1 n-7 diminuent de manière significative (Figure 2.23a). La teneur en 18:1 n-9 augmente (Figure 2.23a). La composition en acides gras de l'embryon est identique chez toutes les lignées (Figure 2.23b). Les variations de la composition lipidique observées sur graine entière reflètent des modifications de composition affectant la fraction albumen (Figure 2.23c). Ce phénotype sera analysé et discuté plus en détails dans les chapitres III et IV.

Chapitre II

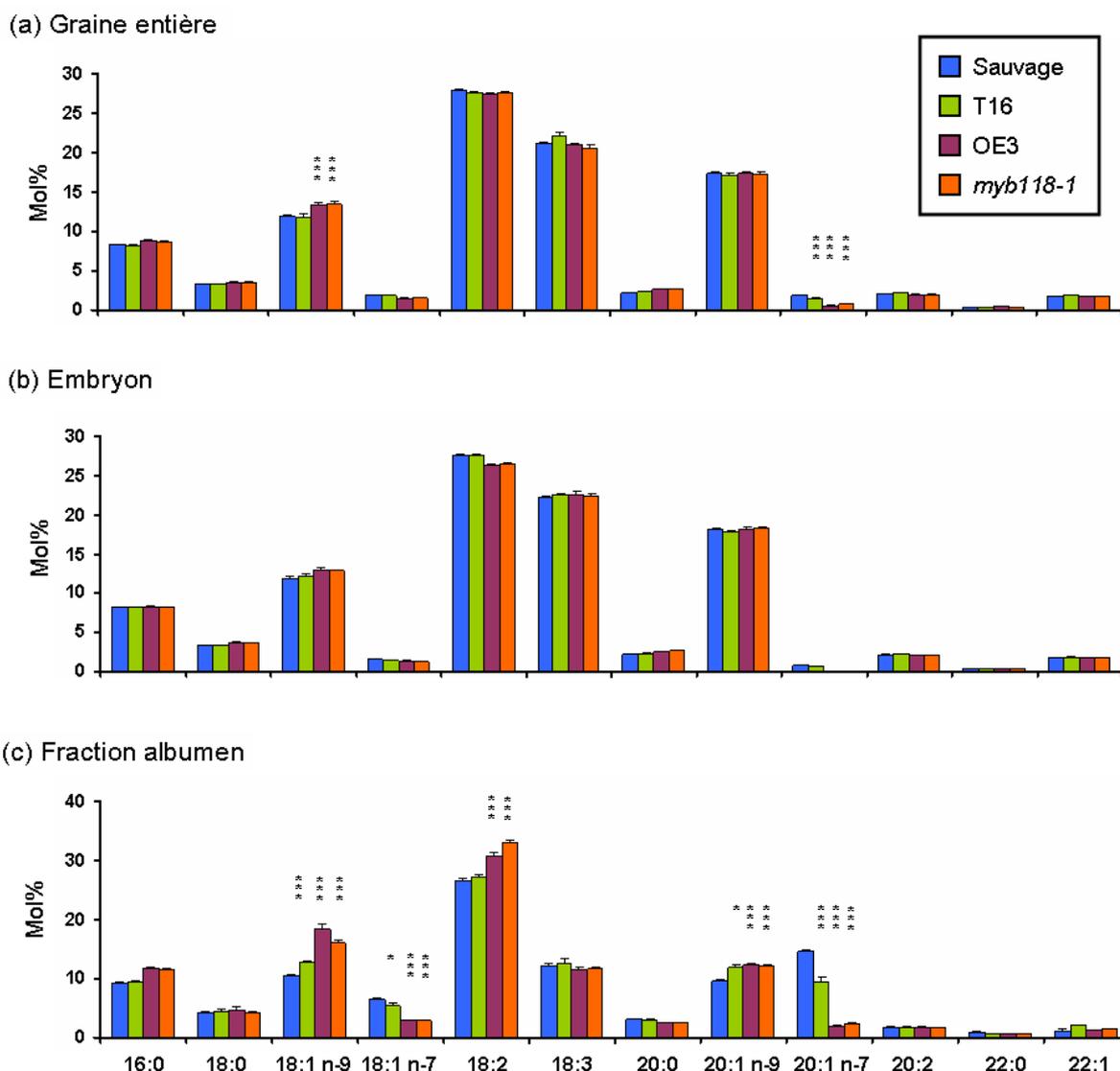


Figure 2.23. Composition en acides gras d'une graine sèche chez le sauvage (Col-0), *myb118-1*, T16 et OE3.

La composition en acides gras a été analysée par chromatographie en phase gazeuse dans des graines entières (a), des embryons excisés (b) et des fractions albumen disséquées (c). Chaque point correspond à la moyenne de cinq répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. * indique une différence significative par rapport au sauvage avec une p -value inférieure à 5%. *** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une p -value inférieure à 0,1%.

De même que pour la teneur en acides gras, la composition lipidique de type sauvage est restaurée par l'introduction du transgène *Pro_{MYB118(2535pb):MYB118g}* en fond *myb118-1*, attestant de la responsabilité de la mutation *myb118* dans ce phénotype (Figure 2.24).

Chapitre II

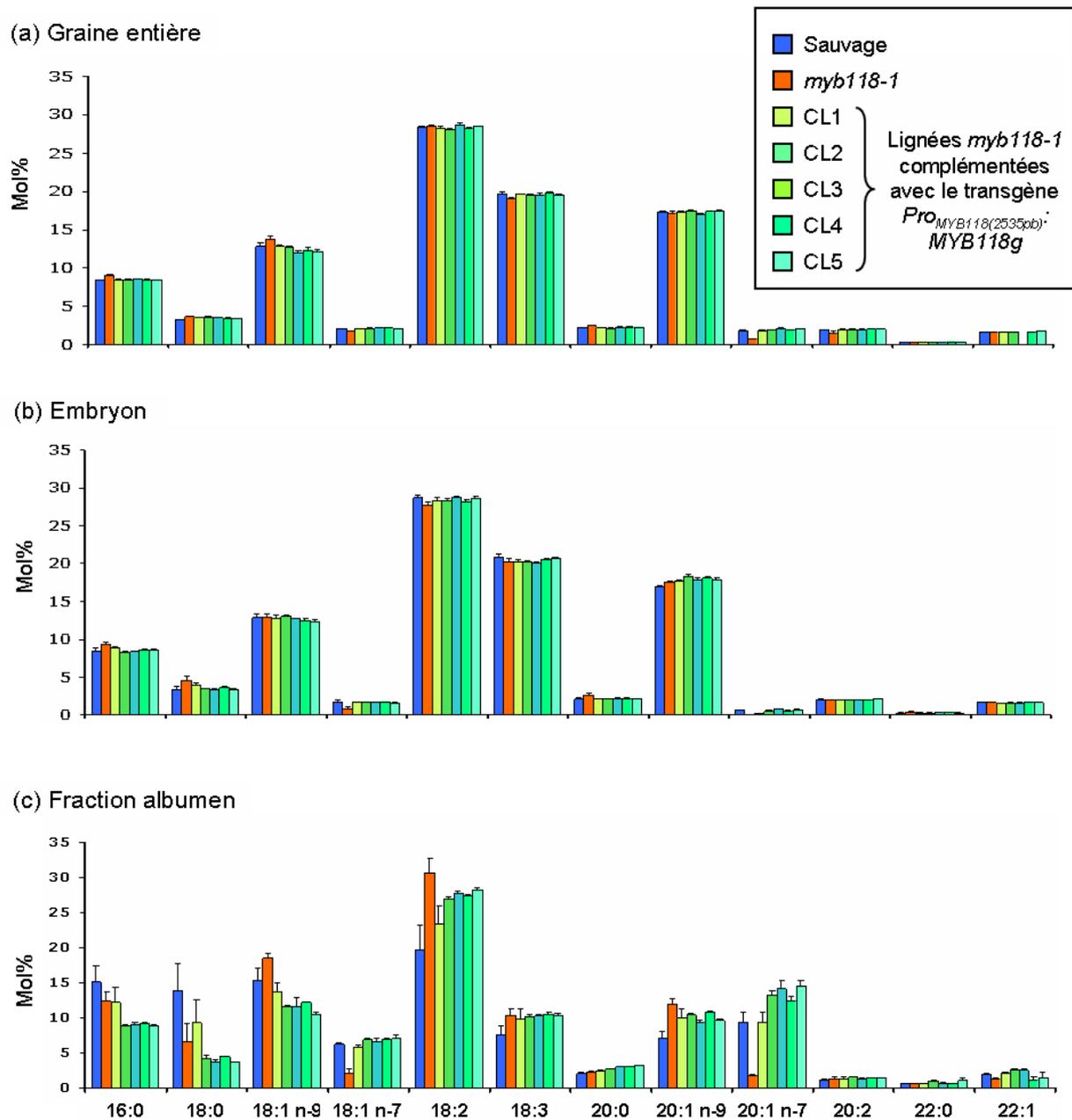


Figure 2.24. Composition en acides gras d'une graine sèche chez le sauvage (Col-0), *myb118-1* et chez cinq lignées *myb118-1* complémentées par le transgène *Pro^{MYB118(2535pb)}:MYB118g*.

La composition en acides gras a été analysée par chromatographie en phase gazeuse dans des graines entières (a), des embryons excisés (b) et des fractions albumen disséquées (c). Chaque point correspond à la moyenne de cinq répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée.

3.2.3 Contenu en protéines de réserve de la graine

Les protéines totales de la graine sèche d'*Arabidopsis* mais aussi de l'embryon et de la fraction, albumen ont été extraites chez *myb118* et le sauvage et analysées sur gel NuPAGE. Sur graine entière, le contenu en protéines des mutants n'est pas modifié (Figure 2.25).

Dans la fraction albumen, la teneur en protéines de réserve par graine est accrue chez les mutants *myb118* (*myb118-1* et OE3) par rapport au sauvage. Au contraire, dans l'embryon, une légère diminution de la quantité de protéines de réserve est décelable chez *myb118-1* et OE3 (Figure 2.25).

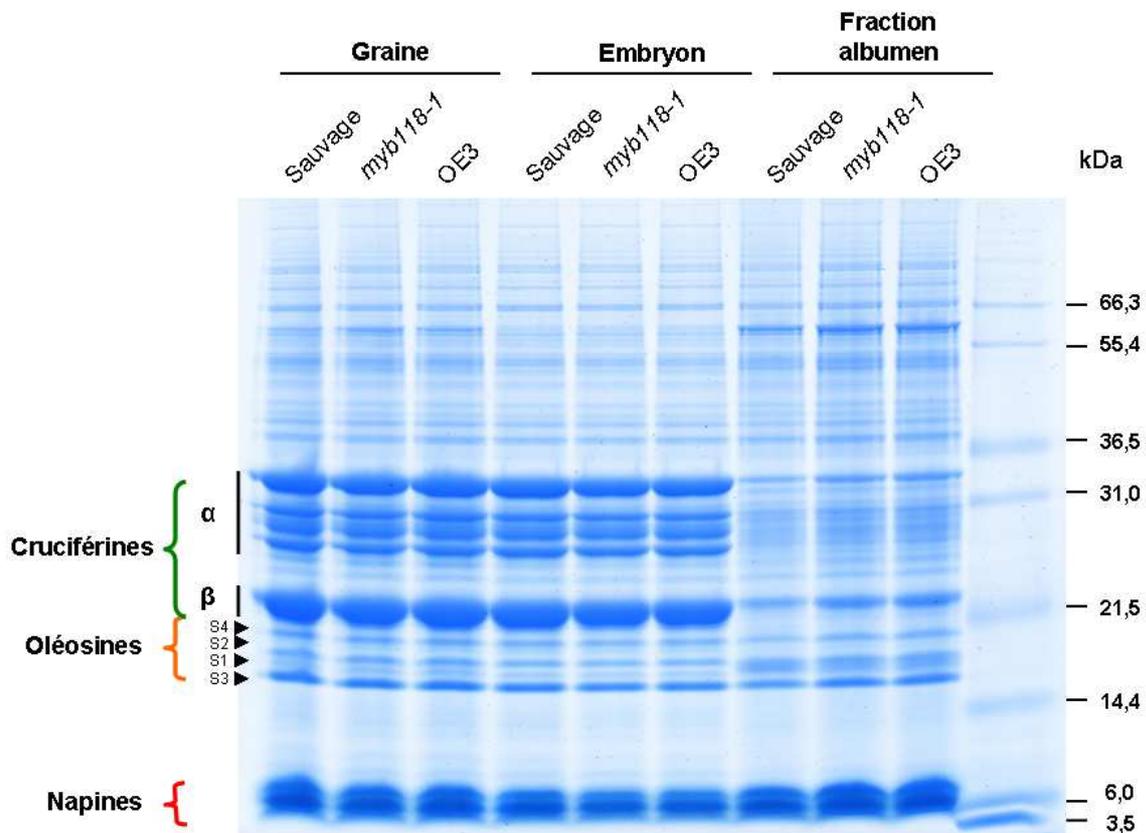


Figure 2.25. Contenu en protéines de graines sèches d'*Arabidopsis* sauvage (Col-0), *myb118-1* ou OE3, entières ou disséquées, analysées en SDS-PAGE.

Le contenu en protéines de 4 graines, 4 embryons ou 16 fractions albumen a été déposé dans chaque puits. Les protéines ont été séparées sur gel NuPAGE 12% puis colorées au bleu de Coomassie G250. Le marqueur de poids moléculaire Mark12 a été utilisé. Les cruciférines (12S) α et β, les napines (2S) ainsi que les oléosines S1/OLEO5, S2/OLEO3, S3/OLEO1 et S4/OLEO2 sont identifiables.

Chapitre II

Pour une analyse plus précise, les deux grands groupes de protéines de réserve (cruciférines et napines) ont été révélés par western blot. Pour les cruciférines, cinq bandes sont identifiables, celle de plus faible poids moléculaire correspondant aux cruciférines β et les quatre autres correspondant aux cruciférines α . La teneur totale en cruciférines est identique dans les graines du sauvage et des deux mutants *myb118* (Figure 2.26). En revanche, la quantité de sous-unité α et β est multipliée par 1,6 dans la fraction albumen et réduite de 30% dans l'embryon chez les mutants *myb118* (Figures 2.26 et 2.27).

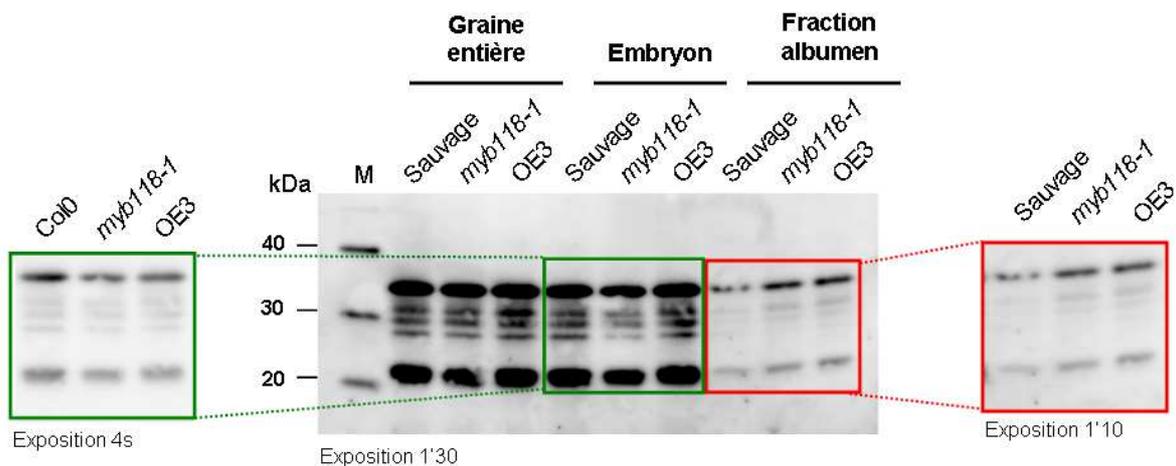
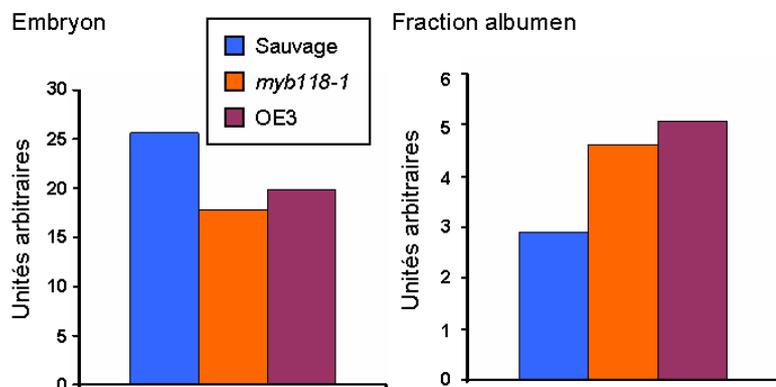


Figure 2.26. Immunodétection des cruciférines (12S) sur des graines sèches d'*Arabidopsis* sauvage (Col-0), *myb118-1* ou OE3, entières ou disséquées.

Le contenu en protéines de 0,05 graines, 0,05 embryons ou 0,2 fractions albumen a été déposé dans chaque puits. Les protéines ont été séparées sur gel NuPAGE 12% puis transférées sur membrane PVDF et hybridées avec des anticorps anti-12S (dilution 1:5000). Un anticorps secondaire couplé à la Horse Radish Peroxidase (HRP) permet la détection par chimiluminescence. Le marqueur de poids moléculaire Magic Mark a été utilisé. Les cruciférines α et β sont identifiables.

Figure 2.27. Quantification relative des cruciférines (12S) d'une graine sèche sauvage (Col-0), *myb118-1* ou OE3 disséquée.

Les protéines totales ont été extraites dans un tampon Laemmli et analysées en NuPAGE puis transférées sur membrane PVDF. Les cruciférines ont été révélées par Western blot grâce à des anticorps spécifiques (Figure 2.26). L'intensité des bandes scannées a été estimée à l'aide du logiciel MultiGauge (Fujifilm). Toutes les isoformes et sous-unités de cruciférines ont été considérées ensemble.



Chapitre II

En ce qui concerne les napines, leur teneur totale dans les graines *myb118* (comparées aux graines sauvages) semble inchangée (Figure 2.28). A contrario, leur teneur est multipliée par 1,4 à 2 dans la fraction albumen alors qu'elle est réduite de 15 à 25% dans l'embryon chez *myb118* par rapport à ce que nous avons pu mesurer chez le sauvage (Figure 2.28 et 2.29).

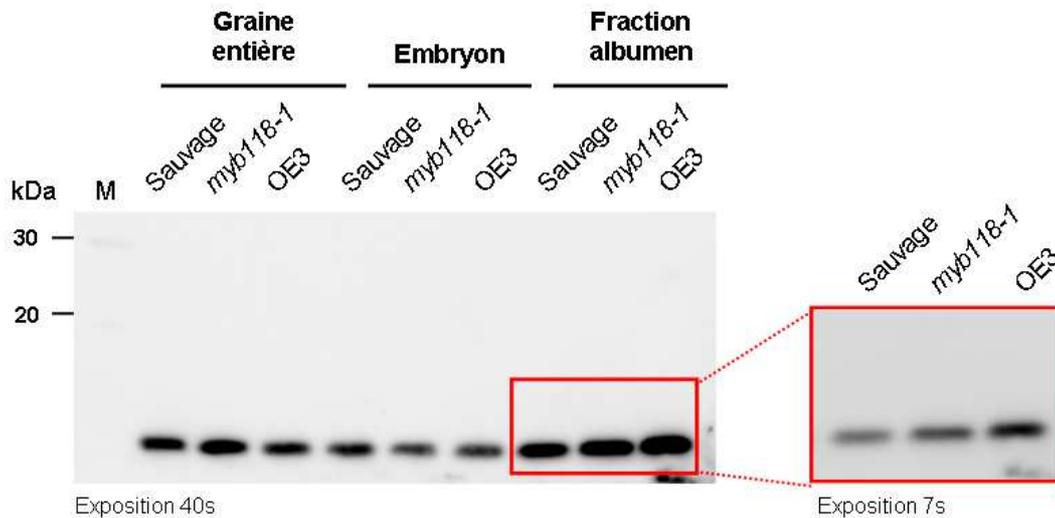


Figure 2.28. Immunodétection des napines (2S) sur des graines sèches d'Arabidopsis sauvages (Col-0), *myb118-1* ou OE3, entières ou disséquées.

Le contenu en protéines de 0,05 graines, 0,05 embryons ou 0,2 fractions albumen a été déposé dans chaque puits. Les protéines ont été séparées sur gel NuPAGE 12% puis transférées sur membrane PVDF et hybridées avec des anticorps anti-2S (dilution 1:2000). Un anticorps secondaire couplé à la Horse Radish Peroxidase (HRP) permet la détection par chimiluminescence. Le marqueur de poids moléculaire Magic Mark a été utilisé.

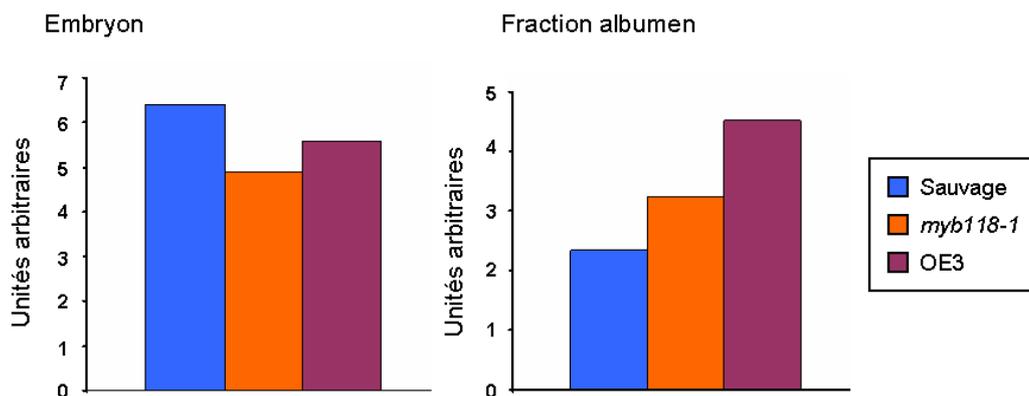


Figure 2.29. Quantification relative des napines (2S) d'une graine sèche sauvage (Col-0), *myb118-1* ou OE3 disséquée.

Les protéines totales ont été extraites dans un tampon Laemmli et analysées en NuPAGE puis transférées sur membrane PVDF. Les napines ont été révélées par Western blot grâce à des anticorps spécifiques (Figure 2.28). L'intensité des bandes scannées a été estimée à l'aide du logiciel MultiGauge (Fujifilm).

Chapitre II

Comme pour la teneur en acides gras, la quantité de protéines de réserve reste globalement inchangée dans la graine des mutants *myb118*, seule la répartition entre albumen et embryon est altérée avec une augmentation d'environ 45% dans la fraction albumen et une diminution d'environ 20% dans l'embryon (ces chiffres correspondent à une estimation moyenne de la variation en protéines de réserve entre sauvage et mutants *myb118* réalisée d'après les quantifications obtenues à l'aide du logiciel MultiGauge).

Chez les mutants *myb118*, la quantité d'acides gras et de protéines de réserve se trouve augmentée d'un facteur 1,5 à 2 dans la fraction albumen suggérant que MYB118 serait un régulateur négatif de l'accumulation de composés de réserve dans ce compartiment où il est exprimé.

3.2.4 Bilan

La graine d'*Arabidopsis* est constituée de trois tissus d'origines distinctes : les téguments, l'albumen, et l'embryon au centre. Les composés nécessaires au développement et à la croissance de la graine sont fournis majoritairement par la plante mère. Amenés par les faisceaux vasculaires *via* le placenta, les nutriments pénètrent dans l'albumen où ils peuvent être stockés transitoirement (sucres solubles dans la vacuole), métabolisés (stockage de TAG et protéines de réserve) ou bien transmis à l'embryon. Lorsque les nutriments sont engagés dans une voie métabolique conduisant à la synthèse de composés de réserve dans l'albumen, il semblerait qu'ils ne puissent être remobilisés et exportés vers le compartiment embryon durant le processus de maturation (seuls les nutriments stockés transitoirement peuvent être remobilisés pour la nutrition de l'embryon).

D'après les données obtenues (Figure 1.1), environ 10% des composés de réserve de la graine sont stockés dans l'albumen, les 90% restants l'étant dans l'embryon (Figure 2.30a). Comme démontré dans la première partie, *MYB118* est exprimé quasi-exclusivement dans l'albumen, où il agirait comme un répresseur de la mise en réserve dans ce compartiment (Figure 2.30a). Enfin, d'après le second paragraphe de ce chapitre, *MYB118* serait régulé par LEC2.

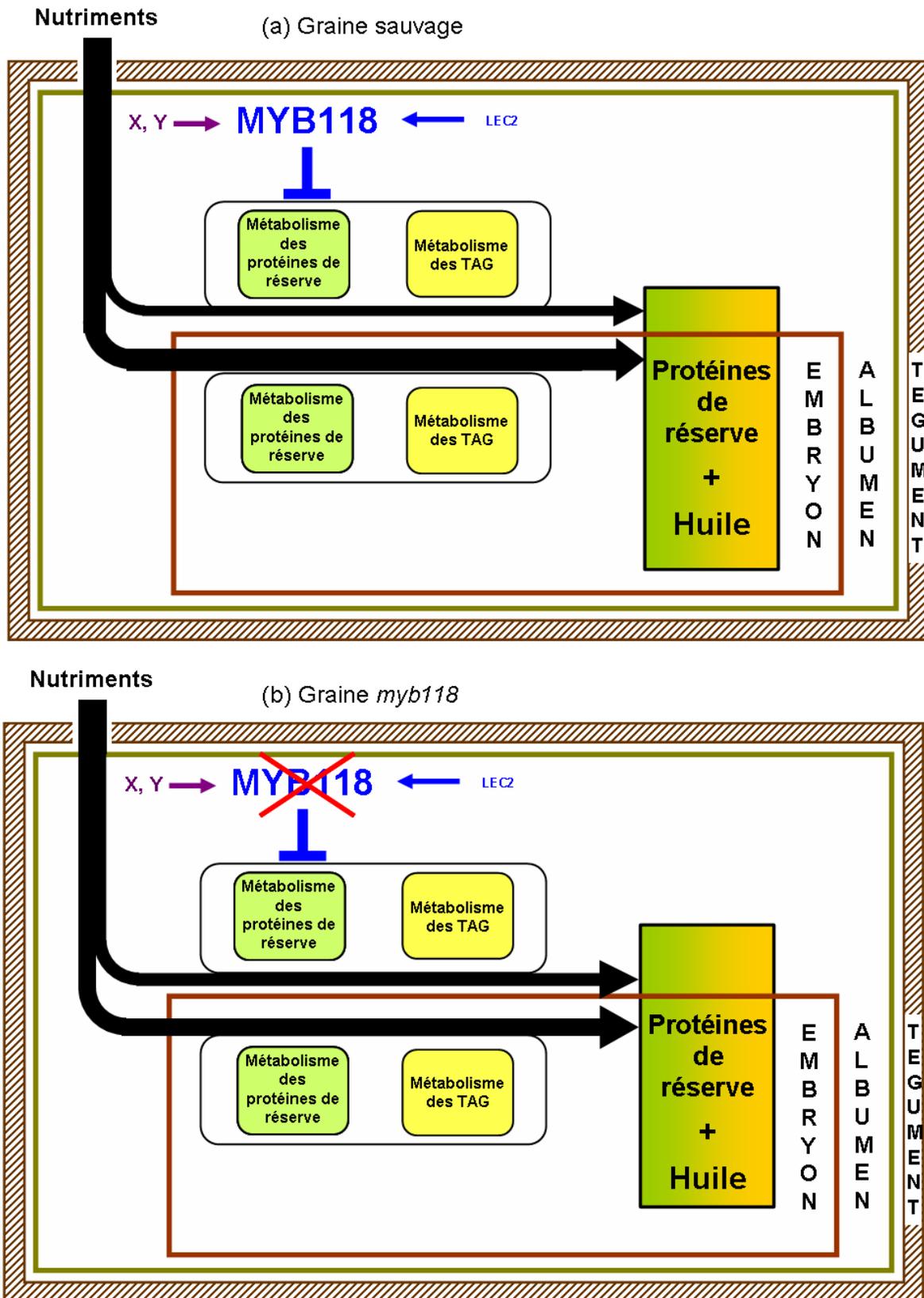


Figure 2.30. Représentation schématique de l'accumulation des composés de réserve dans une graine d'Arabidopsis sauvage (a) ou mutante (b) pour le gène *MYB118*.

Les flèches noires représentent le flux de nutriments. Leur épaisseur est proportionnelle à l'importance du flux. Les flèches bleues ou violettes indiquent des interactions positives, les barres T des interactions négatives. X et Y désignent des régulateurs inconnus. LEC2, LEAFY COTYLEDON2 ; TAG, Triacylglycérol.

Chapitre II

Chez les mutants *myb118*, la quantité de composés de réserve augmente dans l'albumen au détriment de l'embryon, la quantité totale de ces composés dans la graine entière étant globalement constante (Figure 2.30b). Ceci suggère que chez les mutants *myb118*, une partie du flux de nutriments alloués à l'embryon est détournée au profit de l'albumen. Ce prélèvement exacerbé pourrait s'expliquer par une activité métabolique accrue.

3.2.5 Cinétique d'accumulation des composés de réserve

En fond mutant *myb118*, la quantité de composés de réserve est augmentée d'un facteur 1,5 à 2 dans l'albumen des graines sèches matures par comparaison avec des graines de type sauvage. Pour aboutir à ces observations en point final, deux mécanismes peuvent être envisagés : soit la période pendant laquelle l'albumen accumule des réserves est allongée en fond mutant (Modèle 1 ; Figure 2.31) ; soit le taux de synthèse et l'accumulation des réserves est accru dans l'albumen en fond mutant (Modèle 2 ; Figure 2.31).

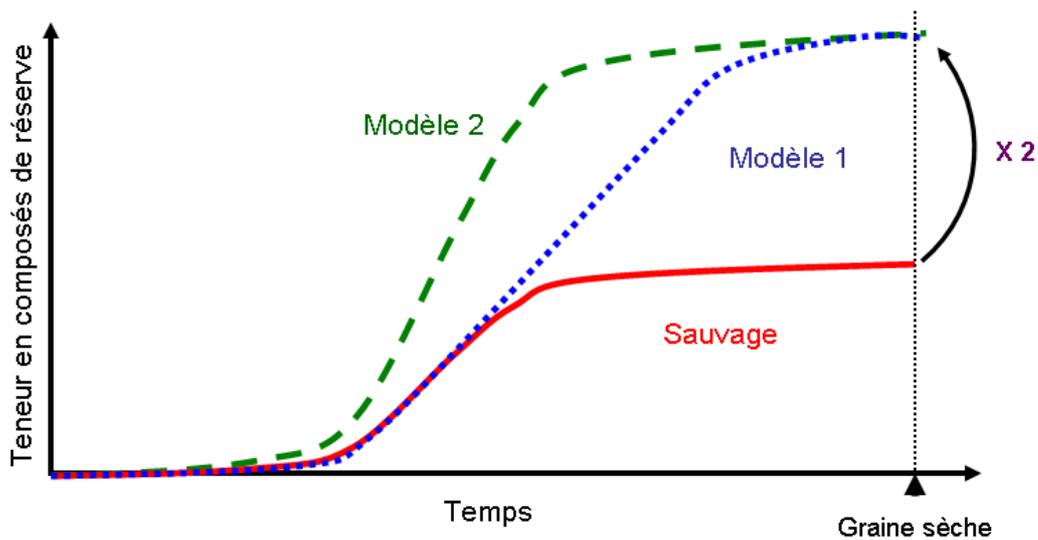


Figure 2.31. Deux modèles pour expliquer l'accumulation accrue de composés de réserve dans l'albumen du mutant *myb118-1*.

La cinétique d'accumulation des composés de réserve dans l'albumen d'une graine sauvage est représentée en rouge. Le modèle 1 présente une période d'accumulation allongée mais avec une vitesse comparable à celle du sauvage alors que le modèle 2 présente une vitesse d'accumulation doublée mais pendant une période de stockage identique à celle du sauvage.

Chapitre II

Pour tester ces deux hypothèses, la teneur en acides gras de graines sauvages et mutantes a été analysée 12 JAF, période à laquelle la vitesse d'accumulation des réserves est maximale chez le sauvage. Comme présenté dans le chapitre I, chez le sauvage, la teneur en acides gras est deux fois plus importante dans l'embryon que dans la fraction albumen (Figure 2.32). A l'inverse chez *myb118-1*, celle-ci est quasiment égale dans les deux compartiments, conséquence d'une baisse du contenu en acides gras de l'embryon et d'une augmentation de leur teneur dans la fraction albumen (Figure 2.32). Cet accroissement de la quantité d'acides gras dans l'albumen à ce stade serait en faveur du second modèle présenté ci-dessus, à savoir une accélération de l'accumulation des composés de réserve en début de phase de maturation.

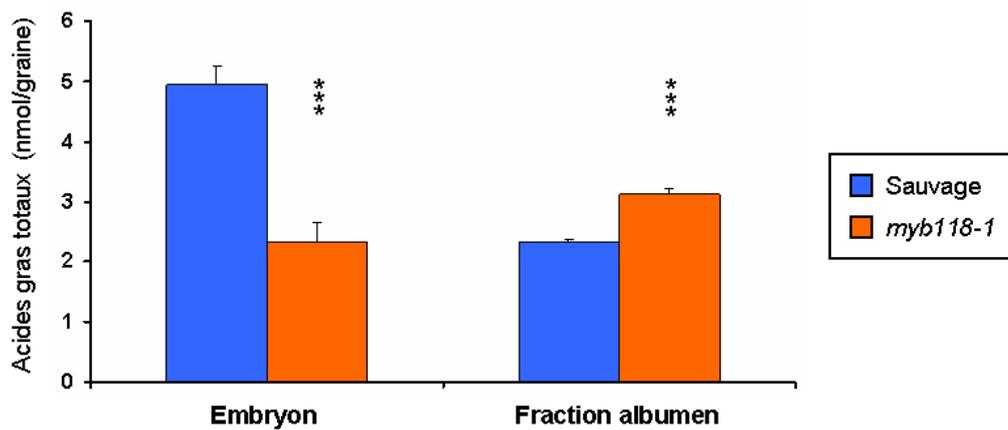


Figure 2.32. Contenu en acides gras de graines disséquées âgées de 12 jours après floraison chez le sauvage (Col-0) et *myb118-1*.

La teneur en acides gras totaux a été analysée par chromatographie en phase gazeuse sur des embryons et des fractions albumen âgées de 12 jours après floraison. Chaque point correspond à la moyenne de cinq répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. *** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 0,1%.

Chapitre II

3.3 Recherche de cibles de MYB118 : analyse transcriptomique

MYB118 étant un facteur de transcription, nos efforts se sont donc concentrés sur la recherche de cibles transcriptionnelles potentielles. Dans ce but, une approche globale et sans *a priori* a été choisie via l'utilisation de puces à ADN. Brièvement, des ARNm d'Arabidopsis de type sauvage (Col-0), *myb118-1* et OE3 ont été extraits de graines 10 JAF, rétrotranscrits et marqués avec un fluorophore avant d'être hybridés sur une puce CATMA.

L'expression des différents gènes d'Arabidopsis en fond mutant *myb118* a été comparée à celle observée en fond sauvage. Pour chaque gène représenté sur la puce, seules deux issues sont possibles. (i) Il n'y a pas de différence significative d'expression du gène X entre le génotype mutant et le sauvage, et dans ce cas, il ne sera plus considéré par la suite. (ii) Le gène X est dérégulé (surexprimé ou sous-exprimé) en fond mutant par rapport au sauvage, il pourra faire l'objet d'une étude plus approfondie.

Parmi les 24 576 gènes représentés sur la puce, seuls 407 sont dérégulés dans les deux fonds mutants OE3 et *myb118-1*. Au sein de cette liste, deux groupes de gènes peuvent être constitués, ceux surexprimés en fond mutant et ceux sous-exprimés.

3.3.1 Les gènes négativement régulés par MYB118

230 gènes sont significativement surexprimés en fond mutant *myb118* comparé au type sauvage. D'après les données transcriptomiques publiées par Le et collaborateurs (2010), une partie de ces gènes ne sont pas ou seulement très faiblement exprimés dans l'albumen en fond sauvage. L'absence de MYB118 entraîne non seulement la surexpression de gènes faiblement exprimés dans l'albumen mais permet aussi l'expression de gènes normalement non exprimés dans ce tissu.

De nombreux gènes connus pour être impliqués dans la maturation de la graine voient leur expression augmenter en fond mutant comme ceux codant le régulateur maître LEC2, les protéines de réserve At2S1 (At4g27140 ; Fujiwara, 2002), At2S-like/At2S5 (At5g54740 ; Van der Klei et al., 1993), la cruciférine At1g03890 ; Whitana-Gamage et al., 2011), des LEA (At2g03850, At5g53730, At4g21020) et des oléosines comme SM3 (At2g25890), At5g56100 et GRP19 (At5g07550) (Figure 2.33). Une liste détaillée des gènes surexprimés en fond *myb118* est présentée en annexe 2, Figure A2.1.

Chapitre II

Gène	Numéro AGI	Ratio (log2)
Régulateur maître		
<i>LEC2</i>	<i>At1g28300</i>	1,42-1,59
Protéines de réserve		
<i>At2S1</i>	<i>At4g27140</i>	1,81-1,78
<i>At2S-like/At2S5</i>	<i>At5g54740</i>	1,80-1,88
-	<i>At1g03890</i>	1,79-2,17
Oléosines		
<i>GRP19</i>	<i>At5g07550</i>	3,40-3,69
<i>SM3</i>	<i>At2g25890</i>	1,68-1,82
-	<i>At5g56100</i>	1,01-1,25
LEA		
-	<i>At2g03850</i>	3,6-3,89
-	<i>At5g53730</i>	2,90-3,13
-	<i>At4g21020</i>	1,81-1,85
Métabolisme de l'amidon		
<i>GWD2/PWD</i>	<i>At4g24450</i>	2,67-2,81

Figure 2.33. Sélection de gènes inhibés par MYB118 identifiés par analyse transcriptomique sur puce à ADN (CATMA).

Le ratio (log2) représente la différence de teneur en transcrits du gène considéré entre le sauvage et les mutants *myb118* (*myb118-1* et OE3). LEA, Late embryogenesis abundant.

Dans un premier temps, la dérégulation de l'ensemble des gènes cités a été vérifiée par RT-PCR quantitative sur des ADNc préparés à partir de graines âgées de 10 JAF (Figure 2.34). L'extraction d'ARNm ayant servi à ces analyses a été réalisée à partir d'une culture indépendante de celle exploitée pour l'approche transcriptomique. De ces analyses, il ressort que l'expression de *LEC2* est multipliée par 3 en fond *myb118*, celle des gènes codant des napines, *At2S1* et *At2S-like/At2S5*, par 3,5 et 6 respectivement, quand celle de la cruciférine *At1g03890* est fortement induite en l'absence de *MYB118*. Le niveau de transcrits des gènes codant des LEA tels que *At2g03850*, *At5g53730* et *At4g21020* est augmenté d'un facteur 25, 3 et 5, respectivement, et celui des gènes codant des oléosines tels que *SM3*, *At5g56100* et *GRP19* d'un facteur 4, 2 et 25, respectivement.

Chapitre II

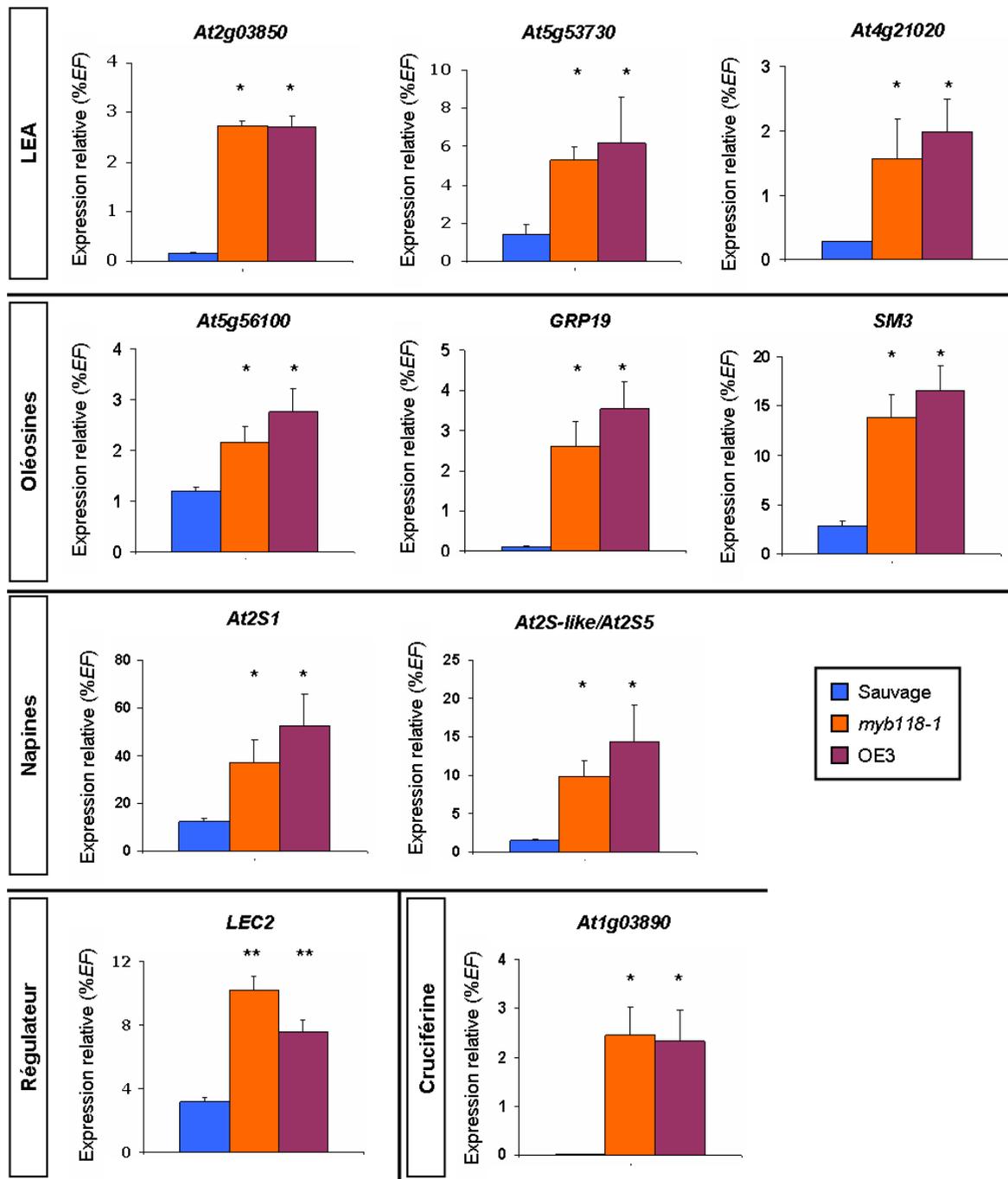


Figure 2.34. Expression relative de dix gènes inhibés par MYB118 dans des graines âgées de 10 jours après floraison en fond sauvage (Col-0), *myb118-1* ou OE3, étudiée par RT-PCR quantitative.

L'expression relative de gènes codant des LEA (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT) tels que *At2g03850*, *At5g53730* et *At4g21020*, de gènes codant des oléosines tels que *SM3*, *At5g56100* et *GRP19*, de gènes codant des napines tels que *At2S1* et *At2S-like/At2S5*, d'un gène de cruciférine, *At1g03890*, et de *LEC2* (*LEAFY COTYLEDON2*) est présentée. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. ** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 1%. * indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 5%.

Chapitre II

Pour confirmer et préciser ces données mais aussi parce que *MYB118* est exprimé très préférentiellement dans la fraction albumen, l'accumulation des transcrits de l'ensemble de ces gènes a été étudiée en fond sauvage et mutant *myb118-1* dans les deux compartiments (embryon et fraction albumen) de graines âgées de 10 JAF (Figure 2.35).

L'expression de l'ensemble de ces gènes est significativement augmentée dans la fraction albumen du mutant *myb118-1* par rapport au sauvage. Les niveaux de transcrits de *At2S1*, *At2S-like/At2S5*, du gène *At5g56100* sont doublés, ceux de la cruciférine *At1g03890*, de *GRP19*, *SM3* et des trois gènes de LEA sont 10 à 15 fois plus élevés dans l'albumen de *myb118-1* que dans celui du sauvage (Figure 2.35). En ce qui concerne *LEC2*, la même tendance est observée avec une expression 6 fois plus élevée dans la fraction albumen du mutant *myb118-1* par rapport au sauvage.

Pour enrichir ce panorama, nous avons étudié l'expression d'autres gènes clefs impliqués dans le métabolisme des TAG ou des protéines de réserve et connus pour être des cibles de *LEC2* (Braybrook et al., 2006) : *CRA1* codant une cruciférine et *S3/OLEO1* codant la principale oléosine de la graine. Tous deux sont surexprimés (d'un facteur 2 pour *CRA1*, 4 pour *S3/OLEO1*) en fond mutant *myb118* comparé au sauvage (Figure 2.35).

Toutes ces données d'expression sont en accord avec le phénotype des mutants *myb118*. *MYB118* réprimerait donc l'accumulation de composés de réserves, TAG et protéines de réserve, dans l'albumen en régulant négativement l'expression de gènes codant des protéines de réserve (*At2S1*, *At2S-like/At2S5*, la cruciférine *At1g03890*, *CRA1*) et des oléosines (*S3/OLEO1*, *SM3*) impliquées dans le stockage des TAG.

De plus, *MYB118* réprime l'expression de *LEC2*, activateur maître du processus de maturation (Figure 2.35). D'après les résultats des Figures 1.13a et 2.4, *LEC2* est exprimé plus précocement que *MYB118* dans l'albumen. Il existerait donc une boucle de rétrocontrôle négatif entre *LEC2* et *MYB118* : dans un premier temps *LEC2* activerait l'expression de *MYB118* qui réprimerait en retour l'expression de son activateur. Enfin, *LEC2* est connu pour stimuler l'accumulation de réserves dans la graine. Une partie du phénotype des mutants *myb118* pourrait donc être due à l'augmentation de l'expression de *LEC2* dans l'albumen. Ce point sera développé dans la dernière partie de ce chapitre.

Chapitre II

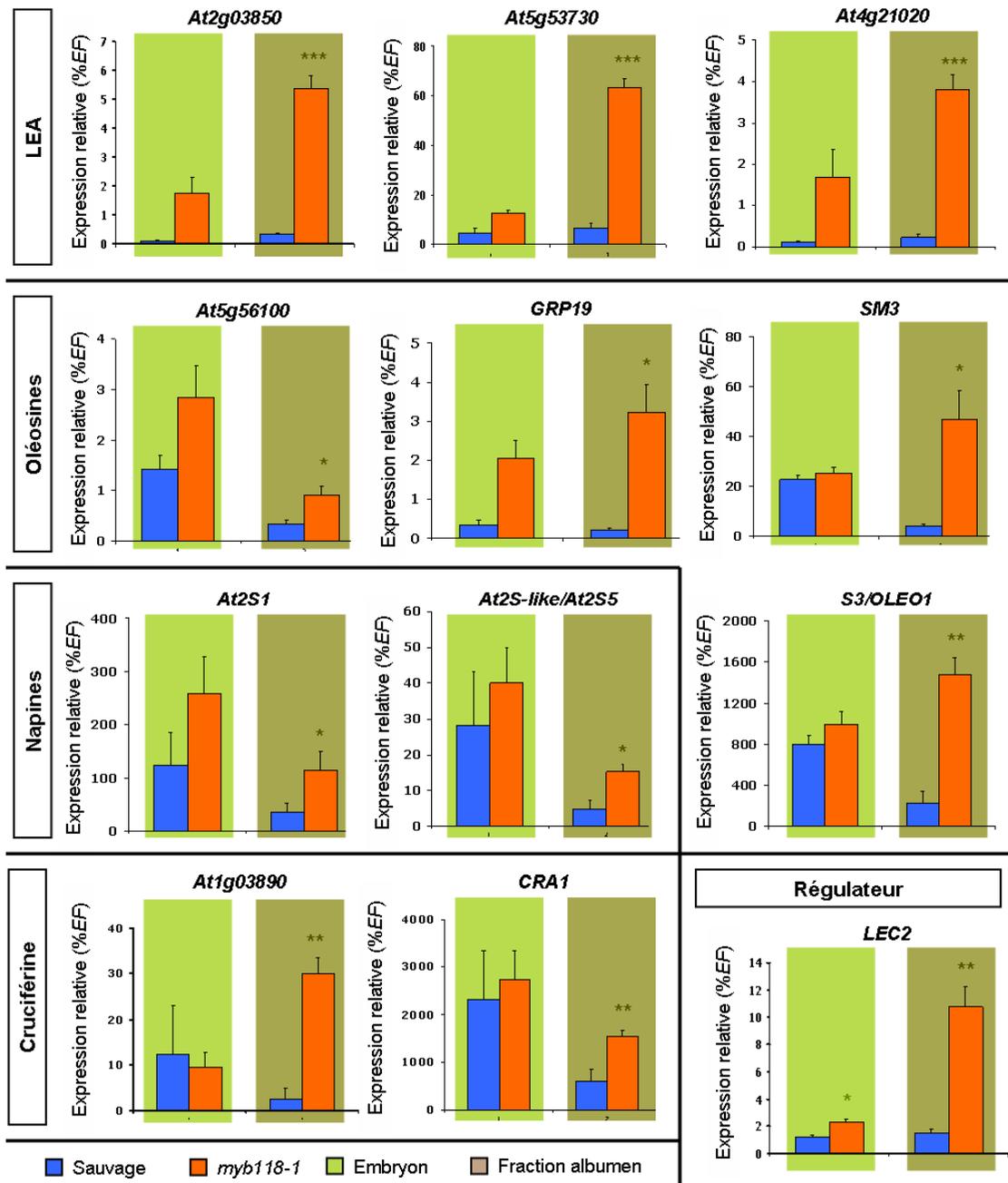


Figure 2.35. Expression relative de 12 gènes inhibés par MYB118 dans les différentes fractions d'une graine âgées de 10 jours après floraison en fond sauvage (Col-0) ou *myb118-1* étudiée par RT-PCR quantitative.

L'expression de gènes codant des LEA (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT) tels que *At2g03850*, *At5g53730* et *At4g21020*, de gènes codant des oléosines tels que *S3*, *SM3*, *At5g56100* et *GRP19*, de gènes codant des napines tels que *At2S1* et *At2S-like/At2S5*, de gènes codant des cruciférines tels que *At1g03890* et *CRA1*, et de *LEC2* (*LEAFY COTYLEDON2*) est présentée. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. *** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 0,1%. ** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 1%. * indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 5%.

Chapitre II

3.3.2 Les gènes positivement régulés par MYB118

177 gènes sont significativement sous-exprimés en fond mutant *myb118* comparé au sauvage. Parmi eux, de nombreux gènes sont impliqués dans le métabolisme et la signalisation hormonale, la réponse aux stress biotiques et abiotiques, la croissance et le développement, ou encore le métabolisme lipidique (Figure 2.37). Une liste détaillée des gènes sous-exprimés en fond *myb118* est présentée en annexe 2, figure A2.1.

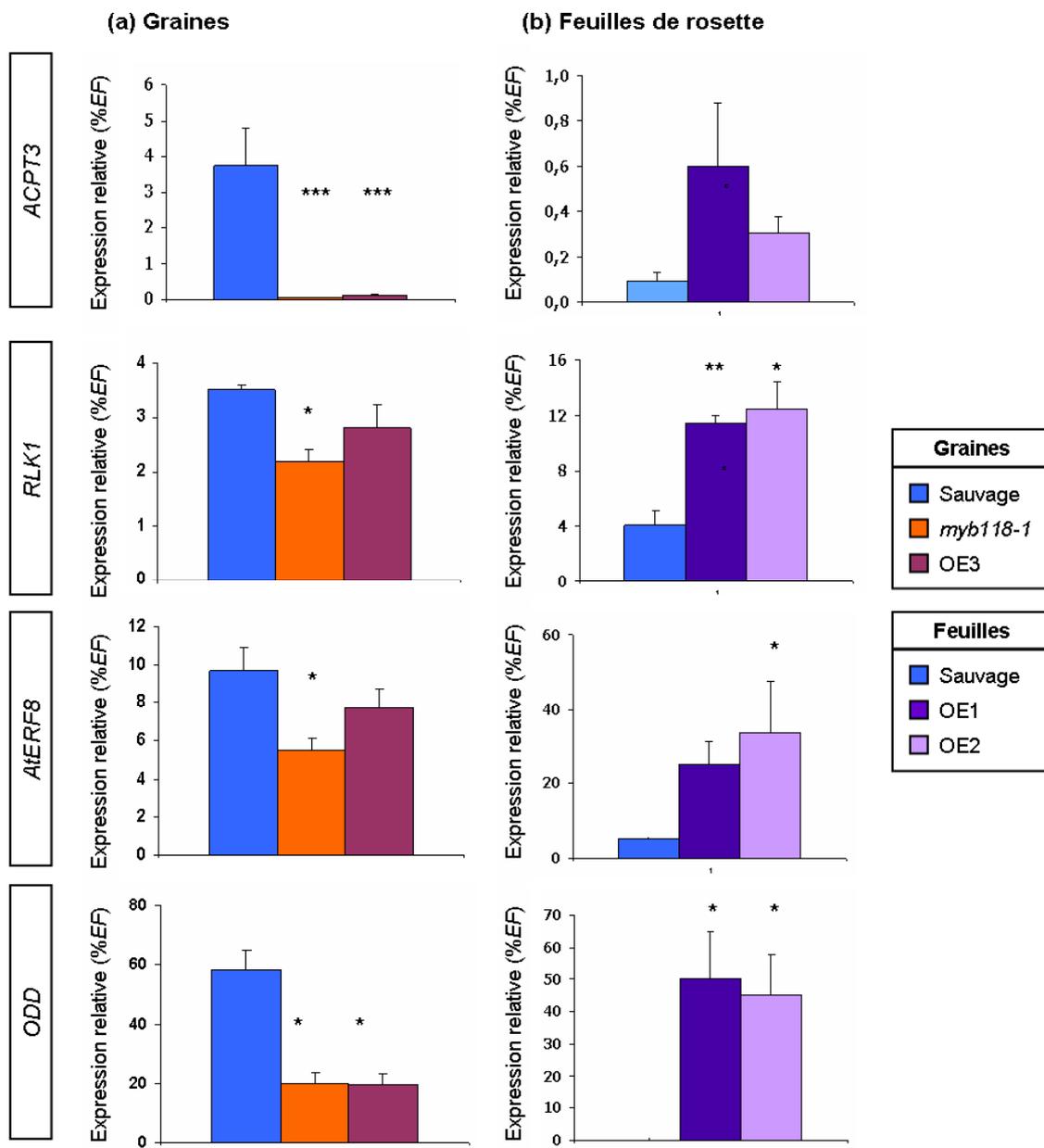
Gène	Numéro AGI	Ratio (log2)
Métabolisme et signalisation de l'auxine		
<i>ARF11</i>	<i>At2g46530</i>	1,28-1,35
<i>NPH3</i>	<i>At2g47860</i>	1,11-1,39
<i>SAUR-like</i>	<i>At2g45210</i>	0,90-1,24
Métabolisme et signalisation des GA		
<i>GA3</i>	<i>At5g25900</i>	1,46-1,69
<i>GA1</i>	<i>At4g02780</i>	1,19-1,23
Métabolisme et signalisation des cytokinines		
<i>ARR15</i>	<i>At1g74890</i>	1,94-2,13
<i>CKX3</i>	<i>At5g56970</i>	1,73-1,75
Métabolisme et signalisation de l'éthylène		
<i>AtERF8</i>	<i>At1g53170</i>	0,97-1,28
Métabolisme et signalisation de l'ABA		
<i>AAO2</i>	<i>At3g43600</i>	1-1,25
<i>HB7</i>	<i>At5g53730</i>	1,03-1,27
Croissance et développement		
<i>EMB1353</i>	<i>At4g30090</i>	1,87-1,99
<i>WOX9</i>	<i>At2g33880</i>	1,02-1,16
<i>PSY1</i>	<i>At5g58650</i>	0,94-1,23
Métabolisme lipidique		
<i>SAD3</i>	<i>At5g16230</i>	1,34-1,87
<i>SAD2</i>	<i>At3g02610</i>	0,91-1,07
Métabolisme de l'amidon		
<i>APL4</i>	<i>At2g21590</i>	1,51-1,52
Réponse aux stress biotique et abiotique		
<i>CYP86C3</i>	<i>At1g13140</i>	2,29-2,37
<i>PER17</i>	<i>At2g22420</i>	1,84-1,88
<i>RLK1</i>	<i>At1g48480</i>	1,09-1,16

Figure 2.36. Sélection de gènes induits par MYB118 identifiés par analyse transcriptomique sur puce à ADN (CATMA).

Le ratio (log2) représente la différence de la teneur en transcrits du gène considéré entre le sauvage et les mutants *myb118* (*myb118-1* et OE3).

Chapitre II

Huit gènes représentatifs ont été choisis et la dérégulation de leur expression en fond mutant a été vérifiée par RT-PCR quantitative sur des ARNm issus de graines entières âgées de 10 JAF (Figure 2.37a). Les gènes *SAD2* et *SAD3* codant des stéaroyl-ACP-désaturases (Figure 2.36) seront étudiés dans le chapitre IV. L'expression de *CKX3*, *EMB1353* et *ARR15* est divisée par 4, 6 et 12 respectivement en fond mutant *myb118* tout comme celle d'*AtERF8* qui chute de 20 à 40% selon le génotype mutant considéré. Les transcrits de *PER17* ou de *ODD* sont 3 fois moins présents chez *myb118-1* que chez le sauvage quand ceux de *RLK1* chutent de 15 à 30% selon le génotype mutant considéré. Enfin, l'expression de *ACPT3* est fortement inhibée en fond mutant *myb118-1* (Figure 2.37a).



Chapitre II

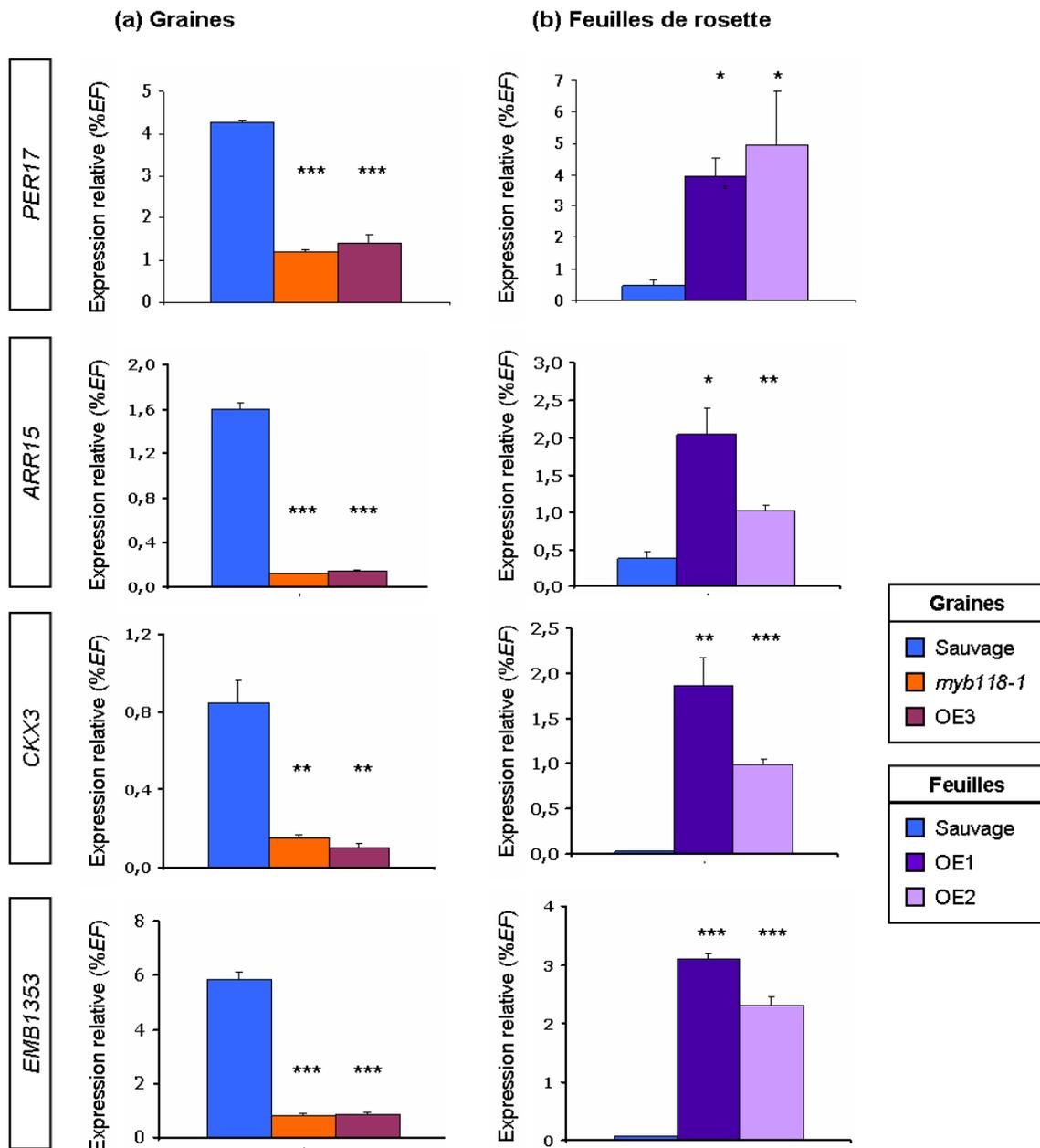


Figure 2.37. Expression relative de huit gènes induits par MYB118 dans divers fonds génétiques étudiée par RT-PCR quantitative.

L'expression de *PER17* (*PEROXYDASE17* ; *At2g22420*), *ACPT3* (*ARABIDOPSIS CIS-PRENYL TRANSFERASE3* ; *At2g23410*), *RLK1* (*RECEPTOR LIKE KINASE1* ; *At1g48480*), *AtERF8* (*ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR8* ; *At1g53170*), *ODD* (codant une 2-oxoglutarate dioxygénase ; *At1g04380*), *ARR15* (*RESPONSE REGULATOR15* ; *At1g74890*), *CKX3* (*CYTOKININE OXYDASE3* ; *At5g56970*) et *EMB1353* (*EMBRYO DEFECTIVE 1353* ; *At4g30090*) est présentée, (a) dans des graines âgées de 10 jours après floraison en fond sauvage (Col-0), *myb118-1* et OE3 ou (b) dans des feuilles de rosette de plantes sauvages et de lignées surexprimant *MYB118* appelées OE1 et OE2 (Figure 2.17). Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. *** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 0,1%. ** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 1%. * indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 5%.

Chapitre II

Parce que *MYB118* est très préférentiellement exprimé dans la fraction albumen, nous avons souhaité confirmer ces résultats sur des ARNm extraits de chacun des compartiments d'une graine âgée de 10 JAF, embryon ou fraction albumen (Figure 2.38).

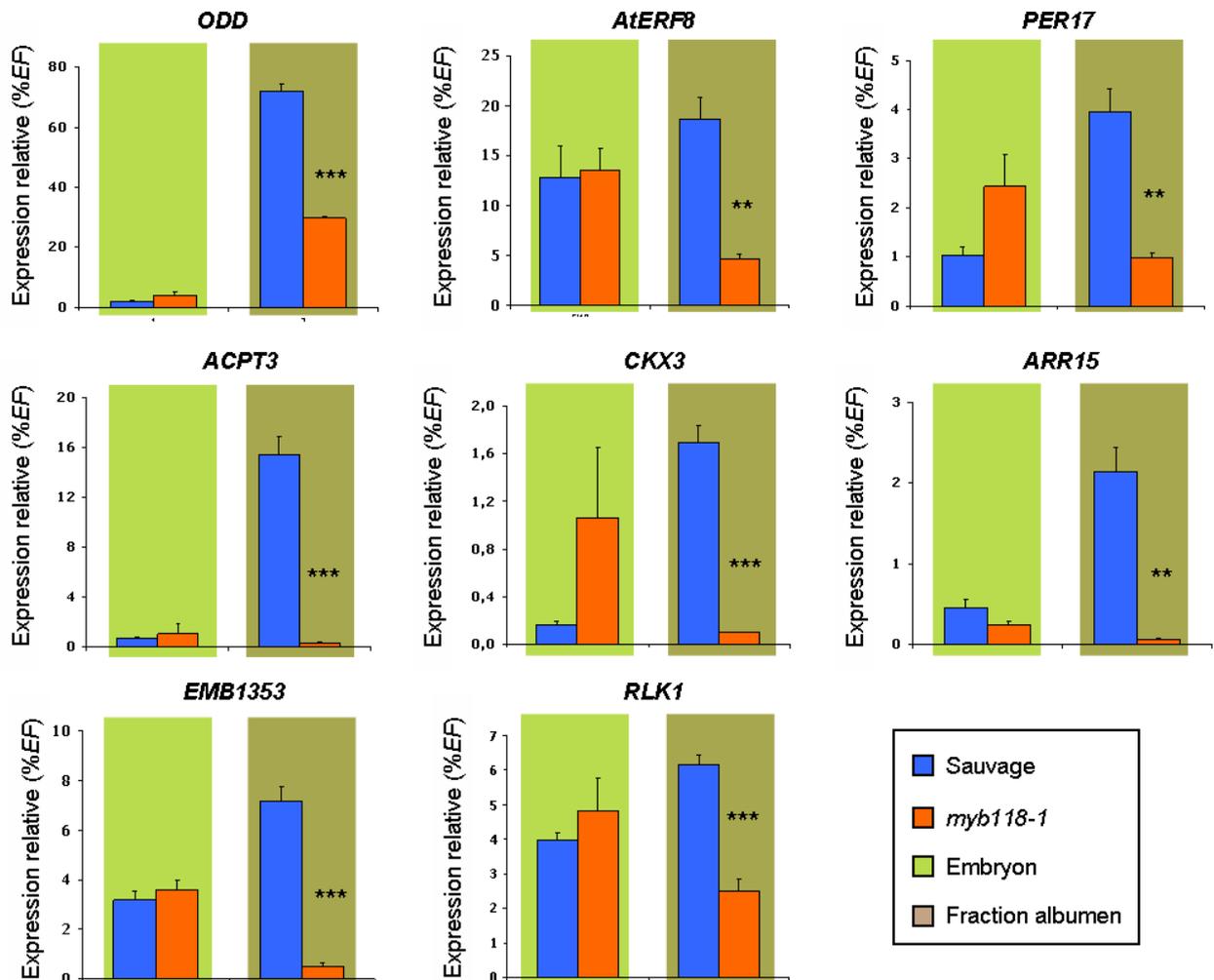


Figure 2.38. Expression relative de 8 gènes induits par MYB118 dans les différentes fractions d'une graine âgées de 10 jours après floraison en fond sauvage (Col-0) ou *myb118-1*, étudiée par RT-PCR quantitative.

L'expression de *PER17* (*PEROXYDASE17* ; *At2g22420*), *ACPT* (*ARABIDOPSIS CIS-PRENYL TRANSFERASE3* ; *At2g23410*), *RLK1* (*RECEPTOR LIKE KINASE1* ; *At1g48480*), *AtERF8* (*ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR8* ; *At1g53170*), *ODD* (codant une 2-oxoglutarate dioxygénase ; *At1g04380*), *ARR15* (*RESPONSE REGULATOR15* ; *At1g74890*), *CKX3* (*CYTOKININE OXYDASE3* ; *At5g56970*) et *EMB1353* (*EMBRYO DEFECTIVE 1353* ; *At4g30090*) est présentée. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. *** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 0,1%. ** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 1%.

Chapitre II

De manière globale, l'expression de ces huit gènes est réduite uniquement dans la fraction albumen de *myb118-1* comparée à celle du sauvage et les variations d'expression déjà visibles sur graine entière sont ici amplifiées dans la fraction albumen (Figure 2.38). L'expression de *CKX3*, *EMB1353* et *ARR15* est divisée par 17, 14 et 21 respectivement dans la fraction albumen de *myb118-1* comparée à celle du sauvage tout comme celle d'*AtERF8* qui diminue de 75%. L'accumulation des transcrits de *ODD* et *PER17* est 2 à 4 fois moins importante dans la fraction albumen du mutant que chez le sauvage ; pour *RLK1*, elle chute de 50%. Enfin, les transcrits de *ACPT3* sont 75 fois moins abondants dans la fraction albumen de *myb118-1* que celle du sauvage.

Ainsi MYB118 serait un régulateur positif de l'expression de ces huit gènes dans la fraction albumen. Nous avons donc analysé leur expression dans les feuilles de rosette des lignées surexprimant *MYB118* (OE1 et OE2) (Figure 2.37b). De manière générale, l'expression de ces huit gènes augmente chez OE1 et OE2 comparativement au sauvage. L'expression de *CKX3*, *EMB1353* et *ODD*, quasi nulle chez le sauvage, est fortement induite chez les lignées surexprimant *MYB118*. Le niveau de transcrits de *PER17* et *AtERF8* est multiplié par 5, celui de *ARR15* et *ACPT3* par 6 et 3 chez OE1 et OE2 respectivement, et enfin celui de *RLK1* par 3 (Figure 2.37b). Toutes ces données confirment l'implication de MYB118 dans la régulation positive de l'expression de ces huit gènes, cependant son mode d'action n'est pas clairement établi.

Pour tester l'hypothèse selon laquelle MYB118, facteur de transcription, serait un activateur transcriptionnel de ces cibles putatives, l'activation du gène rapporteur *uidA* sous contrôle des promoteurs (1kb) de trois gènes choisis parmi ceux validés en RT-PCR quantitative (*Pro_{ODD}*, *Pro_{AtERF8}* et *Pro_{PER17}*) a été étudiée en système hétérologue dans des feuilles de tabac (Figure 2.39). Une très faible activité GUS est constatée lorsque le gène rapporteur sous contrôle des promoteurs testés est introduit dans les cellules de feuilles de tabac. En revanche, une intense coloration bleue est détectée lorsque le gène *uidA* placé sous contrôle des promoteurs de *ODD*, *AtERF8* et *PER17* est cotransfecté avec le construit *Pro_{35Sdual}:MYB118*. Cette activation est spécifique et n'est pas observée en présence d'autres facteurs de transcription MYB tels que MYB92 et MYB107. Enfin, le gène *uidA* sous contrôle du promoteur de *BCCP2*, un gène non régulé par MYB118 d'après les données transcriptomiques et de RT-PCR quantitative, n'est pas activé par MYB118 et constitue donc un bon contrôle négatif (Figure 2.39). Ainsi, MYB118 activerait l'expression de ses cibles de manière transcriptionnelle *via* leur promoteur.

Chapitre II

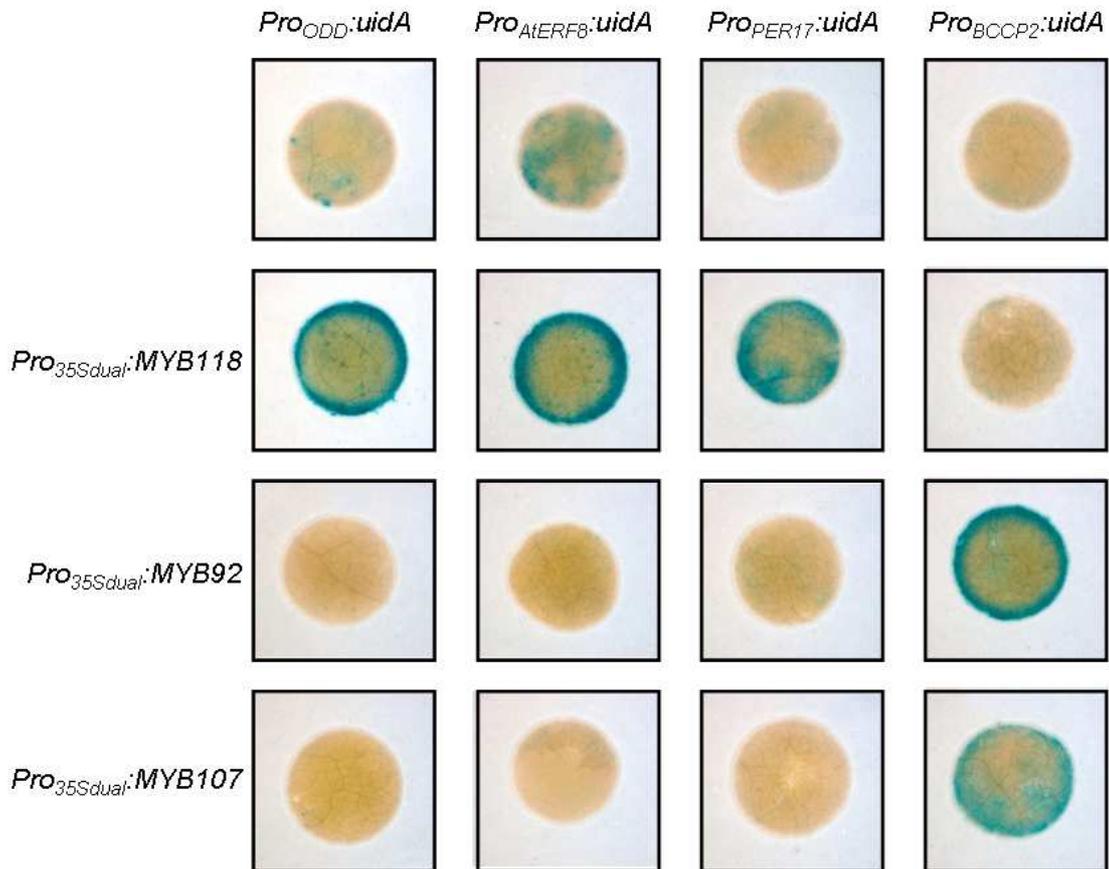


Figure 2.39. Test d'activation du gène rapporteur *uidA* sous contrôle des promoteurs *Pro_{ODD}*, *Pro_{AERF8}* et *Pro_{PER17}* par MYB118 dans des feuilles de tabac (*Nicotiana benthamiana*).

Des feuilles de tabac ont été transfectées avec des construits arborant le gène rapporteur *uidA* sous contrôle des promoteurs *Pro_{ODD}*, *Pro_{AERF8}*, *Pro_{PER17}* ou *Pro_{BCCP2}* (1 kb) seuls ou associés à des vecteurs permettant l'expression des facteurs de transcriptions MYB118, MYB92 ou MYB107 sous contrôle d'un promoteur de type *35Sdual* dans le vecteur *pMDC32* (Annexe 9). Après trois jours de culture, des disques foliaires ont été incubés 5 h dans un tampon phosphate contenant 2 mM de X-Gluc et 0,2 mM de ferrocyanure/ferricyanure de potassium, puis décolorés à l'éthanol.

Puisque MYB118 est un facteur de transcription (Zhang et al., 2009), l'étape suivante consiste à tester sa capacité à interagir physiquement avec le promoteur de ses gènes cibles putatifs.

Chapitre II

3.4 Etude d'interaction entre MYB118 et ses promoteurs cibles

Pour essayer de déterminer s'il existe des interactions physiques entre MYB118 et le promoteur de ses gènes cibles, plusieurs approches ont été envisagées.

Une première consiste à tester l'interaction directe entre une protéine et un fragment d'ADN en levure par la technique de simple hybride. Les séquences promotrices (500 pb) des gènes négativement et positivement régulés par MYB118 ont été clonées en amont du gène rapporteur *HIS3* dans le génome de la levure *S. cerevisiae*. Les levures portant ces constructions ont alors été transfectées avec un vecteur exprimant *MYB118* fusionné au domaine transactivateur Gal4-AD. Dans ces conditions, l'interaction entre MYB118 et les promoteurs de ses cibles putatives permet à la levure de croître sur un milieu dépourvu d'histidine. Sur les 15 promoteurs testés, aucune colonie n'est capable de croître sur un milieu sans histidine. Ces résultats nous amènent à émettre deux hypothèses, (i) soit les promoteurs des gènes testés ne sont pas des cibles directes de MYB118 et il n'interagit donc pas physiquement avec eux, (ii) soit ce sont bien des cibles directes mais MYB118 n'est capable d'interagir seul avec ces mêmes promoteurs et sa fixation nécessiterait l'intervention de cofacteurs.

Pour tester si MYB118 est capable d'interagir seul avec les promoteurs étudiés, des expériences de retard sur gel sont en cours au laboratoire. Pour cela, nous avons pu produire la protéine MYB118 recombinante dans *E. coli* et la purifier grâce à une étiquette hexa-histidine.

En parallèle, des expériences d'ImmunoPrécipitation de la Chromatine (ChIP) sont aussi en cours. Des versions étiquetées de MYB118 (*Pro_{MYB118}:HA::MYB118* et *Pro_{MYB118}:GFP::MYB118*) introduites en fond mutant *myb118-1* complètent le phénotype du mutant. Nous pouvons donc affirmer que la fusion de la GFP (protéine fluorescente verte) ou de l'étiquette HA (hémagglutinine) à MYB118 ne perturbe pas son activité au sein de la plante et de la cellule. Malheureusement nos tentatives de ChIP sur des graines mutantes complémentées par une version étiquetée de MYB118 ont été vaines. La faible proportion de cellules exprimant MYB118 comparée à la quantité importante de matériel végétal nécessaire pour ce type d'expérience explique en partie notre échec. Pour contourner ces difficultés, les mêmes versions étiquetées de MYB118 ont été introduites sous contrôle d'un promoteur *35S_{dual}* dans des protoplastes d'*Arabidopsis* obtenus à partir de cultures cellulaires. Des expériences de ChIP pourront à nouveau être conduites sur ce matériel végétal.

IV- Relation entre MYB118 et LEC2

D'après les données présentées dans les paragraphes précédents, la relation entre MYB118 et LEC2 est complexe (LEC2 active l'expression de *MYB118*, et MYB118 en retour réprime celle de *LEC2*) mais néanmoins intéressante à étudier, notamment en ce qui concerne son rôle dans le contrôle de l'accumulation des réserves au sein de la graine.

Le régulateur maître LEC2 est un activateur du processus de maturation de la graine (Santos Mendoza et al., 2005 ; Braybrook et al., 2006). L'étude de ses nombreux allèles mutants montre une faible réduction de la teneur en acides gras et en protéines de réserve dans les graines présentant un phénotype (Stone et al., 2001 ; Meinke et al., 1994). Des données d'expression précisent que LEC2 est capable d'activer transcriptionnellement l'expression de *WRI1* ou de *S3/OLEO1*, impliqués dans la mise en réserve des TAG, mais aussi de *CRA1*, *At2S1* ou encore *At2S-like/At2S5*, des gènes codant des protéines de réserve de la graine (Figure 2.40) (Santos Mendoza et al., 2005 ; Braybrook et al., 2006).

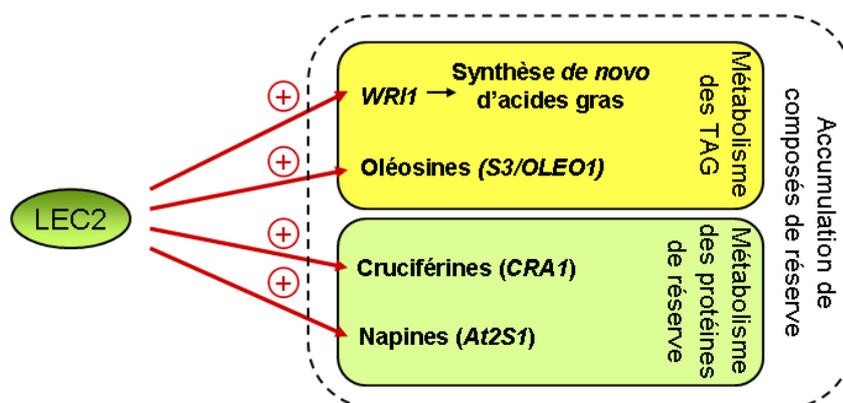


Figure 2.40. Cibles transcriptionnelles directes de LEC2 (D'après Braybrook et al., 2006; Baud et al., 2007).

At2S1, *At4g27140* ; *CRA1*, *At5g44120* ; *S3/OLEO1*, *At4g27160* ; TAG, Triacylglycérol ; *WRI1*, WRINKLED1 (*At3g54320*).

LEC2 étant un activateur du processus de maturation et son expression étant considérablement accrue dans l'albumen en fond mutant *myb118*, est-il possible d'expliquer le phénotype de *myb118* uniquement par une augmentation de l'expression de *LEC2* (Figure 2.41) ?

Hypothèse 1



Hypothèse 2



Figure 2.41. Le phénotype des mutants *myb118* est-il uniquement dû à l'augmentation de l'expression de *LEC2* dans l'albumen ?

Cette figure présente les deux mécanismes de régulation possibles dans l'albumen. Les flèches représentent des interactions positives et les barres T des interactions négatives. LEC2, LEAFY COTYLEDON2.

4.1 Analyse morphologique du double mutant *myb118 lec2*

Dans cette optique, le double mutant *myb118 lec2* a été généré : le mutant *myb118-1* à l'état homozygote a été croisé avec les allèles mutants *lec2-10* et *lec2-11*. La morphologie des graines sèches des simples mutants *myb118-1*, *lec2-10* et *lec2-11* est comparable à celle du sauvage (Col-0) avec une forme oblongue, une extrémité pointue correspondant aux pôles chalazal et micropylaire et une extrémité arrondie due à la courbure en U de l'embryon (Figure 2.42a à d et annexe 2, figure A2.2). En revanche, celle des doubles mutants *myb118 lec2* est profondément altérée. Même si les graines gardent leur forme oblongue, elles présentent une surface ridée qui rappelle celle des mutants *wri1* (Cernac et Benning, 2004 ; Baud et al., 2007) (Figure 2.42e et f et annexe 2, figure A2.2). De plus, la longueur des graines *myb118 lec2* (mais pas leur largeur) se trouve réduite de 15% (Figure 2.43b et c). Enfin, les doubles mutants *myb118 lec2* présentent un défaut d'accumulation de matière sèche d'environ 15% par rapport aux simples mutants correspondants (Figure 2.43a).

Figure 2.42. Morphologie des graines des doubles mutants *myb118 lec2*.

Observations au microscope électronique à balayage des graines sèches sauvage (a), *lec2-10* (b), *lec2-11* (c), *myb118-1* (d), *myb118-1 lec2-10* (e) et *myb118-1 lec2-11* (f). Barre = 0,1 mm.

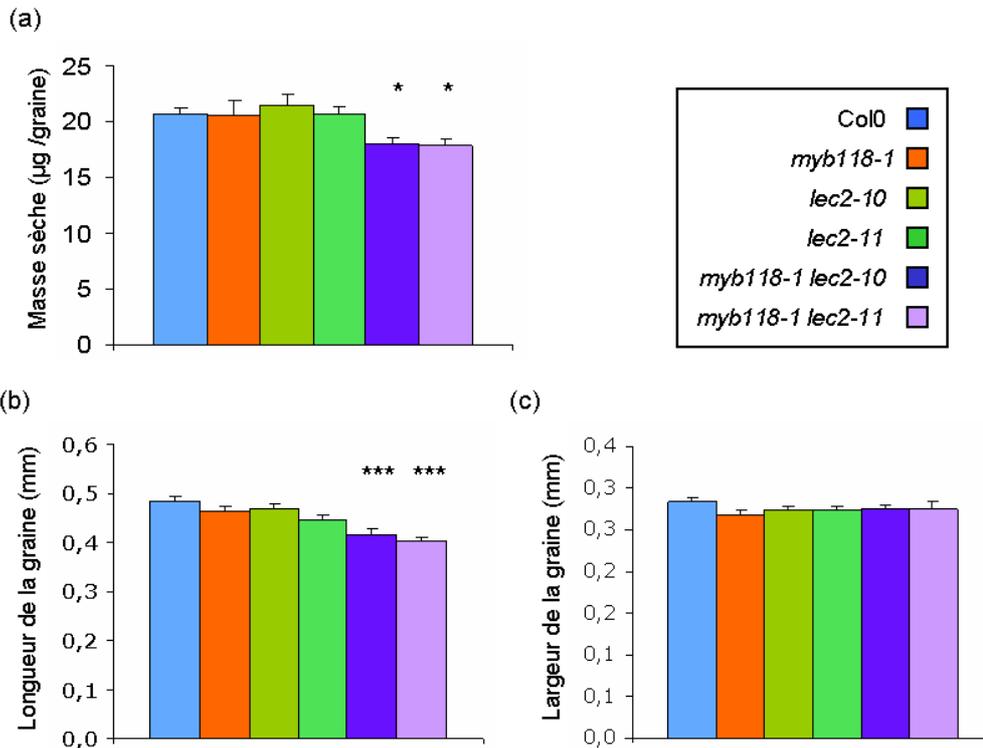
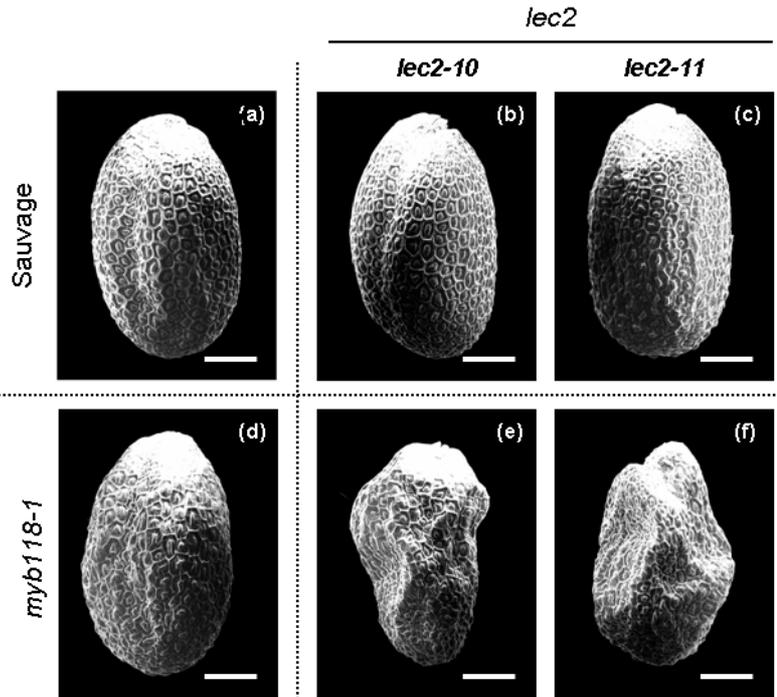


Figure 2.43. Masse et dimensions des graines des doubles mutants *myb118 lec2*.

(a) Masse sèche d'une graine. Chaque barre représente la moyenne des mesures effectuées sur des lots de 20 graines issus de cinq plantes. (b) Longueur de la graine. Chaque barre représente la moyenne des mesures effectuées sur des lots de 10 à 20 graines issus de deux plantes. (c) Largeur de la graine. Chaque barre représente la moyenne des mesures effectuées sur des lots de 10 à 20 graines issus de deux plantes. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. * indique une différence significative par rapport aux simples mutants correspondants avec une p -value inférieure à 5%. *** indique une différence significative par rapport aux simples mutants correspondants avec une p -value inférieure à 0,1%.

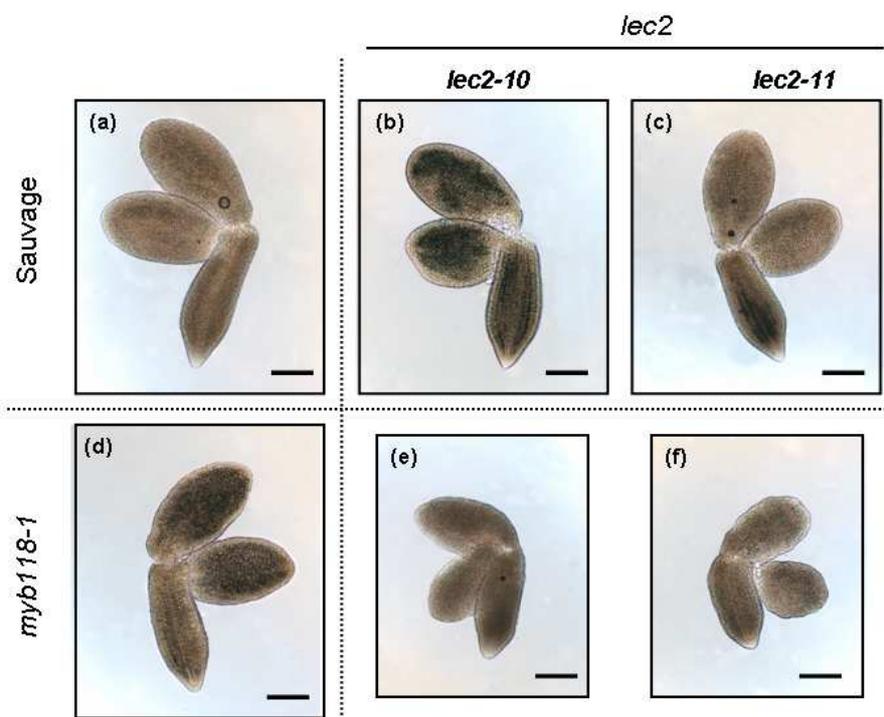
Chapitre II

4.2 Suivi du développement embryonnaire des doubles mutants *myb118 lec2*

Pour compléter cette étude, le développement embryonnaire chez ces différents génotypes a été observé en microscopie optique à contraste de phase entre 6 et 12 JAF (Figures 2.44 et 2.45). Comme décrit dans les Figures 2.18 et 2.219, le développement embryonnaire du mutant *myb118-1* est en tous points comparable à celui du sauvage (Col-0) (Figures 2.44 et 2.45). De même, le développement de l'embryon des deux mutants *lec2* est similaire à celui du sauvage sur la période considérée (Figures 2.44 et 2.45). En ce qui concerne les doubles mutants *myb118 lec2*, l'embryon se développe normalement entre 6 et 9 JAF avec peut être un très léger retard par rapport aux autres génotypes (surtout visible à 6 et 8 JAF). En revanche, à partir de 10 JAF, le développement de l'embryon est sévèrement affecté : sa taille est réduite dans toutes les dimensions, ses cotylédons sont atrophiés et son axe hypocotylaire est relativement large comparé aux autres tissus (Figure 2.45). De fait, les embryons *myb118 lec2* matures sont nettement plus petits que ceux de tous les autres génotypes et le contour de leurs cotylédons est ridé, suggérant un défaut de remplissage.

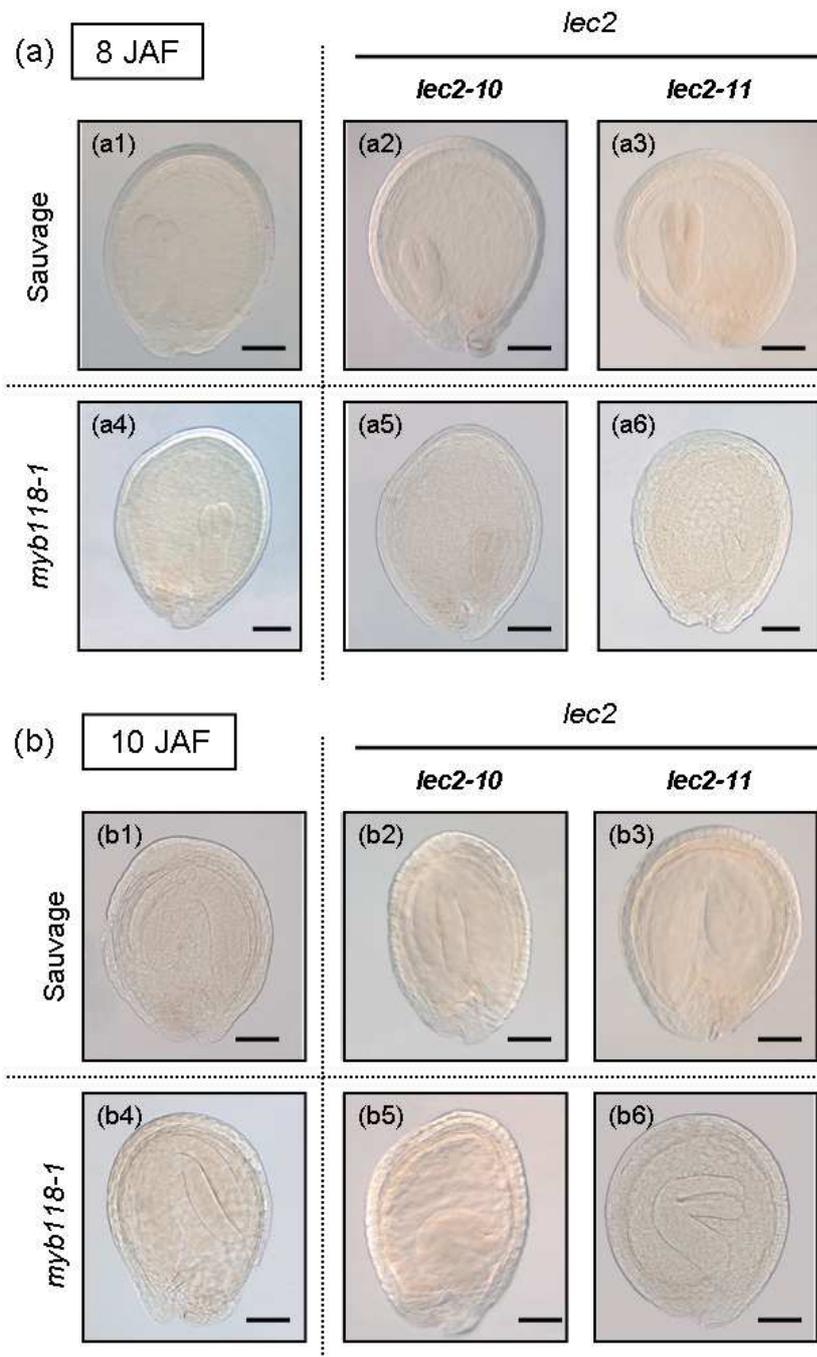
Figure 2.44. Embryons matures des doubles mutants *myb118 lec2*.

Photographies prises en microscopie optique à contraste de phases d'embryons matures sauvage (Col-0) (a), *lec2-10* (b), *lec2-11* (c), *myb118-1* (d), *myb118-1 lec2-10* (e) et *myb118-1 lec2-11* (f) montés dans de l'eau. Barre = 0,5 mm.



Chapitre II

En ce qui concerne les dimensions de la graine, celles des doubles mutants sont comparables aux autres génotypes entre 6 et 10 JAF. A 10 JAF, chez le sauvage, l'embryon croît rapidement et commence à se retourner, son hypocotyle et ses cotylédons venant épouser parfaitement la forme des téguments de la graine. Au contraire, l'embryon des doubles mutants ne remplit pas la totalité de la graine ; son hypocotyle et ses cotylédons ne viennent pas s'adosser à la monocouche cellulaire d'albumen en cours de constitution le long de l'endothélium. Cette anomalie de développement pourrait être une des causes de la réduction de la longueur de la graine et du phénotype ridé observés chez les graines sèches de *myb118 lec2*.



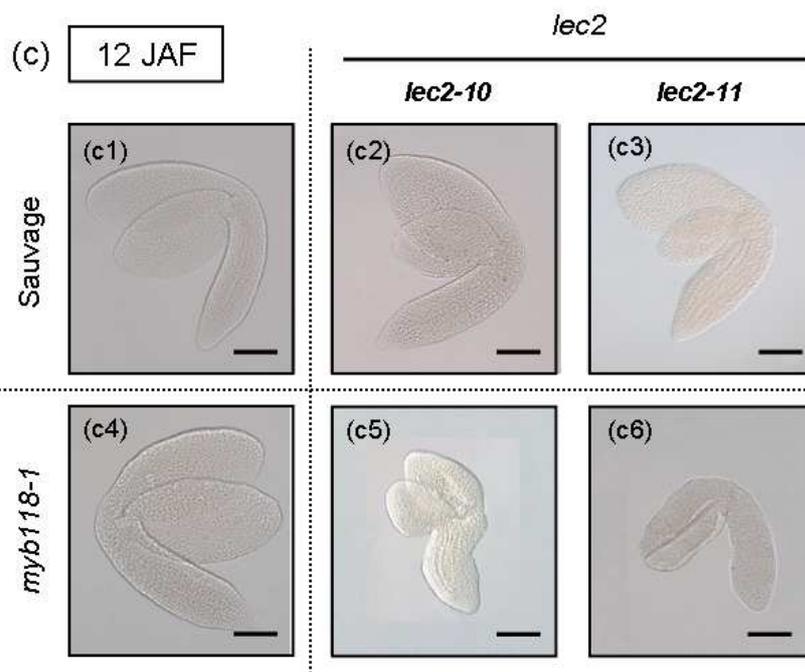


Figure 2.45. Développement embryonnaire des doubles mutants *myb118 lec2* suivi en microscopie à contraste de phases.

Observation des graines ou embryons du type sauvage Col-0 (a1, b1, c1), des mutants *lec2-10* (a2, b2, c2), *lec2-11* (a3, b3, c3), *myb118-1* (a4, b4, c4) et des doubles mutants *myb118-1 lec2-10* (a5, b5, c5) et *myb118-1 lec2-11* (a6, b6, c6) à 8 JAF (a1, a2, a3, a4, a5, a6), 10 JAF (b1, b2, b3, b4, b5, b6) et 12 JAF (c1, c2, c3, c4, c5, c6). Chaque observation a été réalisée à l'aide d'objectifs Nomarski après montage des embryons ou des graines dans un liquide éclaircissant. Les clichés présentés sont représentatifs des observations effectuées sur une dizaine d'embryons ou graines. JAF, Jours après floraison. Barre = 100 μ m.

4.3 Contenu en acides gras des doubles mutants *myb118 lec2*

Pour évaluer l'accumulation de composés de réserve chez les doubles mutants, la teneur en acides gras totaux des graines sèches a été analysée par chromatographie en phase gazeuse pour les six génotypes (Figure 2.46). Sur graine entière, la quantité totale d'acides gras est réduite de 21-24% chez *myb118 lec2* comparé aux autres génotypes, ceci étant dû en très grande partie à une chute dans l'embryon du même ordre de grandeur (Figure 2.46a et b). Ces données quantitatives permettent d'affirmer que les phénotypes macroscopiques et microscopiques observés sont très vraisemblablement dus à une moindre accumulation de composés de réserve dans l'embryon.

Chapitre II

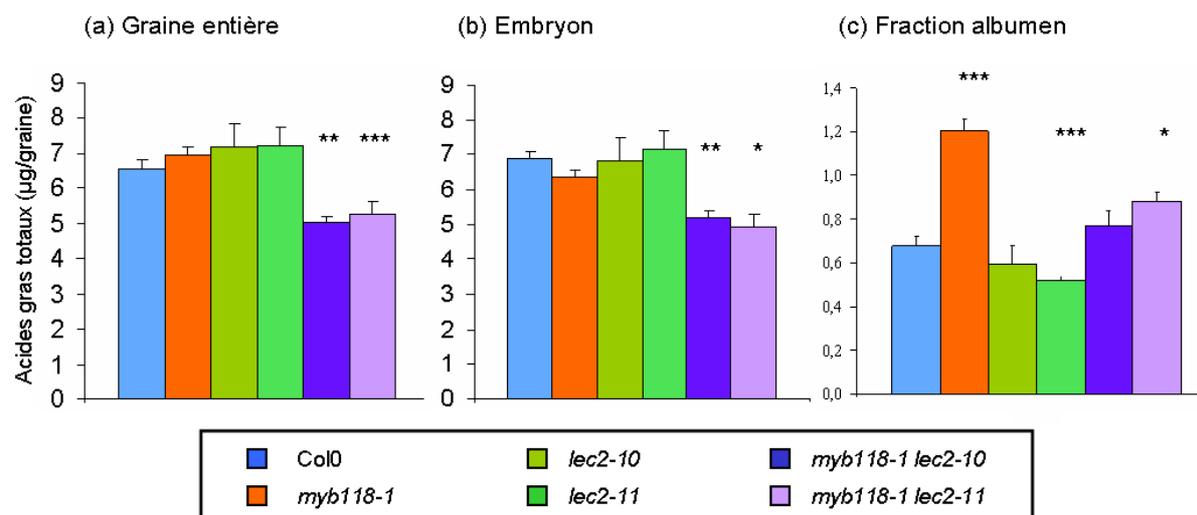


Figure 2.46. Contenu en acides gras de graines sèches de type sauvage (Col-0), *myb118-1*, *lec2-10*, *lec2-11* et des doubles mutants *myb118-1 lec2-10* et *myb118-1 lec2-11*.

La teneur en acides gras totaux a été analysée sur des graines sèches entières (a), des embryons excisés (b) et des fractions albumen disséquées (c) par chromatographie en phase gazeuse. Chaque point correspond à la moyenne de cinq répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. *** indique une différence significative par rapport aux simples mutants sauvage avec une p -value inférieure à 0,1%. ** indique une différence significative par rapport aux simples mutants avec une p -value inférieure à 1%. * indique une différence significative par rapport aux simples mutants avec une p -value inférieure à 5%.

Dans l'albumen, la teneur en acides gras est multipliée par deux chez le mutant *myb118-1* (1,2 µg/graine) par rapport au sauvage (0,65 µg/graine). Chez les mutants *lec2*, il semble qu'il y ait une très légère diminution du contenu en acides gras, mais non significative. Enfin, chez *myb118 lec2*, le phénotype est intermédiaire entre le simple mutant *myb118-1* et un simple mutant *lec2* avec une quantité d'acides gras comprise entre 0,8 et 0,85 µg/graine (Figure 2.46c). Pour expliquer ce phénotype, il faut revenir aux deux hypothèses présentées dans la Figure 2.41.

Dans l'hypothèse 1, *LEC2* est épistatique sur *MYB118*, ce qui signifie que le double mutant *myb118 lec2* doit avoir le même phénotype que le simple mutant *lec2*. Or d'après les résultats des analyses ci-dessus, ce n'est pas le cas. L'hypothèse 1 est donc peu probable.

Dans l'hypothèse 2, *MYB118* régule l'accumulation de composés de réserve de manière directe et de manière indirecte *via* *LEC2*. Selon cette hypothèse, les graines *myb118 lec2* auraient une teneur en acides gras intermédiaire entre celle des deux simples mutants, ce qui concorde avec les résultats obtenus : l'hypothèse 2 est donc privilégiée.

Chapitre II

Pour conforter ces résultats, l'expression de différents gènes codant des enzymes du métabolisme des TAG ou des protéines de réserve, connus pour être à la fois des cibles de LEC2 et de MYB118 est en cours d'étude en fond *myb118-1*, *lec2* et *myb118 lec2*.

Conclusion et perspectives

D'après l'ensemble des résultats de cette étude, MYB118 est exprimé très préférentiellement dans l'albumen au début de la maturation de la graine. Son expression est pour partie régulée par LEC2, un des régulateurs maîtres du développement de la graine. D'après les données biochimiques, MYB118 est un répresseur de l'accumulation de composés de réserves (TAG et protéines de réserve) dans l'albumen. Etant un facteur de transcription (Zhang et *al.*, 2009), MYB118 pourrait agir par répression transcriptionnelle de gènes de protéines de réserve (cruciférines, napines) et de gènes impliqués dans le métabolisme et le stockage des TAG (oléosines). De plus, MYB118 réprimerait *LEC2* dans l'albumen (Figure 2.47).

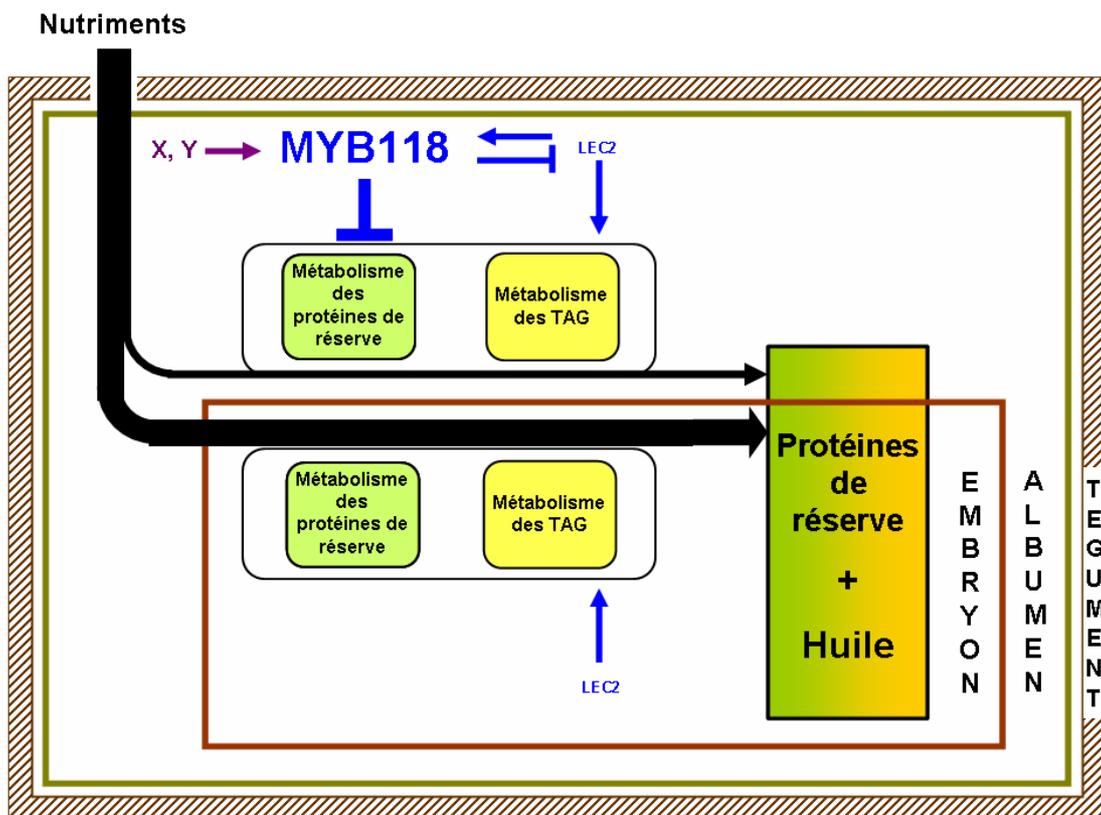


Figure 2.47. Représentation schématique de l'accumulation des composés de réserve dans une graine d'Arabidopsis sauvage : rôles de MYB118 et LEC2.

Les flèches noires représentent le flux de nutriments. Leur épaisseur est proportionnelle à l'importance du flux. Les flèches bleues ou violettes indiquent des interactions positives. X et Y désignent des régulateurs inconnus. LEC2, LEAFY COTYLEDON2 ; TAG, Triacylglycérol.

Chapitre II

En parallèle, nous avons pu montrer que MYB118 régule positivement de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme et la signalisation hormonale mais aussi dans la réponse aux stress, sans qu'il soit aujourd'hui possible de faire le lien avec un phénotype chez le mutant.

Cependant, les données transcriptomiques nous livrent deux gènes clefs du métabolisme de l'amidon, *APL4* (grande sous unité de l'AGPase (ADP-Glucose PYROPHOSPHORYLASE)) et *PWD* (*PHOSPHOGLUCANES WATER DIKINASE*) (Figures 0.24, 2.33 et 2.36). L'AGPase est un hétérotétramère constitué de deux petites sous-unités catalytiques (APS) et de deux grandes sous-unités régulatrices (APL). Elle est impliquée dans la synthèse d'ADP-glucose, étape limitante pour la synthèse d'amidon (Streb et *al.*, 2012). Inversement, *PWD* agirait de manière coordonnée avec *GWD3* pour phosphoryler les résidus glucosyles de l'amidon en position C3 et C6 respectivement, déstabilisant sa structure et permettant par la suite sa dégradation. *PWD* et *APL4* sont donc deux gènes impliqués dans des voies antagonistes du métabolisme de l'amidon. D'après les données transcriptomiques, MYB118 régulerait positivement *APL4* et négativement *PWD*. Ainsi, MYB118 serait un activateur de la mise en réserve de l'amidon dans l'albumen. Partant de ce constat et en utilisant le matériel végétal déjà disponible et caractérisé, il semble intéressant d'étudier le métabolisme de l'amidon dans l'albumen des mutants *myb118*. En outre, comme nous avons pu le décrire dans le chapitre I pour les TAG et les protéines de réserve, il est auparavant indispensable d'étudier plus en profondeur le métabolisme de l'amidon dans l'albumen sauvage. Comme pour le contrôle de la mise en réserve des protéines et des TAG, *LEC2* pourrait avoir un rôle clef dans ce métabolisme, les mutants *lec2* présentant une accumulation accrue de grains d'amidon notamment dans leurs cotylédons (Meinke et *al.*, 1994).

Un deuxième point intéressant à creuser sera celui des interactions physiques entre MYB118 et les promoteurs de ses gènes cibles. Des approches d'immunoprécipitation de la chromatine et de retard sur gel sont déjà en cours en ce sens. En cas d'interaction avérée, la seconde étape de ce travail consistera à déterminer la séquence *cis*-régulatrice reconnue par MYB118 sur le promoteur de ses cibles. Des analyses *in silico* montrent que la quasi-totalité des promoteurs des gènes régulés positivement par MYB118 et la moitié de ceux des gènes régulés négativement par MYB118 possèdent un élément *cis* riche en A/C du type TAACAAA. Cet élément est connu pour être le site de fixation d'un facteur MYB, HvGAMYB, exprimé dans la couche à aleurones du grain d'orge (*Hordeum vulgare*) au cours de son développement mais aussi de sa germination (Diaz et *al.*, 2002 ; Gubler et *al.*, 1999). Dans cette étude, les auteurs montrent également que HvGAMYB est capable de réguler l'expression de *Hor2*, codant la β -hordéine, une protéine de réserve de la

Chapitre II

couche à aleurone de l'orge, *via* cet élément *cis*-régulateur. Ces quelques éléments pourraient orienter nos recherches vers des boîtes de fixation de ce type.

Enfin, un dernier point à éclaircir sera celui des partenaires de MYB118. Comme nous l'avons déjà évoqué à la suite du test réalisé en simple hybride, MYB118 pourrait nécessiter l'intervention de partenaires pour se fixer sur les promoteurs de ses gènes cibles. De même, Diaz et collaborateurs (2002) ont montré que HvGAMYB interagit physiquement avec BPBF (un facteur de transcription DOF exprimé spécifiquement dans l'albumen de l'orge et liant des boîtes de type prolamine). Des expériences de co-immunoprécipitation en utilisant les protéines MYB118 étiquetées dans la graine ou en protoplastes pourraient permettre d'isoler des partenaires de MYB118.

Des recherches menées en ce sens permettront peut être d'expliquer comment, au niveau moléculaire, un facteur de transcription tel que MYB118 peut à la fois activer et réprimer des gènes. Hill et collaborateurs (2008) ont tenté de répondre à une question similaire concernant le facteur de transcription AGL15. Ils montrent que AGL15 s'associe fortement aux promoteurs de ses cibles directes *in vivo* mais faiblement *in vitro* suggérant l'existence de partenaires protéiques modulant son action *in planta*. Parmi les nombreux partenaires potentiels de AGL15, une protéine de la famille des histones déacétylases (HDA) a été identifiée. Cette interaction suggère que AGL15 pourrait réprimer l'expression de certaines de ses cibles par des mécanismes épigénétiques *via* le recrutement de complexes HDA. Inversement, son association avec SEP3 (SEPALATA3) ou AP1 (APETALA1) lui permettrait d'activer l'expression d'un autre set de gènes.

Chapitre III - Analyse fonctionnelle des paralogues de MYB118

Nous venons de voir dans le chapitre précédent que MYB118 est un régulateur négatif du processus de maturation et en particulier de l'accumulation de réserves dans l'albumen. L'étude de plusieurs régulateurs transcriptionnels associés au processus de maturation (AFL, WRI) a montré qu'il pouvait exister une redondance fonctionnelle entre certains de ces régulateurs et leurs paralogues proches.

MYB118 fait partie d'une famille multigénique, codant des R2R3-MYB et qui comprend plus de 150 membres. De ce fait, il présente plusieurs paralogues (Figure 0.45). De plus, Wang et collaborateurs (2008) ont montré que la surexpression de *MYB118* et de *MYB115* (son plus proche paralogue) peut avoir un impact similaire dans la mise en place d'embryons somatiques.

Ce chapitre a pour objectif principal l'étude des paralogues proches de MYB118, à savoir MYB115, MYB22 et MYB110 (Figure 0.46). Après une présentation de leurs patrons d'expression et de leurs régulations, ce chapitre tentera d'évaluer leur degré de redondance fonctionnelle avec MYB118.

I - Données d'expression concernant les paralogues de MYB118

1.1 MYB115, le plus proche paralogue de MYB118

L'étude du patron d'expression de *MYB115* suit la même démarche que celle de *MYB118* avec des approches de RT-PCR quantitative et l'utilisation du gène rapporteur *uidA*.

1.1.1 Etude du patron d'expression de *MYB115* par RT-PCR quantitative

L'expression de *MYB115* dans différents organes d'une plante sauvage a été étudiée par RT-PCR quantitative (Figure 3.1). L'ARNm de *MYB115* s'accumule dans pratiquement tous les organes testés à un niveau faible et de manière importante dans les fleurs et les siliques en développement. Dans ces dernières, son niveau d'expression croît entre 4 et 8 JAF passant de 0,5 à 1% de *EF*

Chapitre III

avant de décroître progressivement. *MYB115* est donc exprimé dans les siliques avec un pic d'expression en début de maturation exactement comme *MYB118*. Cependant son niveau d'expression est inférieur à celui de *MYB118* (1% de *EF* quand celui de *MYB118* est à 5% de *EF*).

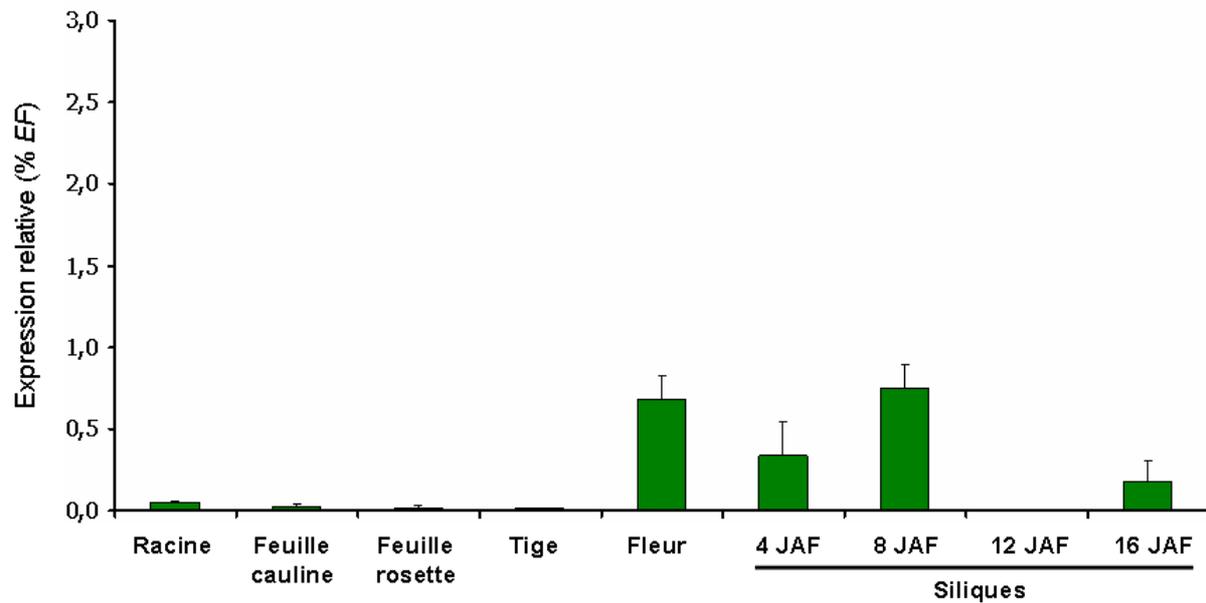


Figure 3.1. Expression relative de *MYB115* dans différents organes d'une plante sauvage (*Col-0*) étudiée par RT-PCR quantitative.

Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. JAF, Jours après floraison.

Pour aller plus loin dans la caractérisation du patron d'expression de *MYB115*, la cinétique d'accumulation de ses transcrits au cours du développement de la graine a été réalisée (Figure 3.2). Le niveau d'expression de *MYB115* augmente entre 4 et 10 JAF pour atteindre 1,8% de *EF* puis retrouve un niveau de base très faible, voisin de 0,2% de *EF*, à partir de 12 JAF. Comme l'expression de *MYB118*, celle de *MYB115* atteint un pic 10 JAF, au début de la maturation de la graine. Néanmoins, comme nous l'avons déjà évoqué ci-dessus, le niveau d'expression de *MYB115* reste relativement faible comparé à celui de *MYB118* (1,8% de *EF* pour *MYB115* quand *MYB118* atteint 11% de *EF*).

Chapitre III

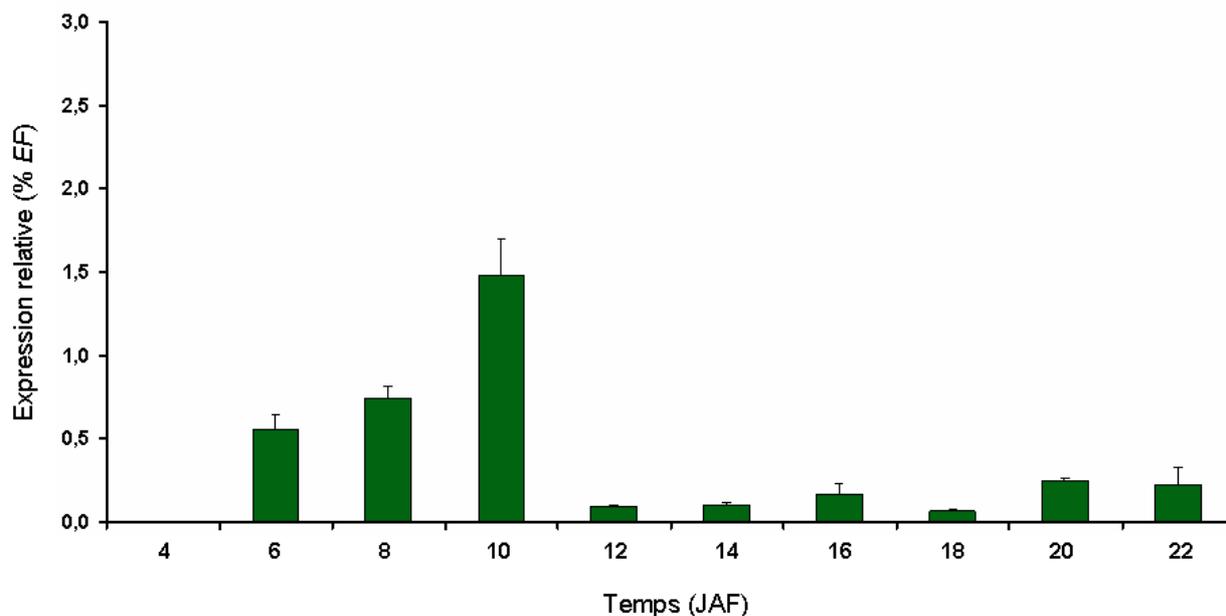


Figure 3.2. Cinétique d'accumulation des transcrits de *MYB115* dans les graines en développement d'une plante sauvage (Col-0) étudiée par RT-PCR quantitative.

Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. JAF, Jours après floraison.

1.1.2 Localisation tissulaire de l'expression de *MYB115* dans la graine par RT-PCR quantitative

Etant donné les résultats présentés dans le chapitre II montrant une expression de *MYB118* majoritairement dans l'albumen, nous avons procédé au même type d'analyses pour *MYB115*. L'accumulation des transcrits de *MYB115* a donc été mesurée par RT-PCR quantitative sur des ADNc extraits de l'embryon ou de la fraction albumen (Figure 3.3). Les ARNm de *MYB115* semblent quasi-exclusivement présents dans la fraction albumen, même si une faible proportion d'entre eux a pu être détectée dans l'embryon aux stades précoces. Plus précisément, l'expression de *MYB115* se maintient dans la fraction albumen aux alentours de 4% de *EF* entre 10 et 12 JAF avant de chuter brutalement pour devenir presque nulle à partir de 14 JAF.

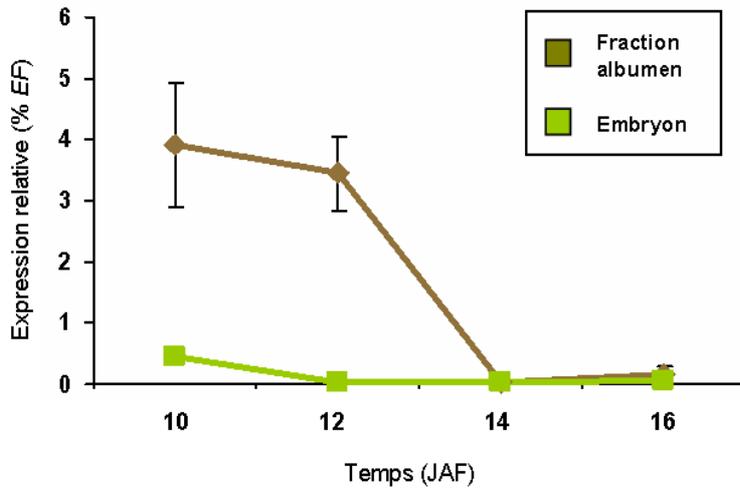


Figure 3.3. Cinétique d'accumulation des transcrits de *MYB115* dans les différents compartiments de la graine d'une plante sauvage (Col-0) étudiée par RT-PCR quantitative.

Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. JAF, Jours après floraison.

Comme l'expression de *MYB118*, celle de *MYB115* dans la graine semble restreinte à la fraction albumen. Cependant, les transcrits *MYB115* dans la fraction albumen atteignent des niveaux 20 fois plus faibles que ceux de *MYB118* et leur abondance diminue bien plus tôt (Figure 3.3).

1.1.3 Activité du promoteur de *MYB115*

L'étude de l'activité du promoteur de *MYB115* a été entreprise en choisissant une séquence promotrice de 998 pb en amont du site d'initiation de la traduction. Cette dernière a été amplifiée à partir d'ADN génomique et fusionnée au gène rapporteur *uidA* dans le vecteur *pBI101 Gateway*. Le transgène a alors été introduit en fond sauvage (Col-0) et 28 transformants primaires ont été sélectionnés. Les tests de coloration GUS effectués sur les différents organes végétatifs de chaque plante transformée se sont avérés négatifs. De la même manière, et bien que des transcrits *MYB115* aient pu être détectés par RT-PCR quantitative dans les fleurs, aucune coloration GUS n'a pu être observée dans les organes floraux. Les tests de coloration GUS effectués sur les graines sont présentés dans la Figure 3.4. Selon ces données, *MYB115* est exprimé spécifiquement dans l'albumen entre 6 et 12 JAF. Aucune coloration GUS n'a pu être détectée dans l'embryon. Plus précisément, l'activité du promoteur de *MYB115* semble se distribuer dans l'ensemble de l'albumen à 6 JAF avec une coloration plutôt claire et diffuse puis progressivement se restreindre à l'albumen chalazal à 12 JAF avec une coloration très localisée et intense.

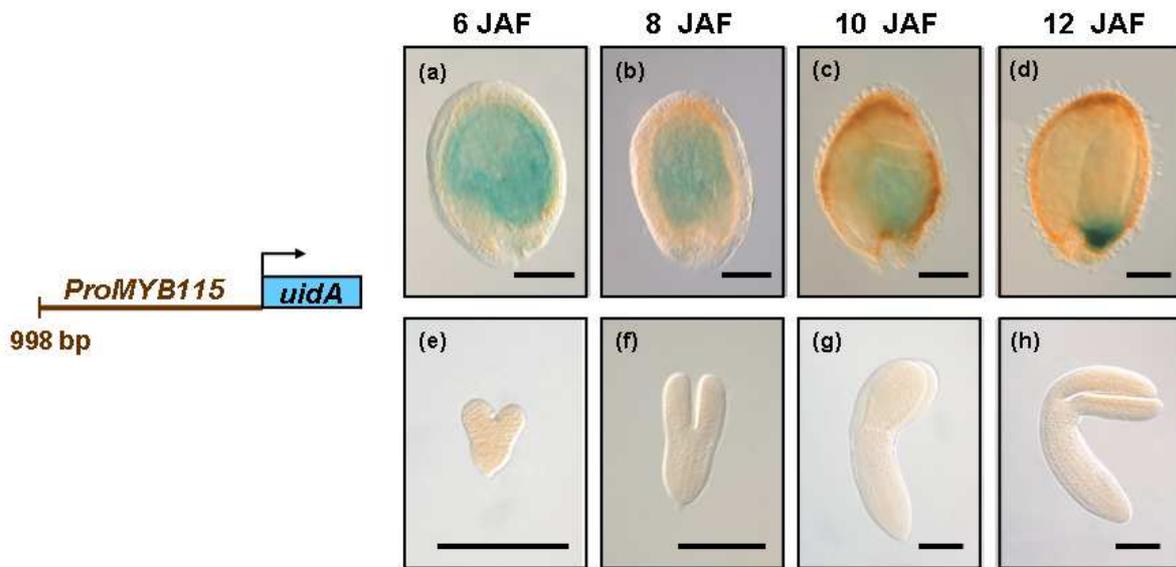


Figure 3.4. Analyse de l'activité β -glucuronidase (GUS) chez des plantes transgéniques *Pro_{MYB115}:uidA*.

Les graines (a, b, c et d) ou les embryons (e, f, g et h) âgés de 6 JAF (a, e), 8 JAF (b, f), 10 JAF (c, g) et 12 JAF (d, h) ont été incubés une nuit dans un tampon phosphate contenant 2 mM de X-Gluc et 0,2 mM de ferrocyanure/ferricyanure de potassium puis 3 h dans un liquide de montage éclaircissant. Les observations microscopiques ont été réalisées à l'aide d'objectifs Nomarski. JAF, jours après floraison. Barre = 100 μ m.

A la lumière de ces nouvelles données, le faible niveau d'expression de *MYB115* dans l'albumen mesuré par RT-PCR quantitative pourrait s'expliquer par une expression extrêmement localisée dans l'albumen chalazal. L'ensemble de ces résultats est appuyé par les données transcriptomiques publiées par Le et collaborateurs (2010), notamment la restriction de l'expression de *MYB115* à l'albumen chalazal.

Chapitre III

1.2 MYB22 et MYB100, deux pseudogènes ?

MYB22 et MYB100 sont les deux MYB les plus proches de MYB118 après MYB115 (Figure 0. 46). L'étude de leurs patrons d'expression a été entreprise selon le même mode opératoire que pour *MYB118* et *MYB115*. Cependant, quels que soient les organes testés (racine, tige, feuille, fleur, silique, graine), aucun ARNm n'a pu être détecté ni par RT-PCR quantitative, ni par RT-PCR semi-quantitative.

D'après les données transcriptomiques publiées par Le et collaborateurs (2010), *MYB22* serait exprimé spécifiquement dans l'albumen chalazal entre 6 et 8 JAF à des niveaux voisins de ceux de *MYB115*. En ce qui concerne *MYB100*, d'après ces mêmes données, il serait exprimé dans les différents tissus de la graine mais à des niveaux très faibles, cent fois inférieurs à ceux de *MYB115* et *MYB22*. Cette concordance imparfaite de nos résultats avec ceux déjà publiés pourrait s'expliquer par le type d'approches utilisé, la RT-PCR quantitative dans un cas et l'hybridation sur puce affymetrix dans l'autre.

Les transcrits de *MYB22* et *MYB100* n'ayant jamais pu être détectés et leurs niveaux d'expression étant décrits comme extrêmement faibles dans les bases de données, leur étude n'a pas été menée plus avant.

II - Régulation de *MYB115*

Selon une démarche analogue à celle entreprise pour *MYB118*, des régulateurs de l'expression de *MYB115* ont été recherchés parmi les régulateurs maîtres du développement de la graine. Pour cela, l'accumulation des transcrits de *MYB115* a été mesurée en fond sauvage et en fond mutant pour l'ensemble des régulateurs maîtres sur des graines âgées de 10 JAF (Figure 3.5). L'expression de *MYB115* chute spécifiquement et de manière significative chez les deux allèles mutants *lec2-10* (d'un facteur 3) et *lec2-11* (d'un facteur 4). *MYB115* serait donc régulé positivement par LEC2, comme *MYB118*.

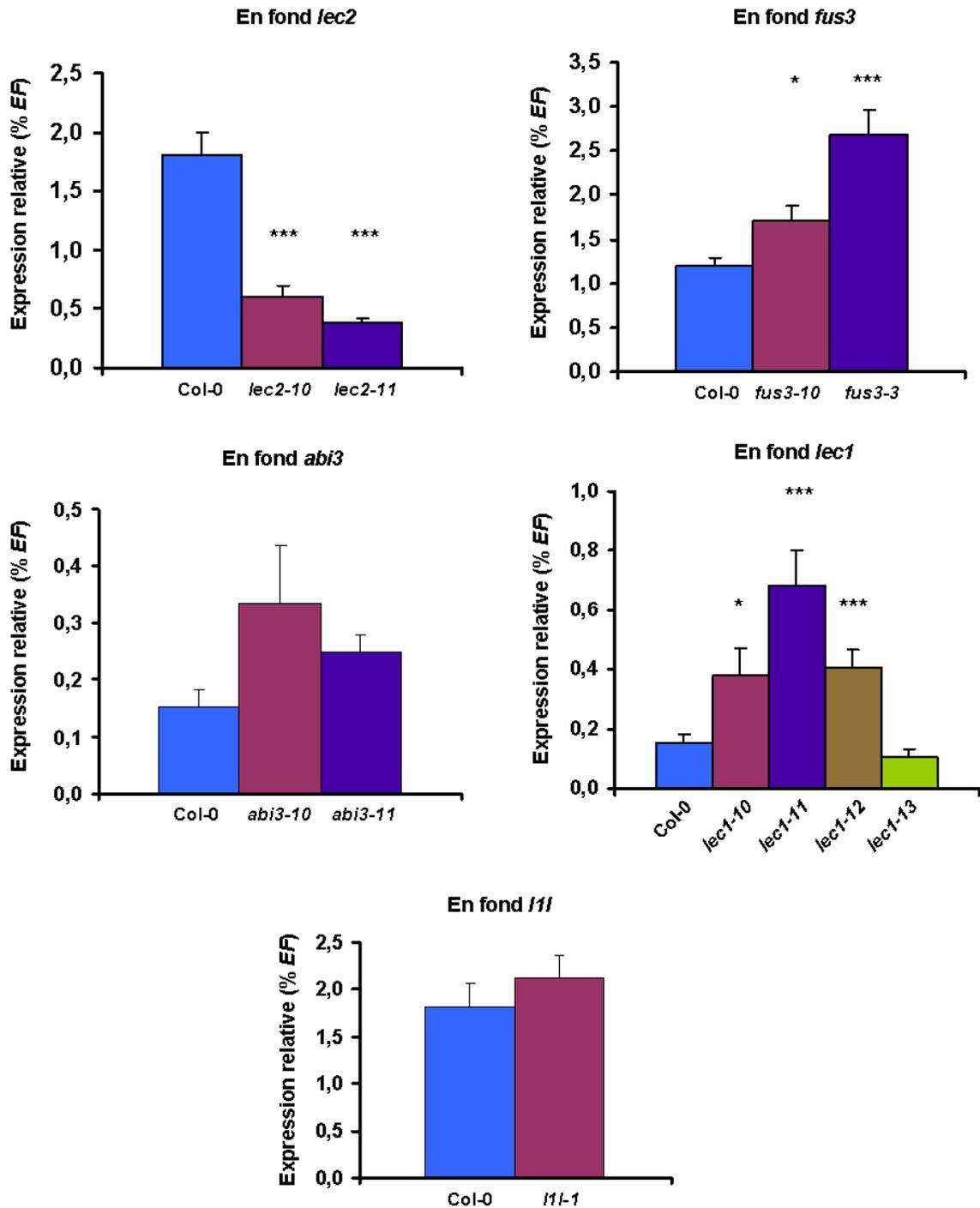


Figure 3.5. Expression relative de *MYB115* dans des graines âgées de 10 jours après floraison chez des mutants des régulateurs maîtres *LEC2*, *LEC1*, *FUS3*, *ABI3* et *L1L*, étudiée par RT-PCR quantitative.

Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Les allèles indiqués font référence aux Figures 2.5 à 2.9. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. * indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 5% ; *** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 0,1%.

Chapitre III

L'étude de l'activation de l'expression de *MYB115* par *LEC2* a été poursuivie grâce à l'utilisation du système inductible *Pro_{35S}:LEC2::ΔGR*. Après 10 jours de culture sur milieu MS (Annexe 8), les plantules sont induites à la dexaméthasone (ou non induites pour le contrôle) pendant deux semaines. A l'issue de ce traitement, l'expression de *MYB115* (Figure 3.6) et *KCS7* (Figure 2.12) est analysée par RT-PCR quantitative sur des feuilles de rosette. Les plantules sauvages (Ws), n'exprimant pas le récepteur aux glucocorticoïdes, ne présentent pas d'induction de l'expression de *MYB115*. La dexaméthasone seule n'induit pas l'expression de *MYB115*. Chez les plantules *Pro_{35S}:TTG1::ΔGR*, aucune induction n'est détectable. Seule la lignée *Pro_{35S}:LEC2::ΔGR* est capable d'activer l'expression de *MYB115* de manière ectopique dans les feuilles de rosette.

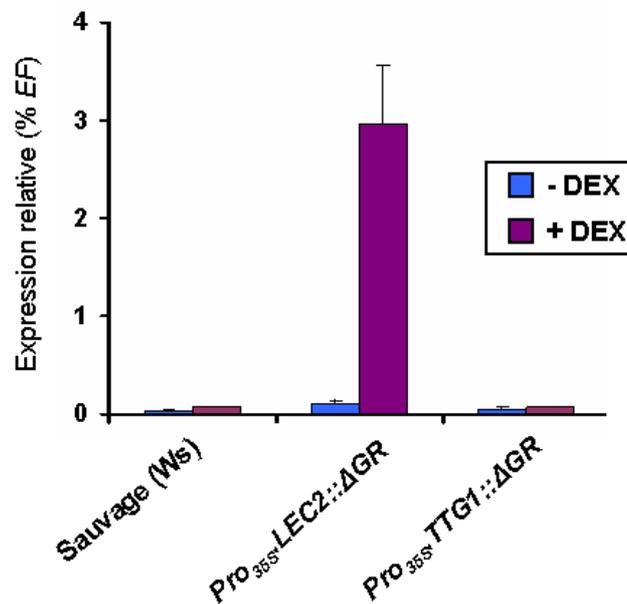


Figure 3.6. Induction ectopique de *MYB115* à l'aide du système *Pro_{35S}:LEC2::ΔGR* dans des feuilles de rosette.

Trois géotypes différents ont été soumis à un test d'induction à la dexaméthasone : la lignée *Pro_{35S}:LEC2::ΔGR* et deux contrôles, l'écotype sauvage de référence (Ws) ainsi qu'une seconde lignée exprimant un facteur de transcription (TTG1) lié à un fragment du récepteur aux glucocorticoïdes (*Pro_{35S}:TTG1::ΔGR* ; Baudry et al., 2004). Des plantules de 10 jours ont été repiquées sur milieu MS (Annexe 8) avec (violet) ou sans (bleu) dexaméthasone (DEX) à 10^{-5} M et cultivées ainsi *in vitro* pendant deux semaines. Les ARNm ont alors été extraits des feuilles de rosette et l'accumulation des transcrits de *MYB115* a été mesurée par RT-PCR quantitative. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (EF). Le gène *KCS7* a été utilisé comme contrôle négatif (non induit ; Figure 2.12). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée.

Chapitre III

Ces premiers résultats ont été précisés en réalisant une cinétique d'accumulation des transcrits *MYB115* au cours de la période d'induction (Figure 3.7). Cette analyse a été réalisée sur des feuilles de rosette de plantules récoltées tous les 2 ou 3 jours au cours de cette période d'induction. Le gène *KCS7* constitue un contrôle négatif non induit. L'expression de *MYB115* est quant à elle induite par le traitement à la dexaméthasone, passant de 0,01% de *EF* à 2,4% de *EF* à 14 jours. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que *LEC2* est un activateur de l'expression de *MYB115*. Pour aller plus loin, le transgène *Pro_{MYB115}:uidA* sera introgressé en fond mutant *lec2* pour vérifier que nous observons bien une diminution de l'intensité de la coloration GUS dans l'albumen chalazal.

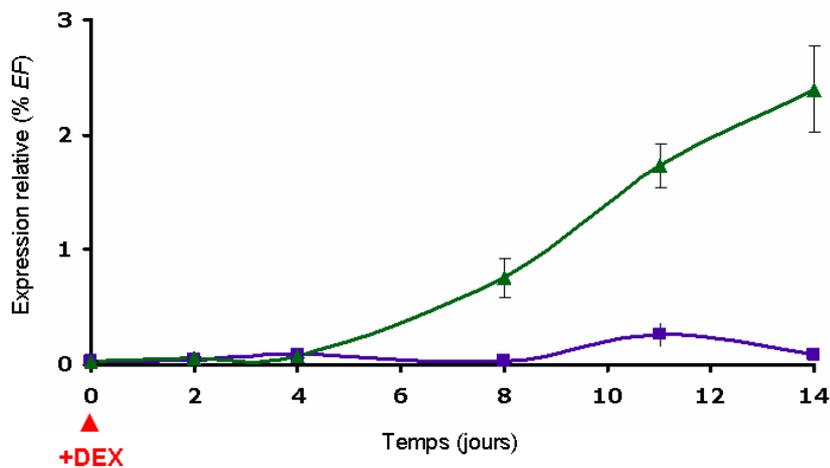


Figure 3.7. Cinétique d'induction de *MYB115* à l'aide du système *Pro_{35S}:LEC2::ΔGR* dans des feuilles de rosette.

Des plantules de 10 jours de la lignée *Pro_{35S}:LEC2::ΔGR* utilisée dans la Figure 3.6 ont été repiquées sur milieu MS (Annexe 8) contenant de la dexaméthasone (DEX) à 10^{-5} M au temps $t = 0$ et cultivées ainsi *in vitro* pendant deux semaines. Des lots de 5 plantules ont été prélevés à $t = 0, 2, 4, 8, 11$ et 14 jours. Les ARNm ont alors été extraits des feuilles de rosette et l'accumulation des transcrits de *MYB115* (vert) ou de *KCS7* (bleu) a été mesurée en RT-PCR quantitative. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Le gène *KCS7* a été utilisé comme témoin négatif (non induit). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée.

En ce qui concerne une régulation négative potentielle de *MYB115* par *FUS3*, il serait intéressant de la confirmer sur d'autres allèles mutants *fus3* et d'étudier plus en profondeur cette relation en développant des outils adaptés. De manière analogue à ce qui a été entrepris pour *LEC2*, la mise au point de lignées *Pro_{35S}:FUS3::ΔGR* permettrait de tester l'inhibition de l'expression de *MYB115* par *FUS3* dans les graines. De plus, en introgressant en fond mutant *fus3* le transgène *Pro_{MYB115}:uidA*, nous nous attendons à observer une augmentation de l'activité de ce dernier si la régulation en question est exercée au niveau transcriptionnel.

III - Caractérisation fonctionnelle de MYB115

3.1 Caractérisation moléculaire d'un allèle mutant *myb115*

3.3.1 Le mutant *myb115-1*

Les différentes lignées ADN-T disponibles présentant une insertion dans *MYB115* ont été commandées et les séquences flanquantes de l'ADN-T ont été amplifiées et séquencées. La présence de l'insertion n'a pu être confirmée que pour la lignée SALK_044168, appelée *myb115-1*. Elle possède un ADN-T inséré dans le premier intron du gène (Figure 3.8a). Une faible quantité de transcrits pleine longueur est détectée chez les graines mutantes âgées de 10 JAF en RT-PCR (Figure 3.8b). Ces résultats sont confirmés en RT-PCR quantitative (Figure 3.8c). Le mutant *myb115-1* est donc un allèle mutant faible.

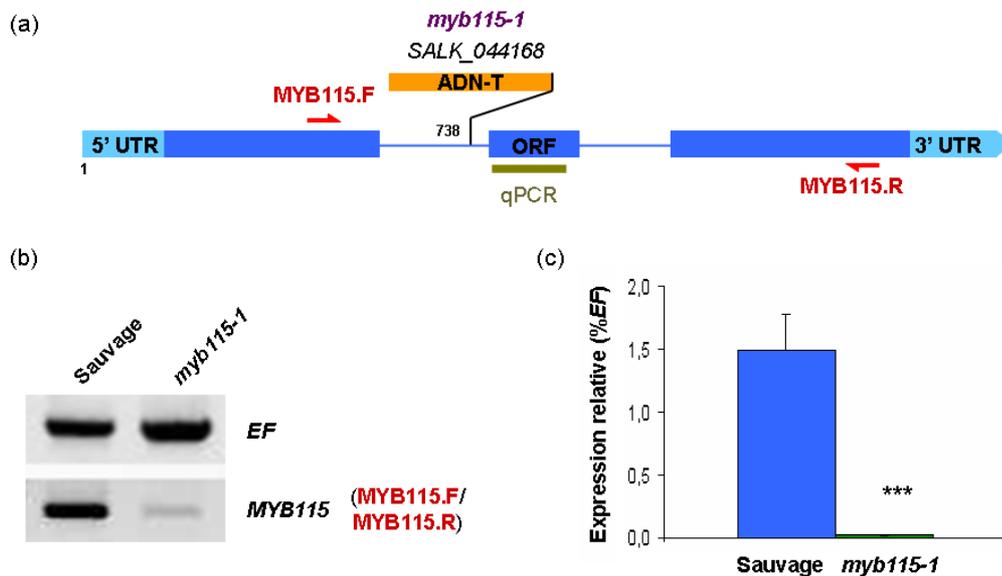


Figure 3.8. Caractérisation du mutant *myb115-1* en fond Col-0.

(a) Représentation schématique de la structure intron (trait)/exon (barre) du gène *MYB115* (*At5g40360*) avec la position de l'insertion ADN-T du mutant SALK_044168, appelé *myb115-1*. Les amorces représentées font référence aux analyses de RT-PCR (b). La séquence de ces amorces est présentée dans l'annexe 10. La position exacte de l'insertion ADN-T au sein de la séquence est indiquée par rapport au site d'initiation de la transcription. La barre marron représente la région amplifiée avec les amorces de RT-PCR quantitative (c). (b) Analyse en RT-PCR de l'expression de *MYB115* sur des graines âgées de 10 jours après floraison, chez le sauvage (Col-0) et chez le mutant *myb115-1*. Les amorces utilisées font référence au schéma (a). Le gène *EF1aA4* (*EF*) est utilisé comme contrôle. (c) Analyse en RT-PCR quantitative de l'accumulation des transcrits de *MYB115* dans des graines récoltées 10 jours après floraison, chez le contrôle sauvage (Col-0) et le mutant *myb115-1*. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre représente la moyenne de trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. *** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 0,1%.

Chapitre III

3.3.2 Le double mutant *myb118 myb115*

L'un des objectifs de ce chapitre étant d'étudier la redondance fonctionnelle possible entre MYB118 et MYB115, le double mutant *myb118 myb115* a été généré à partir des simples mutants *myb118-1* et *myb115-1*. L'expression de *MYB118* et *MYB115* a alors été étudiée par RT-PCR quantitative sur des ARNs extraits de graines âgées de 10 JAF chez les deux mutants simples et le double mutant *myb118 myb115* (Figure 3.9). L'expression de *MYB118* et *MYB115* chez *myb118 myb115* est quasi nulle, confortant les observations déjà effectuées sur les simples mutants correspondants (Figures 2.15 et 3.8).

En outre, nous avons pu remarquer que l'expression de *MYB115* augmente de manière significative chez *myb118-1* (d'un facteur 2). Cette observation pourrait suggérer l'existence d'une compensation fonctionnelle possible entre *MYB118* et *MYB115*, mais l'hypothèse nécessite d'être plus solidement étayée.

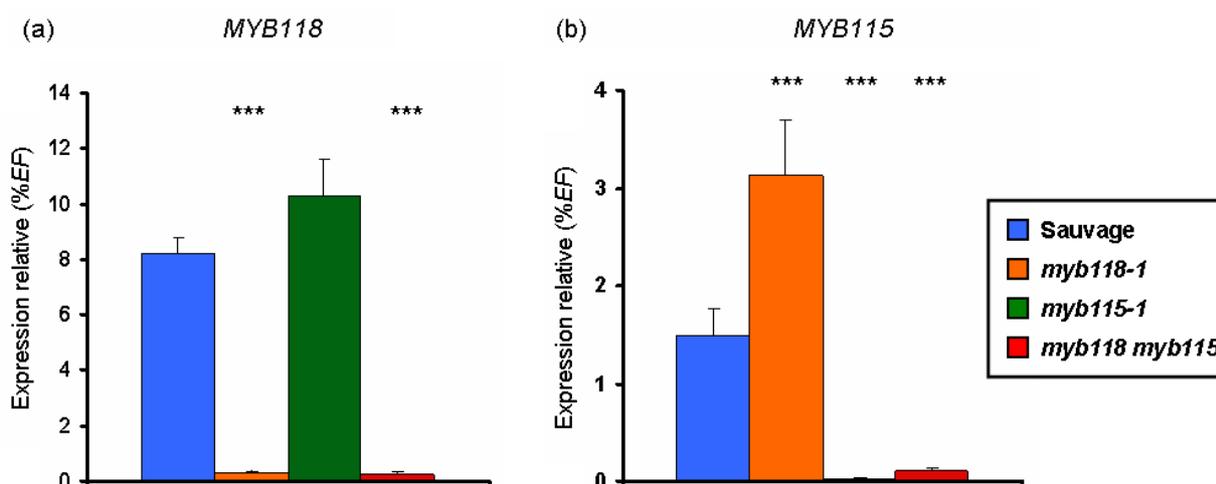


Figure 3.9. Expression de *MYB118* et *MYB115* chez *myb118-1*, *myb115-1* et *myb118 myb115* (fond Col-0).

L'expression de *MYB118* (a) et de *MYB115* (b) est analysée en RT-PCR quantitative sur des graines âgées de 10 jours après floraison. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre représente la moyenne de trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. *** indique une différence significative avec une *p*-value inférieure à 0,1%.

Chapitre III

3.2. Phénotypes des mutants *myb115-1* et *myb118 myb115*

3.2.1 Suivi du développement de la graine

Le développement de la graine du simple mutant *myb115-1* et du double mutant *myb118 myb115* a été suivi par microscopie optique grâce à des objectifs Nomarski. Aucune modification du développement de la graine ni d'aucun de ses tissus constitutifs n'a pu être constatée chez ces deux lignées (Figure 3.10).

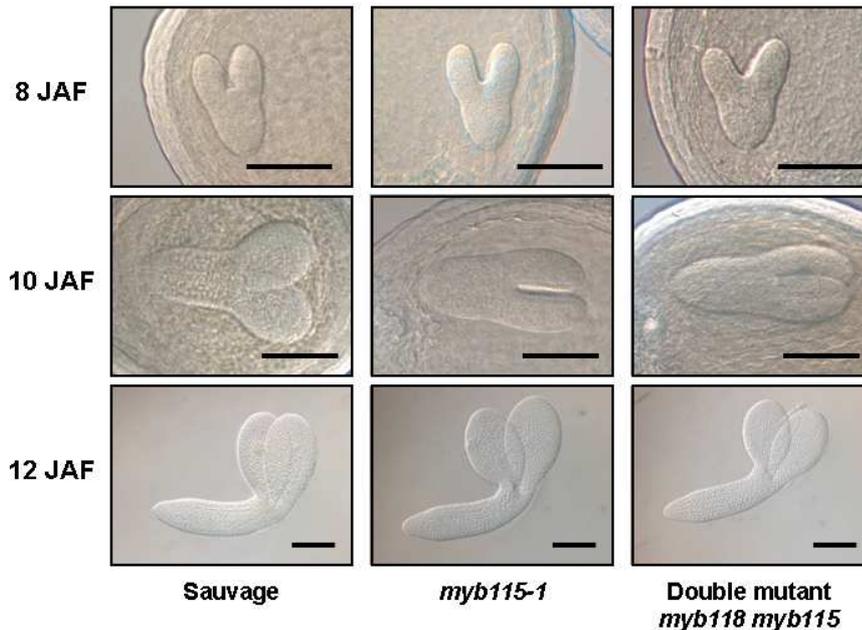


Figure 3.10. Embryons en développement observés à 8, 10 et 12 JAF chez le sauvage (Col-0), le mutant *myb115-1* et le double mutant *myb118 myb115*.

Chaque observation a été réalisée à l'aide d'objectifs Nomarski après montage des embryons ou des graines dans un liquide éclaircissant. Les photographies présentées sont représentatives des observations effectuées sur une dizaine d'individus. JAF, Jours après floraison. Barre = 100 μ m.

3.2.2 Contenu en acides gras totaux de la graine

Le contenu en acides gras totaux d'une graine sèche, de l'embryon excisé et de la fraction albumen a été mesuré par chromatographie en phase gazeuse chez *myb118-1*, *myb115-1* et *myb118 myb115* (Figure 3.11). Nous retrouvons le phénotype du mutant *myb118-1* déjà décrit dans le chapitre II, à savoir une forte augmentation de la teneur en acides gras de l'albumen qui compense partiellement une chute de celle-ci dans l'embryon. La teneur totale en acides gras de la graine ne variant pas de manière significative.

Chapitre III

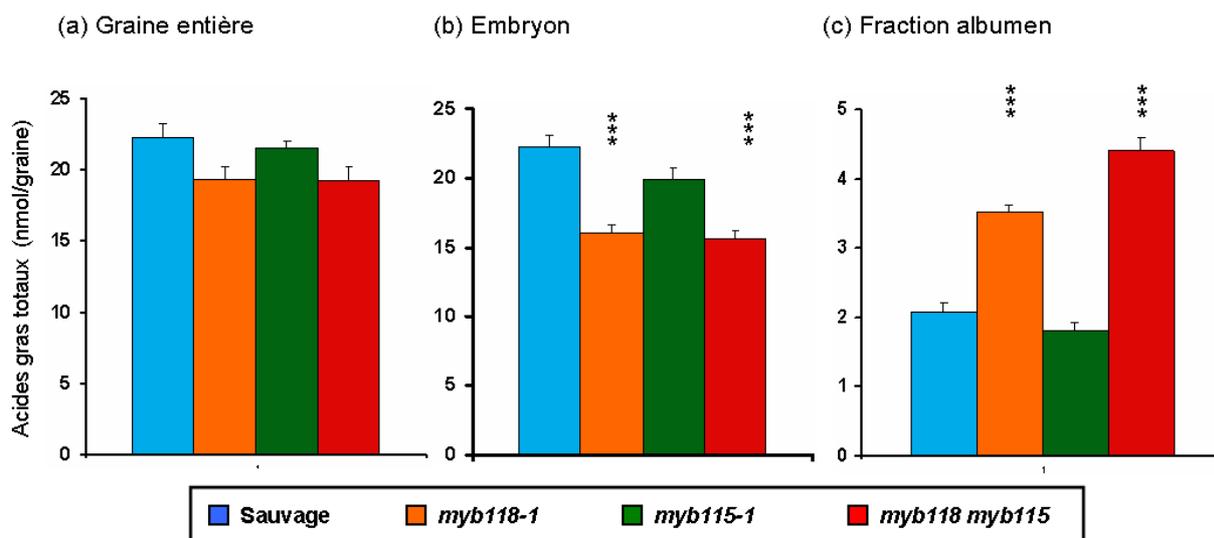


Figure 3.11. Contenu en acides gras totaux d'une graine sèche chez le sauvage (Col-0), *myb118-1*, *myb115-1* et *myb118 myb115*.

La teneur en acides gras totaux a été analysée sur des graines sèches entières (a), des embryons excisés (b) et des fractions albumen disséquées (c) par chromatographie en phase gazeuse. Chaque point correspond à la moyenne de cinq répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. *** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 0,1%.

En ce qui concerne le mutant *myb115-1*, aucune altération significative du contenu en acides gras de sa graine, de son embryon ou de sa fraction albumen n'a pu être constatée (Figure 3.11). Ces résultats sont à mettre en relation avec son niveau d'expression relativement faible dans la fraction albumen et son patron d'expression, localisé précisément dans l'albumen chalazal. Les effets de la mutation *myb115* pourraient ne pas être décelables par une analyse à cette échelle. Il serait nécessaire de poursuivre l'investigation en employant des techniques plus précises.

Enfin le double mutant *myb118 myb115* présente un phénotype comparable à celui du simple mutant *myb118-1*, avec une légère aggravation de ce dernier dans l'albumen. En effet, alors que la teneur en acides gras est multipliée par 1,6 dans l'albumen du mutant *myb118-1* comparé au sauvage, elle est augmentée d'un facteur 2,1 dans l'albumen du double mutant (Figure 3.11). Ces résultats suggèrent l'existence d'une possible redondance fonctionnelle entre MYB118 et MYB115.

Chapitre III

3.2.3 Composition en acides gras de la graine

Comme pour le mutant *myb118-1*, les graines du double mutant *myb118 myb115* ont une composition lipidique modifiée par rapport au sauvage (i.e. diminution du 18:1 n-7 et 20:1 n-7). La composition lipidique des graines du mutant *myb115-1* n'est pour sa part pas altérée (Figure 3.12a).

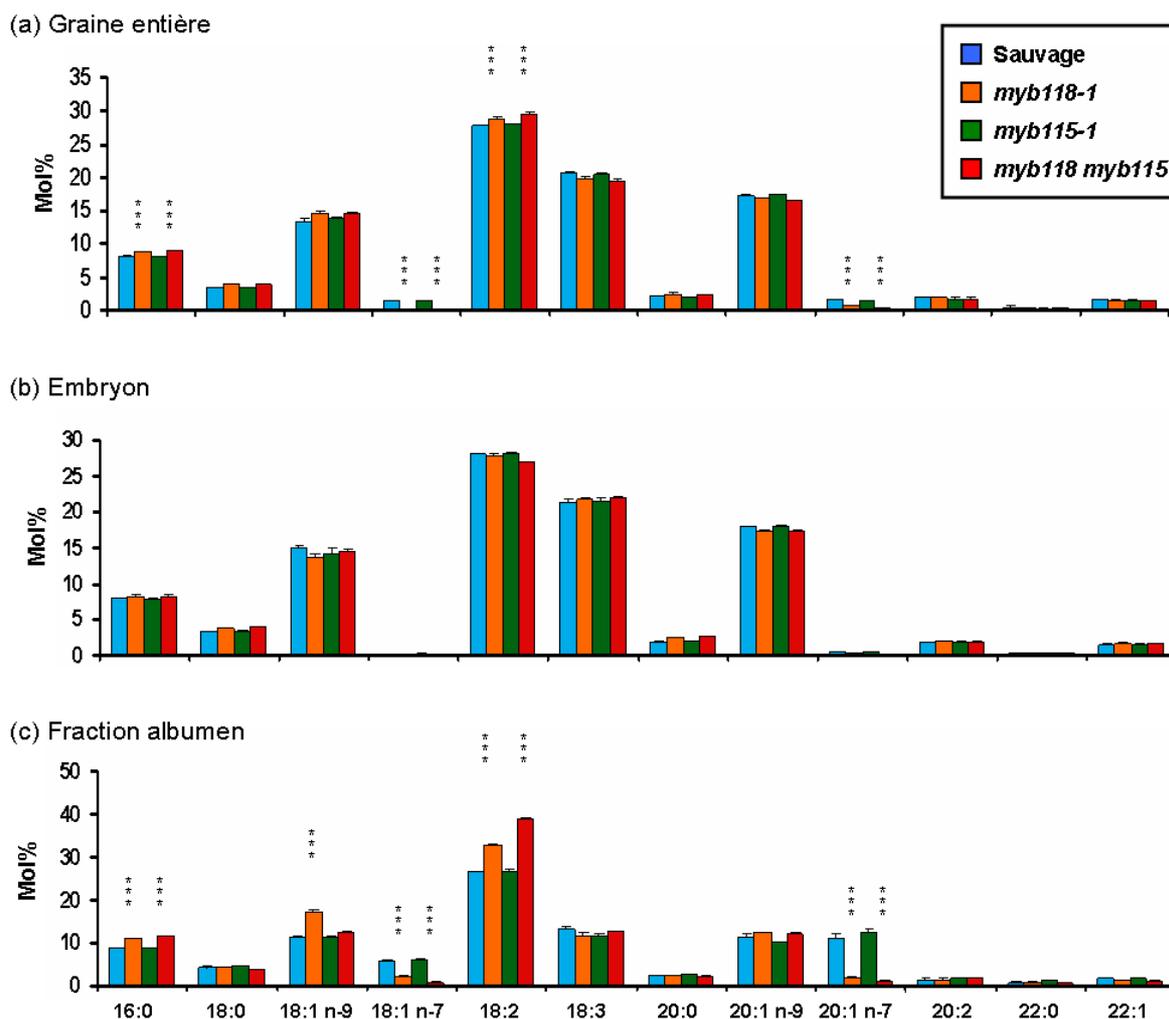


Figure 3.12. Composition en acides gras d'une graine sèche chez le sauvage (Col-0), *myb118-1*, *myb115-1* et le double mutant *myb118 myb115*.

La composition en acides gras a été analysée sur des graines sèches entières (a), des embryons excisés (b) et des fractions albumen disséquées (c) par chromatographie en phase gazeuse. Chaque point correspond à la moyenne de cinq répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. *** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 0,1%.

Chapitre III

En ce qui concerne l'embryon, le profil lipidique de ce dernier n'est pas affecté par les différentes mutations, ce qui concorde avec la très faible expression (voire l'absence d'expression) de *MYB118* et *MYB115* dans ce tissu (Figure 3.12b). En revanche, la fraction albumen est le tissu dont le profil lipidique est le plus affecté par les différentes mutations. Chez le double mutant *myb118 myb115*, la proportion en 18:1 n-7 et 20:1 n-7 est plus fortement réduite que chez le simple mutant *myb118-1* (Figure 3.12c). Les causes de ce phénotype seront abordées plus en profondeur dans le chapitre IV. Ces observations suggèrent encore l'existence d'une redondance fonctionnelle entre MYB118 et MYB115.

Cependant, le profil en acides gras de *myb118 myb115* n'est pas comparable à celui de *myb118-1* en tous points. En effet, chez le simple mutant *myb118-1*, la diminution de la proportion en acides gras monoinsaturés de type n-7 se fait au profit du 18:1 n-9 et du 18:2 alors que chez le double mutant, seule la teneur en 18:2 est fortement accrue. Or, nous savons que le 18:2 est issu du 18:1 n-9 après désaturation par la FATTY ACID DESATURASE2 (FAD2).

Deux hypothèses peuvent alors être avancées :

Soit MYB118 et MYB115 régulent tout deux positivement l'expression de *FAD2* mais la simple mutation de l'un des deux gènes serait compensée par l'autre et l'effet sur la composition en acides gras ne serait visible que chez le double mutant.

Soit MYB115 et MYB118 pourraient avoir des spécificités d'action et par exemple, seul MYB115 régulerait positivement l'expression de *FAD2*, son effet étant visible seulement en cas de suraccumulation de 18:1 n-9 en fond *myb118-1*.

Pour tester ces deux hypothèses, il serait intéressant d'analyser l'expression de *FAD2* dans les différents fonds génétiques mutants.

Enfin, pour apprécier le degré de redondance fonctionnelle entre MYB118 et MYB115, l'analyse de lignées transgéniques exprimant *MYB115* sous contrôle du promoteur de *MYB118* (*Pro_{MYB118}:MYB115*) en fond *myb118-1* permettrait de déterminer si la spécificité de ces deux gènes réside principalement dans leur séquence ou dans leur profil d'expression.

Conclusions et perspectives

Parmi les trois paralogues de MYB118 étudiés dans ce chapitre, MYB115 est le plus proche et celui pour lequel les études ont été menées le plus en profondeur. L'expression de *MYB22* et *MYB100* n'a pu être observée par nos méthodes d'analyses, ces deux gènes sont donc vraisemblablement très faiblement exprimés ou exprimés dans un très petit nombre de cellules. Des techniques plus précises de dissection (du type ablation cellulaire guidée par LASER) seraient nécessaires pour poursuivre l'étude. *MYB115* est exprimé dans l'albumen en début de maturation, comme *MYB118*, mais son expression est restreinte à une sous-région de l'albumen : l'albumen chalazal. L'analyse phénotypique du mutant correspondant suggère une redondance fonctionnelle partielle avec *MYB118* en ce qui concerne la teneur et la composition en acides gras de la fraction albumen.

Le rôle de *MYB22* et *MYB100* dans ces processus n'est aujourd'hui pas établi. L'obtention et l'analyse du phénotype d'un quadruple mutant *myb118 myb115 myb22 myb100* permettrait de statuer sur cette question. Des allèles mutants *myb22* et *myb100* sont d'ores et déjà disponibles au laboratoire.

MYB115 étant exprimé précisément dans l'albumen chalazal, l'étude précise de son phénotype requiert des méthodes d'analyse plus précises que celles utilisées jusqu'à présent dans ce chapitre. Pour les analyses lipidiques, Horn et collaborateurs (2012) ont développé une technique d'analyse lipidique par imagerie permettant une résolution à l'échelle tissulaire. Brièvement, les graines sont fixées chimiquement et de fines sections (environ 30 μm) sont réalisées au cryostat. Déposées sur des lames de verre, elles sont recouvertes d'une matrice d'acide 2,5-dihydrobenzoïque. Un faisceau LASER fin, envoyé sur la section, ionise le mélange lipide-matrice qui est ensuite dirigé vers un spectromètre de masse (Horn et *al.*, 2012). Les différentes espèces moléculaires sont alors identifiées à l'aide de bases de données (bibliothèques de spectres correspondant à différentes espèces de TAG par exemple). Ce type de technique pourrait être mis en œuvre sur l'albumen chalazal du sauvage et de *myb115-1* afin de décrire avec précision le phénotype lipidique de ce mutant.

Pour les analyses d'expression, les différentes sous-régions de la graine peuvent être microdisséquées avant la quantification de leur contenu en ARN. Brièvement, les échantillons récoltés sont déshydratés et inclus dans de la paraffine pour être découpés en fines sections (5-7 μm) par un microtome. Déposées sur des lames spéciales, les sections sont déparaffinées et

Chapitre III

microdisséquées à l'aide d'un LASER. Les sous-régions microdisséquées provenant de coupes adjacentes sont ensuite traitées ensemble pour assurer une bonne représentation de l'ensemble des ARN (Belmonte et *al.*, 2012). Cette technique très précise pourrait être utilisée pour microdisséquer l'albumen chalazal de graines sauvages et *myb115-1*, les ARN extraits de ses coupes seraient alors utilisés pour une analyse transcriptomique analogue à celle effectuées sur les mutants *myb118* et/ou des analyses en RT-PCR quantitative.

Chapitre IV - Régulation et fonction des stéaroyl-ACP désaturases (SAD) dans la graine d'Arabidopsis

Ce chapitre a pour objectif d'étudier une famille multigénique, celle des stéaroyl-ACP désaturases (SAD), impliquées dans la désaturation des acides gras dans le chloroplaste. L'étude de cette famille a été initiée afin de tenter d'expliquer les variations des profils en acides gras monoinsaturés entre l'embryon et l'albumen de la graine sauvage d'une part (Penfield et *al.*, 2004 ; Li et *al.*, 2006), et entre les albumens de *myb118-1* et du type sauvage d'autre part. Avant de présenter les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse, il nous apparaît important d'apporter quelques éléments introductifs.

I - Quelques éléments d'introduction : structure et activité catalytique des stéaroyl-ACP désaturases (SAD)

La désaturation des acides gras nécessite une réaction enzymatique introduisant une double liaison dans la chaîne aliphatique et impliquant une molécule de dioxygène. Cette molécule d'O₂ est complètement réduite en eau au cours de la réaction (Bloomfield and Bloch, 1959). Deux grandes classes de désaturases capables de convertir les acides gras insaturés en acides gras monoinsaturés ont été initialement identifiées : une classe de formes solubles utilisant comme substrat des acyl-ACP et localisées dans le stroma des chloroplastes des végétaux et une classe de formes insolubles, intégrées à la membrane du réticulum endoplasmique, utilisant des acyl-CoA chez les levures et les métazoaires (Jacobson et *al.*, 1974 ; Shanklin et *al.*, 1991).

En dépit de leurs localisations subcellulaires différentes, ces Δ^9 acyl-ACP désaturases (EC 1.14.99.6) partagent plusieurs points communs. Elles catalysent la désaturation du 18:0 (-ACP ou -CoA selon le cas) en position Δ^9 spécifiquement, en introduisant une double liaison de type *cis* entre les positions C9 et C10 (comptées à partir de l'extrémité COOH) (Nagai et Bloch, 1968 ; l'annexe 6 rappelle la nomenclature des acides gras). Elles appartiennent à la famille des enzymes à deux atomes de Fer de classe II comme la ribonucléotide diphosphate réductase et les monooxygénases bactériennes (Fox et *al.*, 1994). Elles possèdent toutes une séquence de fixation des atomes de Fe conservée (D/E)XEX₂H. Leur cycle catalytique requiert une molécule de dioxygène et une courte chaîne de transfert d'électrons.

1.1 La réaction de désaturation

Pour chaque réaction de désaturation, deux électrons sont requis. Pour les désaturases chloroplastiques, ces électrons sont directement fournis par la ferrédoxine 2Fe-2S réduite par le PSI dans les tissus photosynthétiques ou réduite par la ferrédoxine NADPH réductase (FNR) dans les tissus non photosynthétiques (Figure 4.1) (Jacobson *et al.*, 1974 ; Nagai et Bloch 1966 ; Nagai et Bloch 1968 ; Schmidt *et al.*, 1990). Une étude récente démontre que les résidus K56, K60 et K230 de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin (*Ricinus communis*) sont essentiels à son interaction avec la ferrédoxine. Pour les désaturases du réticulum endoplasmique, le cytochrome b5 se substitue à la ferrédoxine et les électrons proviennent du NADH (Shanklin et Cahoon, 1998).

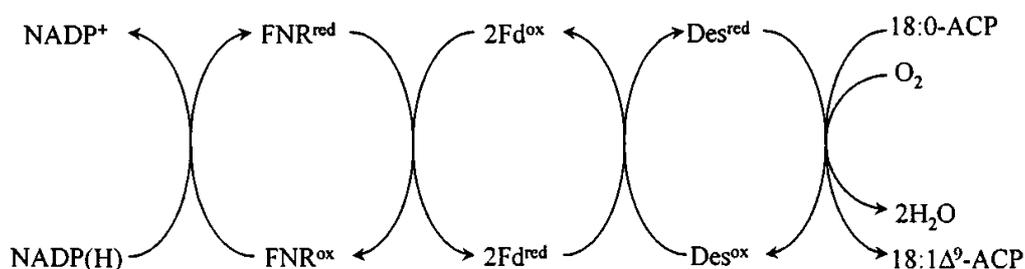


Figure 4.1. Chaîne de transport des électrons utilisés par la Δ^9 -18:0-ACP désaturase à l'obscurité ou au sein de tissus non photosynthétiques.

Durant la photosynthèse, la ferrédoxine peut être directement réduite par le photosystème I. ACP, protéine porteuse d'acyl ; Des, Δ^9 -18:0-ACP désaturase ; Fd, ferrédoxine ; FNR, ferrédoxine NADPH réductase (Shanklin et Cahoon, 1998).

La Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin est aujourd'hui la Δ^9 -acyl-ACP désaturase la mieux caractérisée chez les plantes. Elle insère une double liaison entre les positions C9 et C10 de la chaîne aliphatique du 18:0-ACP (préférentiellement) pour donner du *cis*- Δ^9 -18:1-ACP (Haas *et al.*, 2002). Chaque sous-unité de l'enzyme contient un centre Fe qui utilise l'O₂ lors de la phase d'activation de son cycle catalytique. Par des mesures biophysiques, Fox et collaborateurs (1994) démontrent que les deux atomes de Fe sont liés par un pont impliquant un atome d'oxygène, appelé pont μ -oxo et faisant un angle de 123°.

Chapitre IV

1.2 Structure des acyl-ACP désaturases

La première structure de SAD chez les plantes a été réalisée sur la Δ^9 -18:0-ACP désaturase ou stéaroyl-ACP désaturase (SAD) recombinante de ricin par cristallographie (résolution : 0,24 nm) (Lindqvist et *al.*, 1996). Les 363 acides aminés de la protéine s'organisent en 11 hélices α dont 9 forment un faisceau d'hélices antiparallèles et délimitent un profond chenal (Figure 4.2). L'enzyme s'organise en dimère.

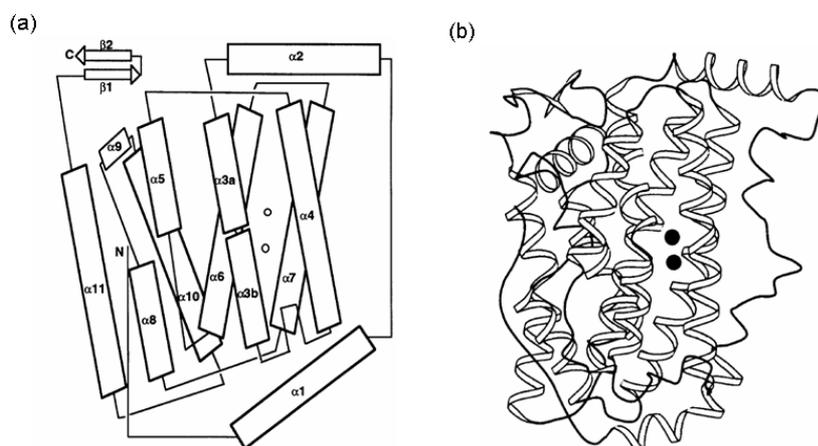


Figure 4.2. Structure de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin (*Ricinus communis*).

(a) Topologie d'une sous-unité de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin. Les hélices α sont numérotées de $\alpha 1$ à $\alpha 11$ et les feuillets β de $\beta 1$ à $\beta 2$. (b) Vue dans l'espace d'une sous-unité de la Δ^9 18:0-ACP désaturase de ricin. La position des 2 atomes de fer est indiquée par des sphères noires (Lindqvist et *al.*, 1996).

1.2.1 Le site actif

L'enzyme renferme deux atomes de Fe par sous-unité. Ces ions Fe^{2+} sont maintenus par des liaisons électrostatiques avec E196 et H232 pour le premier atome et E105 et H146 pour le deuxième (Figure 4.3a et b). Deux chaînes latérales d'acides glutamiques et une molécule d'eau viennent stabiliser l'ensemble. La distance importante entre les deux atomes de fer (0,42 nm) et l'absence de pont μ -oxo normalement présent chez les désaturases (Fox et *al.*, 1994) indiquent vraisemblablement que l'enzyme a été cristallisée sous sa forme réduite et non sous sa forme oxydée, active (Lindqvist et *al.*, 1996).

En 2007, Guy et collaborateurs cristallisent une seconde désaturase de plante, la Δ^4 -16:0-ACP désaturase de lierre (*Hedera helix*), sous sa forme oxydée. Ils révèlent que sa structure est légèrement différente de celle décrite pour le ricin (forme réduite). La distance entre les deux ions Fe^{3+} est de 0,32 nm et un pont μ -oxo est présent entre les 2 atomes. De plus, la liaison entre E224 et les 2 atomes de fer est perdue, tout comme la liaison de H227 avec le deuxième atome de fer qui passe désormais par une molécule d'eau (Figure 4.3c et d).

Chapitre IV

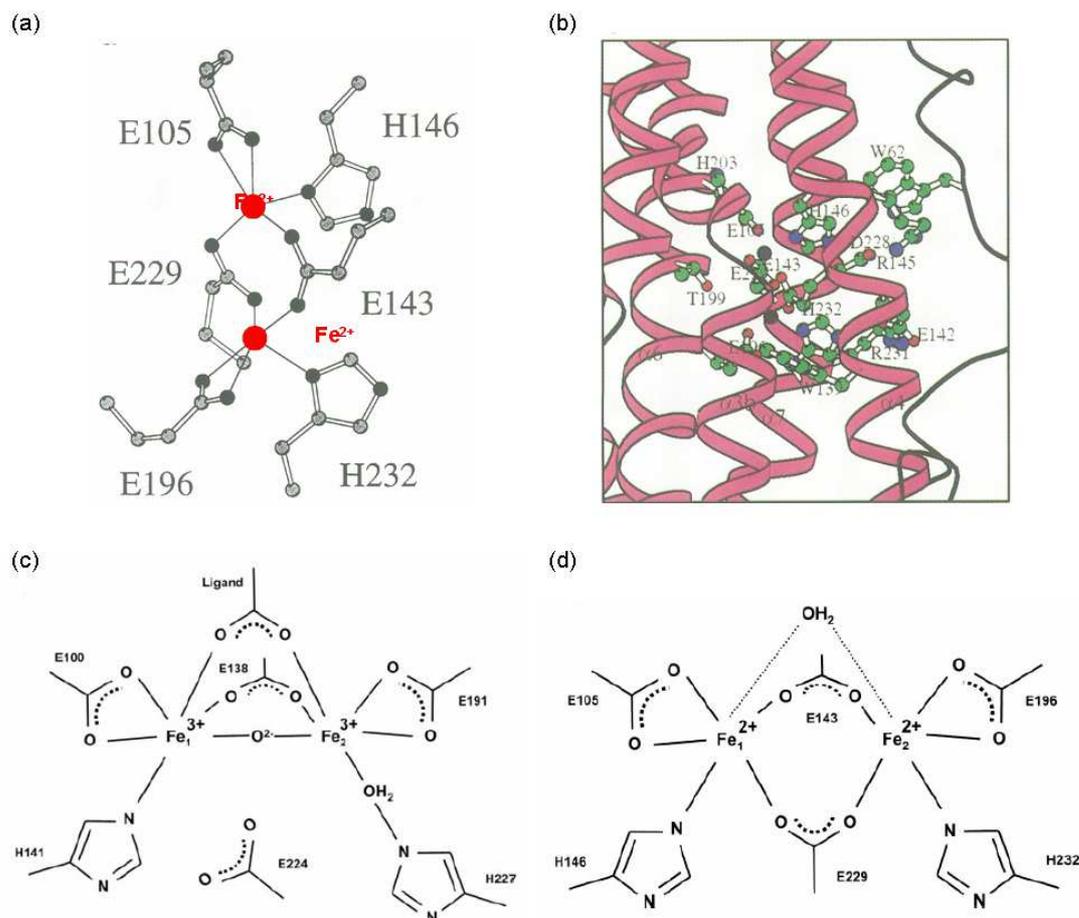


Figure 4.3. Site catalytique de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin (*Ricinus communis*).

(a) Vue dans l'espace du site catalytique d'une sous-unité de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin. (b) Vue dans l'espace du site catalytique d'une sous-unité de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin et de son environnement local (Lindqvist et al., 1996). (c) Représentation schématique montrant les relations entre les ions Fe³⁺ et les chaînes latérales des acides aminés du site catalytique d'une sous-unité de la Δ^4 -16:0-ACP désaturase de lierre (*Hedera helix*). (d) Représentation schématique montrant les relations entre les ions Fe²⁺ et les chaînes latérales des acides aminés du site catalytique d'une sous-unité de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin (Guy et al., 2007).

Le site actif oxydé de la désaturase de lierre (Fe^{III}-Fe^{III}) correspond à la forme d'attente de l'enzyme, état précédent l'initiation du cycle catalytique par fixation du substrat. La fixation du substrat, l'acyl-ACP, entraîne la réduction des ions Fe³⁺ par la ferrédoxine (Fe^{II}-Fe^{II}), observée dans la structure réduite de la désaturase de ricin. Cet état réduit permet de fixer et d'activer le dioxygène nécessaire à la catalyse. Lorsque la molécule d'eau et l'acyl-ACP désaturé sont libérés, le site actif retrouve son état oxydé (Fe^{III}-Fe^{III}), terminant le cycle catalytique. Les sites actifs des deux désaturases étant parfaitement conservés, la comparaison de leurs structures (oxydée versus réduite) met en évidence les changements de conformation à l'œuvre au cours de leur cycle catalytique (Figure 4.4).

Chapitre IV

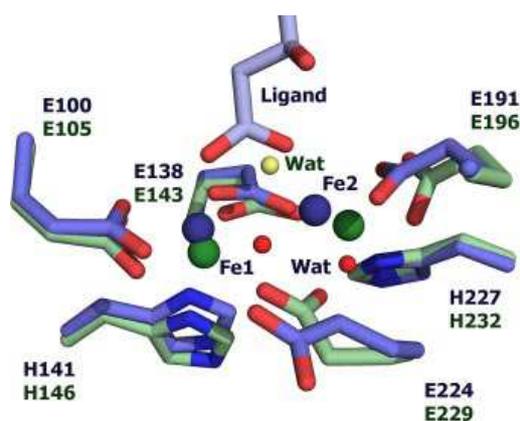


Figure 4.4. Représentation tridimensionnelle des sites actifs des désaturases de lierre (*Hedera helix*) et de ricin (*Ricinus communis*) surimposés, montrant les différences entre les structures à l'état oxydé ou réduit.

Le site actif de la désaturase de lierre (forme oxydée) est représenté en bleu, la molécule d'eau et le pont μ -oxo sont représentés par des sphères rouges. Le site actif de la désaturase de ricin (forme réduite) est représentée en vert, la molécule d'eau par une sphère jaune. Fe1 et Fe2, atomes de fer ; wat, molécule d'eau (Guy et *al.*, 2007).

Le transfert des électrons depuis la ferrédoxine vers les ions Fe^{2+} peut s'effectuer selon deux voies : (i) le long du faisceau d'hélices *via* les résidus aromatiques W139, W135, Y236, F189 et W132 ou (ii) *via* les résidus W62, D228 et H1146.

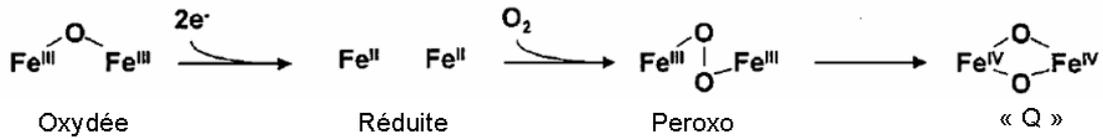
1.2.2 Le mécanisme réactionnel

Les premières étapes du mécanisme réactionnel impliquant l'activation de l'enzyme par l' O_2 sont bien connues chez la méthane monooxygénase (MMO) et sont supposées identiques chez les SAD. Au repos, le centre Fe est à l'état oxydé (diferrique $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Fe}^{\text{III}}$). L'activation de celui-ci par deux électrons venant du NADPH conduit à sa forme réduite (diferreux $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{II}}$). Après réduction, la fixation d'une molécule de dioxygène forme un pont peroxy, donnant l'intermédiaire appelé Q (Figure 4.5a).

Concernant la seconde partie du mécanisme réactionnel, tenant compte d'une multitude de paramètres biophysiques, Shanklin et Cahoon (1998) proposent l'enchaînement suivant : de manière successive, chaque O du composé Q capte un hydrogène de la chaîne aliphatique par attaque nucléophile. La perte de chaque proton engendre la formation d'un radical, les deux radicaux ainsi générés recombinent spontanément pour former une double liaison entre les deux atomes de carbone considérés (Figure 4.5b). Le site catalytique à deux atomes de Fe possède à présent deux groupements hydroxyl qui, en recombinant, régénèrent le pont μ -oxo et une molécule d'eau.

Chapitre IV

(a) Voie commune d'activation par l'O₂



(b) Mécanisme hypothétique de désaturation des acyl-ACP

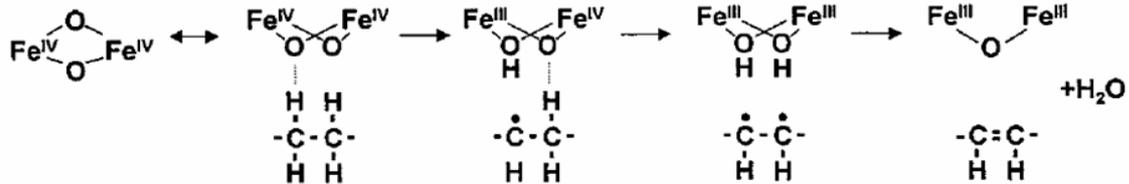


Figure 4.5. Proposition de mécanismes réactionnels pour la méthane monooxygénase et l'acyl-ACP désaturase.

(a) Voie commune d'activation par l'O₂. (b) Mécanisme hypothétique de désaturation des acyl-ACP (Shanklin et Cahoon, 1998).

1.2.3 La poche de fixation des substrats

La structure tridimensionnelle de l'enzyme ménage une profonde poche hydrophobe encadrée par 9 hélices α . Bordé par les chaînes latérales de résidus hydrophobes et coudé au niveau des atomes de fer, le chenal facilite la fixation du produit de la réaction, c'est à dire de l'acyl-ACP désaturé en configuration *cis* (Figure 4.2 et 4.6).

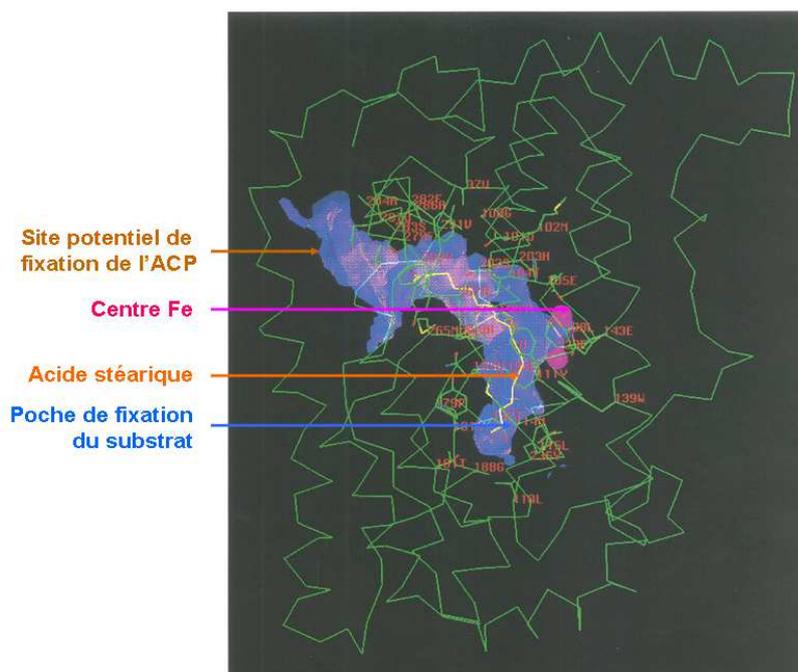


Figure 4.6. Représentation de la poche de fixation du substrat de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin (*Ricinus communis*).

La position des deux atomes de Fe est matérialisée par deux sphères roses. Les chaînes latérales permettant la coordination des ions Fe²⁺ et bordant la poche hydrophobe de fixation du substrat sont représentées en bleu. Un modèle du substrat, l'acide stéarique, est positionné dans la poche (Lindqvist et al., 1996).

Chapitre IV

Par modélisation, les auteurs ont pu montrer que le carbone Δ^9 de l'acide stéarique (18:0) placé dans le chenal hydrophobe de l'enzyme se retrouve à proximité des deux ions Fe^{2+} (Figure 4.6). Cette structure est retrouvée à la fois chez la désaturase de ricin et de lierre. Cependant, leur spécificité de substrat est totalement différente, et la comparaison des deux structures permet de se focaliser sur deux régions : la fixation de l'ACP à la surface de l'enzyme et l'extrémité de la poche de fixation du substrat (Guy et al., 2007).

R112, C113, I174 de la désaturase de lierre correspondent à T117, L118 et P179 respectivement chez la désaturase de ricin (Figure 4.7a). Les mutations T117R, L118C et P179I, introduites dans la séquence de la désaturase de ricin, entraînent une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour le 16:0-ACP par rapport au 18:0-ACP en conservant la régiosélectivité en Δ^9 (Cahoon et al., 1997 ; Whittle et Shanklin, 2001 ; Cahoon et Shanklin, 2000). L'ensemble de ces résidus se situe à l'extrémité de la poche hydrophobe et permettraient de moduler la profondeur de la poche, et ce faisant, d'autoriser l'entrée d'un substrat (chaîne acylée) plus ou moins long.

La fixation de l'ACP et du groupe carboxyl de l'acyl s'effectue à la surface de l'enzyme *via* une hélice et une boucle flexible. Quatre acides aminés variables semblent impliqués dans cette reconnaissance (Figure 4.7b). Les auteurs supposent que ces résidus contribuent à la régiosélectivité de l'enzyme en déterminant la position du groupe carboxyl vis-à-vis du site catalytique et ainsi la position de l'insaturation (en Δ^4 ou Δ^9) (Guy et al., 2007).

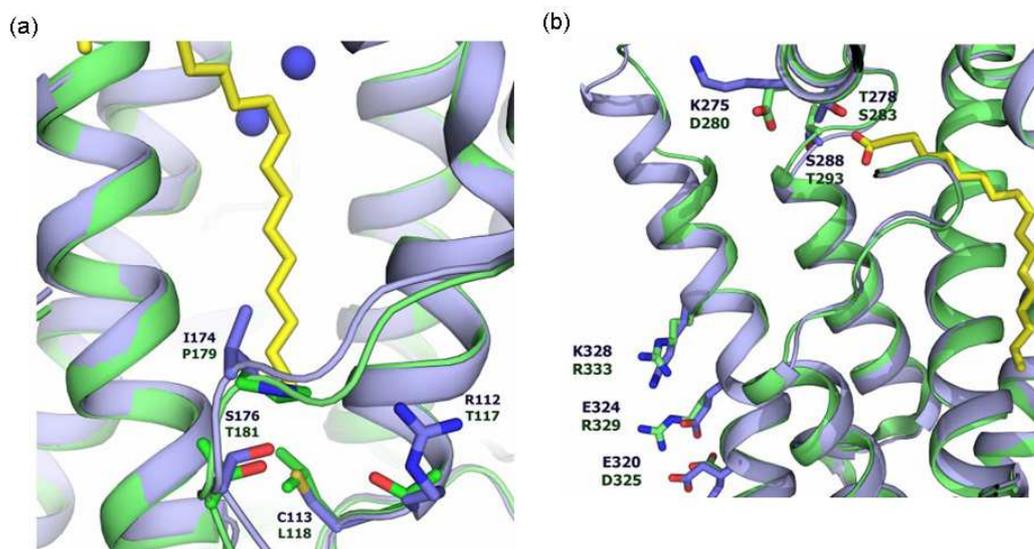


Figure 4.7. Superposition des structures de la désaturase de lierre (*Hedera helix*) (bleu) et de la désaturase de ricin (*Ricinus communis*) (vert).

(a) Extrémité de la poche de fixation du substrat. (b) Région permettant la fixation de l'ACP. L'acide gras, substrat est représenté en jaune. Les chaînes latérales des résidus interagissant avec le substrat (a) ou l'ACP (b) sont représentées sous forme de bâtonnets (Guy et al., 2007).

Chapitre IV

1.2.4 Des acyl-ACP désaturases non conventionnelles

Plusieurs acyl-ACP désaturases provenant d'organismes variés et possédant des spécificités de substrat et des régiosélectivités diverses ont été étudiées. La désaturase de lierre étudiée par Guy et collaborateurs (2007) et dont il a été fait mention dans le paragraphe précédent utilise du 16:0-ACP comme substrat et introduit une double liaison en position Δ^4 et configuration *cis*. Les graines de carotte (*Daucus carota*) ou de coriandre (*Coriandrum sativum*) contiennent des huiles riches en acide pétrosilinique (18:1 *cis*- Δ^6). Cahoon et collaborateurs (1992, 1994) démontrent par des marquages radioactifs et des expériences d'expression en système hétérologue que cet acide gras est issu de l'activité d'une Δ^4 -palmitoyl-acyl carrier protein desaturase (Δ^4 -PAD) qui désature du 16:0-ACP en position Δ^4 et configuration *cis* chez la coriandre. Plus précisément, la désaturation du 16:0-ACP par la Δ^4 -PAD produit de l'acide Δ^4 -hexadécanoïque (16:1 *cis*- Δ^4) qui, allongé de deux carbones, donnera ensuite de l'acide pétrosilinique (18:1 *cis*- Δ^6) (Cahoon et al., 1992 ; Cahoon et Ohlrogge, 1994). Chez *Thumbergia alata*, 80% de l'huile contenue dans la graine est composée d'acide Δ^6 -hexadécanoïque (16:1 *cis*- Δ^6). En utilisant une banque d'ADNc, les auteurs ont cloné une désaturase de l'albumen de *T. alata* présentant 66% d'identité avec la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin et 57% d'identité avec la Δ^4 -16:0-ACP désaturase de coriandre. L'étude de l'activité catalytique de cette enzyme révèle qu'elle assure la désaturation du 16:0-ACP en position Δ^6 : c'est donc une Δ^6 -palmitoyl-ACP désaturase (Δ^6 -PAD) (Cahoon et al., 1994).

Quelques années plus tard, Schultz et collaborateurs (1996) mettent en évidence, chez *Pelargonium xhortorum*, que la Δ^9 -palmitoyl-ACP désaturase (Δ^9 -PAD) est nécessaire à la production d'acide ω -5-anacardique, une classe de métabolites secondaires dérivant des 16:1 Δ^{11} et 18:1 Δ^{13} . Ainsi la Δ^9 -PAD désature le 14:0-ACP en position Δ^9 , qui, par ajouts successifs de deux carbones, est à l'origine du 16:1 Δ^{11} , puis du 18:1 Δ^{13} .

Enfin, une désaturase de la liane patate (*Doxantha unguis-cati*) a été isolée en 1998 (Cahoon et al., 1998). Très proche de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin, elle désature le 16:0-ACP en position Δ^9 (Cahoon et al., 1998). Il existe donc chez les végétaux, des acyl-ACP désaturases très diverses, spécifiques de différents substrats (14:0, 16:0 ou 18:0-ACP) et introduisant une double liaison à différentes positions (Δ^4 , Δ^6 ou Δ^9).

Chapitre IV

1.3 Les SAD d'Arabidopsis

Le génome d'Arabidopsis compte sept gènes codant des stéaroyl-ACP-désaturases (SAD) putatives, dont le gène appelé *SSI2/FAB2* (Kachroo et al., 2007). Trois d'entre eux sont regroupés sur le chromosome 3, deux autres sont positionnés en tandem sur le chromosome 5 (Figure 4.8a). Les deux gènes restants se trouvent sur les chromosomes 1 et 2 (Figure 4.8a). Toutes les protéines codées par ces gènes sont prédites pour être adressées au chloroplaste.

Le gène *FAB2* a été le plus étudié au cours de ces 20 dernières années. Le mutant *fab2* présente un nanisme sévère et accumule plus de 18:0 et moins de 18:1, notamment dans les feuilles. Cette accumulation accrue de 18:0 concerne l'ensemble des lipides membranaires, qu'ils soient chloroplastiques ou non chloroplastiques (Lightner et al., 1994).

De plus, les nombreuses études menées par Kachroo et collaborateurs (Kachroo et al., 2001 ; Kachroo et al., 2003a ; Kachroo et al., 2004) montrent que la réduction de la quantité de 18:1 chez les mutants *fab2* est la cause d'une modification profonde de la communication entre les différentes voies de signalisation induites par les stress biotiques. Chez les mutants *fab2*, la voie de l'acide salicylique est constitutivement induite alors qu'inversement, la voie de l'acide jasmonique et les réponses défensives qu'elle régule sont profondément altérées (Kachroo et al., 2001). Le phénotype morphologique ainsi que le phénotype lié aux mécanismes de défense de *fab2* sont restaurés par élévation du niveau endogène de 18:1 (Kachroo et al., 2003).

L'alignement des séquences des sept membres de la famille des SAD d'Arabidopsis et l'analyse phylogénétique associée montrent la très bonne conservation de leurs séquences protéiques (Figure 4.8b). Deux groupes peuvent néanmoins être distingués : celui comprenant *SAD1*, *SAD5* et *FAB2* et celui comprenant *SAD2*, *SAD3* et *SAD4*. La très grande identité de séquence constatée entre *SAD2* et *SAD4* et la position contiguë des gènes *SAD2* et *SAD4* sur le chromosome 3 semblent indiquer que ces gènes sont issus d'une duplication récente en tandem. La protéine *SAD6* semble diverger nettement des autres membres de la famille (Figure 4.8b). Ces résultats sont concordants avec ceux précédemment publiés par Kachroo et collaborateurs (2007). De plus, le locus de *SAD1* et *SAD3*, situé à l'une des extrémités du chromosome 5, et le locus de *SAD5*, *SAD2* et *SAD4*, sur le chromosome 3, appartiennent à des régions génomiques issues d'une duplication (« The Arabidopsis genome initiative », 2002). Ainsi, nous pouvons supposer que l'ensemble *SAD3/SAD1* du chromosome 5 et *SAD2/SAD4/SAD5* du chromosome 3 sont issus d'un même ancêtre commun : selon ce raisonnement, *SAD1* serait donc proche phylogénétiquement de *SAD5*

Chapitre IV

et *SAD3* serait proche phylogénétiquement du couple *SAD2/SAD4*. Ces observations sont en accord avec l'analyse phylogénétique présentée dans la figure 4.8b. Par la suite, nous nommerons clade I le groupe de SAD comprenant *SAD1*, *SAD5* et *FAB2* et clade II le groupe de SAD comprenant *SAD2*, *SAD3* et *SAD4*.

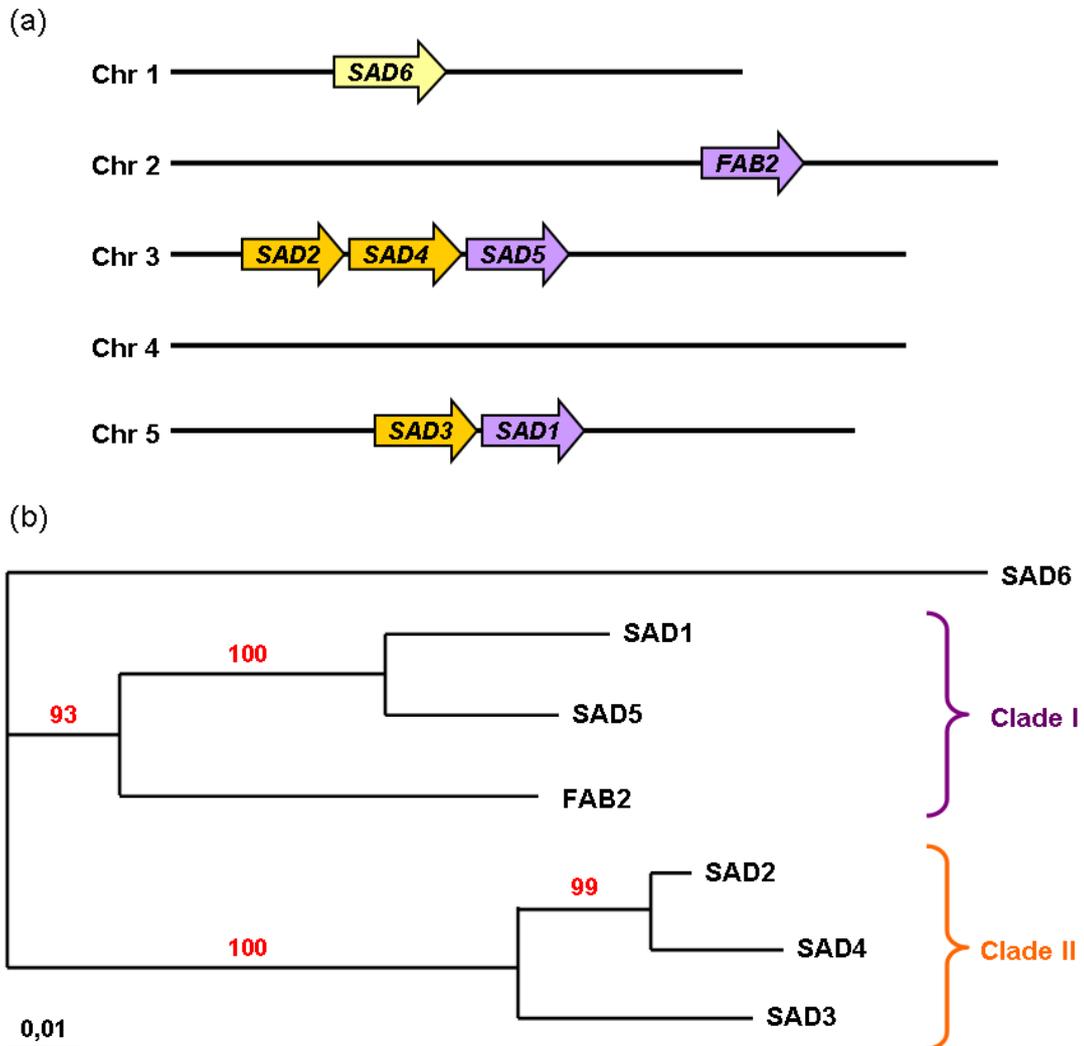


Figure 4.8. Distribution dans le génome des SAD et analyse phylogénétique des SAD.

(a) Représentation schématique de la position des différents gènes *SAD* (*SAD1* (*At5g16240*), *SAD2* (*At3g02610*), *SAD3* (*At5g16230*), *SAD4* (*At3g02620*), *SAD5* (*At3g02630*), *SAD6* (*At1g43800*) et *FAB2/SSI2* (*At2g43710*)) sur les chromosomes d'Arabidopsis (Kachroo et al., 2007). Les gènes du clade I (b) sont représentés en violet et les gènes du clade II (b) en orange. (b) Analyse phylogénétique des séquences protéiques des différents SAD d'Arabidopsis. L'analyse phylogénétique a été conduite en considérant les séquences protéiques entières des différentes SAD et en utilisant le programme MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) version 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) pour l'alignement multiple et la méthode NJ (Neighbor Joining, avec 1000 bootstraps) pour la construction de l'arbre. Les valeurs de bootstrap sont indiquées en rouge. L'alignement des séquences est présenté dans l'annexe 4, figure A4.1.

II - Patron d'expression des SAD d'Arabidopsis

2.1 Etude du patron d'expression des gènes de la famille des SAD dans les différents organes d'une plante sauvage

L'étude du patron d'expression des gènes *SAD* d'Arabidopsis a été menée conjointement par deux techniques, la RT-PCR quantitative et l'utilisation du gène rapporteur *GUS*.

2.1.1 Etude par RT-PCR quantitative

Parmi les sept gènes qui composent la famille, le gène *FAB2* est le plus exprimé dans l'ensemble des organes végétatifs et les fleurs avec un niveau d'expression oscillant entre 10 et 40% de *EF* dans ces différents organes (Figure 4.9). Le gène *SAD5* arrive ensuite avec des niveaux d'expression compris entre 5 et 15% de *EF* dans ces mêmes organes. Les cinq autres gènes de la famille présentent des niveaux de transcrits beaucoup plus faibles. Ces transcrits sont souvent accumulés de manière spécifique dans un tissu donné : *SAD1* serait exprimé préférentiellement dans les tiges, fleurs et feuilles caulines (3 à 5% de *EF*) et *SAD6* serait exprimé plutôt dans les racines (5% de *EF*) (Figure 4.9). L'expression de *SAD2* et *SAD3* peut être qualifiée de basale, elle reste inférieure à 2% dans l'ensemble des organes testés (Figure 4.9). Les transcrits de *SAD4* sont à peine détectés dans tous ces organes (moins de 0,5% de *EF*) (Figure 4.9).

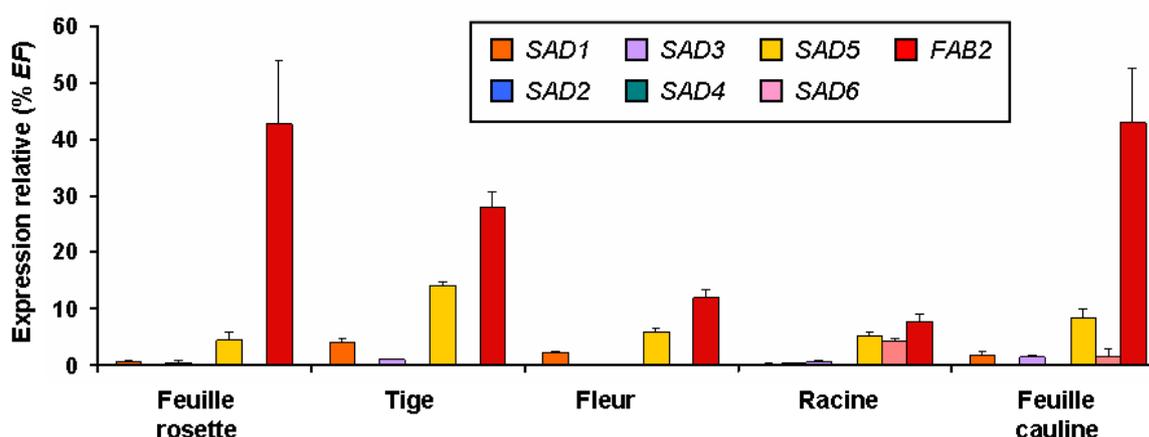


Figure 4.9. Patron d'expression des sept gènes *SAD* d'Arabidopsis dans différents organes d'une plante sauvage (Col-0), étudié par RT-PCR quantitative.

Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée.

Chapitre IV

Dans les graines, de manière générale, les niveaux d'expression des différents gènes *SAD* sont bien plus élevés (Figure 4.10). L'ensemble des gènes est induit au début de la maturation de la graine (6 JAF pour *FAB2*, *SAD1* et *SAD5* et 8 JAF pour *SAD6*, *SAD2* et *SAD3*). *FAB2* reste toujours le plus exprimé, avec un pic d'expression 18 JAF à près de 100% de *EF* (Figure 4.10). L'expression de *SAD5* atteint un pic 14 JAF à 60% de *EF*. *SAD1* est exprimé à environ 25% de *EF* entre 14 et 18 JAF quand *SAD6* atteint seulement 15% de *EF* à 14 JAF (Figure 4.10). Enfin, des gènes presque indétectables dans les organes végétatifs sont exprimés dans la graine : *SAD3* atteint un pic d'expression 18 JAF à 55% de *EF* et *SAD2* est exprimé à 5% de *EF* entre 14 et 16 JAF (Figure 4.10).

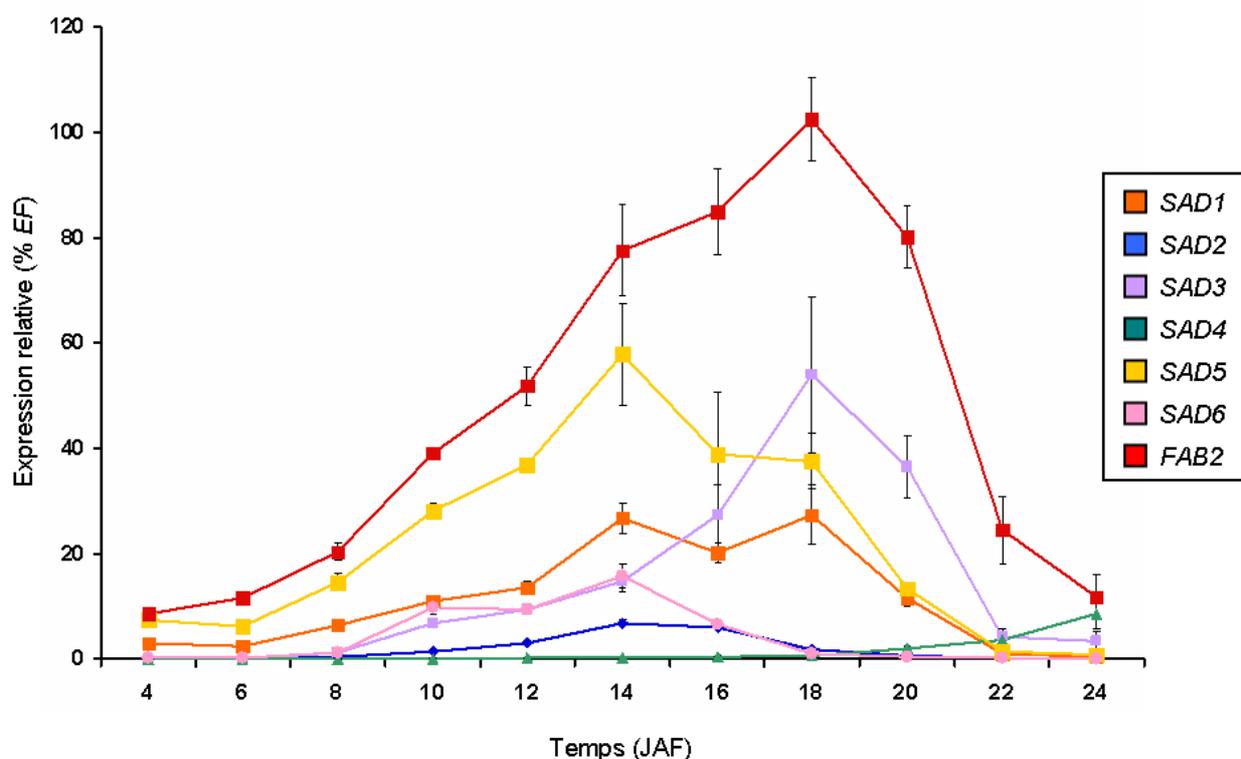


Figure 4.10. Cinétiques d'accumulation des transcrits des sept gènes *SAD* d'Arabidopsis dans des graines en développement d'une plante sauvage (Col-0) étudiées par RT-PCR quantitative. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. JAF, Jours après floraison.

Chapitre IV

2.1.2 Etude de l'activité du promoteur des gènes *SAD*

Pour compléter ces données, l'activité du promoteur des sept gènes *SAD* a été étudiée. Pour ce faire, les régions promotrices situées 1000 pb en amont de l'ATG ont été amplifiées (Annexe 10) à partir d'ADN génomique d'une plante sauvage (Col-0) et fusionnées au gène rapporteur *uidA* dans le vecteur *pGWB3* (Annexe 9) par clonage de type Gateway. Le transgène a alors été introduit dans une plante sauvage (Col-0) et entre 12 et 19 transformants primaires ont été sélectionnés et analysés pour chaque construit.

Des tests de coloration GUS ont été effectués sur les différents organes de chaque transformant primaire (Figure 4.11). Avec le promoteur de *FAB2*, une coloration GUS a pu être observée dans les feuilles de rosette et les feuilles caulines mais aussi dans la tige, les sépales, les pétioles des siliques et dans la graine (Figure 4.11). Ces données sont en accord avec les résultats de RT-PCR quantitative (Figures 4.9 et 4.10) et des données de RT-PCR déjà publiées (Kachroo et al., 2007). Elles permettent en particulier de préciser son expression au sein de la fleur (sépales) et de la graine (embryon). En ce qui concerne le promoteur de *SAD5*, une intense coloration bleue a pu être observée dans les grains de pollen et les graines mais jamais dans les feuilles ou les tiges même si quelques transcrits ont pu être détectés par RT-PCR (Kachroo et al., 2007) et par RT-PCR quantitative (Figure 4.9 et 4.10). Avec le promoteur de *SAD1*, un précipité bleu est observable dans les feuilles de rosette, les tiges, les sépales, le pollen et la graine (Figure 4.11). Ces observations sont en adéquation avec les résultats de RT-PCR quantitative (Figures 4.9 et 4.10) et ceux publiés précédemment par Kachroo et collaborateurs (2007). Le promoteur de *SAD6* permet quant à lui une expression du gène rapporteur uniquement dans la graine (Figure 4.11).

Pour terminer, les promoteurs de *SAD2* et *SAD3* fusionnés au gène rapporteur *uidA* sont responsables d'une coloration bleue essentiellement dans la graine (Figure 4.11), ce qui est en accord avec les résultats de RT-PCR quantitative (Figures 4.9 et 4.10) mais très différent des données déjà publiées (Kachroo et al., 2007).

En ce qui concerne le promoteur de *SAD4*, aucune coloration GUS n'a pu être détectée parmi tous les organes testés (Figure 4.11). Ces données sont en accord avec les résultats de RT-PCR quantitative.

Chapitre IV

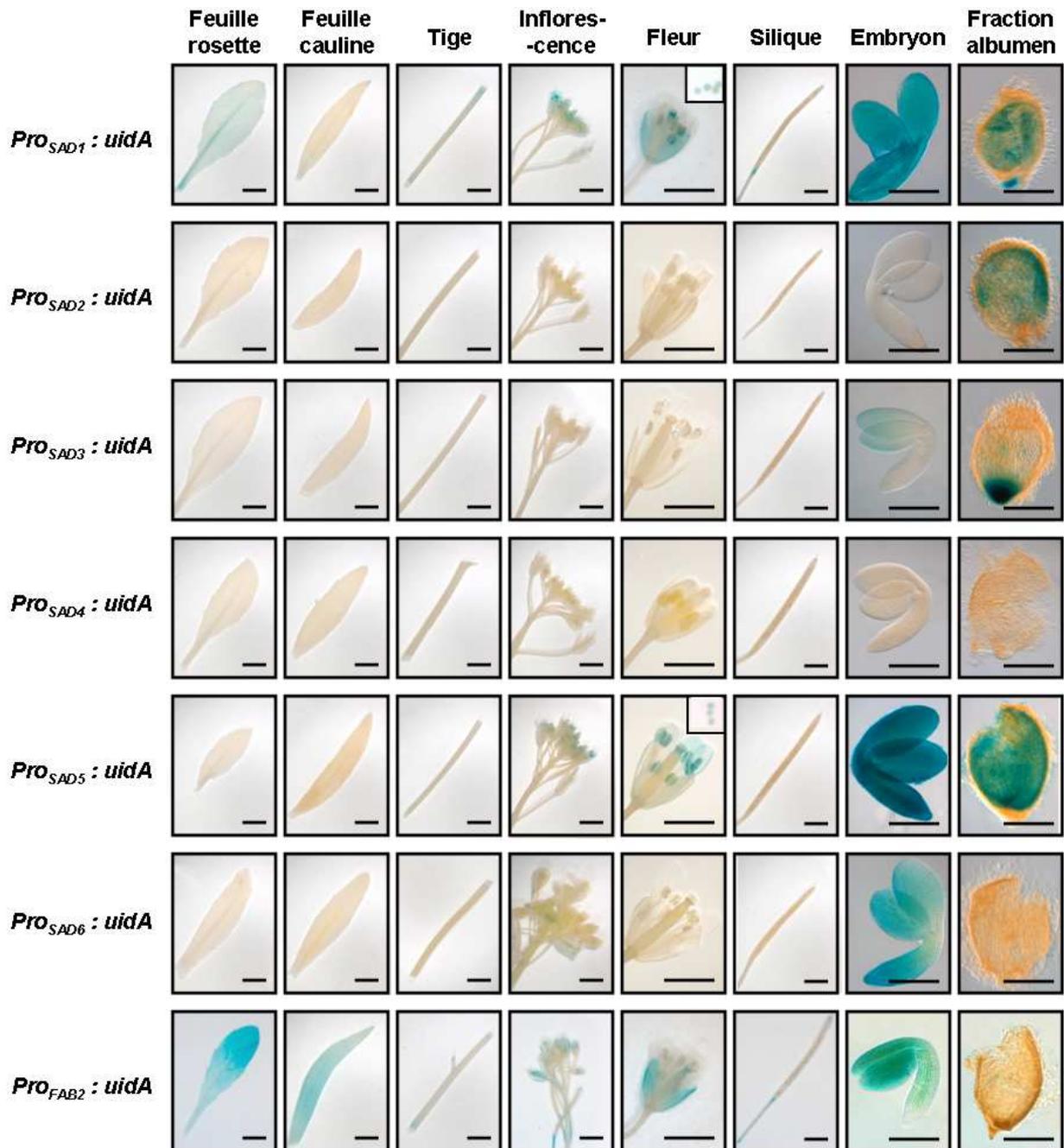


Figure 4.11. Analyse de l'activité β -glucuronidase (GUS) chez des plantes transgéniques *Pro_{SAD1}:uidA*, *Pro_{SAD2}:uidA*, *Pro_{SAD3}:uidA*, *Pro_{SAD4}:uidA*, *Pro_{SAD5}:uidA*, *Pro_{SAD6}:uidA* et *Pro_{FAB2}:uidA*.

Les colorations GUS ont été réalisées sur des feuilles de rosette, des feuilles caulines, des tiges, des inflorescences, des fleurs, des siliques ainsi que des embryons et des fractions albumen âgés de 12 jours après floraison. Les différents tissus ont été incubés une nuit dans un tampon phosphate contenant 2 mM de X-Gluc et 0,2 mM de ferrocyanure/ferricyanure de potassium, puis 3 h dans un liquide de montage éclaircissant. Les observations microscopiques ont été réalisées à l'aide d'objectifs Nomarski. Pour les sept gènes *SAD*, une région promotrice de 1000 pb en amont de l'ATG a été fusionnée au gène *uidA*. Les photographies présentées sont représentatives des observations effectuées sur 19, 19, 15, 12, 16, 12, et 22 lignées transgéniques indépendantes pour *Pro_{SAD1}:uidA*, *Pro_{SAD2}:uidA*, *Pro_{SAD3}:uidA*, *Pro_{SAD4}:uidA*, *Pro_{SAD5}:uidA*, *Pro_{SAD6}:uidA* et *Pro_{FAB2}:uidA*, respectivement. Barre = 0,3 cm.

Chapitre IV

2.2 Etude du patron d'expression des SAD dans les différents tissus de la graine

Le patron d'expression des gènes *SAD* a ensuite été étudié de manière plus détaillée dans la graine. L'accumulation des transcrits des différents gènes *SAD* a été mesurée par RT-PCR quantitative sur des ADNc extraits de l'embryon ou de la fraction albumen entre 10 et 16 JAF (Figure 4.12). Parallèlement, l'activité de leurs promoteurs a été étudiée dans ces mêmes tissus entre 8 et 14 JAF (Figure 4.13).

Les gènes du clade I sont préférentiellement exprimés dans l'embryon (Figure 4.12). *FAB2* reste le gène majoritairement exprimé avec un niveau de transcrits dans l'embryon passant de 150 à 450% de *EF* entre 12 et 14 JAF, suivi de *SAD5* qui, avec un profil de même allure, passe de 50 à 120% de *EF*, et enfin de *SAD1*, qui passe de 30 à 100% de *EF*. Les gènes du clade I sont aussi exprimés dans la fraction albumen à des niveaux plus faibles et de manière constante entre 10 et 16 JAF (100% de *EF* pour *FAB2*, 40% de *EF* pour *SAD5* et 20% de *EF* pour *SAD1*) (Figure 4.12).

Ces données sont confirmées et enrichies par l'analyse de l'activité des promoteurs (Figure 4.13). Le promoteur de *FAB2* est activé spécifiquement dans l'embryon et plus précisément dans les cotylédons entre 12 et 14 JAF. Le promoteur de *SAD5* est activé très fortement dans l'embryon entre 8 et 14 JAF et plus faiblement dans l'albumen entre 8 et 12 JAF. Enfin, le promoteur de *SAD1* induit une intense coloration bleue spécifiquement dans l'embryon entre 10 et 14 JAF (Figure 4.13).

D'après les données de RT-PCR quantitative, *FAB2* est, de loin, le gène *SAD* le plus exprimé dans tous les organes d'une plante sauvage. Cependant, l'intensité de la coloration GUS obtenue avec un promoteur de 1 kb semble plus faible que celle obtenue avec les promoteurs de *SAD5* ou *SAD1*. Le promoteur de *FAB2* utilisé pourrait ne pas être complet. Il pourrait exister des séquences *cis*-régulatrices en amont ou en aval du fragment cloné qui joueraient sur la force de ce promoteur. De nouvelles études sont en cours afin de répondre à cette question.

Chapitre IV

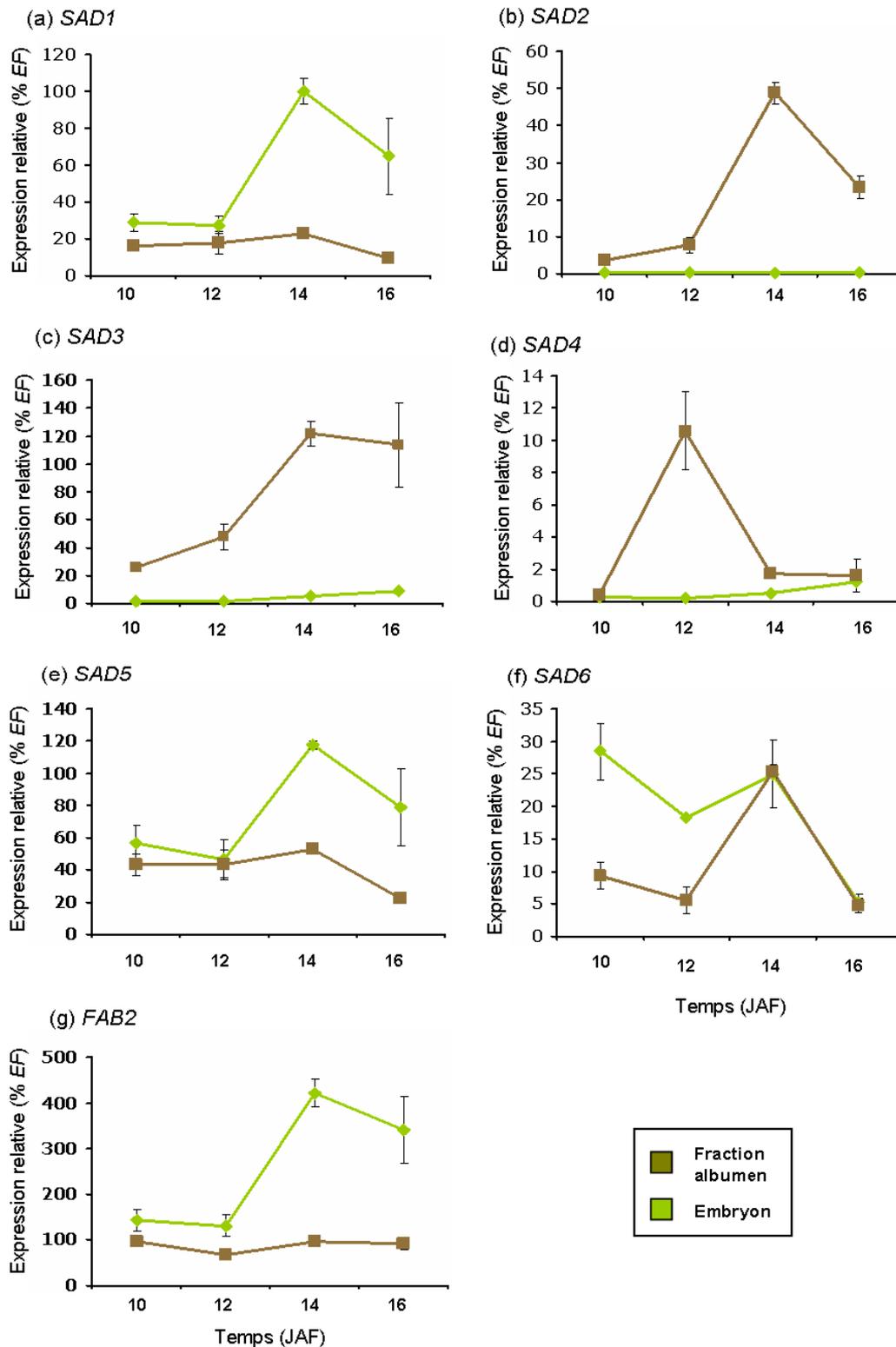


Figure 4.12. Patrons d'expression des sept gènes *SAD* d'Arabidopsis dans la fraction albumen et dans l'embryon de la graine d'une plante sauvage (Col-0), étudiés par RT-PCR quantitative.

Les cinétiques d'accumulation des ARNm de *SAD1* (a), *SAD2* (b), *SAD3* (c), *SAD4* (d), *SAD5* (f), *SAD6* (e) et *FAB2* (g) sont présentées entre 10 et 16 JAF. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. JAF, Jours après floraison.

Chapitre IV

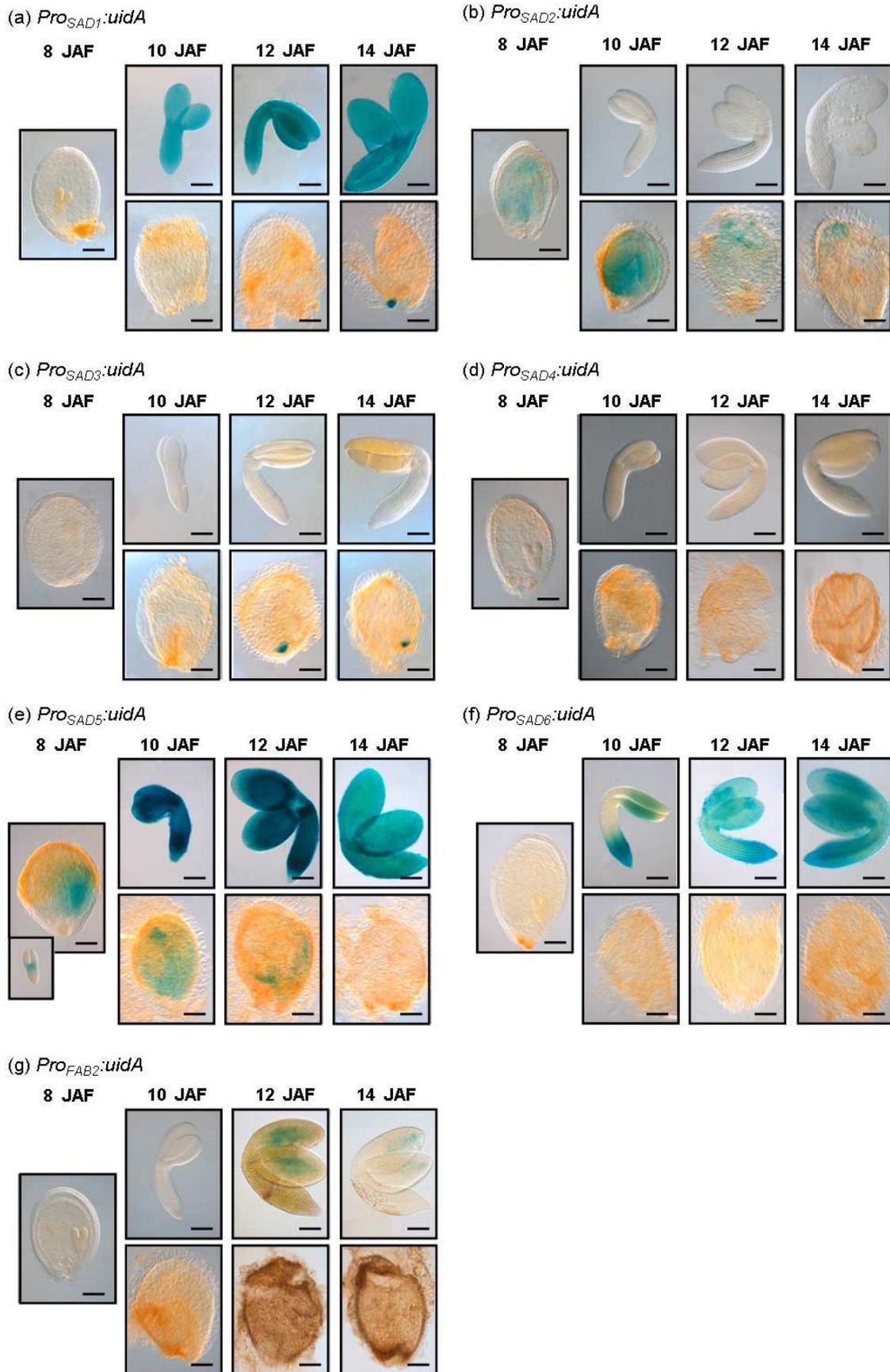


Figure 4.13. Analyse de l'activité β -glucuronidase (GUS) dans des graines de plantes transgéniques *Pro_{SAD1}:uidA*, *Pro_{SAD2}:uidA*, *Pro_{SAD3}:uidA*, *Pro_{SAD4}:uidA*, *Pro_{SAD5}:uidA*, *Pro_{SAD6}:uidA* et *Pro_{FAB2}:uidA*.

Chapitre IV

Les colorations GUS ont été réalisées sur des graines entières à 8 JAF ou sur des embryons et des fractions albumen disséqués entre 10 et 14 JAF. Les différents tissus ont été incubés une nuit dans un tampon phosphate contenant 2 mM de X-Gluc et 2 mM de ferrocyanure/ferricyanure de potassium, puis 3 h dans un liquide de montage éclaircissant. Les observations microscopiques ont été réalisées à l'aide d'objectifs Nomarski. Pour les sept gènes *SAD*, une région promotrice de 1000 pb en amont de l'ATG a été fusionnée au gène *uidA*. Les photographies présentées sont représentatives des observations effectuées sur 19, 19, 15, 12, 16, 12, et 22 lignées transgéniques indépendantes pour *ProSAD1:uidA*, *ProSAD2:uidA*, *ProSAD3:uidA*, *ProSAD4:uidA*, *ProSAD5:uidA*, *ProSAD6:uidA* et *ProFAB2:uidA*, respectivement. JAF, Jours après floraison Barre = 100 µm.

Inversement, les gènes du clade II sont préférentiellement exprimés dans la fraction albumen (Figure 4.12). *SAD3* est le gène de ce clade le plus exprimé, son expression dans la fraction albumen croissant de 30 à 120% de *EF* entre 10 et 14 JAF. Le patron d'expression de *SAD2* suit la même tendance passant de 3% de *EF* à 10 JAF à 50% de *EF* à 14 JAF avant de chuter à 25% de *EF* à 16 JAF. Enfin, le gène *SAD4* est faiblement exprimé (moins de 12% de *EF*) dans l'albumen. Les gènes de ce clade sont très faiblement exprimés dans l'embryon (moins de 10% de *EF* à 16 JAF pour *SAD3*) (Figure 4.12).

En parallèle, l'analyse de l'activité de leurs promoteurs précise ces résultats (Figure 4.13). Le promoteur de *SAD3* est bien activé dans la fraction albumen mais précisément et intensément dans l'albumen chalazal entre 12 et 14 JAF. Le promoteur de *SAD2* est lui induit dans l'ensemble de l'albumen entre 10 et 14 JAF. Par contre, aucune coloration GUS n'a pu être observée avec le promoteur de *SAD4* : soit l'activité du promoteur est trop faible pour être détectée, soit le promoteur que nous avons cloné est incomplet.

Enfin, *SAD6* est exprimé préférentiellement dans l'embryon entre 10 et 14 JAF (environ 25% de *EF*). Les niveaux de transcrits *SAD6* dans la fraction albumen sont globalement plus faibles : ils avoisinent 10% de *EF* à 10 et 12 JAF, augmentent fortement jusqu'à 25% de *EF* à 14 JAF, avant de chuter à 16 JAF (5% de *EF*). D'ailleurs, cette chute à 16 JAF s'effectue conjointement dans l'embryon et la fraction albumen. L'analyse de l'activité de son promoteur révèle une coloration bleue restreinte à l'embryon entre 10 et 14 JAF (Figures 4.12 et 4.13).

Pour conclure sur le patron d'expression des gènes *SAD* dans la graine, les gènes du clade I seraient exprimés fortement et préférentiellement dans l'embryon et plus faiblement dans l'albumen alors que les gènes du clade II seraient exprimés principalement dans l'albumen (Annexe 4, Figure A4.2).

III - Activité catalytique des SAD d'Arabidopsis

Chez Arabidopsis, il existe deux isomères d'acides gras monoinsaturés appelés n-9 et n-7 qui diffèrent par la position de leur double liaison au sein de la chaîne aliphatique (Figure 1.4 et Annexe 6). Nous appellerons ratio n-7/n-9 dans la graine le rapport $(18:1 \text{ n-7} + 20:1 \text{ n-7}) / (18:1 \text{ n-9} + 20:1 \text{ n-9})$. Ce ratio est de 0,07 dans l'embryon alors qu'il est de 0,8 dans la fraction albumen (Figure 1.4) car les formes de type n-7 sont préférentiellement accumulées dans la fraction albumen. D'après les données d'expression présentées dans le paragraphe ci-dessus nous savons que les gènes du clade II sont préférentiellement exprimés dans la fraction albumen alors que les gènes du clade I sont majoritairement exprimés dans l'embryon. Pour tester l'hypothèse selon laquelle la distribution particulière des espèces monoinsaturées entre les deux tissus zygotiques pourrait être la conséquence de l'expression tissu spécifique de SAD présentant des activités catalytiques différentes, nous avons voulu étudier l'activité des sept isoformes d'Arabidopsis.

Plusieurs approches peuvent être envisagées pour déterminer la/les réaction(s) catalysée(s) par les différentes SAD d'Arabidopsis. La première approche présentée ici s'appuie sur une expression hétérologue des SAD dans les feuilles de tabac, la seconde repose sur l'étude de mutants, enfin la troisième utilise des méthodes *in silico*.

3.1 Expression hétérologue des SAD d'Arabidopsis dans les feuilles de tabac

Les feuilles de tabac contiennent une très faible proportion d'acides gras monoinsaturés de type n-7 (0,4% de 16:1 n-7 et 0,3% de 18:1 n-7) (Vanhercke et al., 2012). Elles constituent donc un matériel de choix pour caractériser les SAD produisant ce type d'acide gras monoinsaturé. Les sept séquences codantes des SAD d'Arabidopsis ont été clonées et exprimées transitoirement dans des feuilles de tabac (*Nicotiana benthamiana*) sous contrôle d'un promoteur *35S_{dual}*. Cinq jours après agroinfiltration, la composition en acides gras de la feuille peut être analysée par chromatographie en phase gazeuse. Le rapport n-7/n-9 des acides gras des feuilles de tabac transfectées avec chacune des SAD ou avec les vecteurs contrôles (vecteur helper P19 seul ou associé à un construit

Chapitre IV

exprimant l'*ENOLASE plastidiale (ENOp)*) est alors calculé. Le ratio n-7/n-9 des feuilles de tabac transfectées avec des vecteurs exprimant *SAD1*, *SAD5*, *SAD6* et *FAB2* est proche de 1 et identique à celui des contrôles (Figure 4.14). En revanche, dans les feuilles de *N. benthamiana* transfectées avec des vecteurs exprimant *SAD2*, *SAD3* ou *SAD4*, le ratio n-7/n-9 atteint respectivement des valeurs de 17,5 , 10 et 3,4 significativement plus élevées que celles des contrôles (Figure 4.14). Ces résultats démontrent que *SAD2*, *SAD3* et *SAD4*, autrement dit les SAD du clade II, sont capables de produire des acides gras monoinsaturés en n-7 *in vivo* en système hétérologue, contrairement aux SAD du clade I et à *SAD6*.

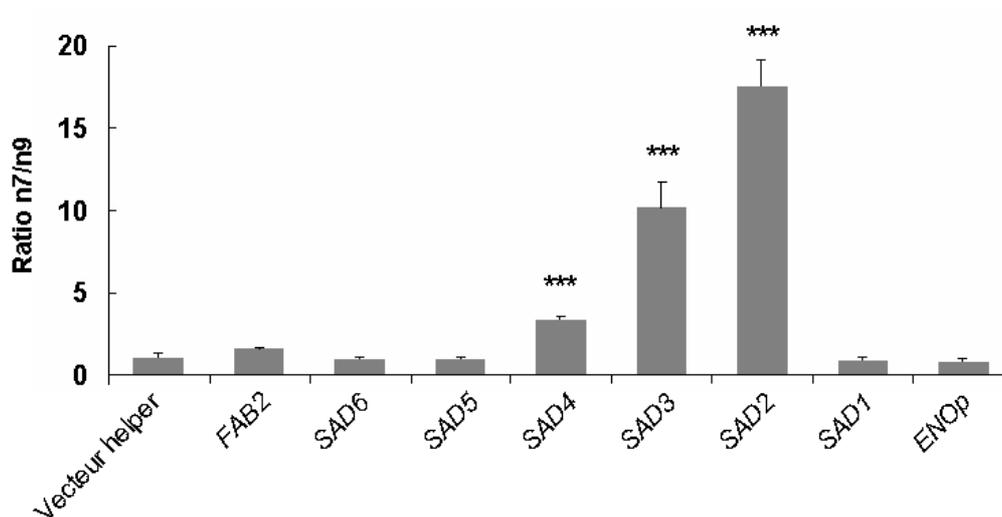


Figure 4.14. Ratio des acides monoinsaturés en n-7 et en n-9 de feuilles de tabac (*Nicotiana benthamiana*) transfectées avec des vecteurs permettant l'expression transitoire des différents gènes *SAD* d'*Arabidopsis*.

Des feuilles de tabac ont été transfectées avec les différents gènes *SAD* sous contrôle d'un promoteur de type *35S_{dual}*. Pour chaque type de vecteur, une co-transformation avec un vecteur « helper » de type *p19* est réalisée. Le rôle de ce vecteur est de limiter les effets de silencing dans le tabac. L'ADNc codant l'énolase plastidiale (*ENOp*) d'*Arabidopsis* a été utilisé comme contrôle négatif. Après cinq jours de croissance en serre, le contenu en acides gras des feuilles transfectées est analysé par chromatographie en phase gazeuse. Le ratio n-7/n-9 est calculé. *** indique une différence significative par rapport au vecteur « helper » seul avec une *p*-value inférieure à 0,1%.

Chapitre IV

3.2 Etude de mutants *sad*

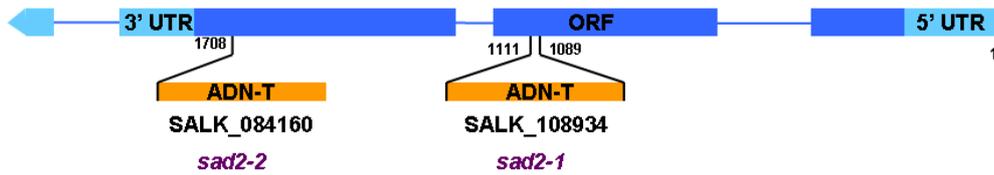
Afin de déterminer la fonction de chacune des SAD d'*Arabidopsis in planta*, une collection de mutants d'insertion (ADN-T) pour chaque gène a été générée (Figure 4.15). La caractérisation moléculaire des insertions ADN-T a tout d'abord été effectuée. Pour le gène *SAD1*, deux allèles ont été isolés : la lignée SALK_079807, appelée *sad1-1*, dont l'ADN-T est inséré dans le premier intron et la lignée Wisc DsLox 485-488, appelée *sad1-2*, et dont l'ADN-T est inséré dans le troisième exon (Figure 4.15a). Concernant le gène *SAD2*, la lignée SALK_108934, appelée *sad2-1* et présentant un ADN-T inséré dans le deuxième exon du gène, et la lignée SALK_084160, appelée *sad2-2* et présentant un ADN-T inséré dans le troisième intron du gène, ont été retenues (Figure 4.15b). Sur les trois lignées ADN-T disponibles dans les bases de données pour le gène *SAD3*, seules deux séquences flanquantes ont pu être confirmées. L'allèle SALK_067280, appelé *sad3-1*, possède un ADN-T inséré dans le premier intron du gène et l'allèle SAIL_604A06, appelé *sad3-2*, possède un ADN-T inséré dans le troisième exon du gène *SAD3* (Figure 4.15c). Pour le gène *SAD4*, deux lignées ont été retenues, l'une possédant une insertion dans le premier exon du gène (SALK_104404 ou *sad4-1*) et l'autre une insertion dans le deuxième exon (SAIL_638B01 ou *sad4-2*) (Figure 4.15d). En ce qui concerne le gène *SAD5*, une lignée GABI_153F01, appelée *sad5-1*, dont l'ADN-T est inséré dans le troisième intron du gène et une lignée SALK_035968, appelée *sad5-2*, dont l'ADN-T est inséré dans le dernier exon du gène, ont été sélectionnées (Figure 4.15e). Pour le gène *SAD6*, aucune lignée ADN-T possédant une insertion dans la séquence codante du gène n'était disponible. Seule la lignée SALK_070018, appelée *sad6-1*, et possédant un ADN-T inséré en position -77 par rapport au site d'initiation de la transcription a été retenue (Figure 4.15f). Des analyses préliminaires en RT-PCR quantitative effectuées sur des ADNc de graines de *sad6-1* montrent une forte diminution des transcrits *SAD6* chez ce mutant (Figure 4.15h). Enfin, deux lignées d'insertion dans le gène *FAB2* ont été considérées : SAIL-209D07, appelée *fab2-1* et possédant un ADN-T inséré dans le deuxième exon du gène, et SALK_036854, appelée *fab2-2* et possédant un ADN-T inséré dans le deuxième intron du gène (Figure 4.15g). L'ensemble de ces lignées ont été amenées à l'état homozygote pour pouvoir réaliser (i) une caractérisation moléculaire et confirmer que ce sont bien des lignées mutantes, voire des allèles forts et (ii) des analyses phénotypiques. Au niveau développemental, seuls les allèles *fab2-1* et *fab2-2* présentent un phénotype : les plantes sont naines. Ce phénotype a déjà été décrit pour des mutants EMS *fab2* (Kachroo et al., 2001) (Figure 4.15i).

Chapitre IV

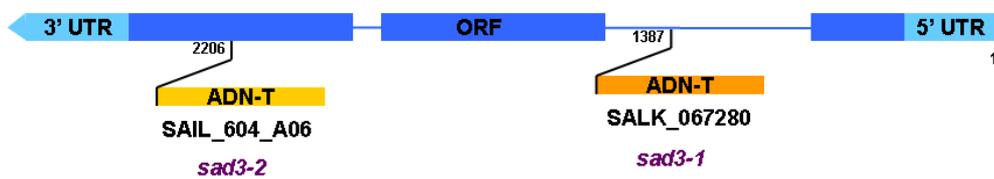
(a) *SAD1* (At5g16240)



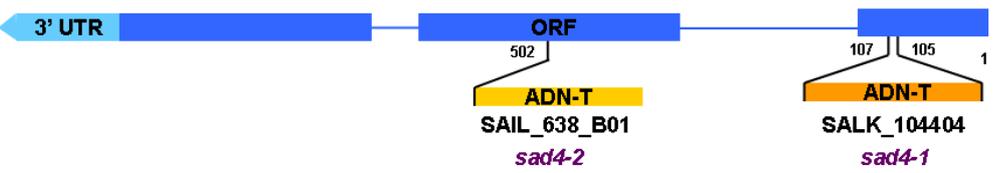
(b) *SAD2* (At3g02610)



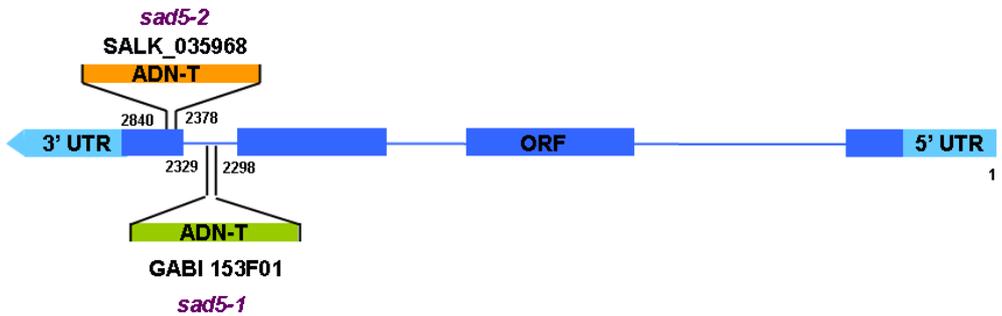
(c) *SAD3* (At5g16230)



(d) *SAD4* (At3g02620)



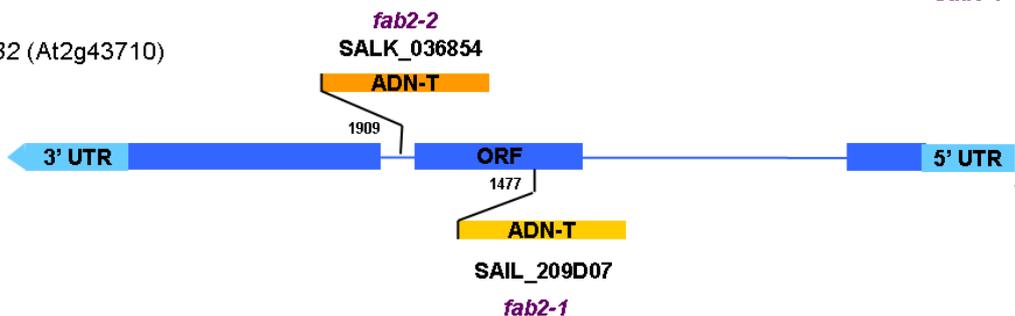
(e) *SAD5* (At3g02630)



(f) *SAD6* (At1g43800)



(g) *FAB2* (At2g43710)



Chapitre IV

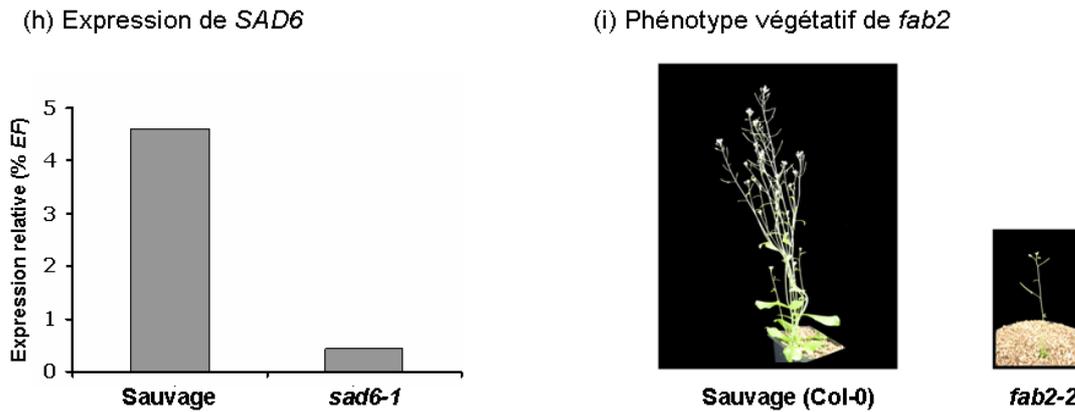


Figure 4.15. Caractérisation moléculaire de mutants d'insertion pour les sept gènes *SAD* d'*Arabidopsis* (en fond Col-0).

La structure intron (trait)/exon (barre) de chaque gène est représentée schématiquement de même que la position de chaque insertion ADN-T. La position exacte de chaque ADN-T au sein de la séquence codante est indiquée par rapport au site d'initiation de la transcription. (a) Représentation du gène *SAD1* avec la position des insertions ADN-T des mutants SALK_079807 (*sad1-1*) et Wisc DsLox 485-488 (*sad1-2*). (b) Représentation du gène *SAD2* avec la position des insertions ADN-T des mutants SALK_108934 (*sad2-1*) et SALK_084160 (*sad2-2*). (c) Représentation du gène *SAD3* avec la position des insertions ADN-T des mutants SALK_067280 (*sad3-1*) et SAIL_604_A06 (*sad3-2*). (d) Représentation du gène *SAD4* avec la position des insertions ADN-T des mutants SALK_104404 (*sad4-1*) et SAIL_638_B01 (*sad4-2*). (e) Représentation du gène *SAD5* avec la position des insertions ADN-T des mutants GABI 153F01 (*sad5-1*) et SALK_035968 (*sad5-2*). (f) Représentation du gène *SAD6* avec la position de l'insertion ADN-T du mutant SALK_070018 (*sad6-1*). (g) Représentation du gène *FAB2* avec la position des insertions ADN-T des mutants SAIL_209_D07 (*fab2-1*) et SALK_036854 (*fab2-2*). (h) Niveau d'expression de *SAD6* en fond sauvage et en fond mutant *sad6-1* étudiée par RT-PCR quantitative sur des graines âgées de 12 jours après floraison. (i) Phénotype végétatif du mutant *fab2-2*.

D'après les analyses de séquences présentées précédemment (Figure 4.8), les *SAD* d'*Arabidopsis* s'organisent en deux clades (Kachroo et al., 2007) qui pourraient présenter des redondances fonctionnelles importantes. Nous avons donc choisi de construire les doubles et triples mutants au sein de chaque clade (Figure 4.16a). Pour chaque double mutant, deux combinaisons alléliques sont générées.

Pour le clade I, les doubles mutants *sad1 sad5* et *sad1 fab2* ont été obtenus à l'état homozygote. En revanche, le double mutant *sad5 fab2* n'a jamais pu être obtenu. L'observation du contenu des siliques de plantes homozygotes *sad5/sad5* et hétérozygote *fab2/FAB2* montre qu'un quart des graines présentes dans la silique ont avorté. Elles correspondent vraisemblablement aux graines doubles homozygotes *sad5/sad5 fab2/fab2*. Pour déterminer l'origine de cet arrêt de développement, une étude plus approfondie du processus de reproduction des plantes *sad5/sad5 fab2/FAB2* a été entreprise. Tout d'abord, le développement du gamétophyte mâle ne semble pas

Chapitre IV

affecté comme l'atteste la coloration d'Alexander réalisée sur des étamines de plantes *sad5/sad5 fab2/FAB2* : tous les grains de pollen sont viables (Figure 4.16b). De même, le développement du gamétophyte femelle semble se dérouler normalement (Figure 4.16c). Cependant, 25% des graines observées en descendance (correspondant vraisemblablement aux individus *sad5 fab2*) présentent un arrêt très précoce du développement de l'embryon (au stade globulaire quand les embryons contrôles sont au stade torpille) suggérant une létalité embryonnaire précoce en réponse à la double mutation *sad5 fab2* (Figure 4.16c). Le triple mutant ne pourra donc pas être envisagé pour ce clade.

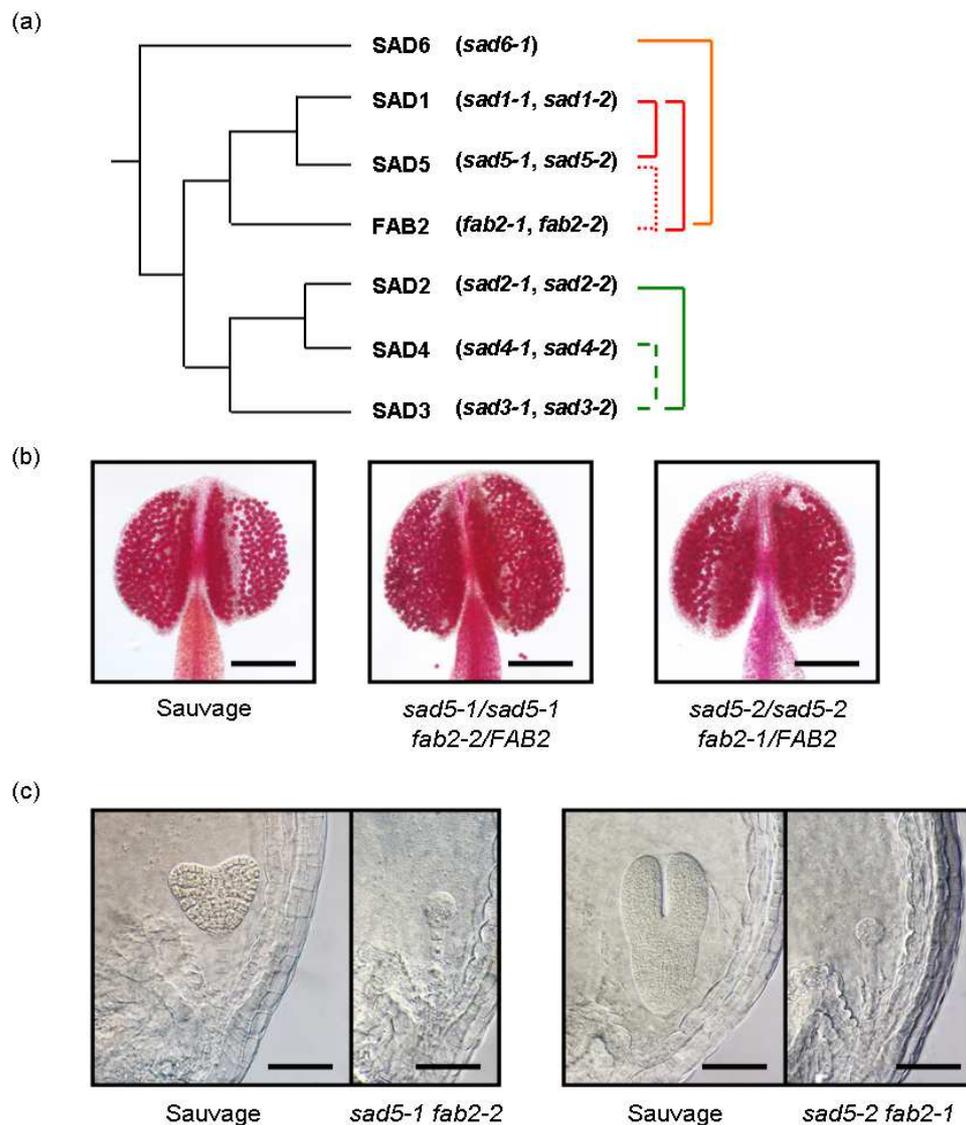


Figure 4.16. Doubles mutants *sad*.

(a) Représentation schématique des doubles mutants *sad* en cours de construction. Les doubles mutants en cours de construction au sein du clade I sont représentés en rouge et ceux du clade II en vert. En orange, sont représentés les doubles mutants *sad6 fab2*. (b) Test d'Alexander sur des étamines sauvages, *sad5-1/sad5-1 fab2-2/FAB2*, ou *sad5-2/sad5-2 fab2-1/FAB2*. Barre = 200 μ m. (c) Observation en Nomarski d'embryons sauvages et *sad5 fab2* en début de maturation. Barre = 30 μ m.

Chapitre IV

Pour le clade II, le double mutant *sad2 sad3* est disponible à l'état homozygote, *sad4 sad3* est en cours d'obtention. Le double mutant *sad2 sad4* n'a pu être obtenu, les gènes *SAD2* et *SAD4* étant côte à côte sur le chromosome 3. De même, aucun triple mutant ne pourra être généré pour ce clade.

Enfin, le gène *SAD6*, qui n'appartient à aucun clade, semble tout de même se rapprocher du clade I d'après son patron d'expression et sa séquence (Figure 4.16). Les doubles mutants *fab2 sad6* sont en cours d'obtention.

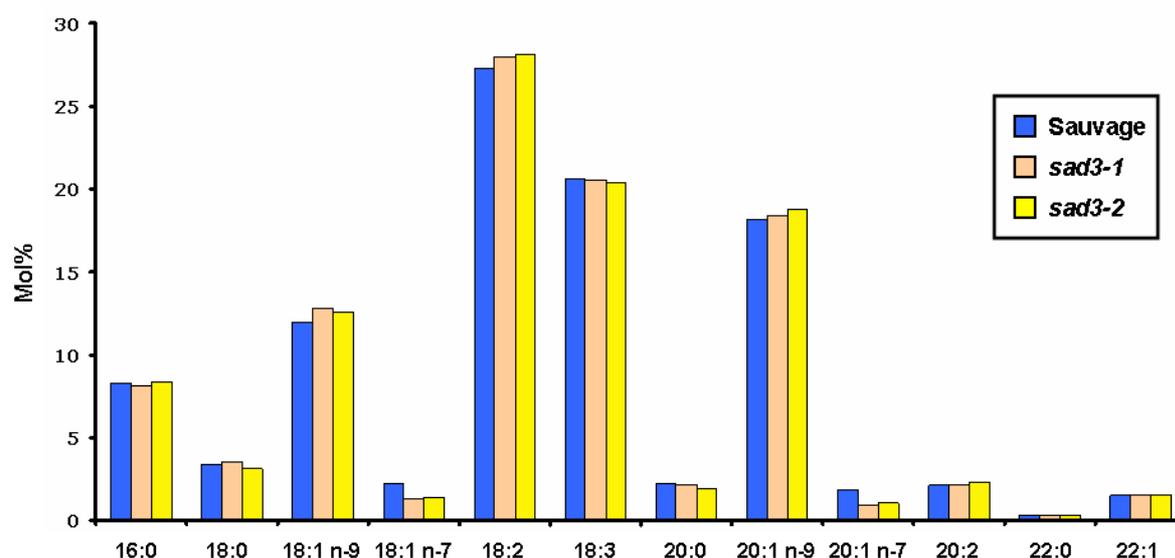


Figure 4.17. Résultats préliminaires présentant la composition en acides gras d'une graine sèche chez le sauvage (Col-0), *sad3-1* et *sad3-2*.

La composition en acides gras a été analysée par chromatographie en phase gazeuse sur des pools de 20 graines.

Prochainement, tous les génotypes mutants seront cultivés en conditions contrôlées afin de déterminer le profil en acides gras de leurs graines (embryon et fraction albumen) puis dans différents organes par chromatographie en phase gazeuse. La figure 4.17 présente les résultats préliminaires obtenus pour les mutants *sad3*. Chez ces derniers, la teneur en acides gras monoinsaturés de type n-7 est réduite de près de 50% par rapport au sauvage, suggérant l'implication de *SAD3* dans la production d'acyl-ACP monoinsaturés en n-7. Ces premières données confirment les résultats obtenus lors de l'expression hétérologue de *SAD3* dans les feuilles de tabac (Figure 4.14).

Chapitre IV

En fonction des résultats obtenus, les analyses pourront être approfondies notamment en séparant les différentes classes de lipides (phospholipides, sphingolipides, lipides chloroplastiques (MGDG, DGDG),...). De telles analyses ont déjà été conduites pour le mutant *fab2* (Kachroo et *al.*, 2001), il serait intéressant de les poursuivre pour chaque mutant *sad*.

3.3 Modélisation de la structure tridimensionnelle des SAD

La structure tridimensionnelle de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin ayant été déterminée par cristallographie, les différents résidus du site catalytique entourant la poche du substrat ou impliqués dans la fixation de l'ACP ou encore du groupement carboxyl de la chaîne acylée ont pu être déterminés (Linqvist et *al.*, 1996). Par alignement des séquences protéiques des sept SAD d'*Arabidopsis* avec celle de la SAD de ricin (Clustal W2, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), il est possible d'établir des correspondances entre résidus (Figure 4.18). L'ensemble des résidus impliqués dans la fixation des atomes de fer, de l'ACP ou encore du groupement carboxyl sont conservés chez les SAD d'*Arabidopsis* par rapport au ricin. De même, les acides aminés bordant la poche hydrophobe accueillant l'acyl-ACP de toutes ces SAD sont rigoureusement identiques, exceptés ceux situés à son extrémité (Figure 4.18). Sur la base de ces variations, deux grands groupes peuvent être distingués. (i) Les SAD dont les résidus de l'extrémité de la poche sont identiques à ceux de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin (en bleu dans le tableau). Ce groupe correspond au clade I augmenté de SAD6. (ii) Les SAD dont les résidus de l'extrémité de la poche sont pour partie différents de ceux de la désaturase de ricin (en rouge, orange et jaune dans le tableau). Ce groupe correspond au clade II. SAD2 et SAD3 diffèrent de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin par trois acides aminés (T181 remplacé par F, P179 remplacé par S et M114 remplacé par T) dont les chaînes latérales présentent un encombrement stérique plus important (Figure 4.18). SAD4 diffère de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin et des deux autres SAD de son clade par cinq acides aminés (F189 remplacé par Y, L115 remplacé par M, T181 remplacé par Y, P179 remplacé par T, M114 remplacé par V) dont les chaînes latérales présentent un encombrement stérique supérieur ou égal. Ces données suggèrent une réduction de la taille de la poche hydrophobe accueillant le substrat chez les SAD du clade II.

Chapitre IV

		<i>Ricinus communis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>							
			SAD6	SAD1	SAD5	FAB2	SAD3	SAD2	SAD4	
Site catalytique (liant Fe)		E105	E130	E135	E137	E143	E140	E150	E133	
		E229	E254	E259	E268	E267	E284	E274	E257	
		E196	E221	E226	E228	E234	E231	E241	E224	
		H146	H171	H176	H178	H184	H181	H191	H174	
		E149	E168	E173	E175	E181	E178	E188	E171	
		H232	H257	H262	H271	H270	H267	H277	H260	
Poche hydrophobe de l'acyl-ACP	Avant les 2 atomes de Fe	W139	W164	W169	W171	W177	W174	W184	W167	
		T192	T217	T222	T225	T230	T227	T237	T220	
		Y111	Y136	Y141	Y143	Y149	Y146	Y156	Y139	
		M114								
		Y191	Y216	Y221	Y224	Y229	Y226	Y236	Y219	
		Q195	Q220	Q225	Q227	Q233	Q230	Q240	Q223	
		P266	P291	P296	P298	P304	P301	P311	P294	
		T199	T224	T229	T231	T237	T234	T244	T227	
		T104	T129	T134	T136	T142	T139	T149	T132	
	Après les 2 atomes de Fe	Y292	Y317	Y322	Y324	Y336	Y327	Y337	Y320	
		M265	M290	M295	M297	M303	M300	M310	M292	
		F279	F304	F309	F311	F317	F314	F324	F307	
		S283	S308	S313	S315	S321	A318	A328	A311	
	Extrémité de la poche	L118	L143	L148	L150	L156	L153	L163	L146	
		F189	F214	F219	F221	F227	F224	F234	Y217	
		L115	I140	I145	L147	L153	L150	L160	M143	
		T117	T142	T147	T149	T155	T152	T162	T145	
		G188	G213	G218	G220	G226	G223	G233	G216	
		T181	T206	T211	T213	T219	F216	F226	Y209	
		P179	P204	P209	P211	P217	S214	S224	T207	
		M114	M139	M144	M146	M152	T149	T159	V142	
		Fixation de l'ACP	D325	E350	D355	D357	D363	E361	D371	D354
			R329	G354	T359	T361	T367	T365	T375	T358
	R333		R358	R363	R365	R371	R369	R379	R362	
	Interaction avec le groupe carboxyl	D280	D305	D310	D312	D318	D315	D325	D315	
		S283	S308	S313	S315	S321	A318	A328	A318	
		T293	T318	T323	T325	T331	T328	T338	T328	

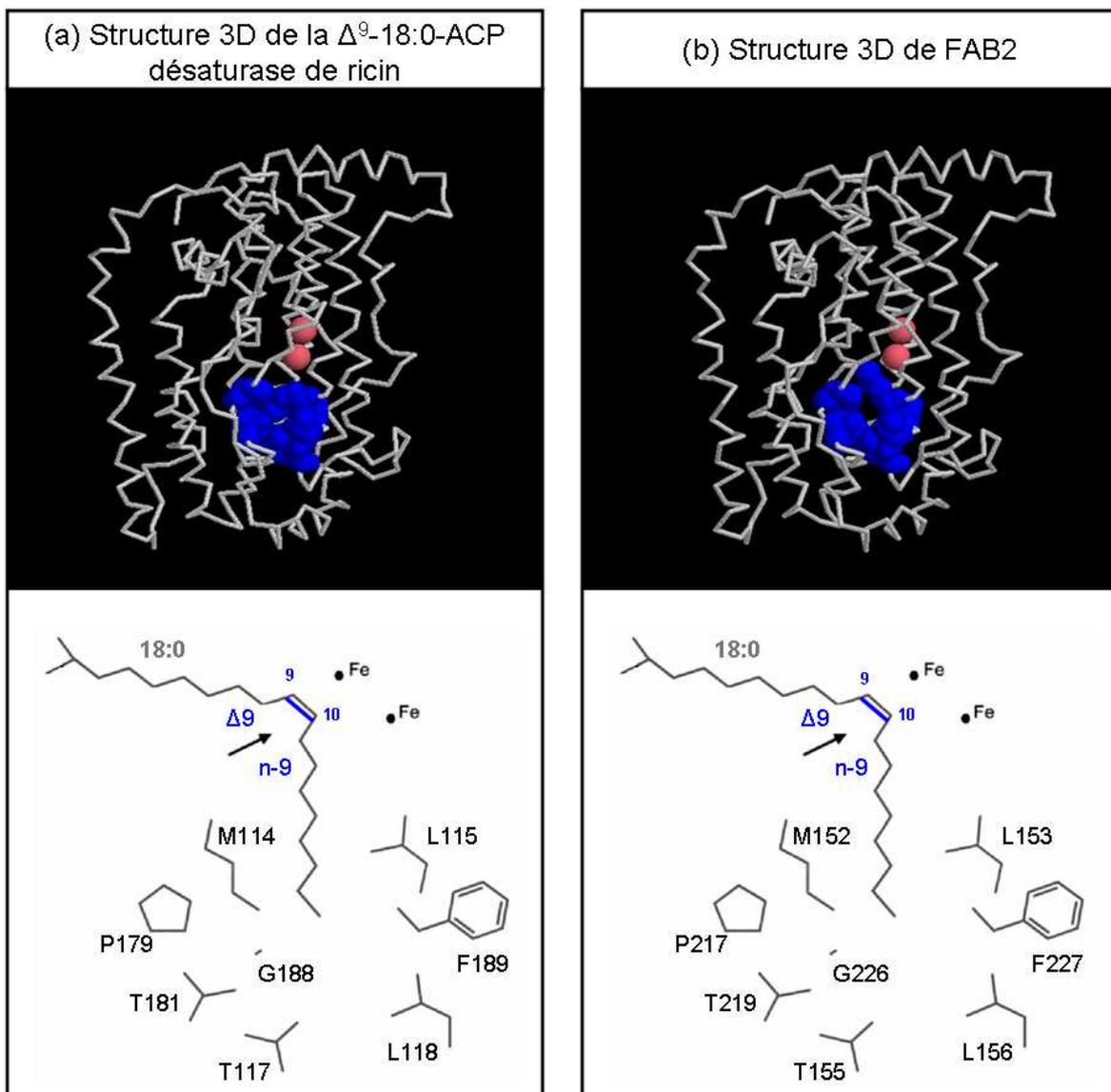
Figure 4.18. Tableau de correspondance des résidus entre les différentes SAD d'Arabidopsis et la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin (*Ricinus communis*) (Lindqvist et al., 1996).

L'alignement a été réalisé grâce au programme ClustalW (Annexe 4, figure A4.1).

Pour étayer cette hypothèse, la structure tridimensionnelle des sept SAD d'Arabidopsis a été modélisée (SWISS-MODEL, <http://swissmodel.expasy.org/>) en utilisant comme référence la structure cristallographique de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin (Lindqvist et al., 1996). La structure tridimensionnelle globale de toutes les SAD d'Arabidopsis rejoint celle de la SAD de ricin (Figure 4.19 et Annexe 4, Figure A4.3). En ce qui concerne les résidus formant l'extrémité de la poche hydrophobe, la position de leur chaîne latérale est exactement identique chez FAB2 et la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin (Figure 4.19a et b), ce que suggéraient déjà les alignements de séquences. Le même constat a été fait en ce qui concerne SAD1, SAD5 et SAD6 (Annexe 4, figures A4.3a, b et c). En revanche, pour SAD3, la chaîne latérale de F216 fait saillie au sein de la poche,

Chapitre IV

réduisant sensiblement la longueur de celle-ci (Figure 4.19a et c). Le même constat a été fait en ce qui concerne le résidu F226 de SAD2 (Annexe 4, Figure A4.3d). Enfin, parmi les nombreuses modifications d'acides aminés de SAD4, Y209 projette sa chaîne latérale au centre de la poche réduisant la longueur de celle-ci de manière analogue à ce qui peut être observé chez SAD2 et SAD3 (Figure 4.19d). Les données de modélisation semblent confirmer l'hypothèse précédente, à savoir une réduction de la taille de la poche hydrophobe accueillant le substrat et plus précisément une réduction de sa profondeur chez les SAD du clade II.



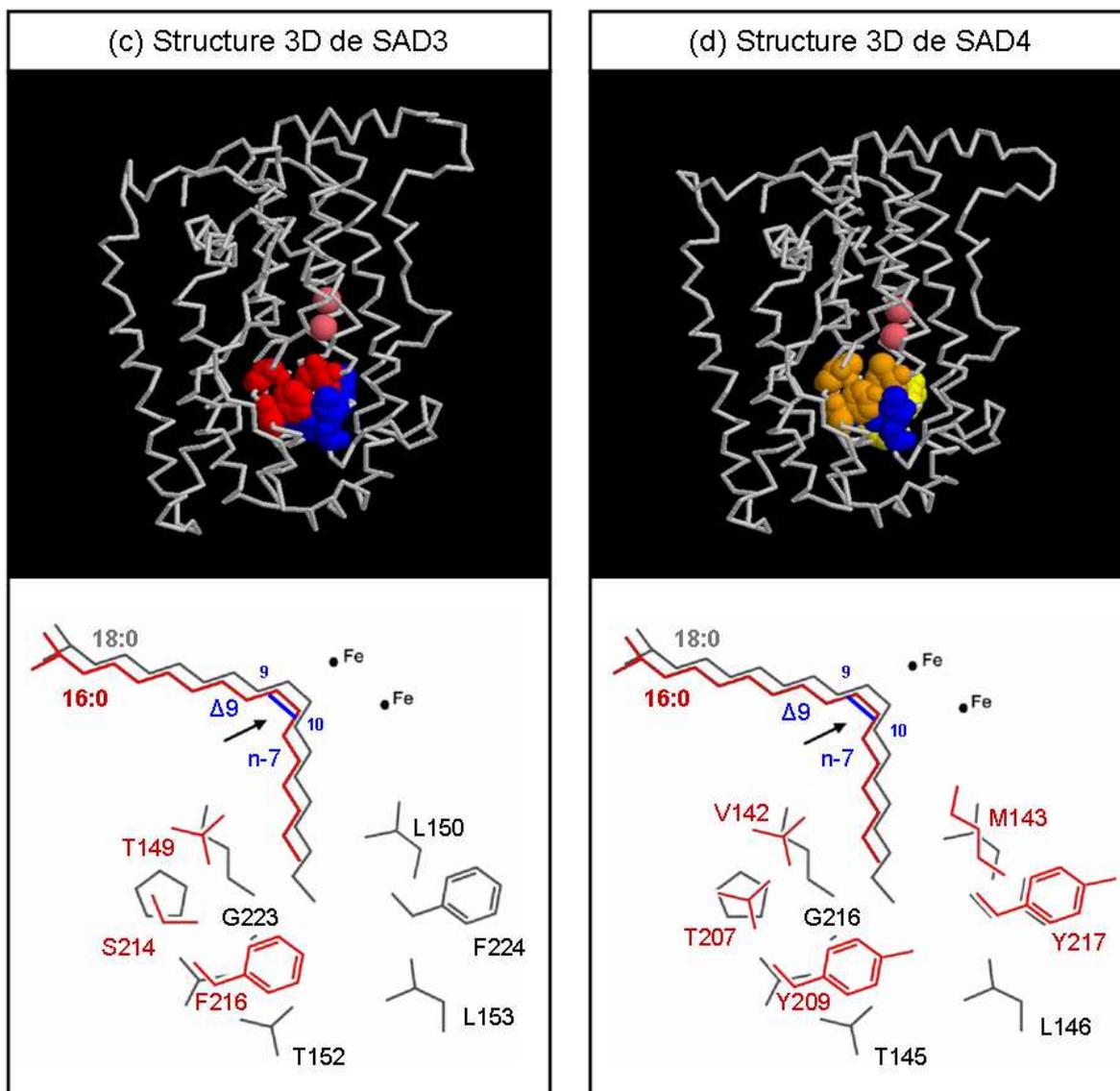


Figure 4.19. Modélisation de la structure tridimensionnelle d'un monomère de FAB2, SAD3 et SAD4 d'Arabidopsis.

Les structures tridimensionnelles de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin (*Ricinus communis*) (Lindqvist et al., 1996) (a), de FAB2 (b), de SAD3 (c) et de SAD4 (d) sont présentées. La structure des SAD d'Arabidopsis a été modélisée grâce à l'application SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) en utilisant la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin comme référence. Le squelette carboné de la chaîne polypeptidique est représenté sous forme de bâtonnets. Les deux atomes de fer sont figurés en rose. Les résidus formant l'extrémité de la poche hydrophobe sont représentés sous forme de sphères colorées. Les diagrammes associés présentent uniquement les résidus formant l'extrémité de la poche du substrat et les deux atomes de fer du site catalytique. Les résidus présentés en gris sont identiques à ceux de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin utilisée comme référence. Les résidus représentés en rouge sont ceux qui diffèrent. Le positionnement du substrat 16:0 et 18:0 au sein de la poche est matérialisé (Diagramme modifié d'après Cahoon et Shanklin, 2000).

Chapitre IV

En 1998, Cahoon et collaborateurs (1998) comparaient la structure des SAD de ricin et de la liane patate (*Doxantha unguis-cati*). Ils ont montré que l'ensemble des résidus formant la poche hydrophobe des deux enzymes sont identiques, excepté le résidu L118 du ricin remplacé par W118 chez *D. Unguis-cati*. Cette seule modification d'acide aminé a pour effet de réduire la profondeur de la poche hydrophobe (Annexe 4, Figure A4.4a). De plus, l'introduction de la mutation L118W chez la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin augmente son activité vis à vis du 16:0-ACP et diminue son activité vis à vis du 18:0-ACP (Annexe 4, Figure A4.4b). Parallèlement, les mêmes auteurs ont montré qu'une modification de la glycine 188 en leucine change la spécificité de substrat de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin : l'enzyme native utilise préférentiellement le 18:0-ACP alors que l'enzyme mutée G188L utilise préférentiellement le 16:0-ACP (Cahoon et *al.*, 2000) (Annexe 4, Figure A4.5).

Il semble donc que la profondeur de la poche hydrophobe soit en grande partie responsable de la spécificité de substrat des acyl-ACP désaturases. Une réduction de sa profondeur par l'encombrement stérique dû à la projection de chaînes latérales d'acides aminés en son sein ferait basculer la spécificité de substrat de l'enzyme du 18:0-ACP au 16:0-ACP. Bien que les substitutions d'acides aminés chez SAD2, SAD3 et SAD4 soient différentes de celles présentées ci-dessus, il est raisonnable de penser que la substitution d'une thréonine (T) en phénylalanine (F) ou tyrosine (Y), dont la chaîne latérale projetées au sein de la poche réduit la longueur de celle-ci (Figure 4.19), entraîne chez ces enzymes une modification de leur spécificité de substrat du 18:0-ACP vers le 16:0-ACP.

Les données publiées par Kachroo et collaborateurs (2007) viennent soutenir cette hypothèse. Les auteurs ont analysé la spécificité de substrat et la régiosélectivité de cinq des sept SAD d'*Arabidopsis in vitro*. FAB2, SAD1 et SAD5 utilisent préférentiellement le 18:0-ACP alors que SAD3 utilise préférentiellement le 16:0-ACP comme substrat (Annexe 4, Figure A4.6). L'activité enzymatique de SAD4 est très faible avec les deux substrats proposés (Annexe 4, Figure A4.6).

3.4 Bilan sur l'activité catalytique des SAD d'Arabidopsis

Malgré des données encore parcellaires, nous pouvons proposer un portrait robot pour chaque SAD.

Les SAD du clade I, à savoir FAB2, SAD1 et SAD5, sont phylogénétiquement proche de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin. Chez les mutants *fab2*, la proportion de 18:1, 18:2 et 16:3 chute quand

Chapitre IV

celle en 18:0 augmente (Kachroo et *al.*, 2001). Parallèlement, les auteurs ont pu montrer *in vitro* que FAB2 désature préférentiellement le 18:0-ACP en position Δ^9 (ou n-9) pour donner du 18:1 Δ^9 (Lightner et *al.*, 1994 ; Kachroo et *al.*, 2001). Les résidus constituant le site catalytique ou la poche de reconnaissance du substrat de FAB2, SAD1 et SAD5 sont identiques à ceux de la désaturase de ricin. Nous pouvons donc supposer que la spécificité de substrat et la régiosélectivité des SAD du clade I sont identiques à celles de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin, et donc de FAB2 : elles catalysent la désaturation du 18:0-ACP en position Δ^9 (aussi appelée n-9).

Les SAD du clade II, à savoir SAD2, SAD3 et SAD4, sont phylogénétiquement plus éloignées de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin que les SAD du clade I. Trois à cinq de leurs résidus situés à l'extrémité de la poche du substrat réduisent la profondeur de celle-ci par rapport à la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin, suggérant l'utilisation préférentielle de 16:0-ACP. De plus, l'expression hétérologue de ces trois gènes *SAD* dans les feuilles de tabac et les analyses préliminaires réalisées sur les mutants *sad3-1* et *sad3-2* montrent l'implication de SAD2, SAD3 et SAD4 dans la synthèse des acides gras monoinsaturés en n-7. L'ensemble de ces données nous permet d'émettre l'hypothèse suivante : les SAD du clade II seraient responsables de la désaturation de 16:0-ACP en position Δ^9 ou n-7 et donc à l'origine de la lignée des acides gras monoinsaturés en n-7. Si cette hypothèse est vérifiée, alors les stéaroyl-ACP désaturases (SAD) du clade II devraient être renommées palmitoyl-ACP désaturases car elles utilisent préférentiellement le palmitoyl-ACP (16:0-ACP) et non du stéaroyl-ACP (18:0-ACP).

Pour rendre compte des observations effectuées sur les profils en acides gras des différents compartiments de la graine, chez le sauvage (Figure 1.4) ou chez les mutants *sad3* (Figure 4.17), nous avons élaboré un modèle de travail (Figure 4.20). Les acides gras insaturés dérivent du 16:0-ACP par élongation *via* la kéto-acyl synthase II (KASII) dans le plaste ou les KCS dans le réticulum endoplasmique. Le 16:1 n-7 serait issu de la désaturation du 16:0-ACP en Δ^9 par les SAD du clade II. Allongé par KASII puis les KCS, il est à l'origine des acides gras monoinsaturés en n-7 (18:1 n-7 et 20:1 n-7). Le 18:1 n-9 est issu de la désaturation du 18:0-ACP en Δ^9 par les SAD du clade I. Allongé par les KCS, il est à l'origine des acides gras monoinsaturés en n-9 (20:1 n-9 et 22:1 n-9). Désaturé à nouveau par les désaturases d'acides gras (FAD) dans le réticulum, il est à l'origine des acides gras polyinsaturés (18:2, 18:3). Ce modèle demandera à être conforté par l'étude fine des mutants préparés et par les expériences d'expression hétérologue et de complémentation prévues (voir 3.5, ci-dessous).

Chapitre IV

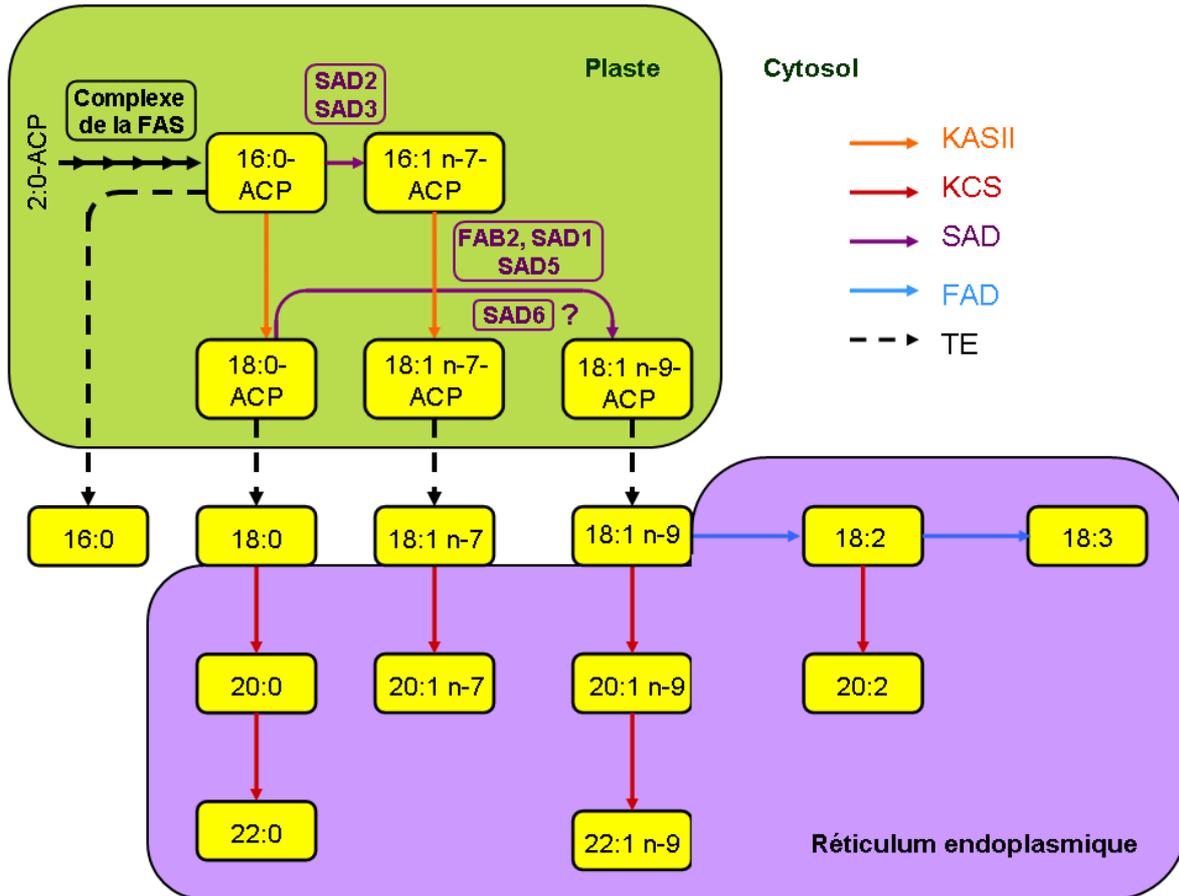


Figure 4.20. Représentation schématique de l'origine des différents acides gras de la graine d'Arabidopsis et rôle hypothétique des différentes SAD.

Le complexe de l'acide gras synthase (FAS) produit du 16:0-ACP qui peut être allongé en 18:0-ACP par la KETOACYL-CoA SYNTHASEII (KASII) dans le plaste. Le 16:0-ACP ou le 18:0-ACP peuvent être désaturés par des acyl-ACP désaturases plastidiales (SAD) donnant naissance au 16:1 n-7-ACP et au 18:1 n-9-ACP, respectivement. Le 16:1 n-7-ACP est alors allongé par KASII pour former du 18:1 n-7-ACP. Le 18:0, le 16:0, le 18:1 n-7 et le 18:1 n-9 peuvent être transférés dans le cytosol après l'intervention d'une thioestérase (TE). Dans le réticulum endoplasmique, ces différents acyl-CoA pourront être allongés grâce à la 3-KETOACYL-CoA SYNTHASE (KCS) du complexe de l'élongase. SAD2 et SAD3 seraient responsables de la synthèse de 16:1 n-7-ACP à partir de 16:0-ACP et FAB2, SAD1 et SAD5 seraient responsables de la synthèse de 18:1 n-9-ACP à partir de 18:0-ACP. SAD4 étant très faiblement exprimée et ayant une activité très faible (Kachroo et *al.*, 2007), elle n'a pas été représentée. Le 18:2 correspond au 18:2 *cis*- $\Delta^{9,12}$ et le 18:3 correspond au 18:3 *cis*- $\Delta^{9,12,15}$ (D'après Nguyen et *al.*, 2010).

Chapitre IV

3.5 Perspectives concernant l'étude de l'activité catalytique des SAD

Pour aller plus loin dans la caractérisation de l'activité catalytique des SAD, plusieurs approches sont envisagées. La première consiste à valider *in vivo* l'activité catalytique des SAD du clade I comme nous avons pu le faire pour les SAD du clade II dans les feuilles de *N. benthamiana*. *E. coli* ne produisant pas naturellement de 18:1 n-9, elle constitue un organisme de choix pour caractériser les SAD produisant ce type d'acides gras monoinsaturés.

En système hétérologue bactérien, les gènes d'intérêt peuvent être exprimés grâce à un système *pET* dans une souche BL21 DE3 d'*E. coli*. Cao et collaborateurs (2010) ont montré que l'expression de *FAB2* dans cette souche en présence de 18:0 dans le milieu de culture permet la synthèse d'un nouvel acide gras, le 18:1 n-9 (Annexe 4, Figure A4.6). *FAB2* est donc capable de désaturer le 18:0 en position Δ^9 pour produire du 18:1 n-9. Ce système pourrait être utilisé pour caractériser l'activité catalytique de SAD1, SAD5 et SAD6.

Une seconde approche, à plus long terme et *in planta*, consistera à introduire dans le mutant *fab2*, les différents gènes de SAD sous contrôle du promoteur *35S α* ou du promoteur de *FAB2*. Ces constructions génétiques permettront de valider *in planta* l'activité catalytique des SAD en repérant les isoformes capables de se substituer à *FAB2* (par complémentarité du phénotype mutant) dont la fonction enzymatique est déjà parfaitement caractérisée.

IV - Régulation de l'expression des SAD d'Arabidopsis

4.1 Régulation de l'expression des gènes SAD d'Arabidopsis par MYB118

L'analyse du profil lipidique de la fraction albumen de graines sèches de mutants *myb118* (Figure 2.23c) montre une altération des proportions en acides gras monoinsaturés : le rapport n-7/n-9 passe de 0,8 chez le sauvage à 0,18 chez les mutants *myb118* (*myb118-1* et OE3). De plus, une augmentation significative de la teneur en 18:2 est observée. Pour tenter de comprendre ce phénotype au niveau moléculaire, nous avons étudié l'expression des différents gènes SAD en fond mutant *myb118*.

Chapitre IV

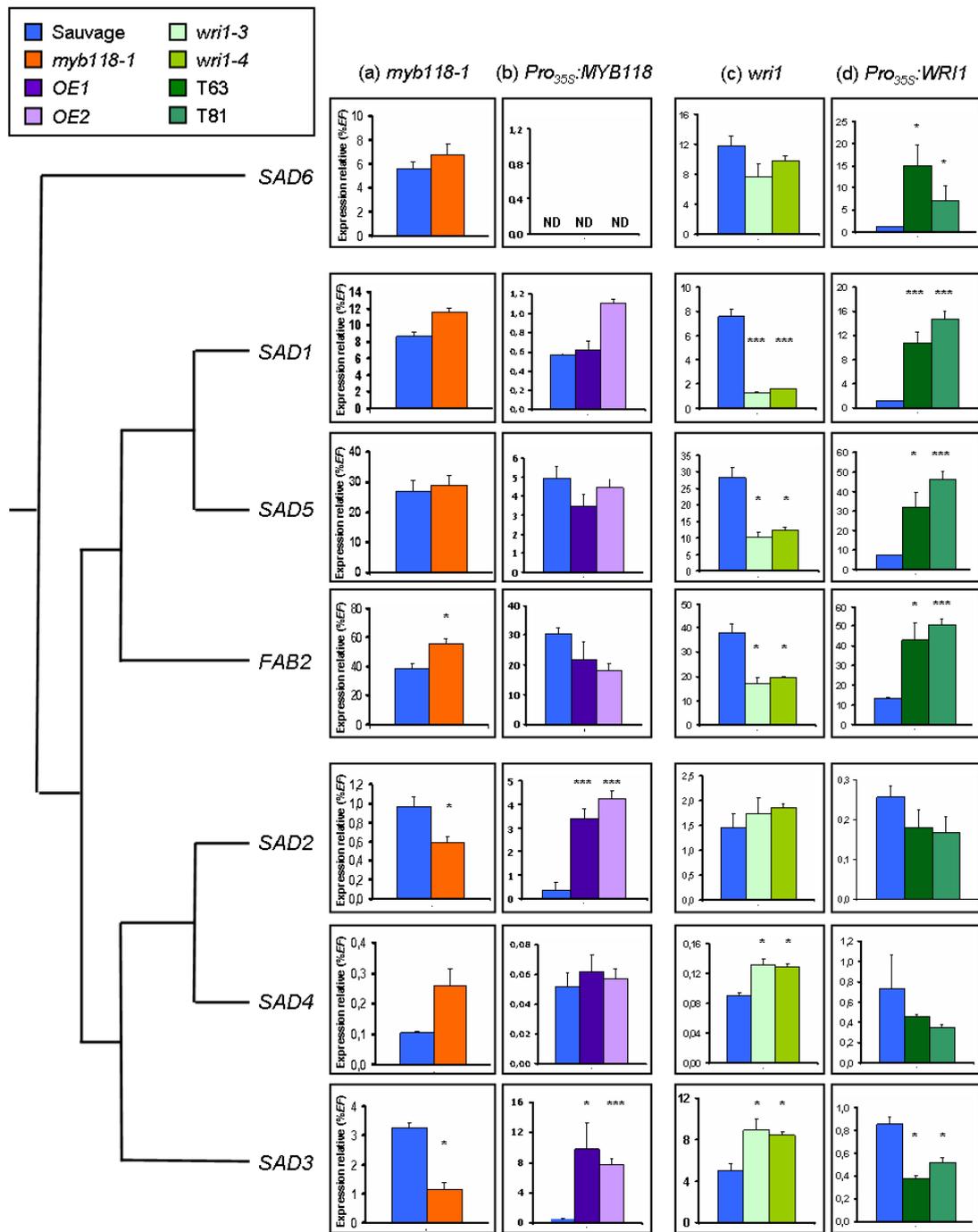


Figure 4.21. Expression relative des sept gènes *SAD* d'Arabidopsis dans divers fonds génétiques étudiée par RT-PCR quantitative.

(a) Expression des sept gènes *SAD* dans des graines âgées de 10 jours après floraison en fond sauvage et en fond mutant *myb118-1*. (b) Expression des sept gènes *SAD* dans des feuilles de rosette de plantes sauvages et de lignées surexprimant *MYB118* appelées OE1 et OE2. La caractérisation de ces lignées fait référence à la figure 2.17. (c) Expression des sept gènes *SAD* dans des graines âgées de 10 jours après floraison en fond sauvage et en fonds mutants *wri1-3* et *wri1-4*. (d) Expression des sept gènes *SAD* dans des feuilles de rosette de plantes sauvages et de lignées surexprimant *WRI1* appelées T63 et T81 (Baud et al., 2007). Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. *** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 0,1%. * indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 5%.

Chapitre IV

4.1.1 Expression des *SAD* en fond mutant *myb118*

Le niveau d'expression des différentes *SAD* a été mesuré en fond sauvage et en fond *myb118* dans des graines âgées de 10 JAF par RT-PCR quantitative (Figure 4.21). Seul le niveau de transcrits de *SAD2* et *SAD3* chute de manière significative en fond mutant (40% et 60% de baisse respectivement). Inversement, l'expression de *FAB2* et *SAD1* est légèrement augmentée. Le même type d'analyse a été réalisé sur des lignées surexprimant *MYB118* dans des feuilles de rosette, montrant une induction de l'expression de *SAD2* et *SAD3* dans cet organe (Figure 4.21). En ce qui concerne *SAD4*, aucune modification notable de son expression n'a pu être observée par les analyses en RT-PCR quantitative, son niveau d'expression étant par ailleurs extrêmement faible (Figure 4.21).

Pour préciser ces résultats, l'expression des sept gènes *SAD* a été mesurée dans l'embryon et dans la fraction albumen à 12 JAF en fond sauvage ou mutant *myb118-1* (Figure 4.22). L'accumulation des transcrits de *SAD2*, *SAD3* et *SAD4* est bien moindre dans la fraction albumen du mutant *myb118-1* que dans la fraction albumen du sauvage (d'un facteur 20, 4 et 13, respectivement). Inversement, deux fois plus de transcrits *FAB2* s'accumulent dans la fraction albumen de *myb118-1* que dans celle du sauvage. Ces données indiquent que les variations d'expression observées sur graines entières entre sauvage et mutant *myb118* sont dues à des modifications de l'expression de ces gènes dans la fraction albumen. Elles permettent également d'observer des variations fines mais significatives de l'expression de *SAD4* dans l'albumen (Figure 4.22).

Chapitre IV

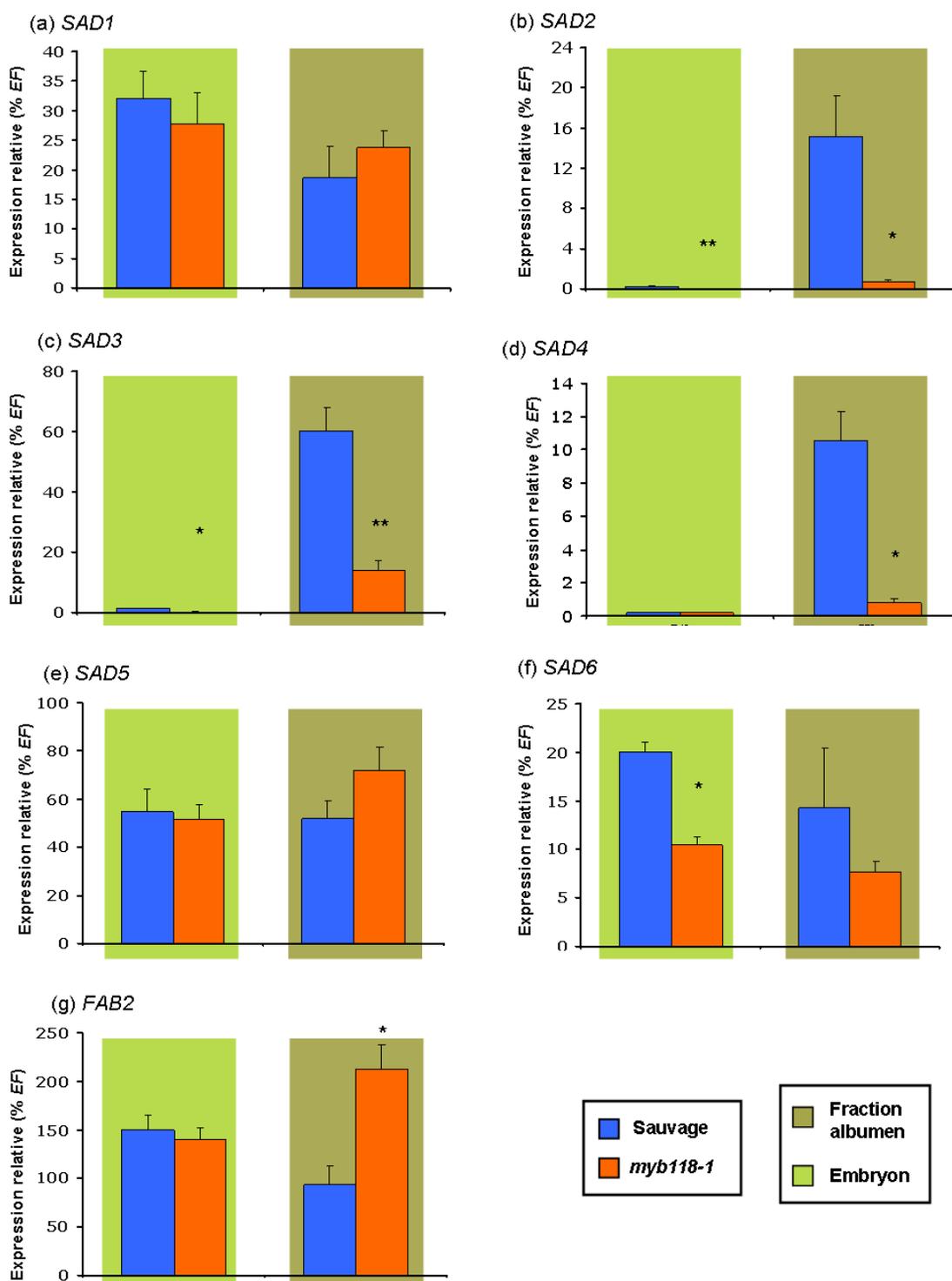


Figure 4.22. Expression relative des sept gènes *SAD* d'Arabidopsis dans les différentes fractions d'une graine âgées de 12 jours après floraison sauvage (Col-0) ou *myb118-1*, étudiée par RT-PCR quantitative.

L'expression de *SAD1* (a), *SAD2* (b), *SAD3* (c), *SAD4* (d), *SAD5* (f), *SAD6* (e) et *FAB2* (g) est présentée. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. *** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 0,1%. * indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 5%.

Chapitre IV

4.1.2 Activité du promoteur de *SAD3* en fond mutant *myb118-1*

Pour poursuivre cette étude, l'activité du promoteur de *SAD3* a été analysée en fond sauvage et en fond mutant *myb118-1* dans des graines âgées de 12 JAF grâce au construit *Pro_{SAD3}:uidA* introgressé dans ces deux fonds génétiques (Figure 4.23). La proportion de graines colorées ainsi que l'intensité de la coloration décroît dans l'albumen des graines *myb118-1* comparé à celui du sauvage. Ces résultats confirment les données de RT-PCR quantitative selon lesquelles MYB118 serait un activateur de l'expression de *SAD3*. Etant donnée la localisation de l'expression de *SAD3*, cantonnée à l'albumen chalazal, et la redondance fonctionnelle partielle qui existe entre MYB115 et MYB118, il serait intéressant d'introgresser le transgène *Pro_{SAD3}:uidA* en fond *myb118 myb115* pour compléter cette étude. Une approche identique est en cours concernant l'activité du promoteur de *SAD2*.

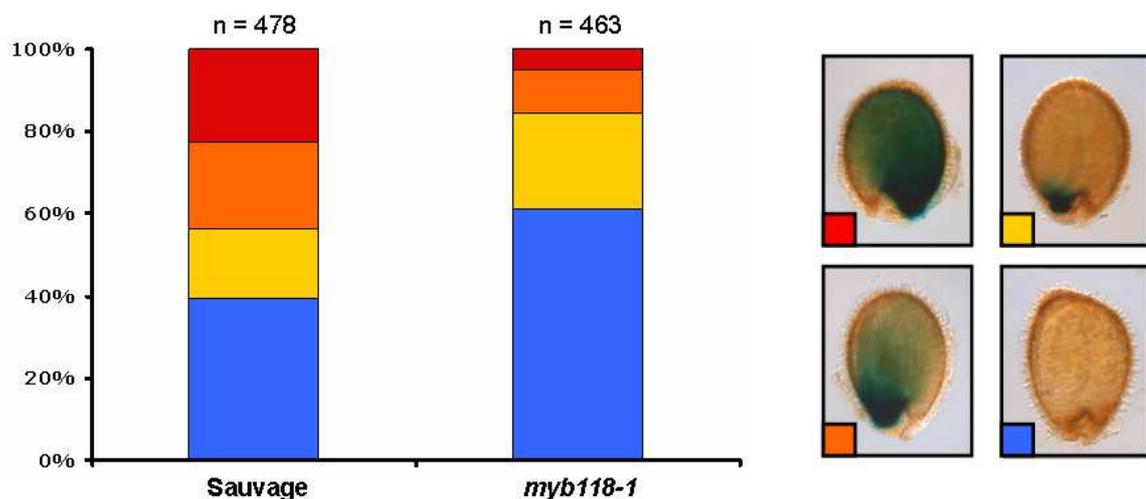


Figure 4.23. Activité du promoteur de *SAD3* dans des graines âgées de 12 JAF en fond sauvage ou en fond mutant *myb118-1*.

Comparaison de l'activité du promoteur de *SAD3* en fond sauvage et en fond mutant *myb118-1*. Les plantes utilisées sont hétérozygotes pour le construit *Pro_{SAD3}:uidA*, homozygotes pour la mutation *myb118-1*. Les graines ont été incubées une nuit dans un tampon phosphate contenant 2 mM de X-Gluc et 2 mM de ferrocyanure/ferricyanure de potassium puis 3 h dans un liquide de montage éclaircissant. Les observations microscopiques ont été réalisées à l'aide d'objectifs Nomarski. Le panel de droite représente les différentes catégories de coloration observées : bleu, aucune coloration décelable; jaune, une très faible coloration bleue pâle; orange, une coloration bleue homogène; rouge, une coloration bleue intense. Le graphique de gauche représente la proportion des différentes catégories de colorations pour chaque génotype (sauvage ou *myb118-1*).

Chapitre IV

4.1.3 Bilan

Pour résumer ces résultats, MYB118 régulerait positivement l'expression des gènes du clade II, en particulier de *SAD2* et *SAD3*, dans l'albumen. Ces *SAD* seraient impliquées dans la synthèse de 16:1 n-7 (ou Δ^9) à l'origine de la lignée des acides gras monoinsaturés en n-7 (Figure 4.20), ce qui permet de rendre compte du phénotype en acides gras des mutants *myb118* (Figure 2.23). Ces résultats sont en accord avec les données de l'analyse transcriptomique effectuée sur les mutants *myb118* (Figure 2.36) qui révèlent une forte diminution de l'expression de *SAD2* et *SAD3* en fond *myb118-1* et OE3. La baisse du ratio n-7/n-9 chez les mutants *myb118* est donc essentiellement due à une baisse de la teneur en acides gras monoinsaturés de type n-7, conséquence d'une expression réduite de *SAD2* et *SAD3*.

4.1.4 Interactions moléculaires

Afin d'aller plus loin dans la caractérisation de cette régulation de certains gènes *SAD* par MYB118, un test d'interaction physique par simple hybride en levure a été entrepris. Les séquences promotrices (1 kb) des sept gènes *SAD* ont été clonées en amont du gène rapporteur *HIS3* et les construits correspondants intégrés dans le génome de la levure. Aucune activation du gène rapporteur par des protéines de levure n'a été constatée. Les levures contenant les différentes constructions ont alors été transfectées avec un vecteur exprimant MYB118 fusionné au domaine transactivateur GAL4-AD. L'interaction de MYB118 avec ces promoteurs a été testée *via* la capacité de croissance des levures sur un milieu dépourvu d'histidine (Figure 4.24). Aucune des colonies de levure transfectées n'est capable de croître sur un milieu sans histidine, ce qui suggère que MYB118 seul n'est pas capable d'interagir physiquement avec les promoteurs testés en système simple hybride ou que la régulation étudiée *in planta* est indirecte (Figure 4.24).

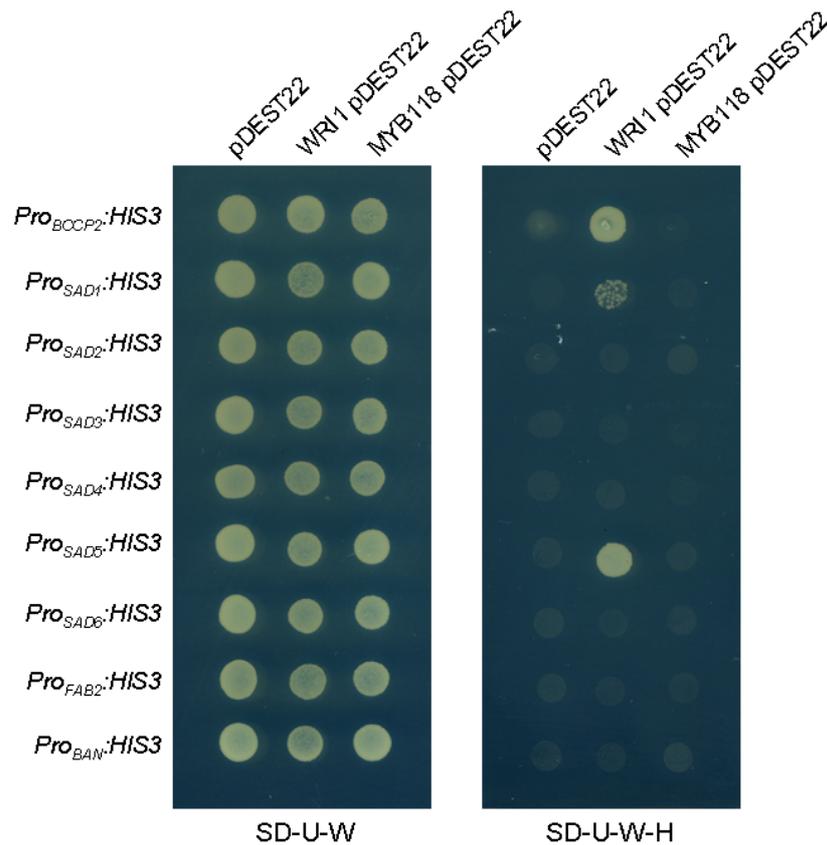


Figure 4.24. Analyse de l'interaction de MYB118 et de WRI1 avec les promoteurs (1000 pb) de *SAD1*, *SAD2*, *SAD3*, *SAD4*, *SAD5*, *SAD6* et *FAB2* étudiée en simple hybride.

Des souches de levures présentant le gène rapporteur *HIS3* sous le contrôle des différents promoteurs des gènes *SAD*, mais aussi du promoteur de *BAN* (contrôle négatif) et de *BCCP2* (contrôle positif) ont été préparées. Elles ont ensuite été transfectées avec le vecteur *pDEST22* vide, exprimant *MYB118* ou *WRI1*, sélectionnées sur milieu SD-U-W et finalement repiquées sur milieu SD-U-W-H pour tester l'activation du gène rapporteur. Les données présentées sont représentatives des résultats obtenus sur 6 colonies indépendantes. SD, Synthetic Defined medium ; U, Uracile ; H, Histidine ; W, Tryptophane.

4.2 Régulation de l'expression des gènes *SAD* d'Arabidopsis par *WRI1*

L'analyse du profil lipidique de graines sèches de mutants *wri1* (*wri1-3* et *wri1-4*) révèle une chute importante de la proportion d'acides gras monoinsaturés de type n-9 (Figure 4.25). Une analyse plus approfondie sur l'embryon et la fraction albumen montre que cette baisse est effective dans les deux compartiments : le rapport n-7/n-9 de l'embryon passe de 0,07 chez le sauvage à 0,2 chez *wri1* et le rapport n-7/n-9 de la fraction albumen passe de 0,8 chez le sauvage à 1,9 chez *wri1*. C'est un phénotype inverse à celui des mutants *myb118* décrit ci-dessus et impliquant peut-être lui aussi une dérégulation de l'activation transcriptionnelle de certaines *SAD*. L'étude de la régulation putative de certains gènes *SAD* par *WRI1* a donc été entreprise.

Chapitre IV

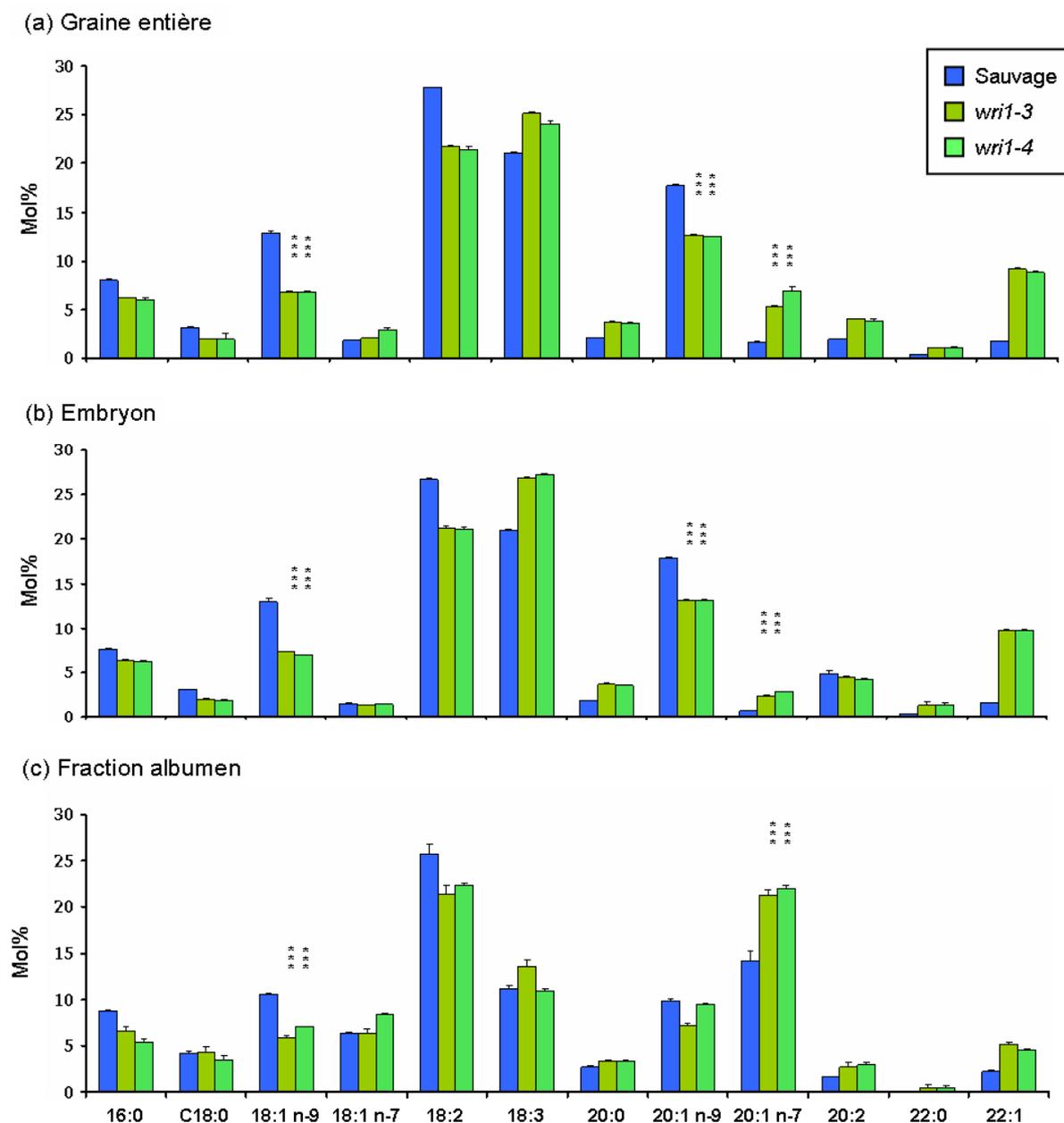


Figure 4.25. Composition en acides gras d'une graine sèche chez le sauvage (Col-0), et chez les mutants *wri1-3* et *wri1-4*.

La composition en acides gras de graines sèches entières (a), d'embryons excisés (b) ou de fractions albumen disséquées (c) a été analysée par chromatographie en phase gazeuse. Chaque barre correspond à la moyenne de cinq répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. *** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 0,1%.

Chapitre IV

4.2.1 Expression des SAD en fond mutant *wri1*

L'accumulation des transcrits des différents gènes *SAD* a tout d'abord été mesurée par RT-PCR quantitative dans des graines âgées de 10 JAF chez le sauvage et chez les mutants *wri1-3* et *wri1-4* (Figure 4.21). L'expression de *FAB2*, *SAD1* et *SAD5*, c'est à dire des gènes du clade I, diminue de plus de 50% en fond mutant *wri1*. Inversement, le niveau d'expression de *SAD3* et *SAD4* augmente de 80% et 50% respectivement en fond *wri1* par comparaison à celui observé chez le sauvage (Figure 4.21).

Le même type d'analyse a été réalisé dans des feuilles de rosette sur des lignées surexprimant *WRI1* (T63 et T81) (Baud et al., 2007). L'expression des gènes du clade I est fortement induite chez T63 et T81 confirmant les précédentes analyses en fond mutant. Ces résultats suggèrent une régulation positive des gènes du clade I par *WRI1*. De plus, *SAD6* semble lui aussi induit dans les feuilles de rosette des lignées surexprimant *WRI1* (Figure 4.21). Cependant son expression n'étant que faiblement diminuée dans les mutants *wri1*, nous ne pouvons conclure avec certitude quant à la régulation de l'expression de *SAD6* par *WRI1*. Enfin, le niveau d'expression des gènes du clade II déjà très faible dans les feuilles de rosette du sauvage, diminue légèrement dans les lignées T63 et T81 et de manière significative pour le gène *SAD3*.

En résumé, *WRI1* régulerait positivement les gènes du clade I, *FAB2*, *SAD1* et *SAD5*. Pour confirmer ces résultats, des analyses de l'activité des promoteurs de *FAB2*, *SAD1*, *SAD5* et *SAD6* en fond mutant *wri1* sont en cours. Elles devraient permettre de déterminer dans quel(s) compartiment(s) de la graine *WRI1* active l'expression de ses gènes cibles.

Les *SAD* du clade I seraient impliquées dans la synthèse de 18:1 Δ^9 ou n-9 dont dérive la lignée des acides gras monoinaturés de type n-9 et les acides gras polyinsaturés, ce qui permet de rendre compte du phénotype observé chez les mutants *wri1* (Figures 4.21 et 4.25).

4.2.2 Interactions moléculaires

Pour aller plus loin dans la caractérisation de cette régulation, un test simple hybride en levure a été entrepris dans les mêmes conditions que celles présentées en 3.4.2 en utilisant un vecteur exprimant *WRI1* fusionné au domaine transactivateur GAL4-AD (Figure 4.24). Le promoteur de *BCCP2* constitue un témoin positif d'interaction avec *WRI1*, et le promoteur de *BANYULS* (*BAN*) un témoin négatif. Seules les colonies exprimant le gène *HIS3* sous contrôle des promoteurs de *SAD1* et *SAD5* sont capables de croître sur un milieu sans histidine. Ces résultats indiquent que *WRI1* se

Chapitre IV

lie physiquement aux promoteurs de *SAD1* et *SAD5* en système hétérologue levure et confirment donc la régulation de ces deux gènes par WRI1 (Figure 4.24). En ce qui concerne le promoteur de *FAB2*, aucune interaction avec WRI1 n'a pu être constatée, bien que les données de RT-PCR quantitative obtenues (figure 4.21) suggèrent une régulation de celui-ci par WRI1. Deux hypothèses peuvent être proposées : soit WRI1 seul n'est pas capable d'interagir avec le promoteur de *FAB2* en système levure, soit la fraction de promoteur de *FAB2* utilisée pour réaliser le test est incomplète. Le promoteur de *FAB2* utilisé pour cette expérience est le même que celui utilisé pour les tests de coloration GUS (Figures 4.11 et 4.13) dont l'intensité était très faible comparativement au niveau d'expression mesuré par RT-PCR quantitative. Ceci pourrait conforter l'idée que nous n'avons pas utilisé un promoteur complet de *FAB2*.

Enfin, aucune des colonies de levure transfectées avec les promoteurs de *SAD6* ou des gènes du clade II n'est capable de croître sur un milieu sans histidine, ce qui suggère que WRI1 n'interagirait pas avec ces promoteurs, en système simple hybride (Figure 4.24).

4.3 Bilan et perspectives sur la régulation des gènes *SAD*

D'après les analyses de composition en acides gras et les données de RT-PCR quantitative, il semble que les gènes *SAD* du clade II soient activés par MYB118 dans la fraction albumen et que les gènes *SAD* du clade I soient régulés positivement par WRI1 dans l'embryon et la fraction albumen de la graine (Figure 4.26). Pour les gènes *SAD1* et *SAD5* du clade I, ces données sont confortées par les tests d'interaction en simple hybride. En ce qui concerne *SAD6*, les données obtenues jusqu'à présent ne sont pas suffisamment étayées pour conclure sur sa régulation, notamment par WRI1 (Figure 4.26).

Pour poursuivre la caractérisation de ces régulations, des approches analogues à celles présentées dans le paragraphe sur les cibles de MYB118 (Chapitre II paragraphes 3.3 et 3.4) seront entreprises. Ces démarches inclueront des tests d'activation en système hétérologue dans des feuilles de tabac et dans des protoplastes d'*Arabidopsis*. En outre, le test d'interaction en simple hybride ayant été positif pour deux des gènes du clade I régulés par WRI1, une expérience de gel retard est envisagée avec le domaine de fixation à l'ADN de la protéine WRI1 déjà produite et disponible au laboratoire (Baud et *al.*, 2009).

Chapitre IV

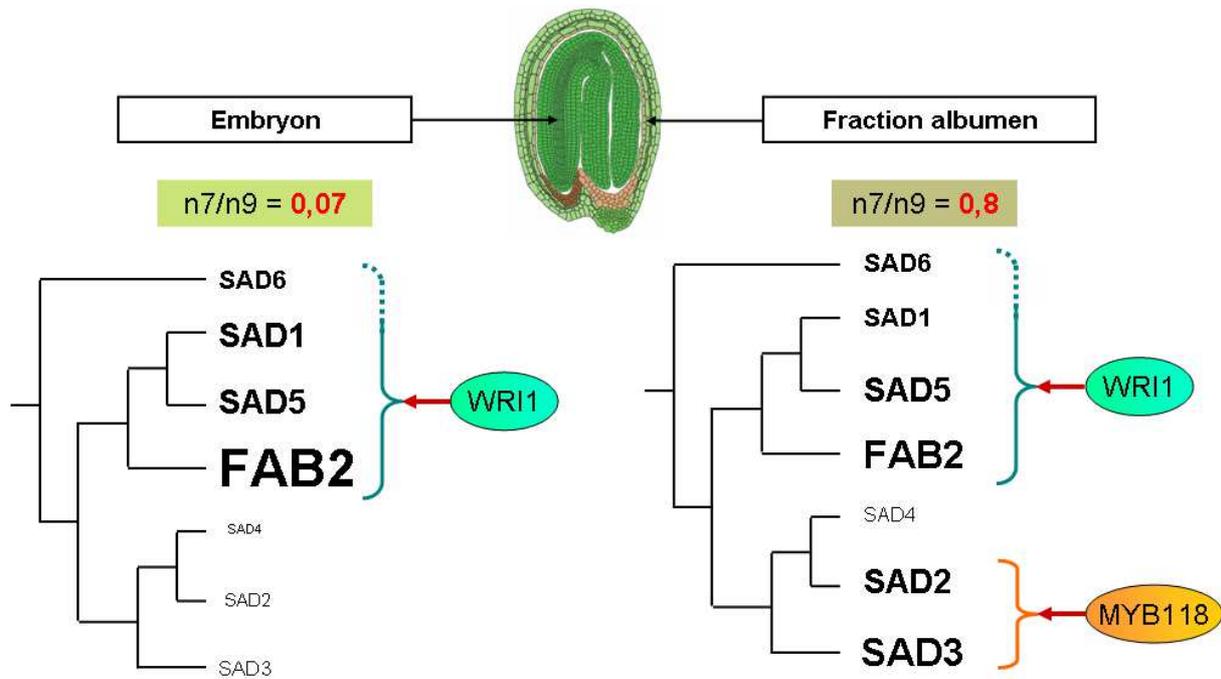


Figure 4.26. Représentation schématique de la régulation de l'expression des sept gènes *SAD* dans la graine d'*Arabidopsis*.

Les deux compartiments de la graine, embryon et fraction albumen sont représentés ainsi que le rapport $n7/n9$ ($18:1 n-7 + 20:1 n-7/18:1 n-9 + 20:1 n-9$) des acides gras qu'ils contiennent. La taille des caractères est proportionnelle à l'abondance relative des transcrits. La protéine MYB118, présente uniquement dans la fraction albumen, et WRI1, présente dans les deux compartiments de la graine, sont représentées. Les flèches indiquent des régulations positives. Les pointillés signifient que la relation présentée est faiblement étayée.

Enfin, *FAB2* étant, d'après son niveau d'expression mesuré par RT-PCR quantitative, la *SAD* prépondérante chez *Arabidopsis*, il semble nécessaire d'approfondir l'étude de son promoteur. En effet, les résultats des tests GUS et des tests d'interaction en simple hybride suggèrent que nous ne possédons pas le promoteur complet de *FAB2*. Plusieurs solutions peuvent être envisagées : (i) utiliser un fragment de promoteur plus long que celui employé jusqu'à présent (1 kb), (ii) utiliser une construction *Pro_{FAB2}:FAB2g::uidA* pour prendre en compte le fait que certaines séquences régulatrices pourraient se situer dans les introns ou dans la séquence codante.

Conclusion et perspectives générales

Il existe donc chez *Arabidopsis* deux types d'acides gras monoinsaturés, ceux en n-9, majoritaires, et dont dérivent les acides gras polyinsaturés, et ceux en n-7. L'incorporation d'acides gras monoinsaturés en n-9 dans les TAG, les phospholipides ou encore les sphingolipides est bien décrite (Li-Beisson et *al.*, 2010). Celle des acides gras en n-7 a uniquement été décrite dans les TAG (Penfield et *al.*, 2004 ; Li et *al.*, 2006).

FAB2 est, de toutes les *SAD* du clade I, celle qui semble avoir un rôle ubiquiste comme le montre le phénotype de ses mutants (Figure 4.15i) : (i) parce que *FAB2* est fortement exprimé et de manière ubiquitaire dans la plante et (ii) parce que l'activité de l'enzyme qu'il code est supérieure de plusieurs ordres de grandeur à celle des autres *SAD* du clade I (Kachroo et *al.*, 2007).

SAD1 et *SAD5* appartiennent comme *FAB2* au clade I. Leurs domaines d'expression est bien plus restreint que celui de *FAB2*. De plus, ces deux gènes ont des fonctions vraisemblablement partiellement redondantes avec celle de *FAB2* comme le montre la létalité embryonnaire du double mutant *fab2 sad5*. D'après les analyses préliminaires effectuées jusqu'à présent, *SAD1* et *SAD5* auraient la même activité catalytique que *FAB2*, à savoir la désaturation du 18:0 en n-9.

SAD2, *SAD3* et *SAD4* appartiennent aux *SAD* du clade II. Leur expression est majoritairement localisée dans l'albumen des graines en maturation. Les diverses études menées dans ce chapitre suggèrent qu'elles sont à l'origine de la désaturation des acides gras en position n-7.

De là, plusieurs questions peuvent être soulevées. Quel pourrait être le rôle physiologique de ces acides gras monoinsaturés en n-7 ? Peut-on les trouver dans d'autres lipides que les TAG ? Le matériel végétal généré au cours de ma thèse et présenté dans ce chapitre nous permettra d'explorer le rôle des deux types d'acides gras monoinsaturés (en n-7 et en n-9) dans la physiologie de la plante.

Chapitre V – Premières données sur WB3

Ce chapitre présente le travail préliminaire effectué sur un second facteur de transcription codé par *WB3* (*At1g26680*). Après une description précise de son patron d'expression, ce chapitre présentera quelques éléments de régulation ainsi que les premières données concernant sa caractérisation fonctionnelle.

I - Patron d'expression de *WB3*

WB3, comme *MYB118*, a été isolé à partir d'un crible transcriptomique sur la base d'une co-régulation avec les gènes codant *WRI1* et les enzymes de la voie de biosynthèse des acides gras dans la graine. Afin de préciser le patron d'expression de *WB3*, deux techniques ont été combinées : la RT-PCR quantitative et la fusion du promoteur de *WB3* avec le gène rapporteur *uidA*.

1.1 Etude de l'expression de *WB3* par RT-PCR quantitative

Dans un premier temps, l'expression de *WB3* a été analysée dans différents organes d'une plante sauvage (Col-0) (Figure 5.1). *WB3* est très faiblement exprimé dans les racines, les fleurs, la tige et les feuilles caulines (moins de 0,5% de *EF*). Ses transcrits n'ont pas pu être détectés dans les feuilles de rosette. En revanche, il est plus fortement exprimé dans les siliques à 8-12 JAF (entre 2 et 3% de *EF*). En conclusion, *WB3* serait exprimé préférentiellement dans les siliques en développement avec un pic d'expression au début de la phase de maturation de la graine.

Pour poursuivre la caractérisation du patron d'expression de *WB3*, une cinétique d'accumulation de ses transcrits a été réalisée sur des ADNc provenant de graines en développement isolées des siliques (Figure 5.2). L'abondance relative des transcrits *WB3* augmente entre 4 et 10 JAF pour atteindre près de 6,5% de *EF*, puis décroît d'abord faiblement entre 10 et 14 JAF (1,25% de *EF* par jour) puis plus fortement entre 14 et 16 JAF pour atteindre un niveau basal inférieur à 0,5% de *EF* à partir de 18 JAF. L'expression de *WB3* atteint donc un pic au début de la maturation de la graine.

Chapitre V

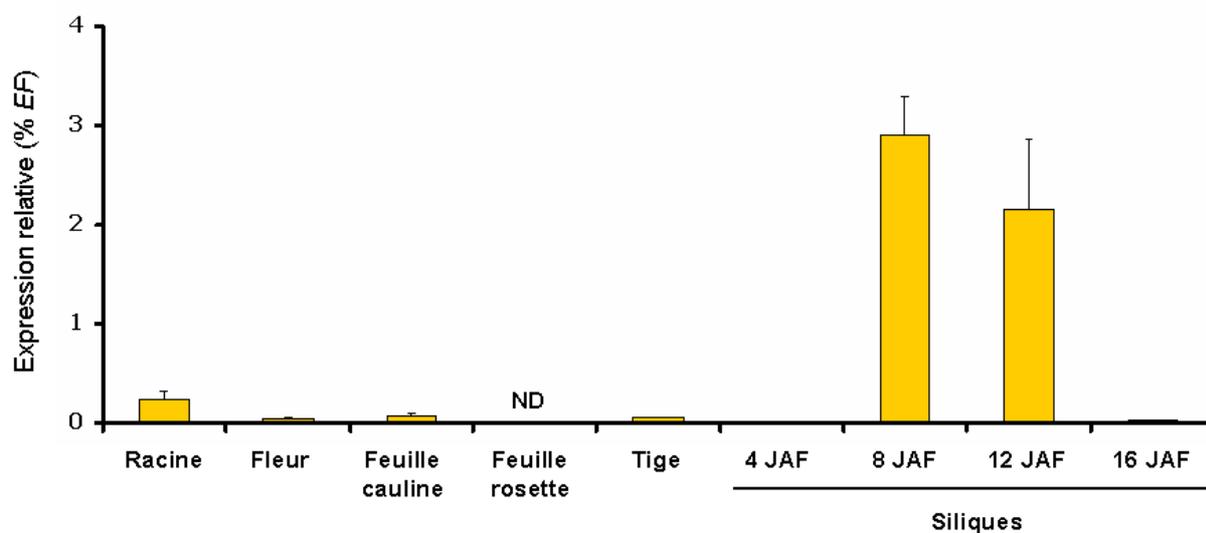


Figure 5.1. Accumulation des transcrits de *WB3* dans différents organes d'une plante sauvage (Col-0) étudiée par RT-PCR quantitative.

Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. JAF, Jours après floraison ; ND : non détecté.

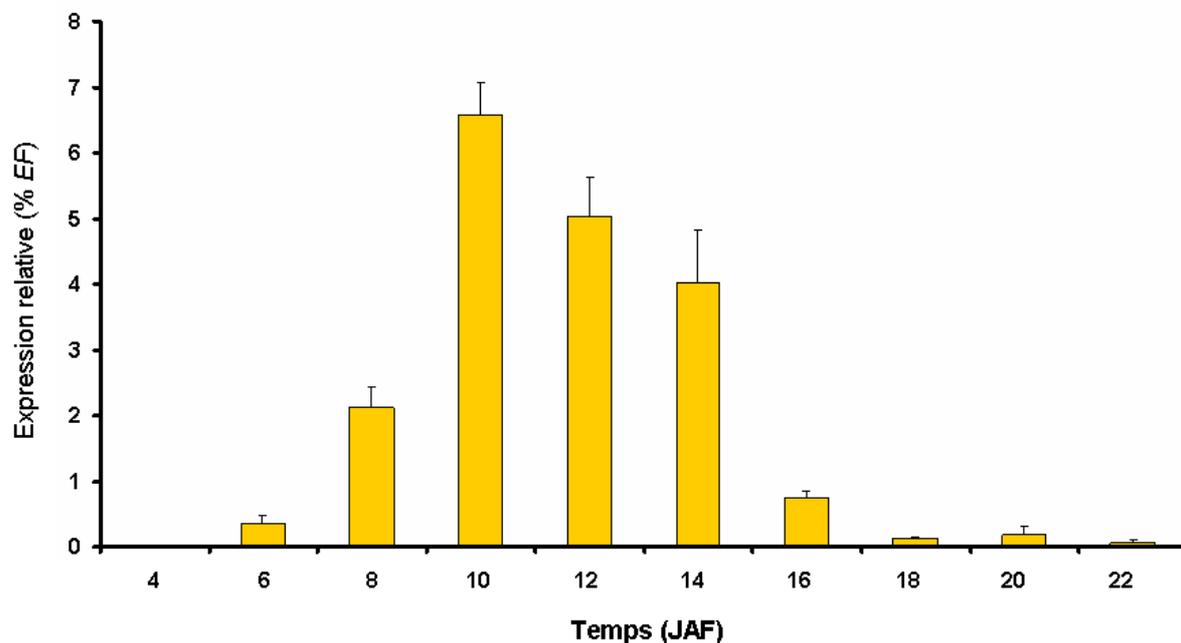


Figure 5.2. Cinétique d'accumulation des transcrits de *WB3* dans des graines en développement d'une plante sauvage (Col-0) analysée par RT-PCR quantitative.

Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. JAF, Jours après floraison.

Chapitre V

Ces données concordent avec les données transcriptomiques (AtGenExpress) et ressemblent aux patrons d'expressions de *WRI1*, *BCCP2* et *PKp-b2* (Baud et al., 2007).

1.2 Activité du promoteur de *WB3*

L'étude de l'activité du promoteur de *WB3* a été analysée en choisissant une séquence promotrice de 1 kb en amont du site d'initiation de la traduction. Amplifiée à partir d'ADN génomique d'une plante sauvage (Col-0), la séquence promotrice a été fusionnée au gène rapporteur *uidA* dans le vecteur *pBI101 Gateway* et la construction ainsi obtenue a été introduite en fond sauvage (Col-0). Onze transformants primaires ont été analysés.

Des tests de coloration GUS effectués sur les différents organes végétatifs et reproducteurs des plantes transformées montrent un précipité bleu seulement au niveau de la zone méristématique de l'inflorescence (Figure 5.3a). Une série de tests effectués sur des graines en développement montre une coloration bleue au niveau du méristème apical caulinaire ainsi que sur la marge externe des cotylédons de l'embryon entre 8 et 12 JAF, l'intensité de la coloration étant croissante au fur et à mesure que l'embryon grandit (Figures 5.3b à e). A 12 JAF, la coloration GUS est aussi visible au niveau du méristème apical racinaire (Figure 5.3d et f).

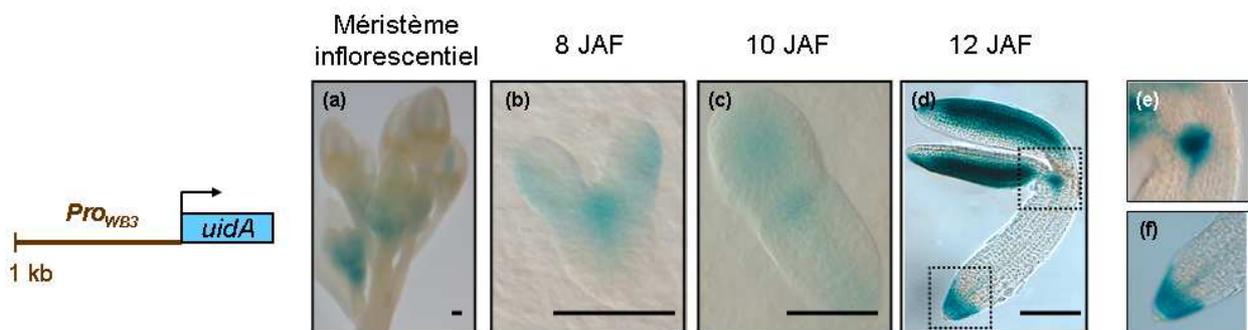


Figure 5.3. Analyse de l'activité β -glucuronidase (GUS) chez des plantes transgéniques *Pro_{WB3(1kb)}:uidA*.

Le méristème inflorescentiel (a) et les embryons âgés de 8 JAF (b), 10 JAF (c) et 12 JAF (d) ont été incubés une nuit dans un tampon phosphate contenant 2 mM de X-Gluc et 0,2 mM de ferrocyanure/ferricyanure de potassium, puis 3 h dans un liquide de montage éclaircissant. Les observations microscopiques ont été réalisées à l'aide d'objectifs Nomarski. Les photographies (e) et (f) présentent chacune un détail de la photographie (d), le méristème apical caulinaire et le méristème apical racinaire de l'embryon, respectivement. JAF, jours après floraison. Barre = 100 μ m.

Chapitre V

Ainsi, *WB3* semble très préférentiellement exprimé au niveau des méristèmes, le MAC pendant la floraison ou les méristèmes embryonnaires au cours de son développement. En cela, il diffère des patrons d'expression de *WRI1* et de ses cibles (Baud et *al.*, 2007). Pour compléter cette description, un test de coloration GUS pourrait être réalisé au niveau de l'apex racinaire de la plante.

II - Quelques éléments de régulation de l'expression de *WB3*

Des régulateurs de l'expression de *WB3* peuvent être recherchés selon une démarche analogue à celle engagée pour *MYB118*, en utilisant la collection de mutants des régulateurs maîtres présentée dans le chapitre II. Cette étude est encore en cours mais d'ores et déjà, l'expression de *WB3* chute en fond mutant *lec2* dans des graines âgées de 10 JAF (Figure 5.4). Comme pour *MYB118*, *LEC2* serait un activateur potentiel de l'expression de *WB3*. Cependant des données complémentaires sont nécessaires pour conforter ces premiers résultats.

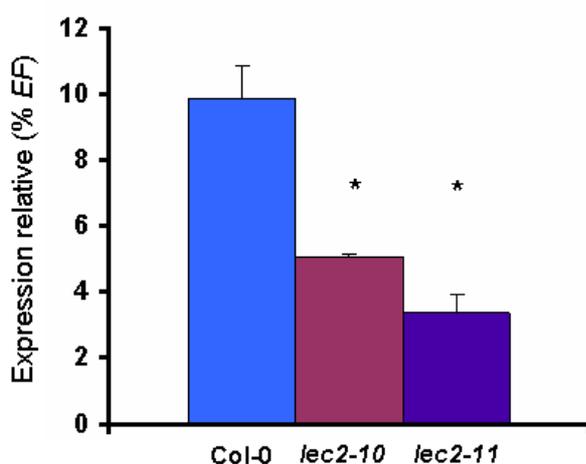


Figure 5.4. Expression relative de *WB3* dans des graines âgées de 10 jours après floraison chez des mutants *lec2* étudiée par RT-PCR quantitative.

Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. * indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 5%.

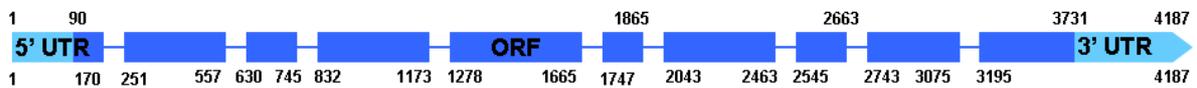
III - Caractérisation fonctionnelle de *WB3*

3.1 Caractérisation moléculaire de mutants *wb3*

3.1.1 Structure du gène *WB3* en fond *Ws*

Un des mutants dont nous disposons provient de la collection de mutants d'insertion de l'INRA de Versailles dans le fond génétique *Ws*. Préalablement à toute caractérisation moléculaire, nous avons entièrement séquencé le gène *WB3* dans ce second écotpe (Figure 5.5 et annexe 5). Comparé au gène *WB3* en fond *Col-0*, *WB3* en fond *Ws* présente de nombreuses substitutions nucléotidiques (84 sur 4191 nucléotides), mais aussi de nombreuses insertions et délétions dans les introns (deuxième, sixième, huitième, neuvième et dixième intron) et une insertion de 9 nucléotides (ne décalant pas le cadre de lecture) dans le quatrième exon (Figure 5.5b). Des prédictions bioinformatiques utilisant des programmes tels que 'getorf' ou 'showorf' (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/>) indiquent que la séquence du gène *WB3* dans l'écotype *Ws* possède un exon de plus à son extrémité 3' et que la position du codon stop s'en trouve décalée, augmentant la taille de la séquence codante de l'ARNm (Figure 5.5).

(a) Gène *WB3* en fond *Col-0*



(b) Gène *WB3* en fond *Ws*

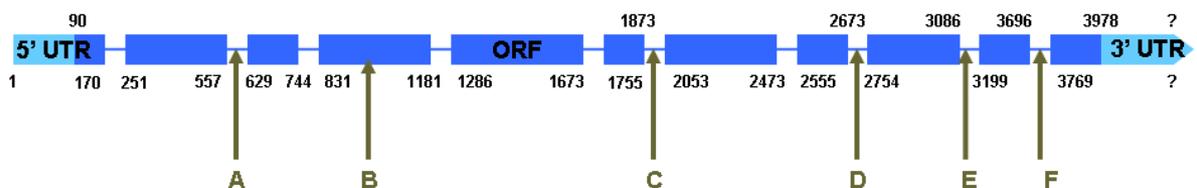


Figure 5.5. Comparaison de la séquence du gène *WB3* en fond *Col-0* et *Ws*.

(a) Représentation schématique de la structure intron (trait)/exon (barre) du gène *WB3* en fond *Col-0*. Les numéros du premier et dernier nucléotide de chaque exon ainsi que celui marquant le début de la traduction et la fin du codon stop sont indiqués. (b) Représentation schématique de la structure intron (trait)/exon (barre) du gène *WB3* en fond *Ws*. Les numéros du premier et dernier nucléotide de chaque exon ainsi que celui marquant le début de la traduction et la fin du codon stop sont représentés. Les délétions et insertions de nucléotides sont indiquées. A, délétion d'un nucléotide en position 622 ; B, insertion de 9 nucléotides en position 941 ; C insertion d'un nucléotide en position 1895 et de 2 nucléotides en position 1900 ; D, insertion d'un nucléotide en position 2718 ; E, insertion d'un nucléotide en position 3116 et délétion de 8 nucléotides en position 3148 ; F, délétion de 2 nucléotides en position 3708 et insertion d'un nucléotide en position 3762. Les substitutions nucléotidiques ne figurent pas sur cette représentation. La séquence complète du gène *WB3* en fond *Ws* est présentée dans l'annexe 5.

Chapitre V

3.1.2 Transcrits *WB3* en fond *Ws*

L'analyse des transcrits *WB3* par RT-PCR à l'aide des amorces *WB3.atg* et *WB3.stop* révèle la présence de deux ARNm de tailles différentes, seulement en fond *Ws* (Figure 5.6a et c). Le séquençage de ces deux variants a permis de préciser leur structure (Figure 5.6b). *WB3-A*, long de 3219 nucléotides, correspond bien à l'ARNm prédit de *WB3* (*Ws*) avec épissage de tous les introns. *WB3-B* correspond à un ARNm plus court (2868 nucléotides) issu de l'épissage supplémentaire du 3^{ème} exon et d'une partie du 2^{ème} et 4^{ème} exon.

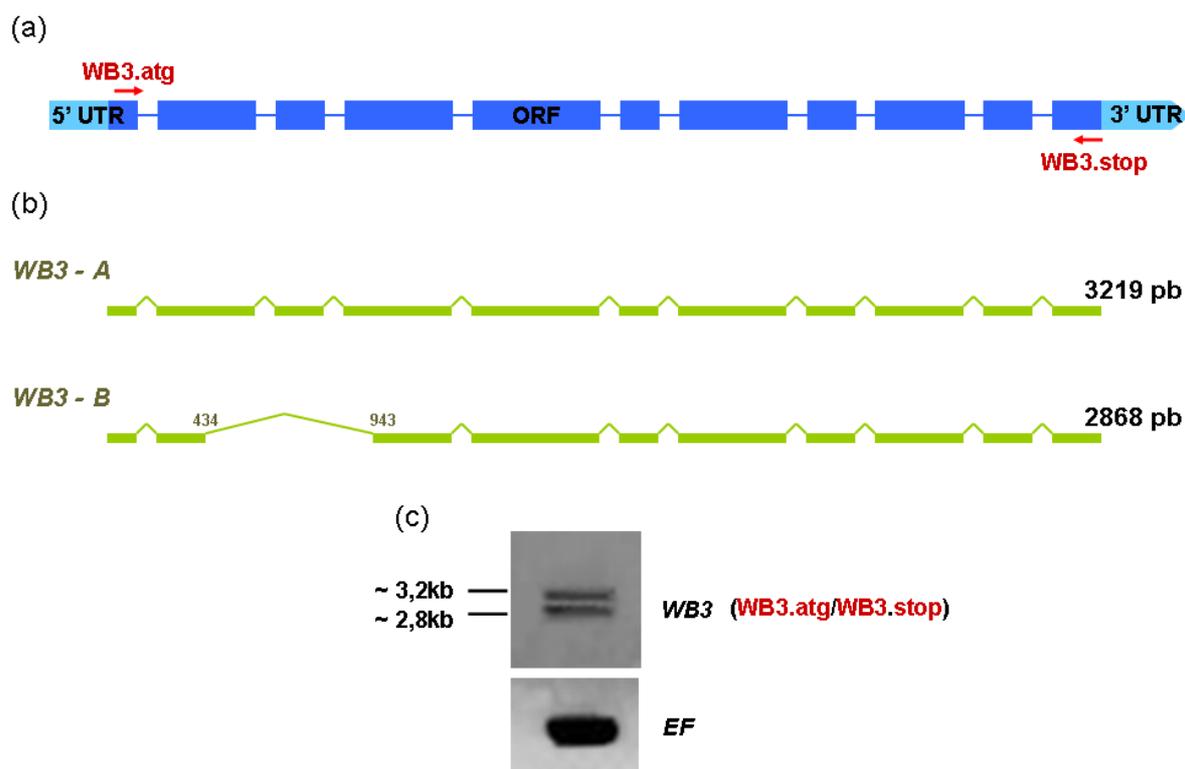


Figure 5.6. Analyse des transcrits *WB3* en fond *Ws*.

(a) Représentation schématique de la structure intron (trait)/exon (barre) du gène *WB3* en fond *Ws*. (b) Représentation schématique de la structure des deux transcrits *WB3* (*WB3-A* et *WB3-B*) en fond *Ws*. La longueur des ADNc correspondants est indiquée. (c) Analyse en RT-PCR des transcrits *WB3* sur des graines âgées de 10 jours après floraison chez le sauvage (*Ws*). Les amorces utilisées font référence au schéma (a). Leur séquence est donnée dans l'annexe 10.

Pour déterminer la conséquence au niveau protéique de cet épissage alternatif, les ARNm correspondants ont été traduits *in silico* puis analysés à l'aide de l'application pfam (pfam.sanger.ac.uk/) à la recherche de motifs connus (Figure 5.7). Pour avoir un élément de comparaison, un traitement similaire a été réalisé sur le transcript *WB3* en fond *Col-0*, transcript qui ne subit pas d'épissage alternatif dans les graines.

Chapitre V

Comme décrit dans l'article de Romanel et collaborateurs (2009), la protéine WB3 (Col-0) possède six domaines B3 (Figure 5.7). En revanche, la protéine WB3-A présenterait un domaine B3 supplémentaire, soit 7 motifs B3. Ce domaine supplémentaire est essentiellement dû à l'allongement de la séquence codante de *WB3* en fond *Ws* (Figure 5.7). Enfin, la forme épissée WB3-B renfermerait uniquement 6 domaines B3 comme WB3 en fond Col-0 (mais non identiques).

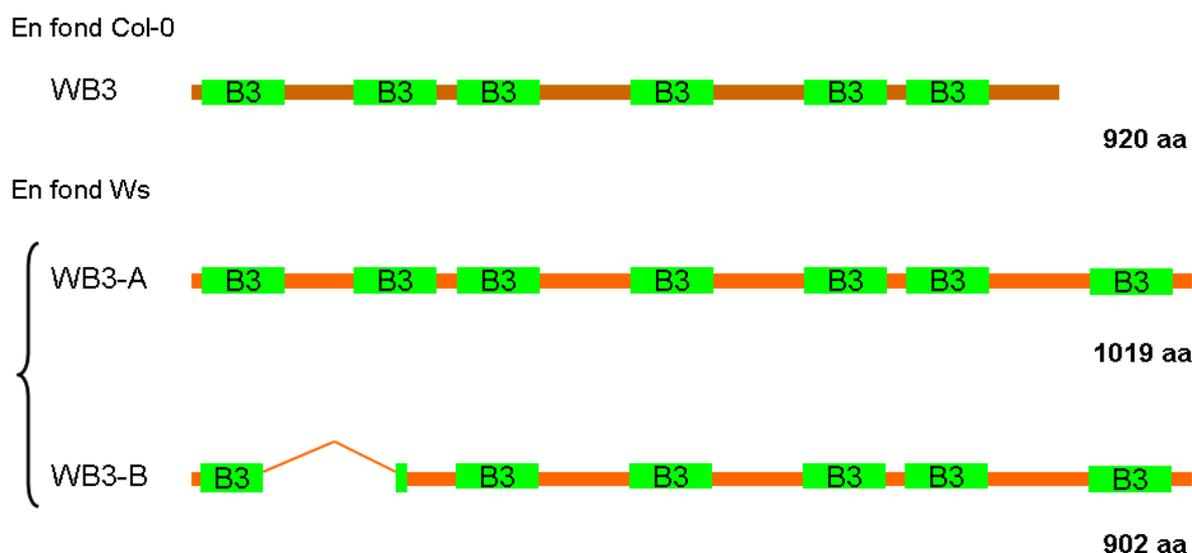


Figure 5.7. Prédiction de la structure des protéines WB3 à partir des transcrits en fond Col-0 et Ws.

L'analyse a été réalisée à l'aide de l'application Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). Les différents domaines B3 prédits sont représentés. La longueur des protéines correspondantes est indiquée.

3.1.3 Mutants *wb3* en fond Col-0

Les deux mutants d'insertion ADN-T dans le gène *WB3* disponibles en fond Col-0 ont été commandés et les séquences flanquantes de l'ADN-T ont été confirmées dans chaque lignée. La position de l'ADN-T a pu être observée dans la séquence promotrice de *WB3* pour la lignée SALK_038469, appelée *wb3-1*, et dans le dernier exon du gène *WB3* pour la lignée SAIL_825G12, nommée *wb3-2* (Figure 5.8a). Une RT-PCR réalisée sur des ADNc de graines âgées de 10 JAF montre qu'aucune amplification de l'ADNc de *WB3* n'est observée chez *wb3-2* alors qu'une faible quantité d'ARNm *WB3* est détectée chez *wb3-1* (Figure 5.8b et c). En conclusion, le mutant *wb3-2* peut être considéré comme un allèle fort tandis que le mutant *wb3-1* serait un allèle faible.

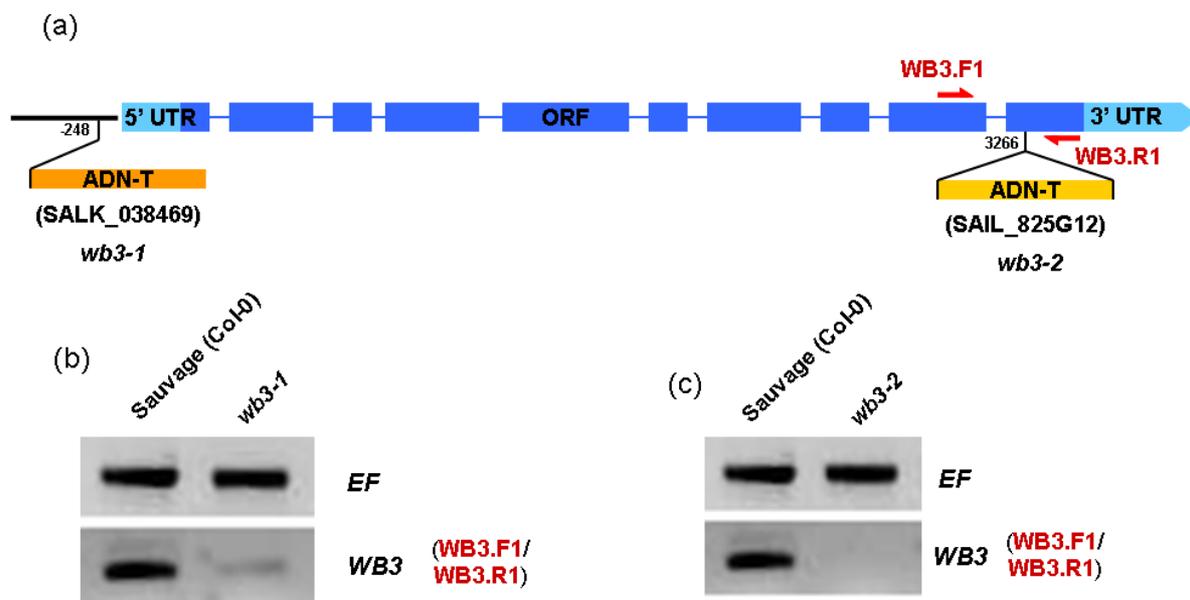


Figure 5.8. Caractérisation des mutants *wb3* en fond Col-0.

(a) Représentation schématique de la structure intron (trait)/exon (barre) du gène *WB3* en fond Col-0 avec la position de l'insertion ADN-T de la lignée SALK_038469, appelée *wb3-1*, et de la lignée SAIL_825G12, appelée *wb3-2*. Les amorces représentées font référence aux analyses de RT-PCR (b et c). La séquence des amorces est donnée dans l'annexe 10. La position exacte de l'ADN-T au sein de la séquence codante est indiquée par rapport au site d'initiation de la transcription. (b et c) Analyse en RT-PCR de l'expression de *WB3* sur des graines âgées de 10 jours après floraison, chez le contrôle sauvage (Col-0) et chez les mutants *wb3-1* (b) et *wb3-2* (c). Les amorces utilisées font référence au schéma (a).

3.1.4 Mutant *wb3* en fond Ws

Un mutant d'insertion ADN-T, nommé FLAG_494E02 ou *wb3-3*, était disponible dans les banques en fond Ws. Il a tout d'abord été caractérisé au niveau moléculaire ; la recherche des séquences flanquantes de l'ADN-T a été engagée. Malheureusement, celles-ci n'ont jamais pu être ré-amplifiées mais une PCR conduite sur de l'ADN génomique du mutant *wb3-3* à l'aide des amorces WB3.F2/WB3.R2 ne produit jamais d'amplicon, suggérant que nous avons bien isolé une lignée homozygote mutante (Figure 5.9). Nous supposons que le mutant *wb3-3* possède une insertion complexe empêchant toute amplification d'ADN génomique aux alentours du 2060^{ème} nucléotide de *WB3* par rapport au site d'initiation de la transcription (Figure 5.9a). Une RT-PCR réalisée sur des ADNc de graines âgées de 10 JAF montre qu'aucune amplification n'est détectable chez *wb3-3* avec les couples d'amorces WB3.F2/WB3.R2 (Figure 5.9b). Ne possédant pas d'ARNm pleine longueur, *wb3-3* est donc un allèle mutant fort du gène *WB3*.

Chapitre V

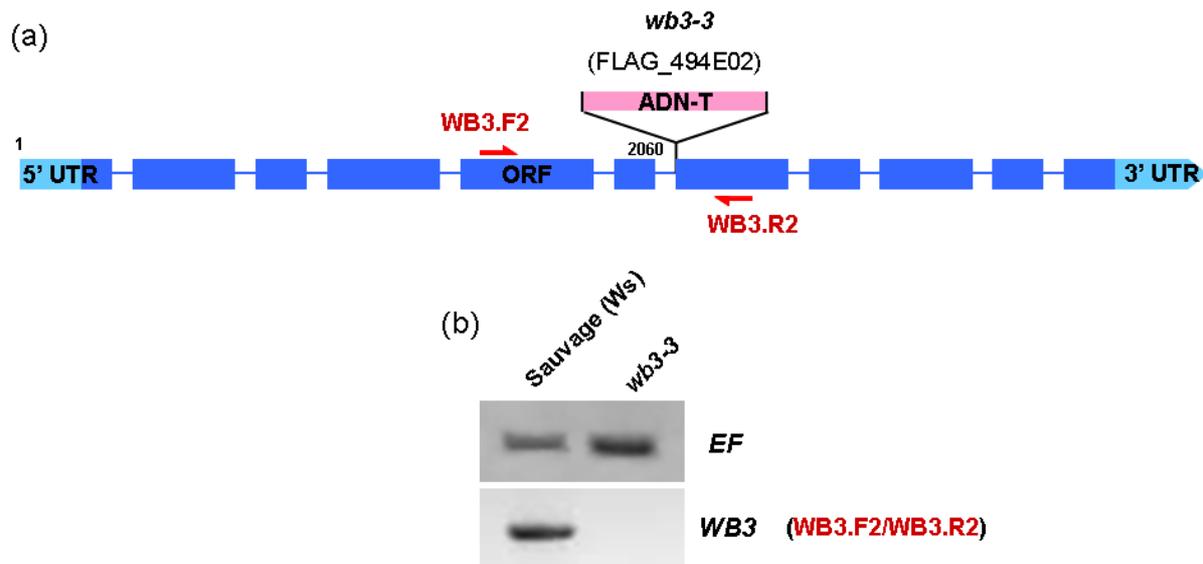


Figure 5.9. Caractérisation du mutant *wb3-3* en fond *Ws*.

(a) Représentation schématique de la structure intron (trait)/exon (barre) du gène *WB3* en fond *Ws* avec la position de l'insertion ADN-T de la lignée *FLAG_494E02*, appelée *wb3-3*. Les amorces représentées font référence aux analyses de RT-PCR (b). Leur séquence est donnée dans l'annexe 10. La position exacte de l'ADN-T au sein de la séquence codante est indiquée par rapport au site d'initiation de la transcription. (b) Analyse en RT-PCR de l'expression de *WB3* sur des graines âgées de 10 jours après floraison, chez le contrôle sauvage (*Ws*) et chez le mutant *wb3-3*. Les amorces utilisées font référence au schéma (a).

3.2 Phénotype des mutants *wb3*

3.2.1 Développement de la rosette et de la hampe florale

Le gène *WB3* s'exprimant au niveau des zones méristématiques et en particulier au niveau du méristème inflorescentiel, un suivi du développement de la rosette et de la hampe florale devra être effectué. En première approche, le développement végétatif de *wb3-1* et *wb3-2* ne semble pas affecté par la mutation du gène *WB3*. En revanche, le mutant *wb3-3* présente de nombreuses anomalies de développement : feuilles ternes et mates (Figure 5.10), hampe florale à croissance rapide, allongement des pédoncules floraux, réduction du nombre de fleurs par hampe, augmentation de la taille des fleurs, arrêt très précoce du fonctionnement du méristème inflorescentiel. Une description plus précise de ces phénotypes (taille des organes floraux, nombre de fleurs par hampe florale, vitesse de croissance de la hampe florale) sera une étape importante pour la caractérisation phénotypique du mutant *wb3-3*.

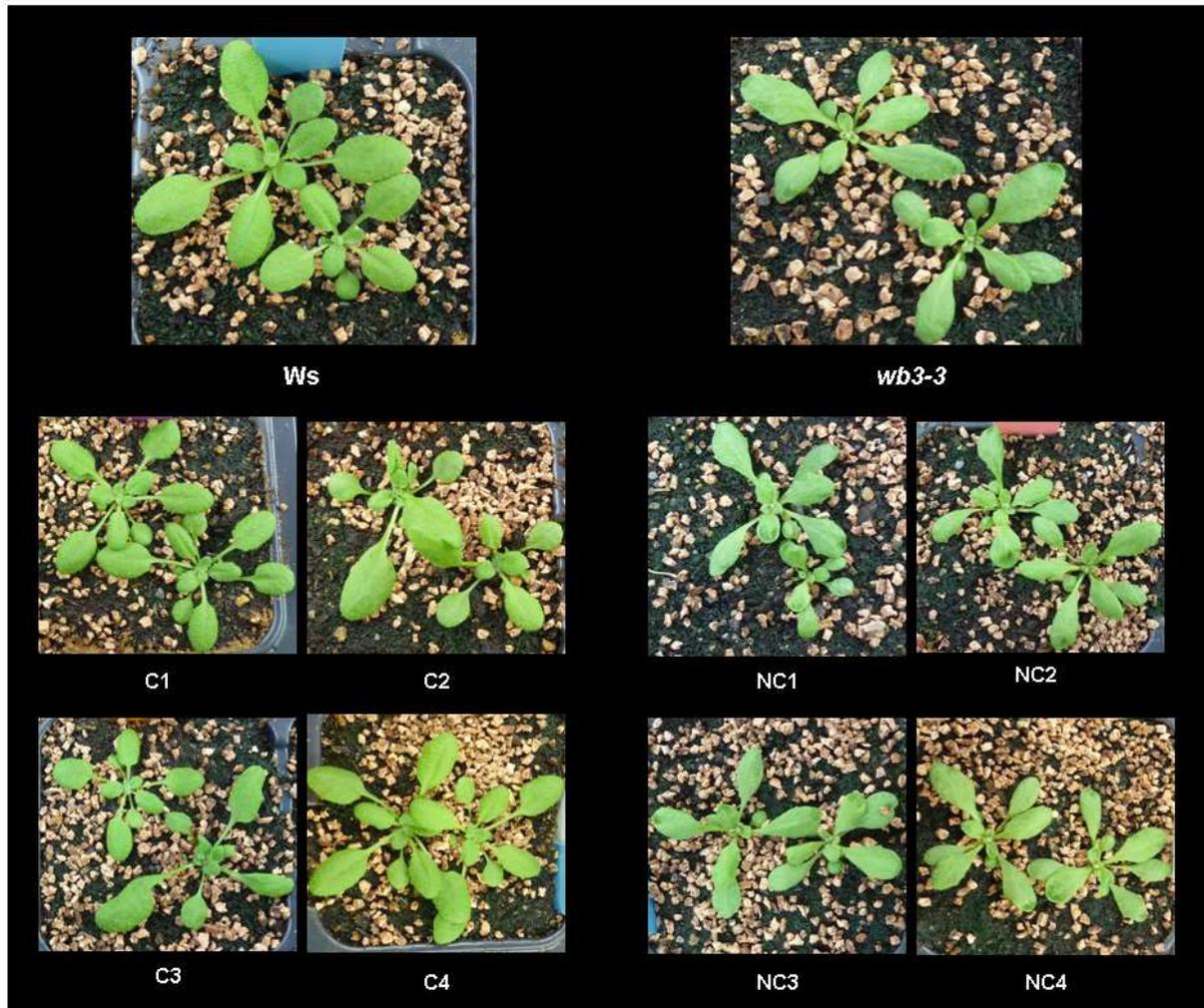


Figure 5.10. Morphologie des rosettes âgées de deux semaines du sauvage (Ws), du mutant *wb3-3* et de huit lignées *wb3-3* portant le transgène *Pro35S_{dual}:WB3-A*.

C, lignées présentant une morphologie proche du sauvage (Ws) et NC, lignées présentant une morphologie proche du mutant *wb3-3*.

3.2.2 Suivi du développement de la graine et de l'embryon

Afin de déterminer le rôle de WB3 au sein de la graine, le développement de cette dernière et des trois tissus qui la constitue a été suivi en microscopie à l'aide d'objectifs Nomarski (Figure 5.11). Aucune modification du développement n'a été observée chez *wb3-1* et *wb3-2* comparé au sauvage Col-0 (Figure 5.11). Des analyses similaires sont en cours pour *wb3-3*.

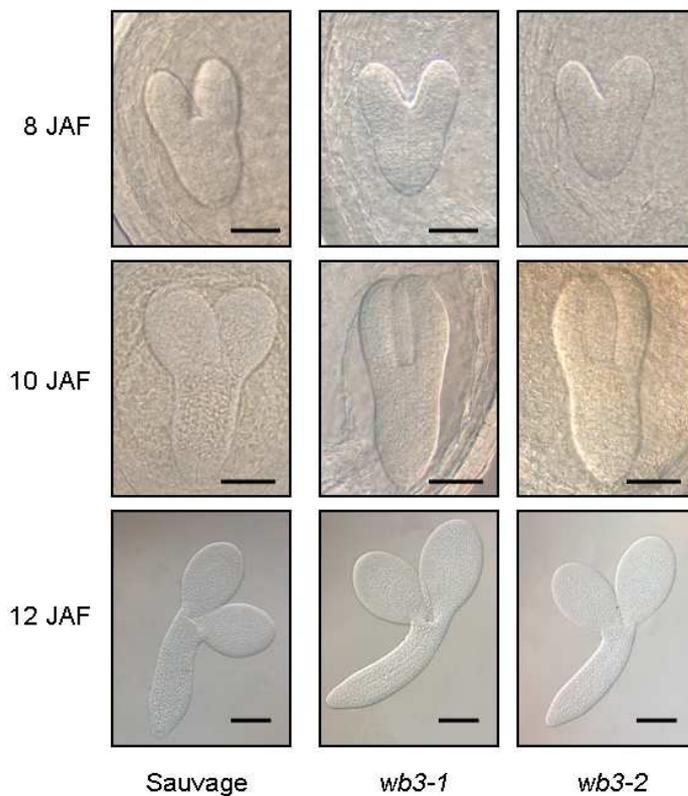


Figure 5.11. Graines et embryons en développement observés à 8, 10 et 12 JAF chez le sauvage (Col-0) et les deux mutants *wb3-1* et *wb3-2*.

Chaque observation a été réalisée à l'aide d'objectifs Nomarski après montage des graines ou des embryons dans un liquide éclaircissant. Les photographies présentées sont représentatives des observations effectuées sur une dizaine d'embryons. JAF, jours après floraison. Barre = 100 μ m.

3.2.3 Contenu et composition en acides gras de la graine

Les mutants *wb3-1* et *wb3-2* ne présentent aucune modification du contenu ou de la composition en acides gras de leurs graines.

La graine du mutant *wb3-3* contient environ 15% d'huile en moins que celle du sauvage (Ws), sans modification de sa masse (Figure 5.12a et b). De plus, la composition de son huile est altérée avec une augmentation de la proportion en 18:1 et 18:2 et une diminution de celle en 18:3 et 20:1 (Figure 5.12c). Ces résultats sont encore difficiles à interpréter et nécessiteraient des analyses plus précises, notamment sur les cotylédons et les hypocotyles séparés, compte tenu du patron d'expression de *WB3*.

Chapitre V

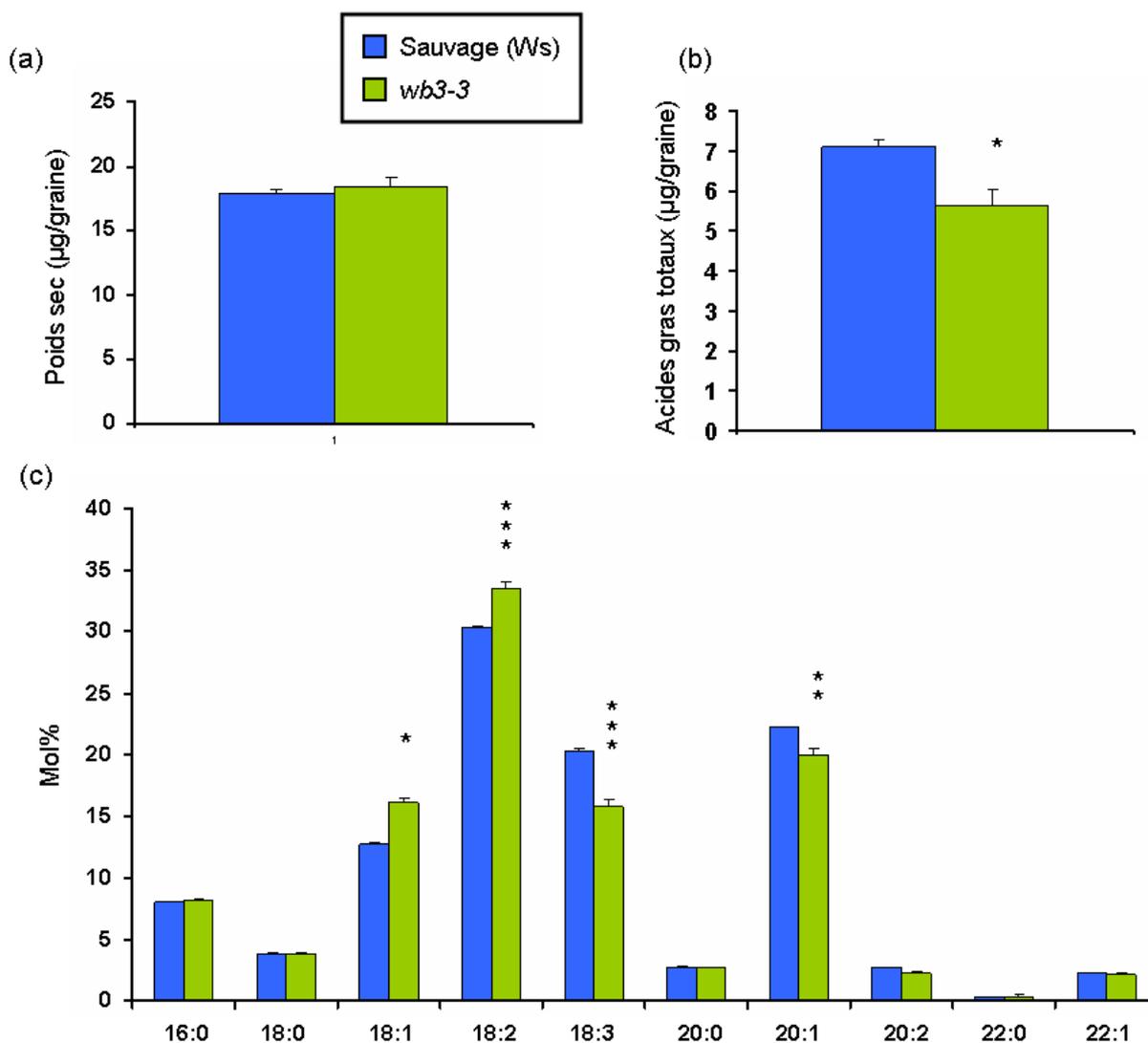


Figure 5.12. Contenu et composition en acides gras d'une graine sèche chez le sauvage (Ws) et *wb3-3*.

(a) Poids sec d'une graine. Chaque point représente la moyenne des mesures effectuées sur 20 graines pour cinq plantes. La teneur (b) et la composition (c) en acides gras totaux a été analysée par chromatographie en phase gazeuse. Chaque point correspond à la moyenne de cinq répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. *** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une p -value inférieure à 0,1%. ** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une p -value inférieure à 1%. * indique une différence significative par rapport au sauvage avec une p -value inférieure à 5%.

3.3 Complémentation du phénotype du mutant *wb3-3*

Pour établir un lien formel entre la mutation *wb3* en fond Ws et le phénotype lipidique associé, le mutant *wb3-3* a été transfecté avec le transgène *Pro_{35Sdual}:WB3-A* ou *Pro_{35Sdual}:WB3-B* pour tester la complémentation du phénotype mutant par chacune des deux formes d'ARNm.

La transfection avec le transgène *Pro_{35Sdual}:WB3-B* ne permet pas de compléter ni les phénotypes végétatifs (d'après une analyse morphologique préliminaire) ni le phénotype lipidique des graines du mutant *wb3-3*. De ces observations, deux hypothèses peuvent être formulées : soit la forme courte de la protéine WB3 n'assure pas la fonction du gène (ou tout du moins, celle que nous suivons), soit les deux formes protéiques sont essentielles à la fonction du gène *WB3* dans l'écotype Ws, en s'associant par exemple en dimères.

Les résultats de l'analyse du contenu et de la composition en acides gras des mutants *wb3-3* transfectés avec le transgène *Pro_{35Sdual}:WB3-A* ne sont pas encore disponibles. Cependant, le phénotype des rosettes et des hampes florales de certains transformants laisse suggérer que cette forme longue de la protéine WB3 est nécessaire et suffisante pour compléter le phénotype du mutant (Figure 5.10).

Pour comparer la version Col-0 de *WB3* avec sa version Ws, le mutant *wb3-3* a été transfecté avec le transgène *Pro_{35Sdual}:WB3(Col-0)*. Une analyse morphologique rapide des rosettes et des hampes florales semble montrer que les lignées transfectées T2, T5, T10 et T16 ne présentent plus les phénotypes de *wb3-3*. Une étude plus approfondie en suivant des paramètres quantifiables bien définis permettra de déterminer si T2, T5, T10 et T16 présentent une morphologie plus proche du sauvage Ws ou du sauvage Col-0.

De manière intéressante, la version Col-0 de *WB3* conduit à une augmentation du contenu en huile de la graine à un niveau voisin de celui du sauvage Ws chez T2, T5, T10 et T16, bien que la teneur en huile du sauvage Col-0 soit, comme chez *wb3-3*, inférieure à celle du sauvage Ws (Figure 5.13a). Ainsi la forme Col-0 de *WB3* serait capable de remplacer la forme Ws de *WB3*. Des répétitions biologiques seront nécessaires pour valider ces résultats.

Cependant, les graines des lignées *wb3-3* portant le transgène *Pro_{35Sdual}:WB3(Col-0)* présentent une composition en acides gras modifiée ressemblant plus à celle d'une graine sauvage Col-0 qu'à celle d'une graine sauvage Ws (Figure 5.13b).

Chapitre V

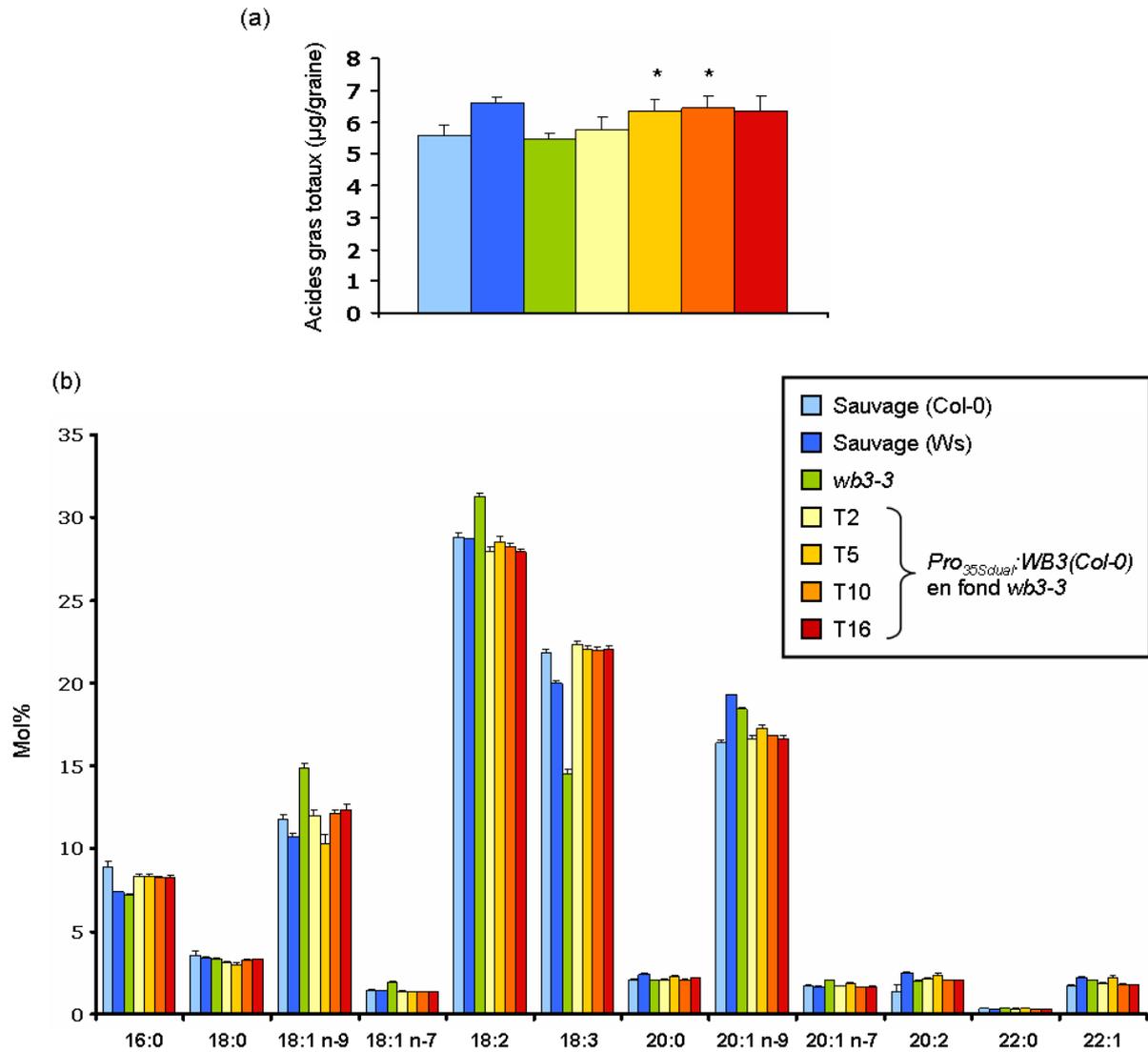


Figure 5.13. Contenu et composition en acides gras de graines sèches sauvages (Col-0 et Ws), du mutant *wb3-3* et de quatre lignées *wb3-3* complémentées par le transgène *Pro_{35Sdual}:WB3(Col-0)*

La teneur (a) et la composition (b) en acides gras totaux a été analysée par chromatographie en phase gazeuse. Chaque point correspond à la moyenne de cinq répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée.

Ces données préliminaires révèlent que la structure des protéines WB3 et en particulier le nombre et la position de leurs domaines B3 semblent importants pour leur fonction. Une fois les diverses expériences de complémentation achevées, l'étude de cette relation structure/fonction pourrait être un axe de recherche intéressant.

IV- Perspectives

L'étude de WB3 débute et de nombreux axes de recherche peuvent être explorés à plus ou moins long terme.

A court terme, il faut achever les travaux déjà initiés. L'étude de WB3 en fond Ws semble très prometteuse. Il faudra commencer par vérifier le patron d'expression de WB3 en fond Ws grâce aux mêmes techniques que celles mises en œuvre en fond Col-0. La séquence du promoteur Ws de WB3 est quasiment identique à celle du promoteur Col-0, laissant présager d'un profil similaire (Annexe 5). Des lignées *Pro_{WB3.Ws.1kb}:uidA* sont disponibles au laboratoire et prêtes à être analysées. Dans un second temps, il faudra s'attacher à décrire de manière exhaustive le phénotype végétatif et potentiellement embryonnaire du mutant *wb3-3*. Enfin, il faudra poursuivre et exploiter en profondeur les expériences de complémentation de *wb3-3* déjà en cours, notamment avec le transgène *Pro_{35Sdual}:WB3-A*, et éventuellement envisager une construction utilisant la séquence génomique de WB3 et son promoteur endogène.

A plus long terme, il conviendra de se concentrer sur la recherche de cibles du facteur de transcription WB3. Cette approche sans *a priori* pourra débiter par une analyse transcriptomique menée sur la lignée mutante *wb3-3*, mais aussi sur des lignées surexpresses *Pro_{35Sdual}:WB3-A*, et éventuellement sur des lignées antisens. Ces analyses pourraient être couplées à la construction de lignées inductibles *Pro_{35S}:WB3-A::ΔGR* afin de valider les cibles putatives ainsi détectées et de déterminer le caractère direct ou non du contrôle transcriptionnel exercé. Pour les cibles directes identifiées, la recherche d'interactions physiques entre la protéine WB3 et le promoteur de ces gènes cibles pourra être engagée *via* des expériences de retard sur gel ou d'immunoprécipitation de la chromatine. Enfin, identifier le rôle de ces différents domaines B3 qui font l'originalité de cette protéine serait un axe de recherche à développer sur le long terme.

Discussion

I - Stratégie d'étude des facteurs de transcription

L'étude d'un facteur de transcription comprend généralement trois grands axes : (1) l'étude de la régulation de son expression, (2) la recherche de sa fonction physiologique au sein de la plante et (3) l'élucidation de son mode d'action au niveau moléculaire.

Patron d'expression et régulateurs

Dans le cas de MYB118, étude la plus aboutie qui a constitué le travail principal de cette thèse, nous avons pu caractériser finement le patron d'expression du gène. En revanche, nous n'avons pas été en mesure de suivre l'accumulation de la protéine, les différentes protéines de fusion réalisées et placées sous contrôle du promoteur endogène de *MYB118* n'ayant jamais pu être détectées par western blot ou microscopie à fluorescence (dans le cas où MYB118 était lié à la GFP). Il est probable que le faible niveau d'expression inhérent aux facteurs de transcription, particulièrement quand ils sont exprimés dans un tissu minoritaire de la graine, rende leur détection compliquée, voire impossible. L'utilisation d'anticorps polyclonaux dirigés contre MYB118 et reconnaissant donc plusieurs épitopes pourrait éventuellement amplifier le signal et faciliter la détection. Inversement cette stratégie pourrait nous amener à détecter des protéines très proches de MYB118 comme MYB115 et donc biaiser les observations.

La recherche de régulateurs transcriptionnels de MYB118 s'est appuyée sur une approche *a priori* considérant que tous les gènes exprimés lors de la maturation de la graine sont régulés par les régulateurs maîtres. Une étude plus systématique de la régulation de son expression nécessiterait de réaliser une dissection de son promoteur afin d'identifier les séquences *cis*-régulatrices impliquées et ainsi des régulateurs potentiels. Au cours de cette étude, nous nous sommes restreint au contrôle transcriptionnel de l'expression de *MYB118*. *MYB118* est exprimé dans l'albumen, il pourrait donc comme d'autres gènes, être soumis à l'empreinte parentale. Aussi, une étude de la régulation chromatinienne de son expression pourrait s'avérer intéressante.

Discussion

Rôle physiologique au sein de la plante

La deuxième étape de l'étude de MYB118 s'est intéressée à sa fonction physiologique *via* l'analyse phénotypique de lignées mutantes. Les analyses biochimiques et cytologiques de ces lignées ont permis de circonscrire relativement précisément le rôle de MYB118 dans la graine. Néanmoins, cette analyse n'a pu être réalisée qu'après une caractérisation précise du patron d'expression du facteur étudié. A ce titre, il est à noter que les données de la littérature indiquant une expression embryonnaire de *MYB118* (Wang et al., 2008) nous avaient amenés, au début de ce travail de thèse, à émettre des hypothèses erronées au sujet du rôle probable de MYB118. L'interprétation faite du phénotype *myb118* ainsi que l'étude des cibles potentielles de ce facteur de transcription étudiées *a priori* (avant de disposer de données d'expression fines et fiables) se sont révélées être une mauvaise piste, rendant compte plus d'effets secondaires que de l'effet direct de MYB118 sur la maturation de l'albumen (données non présentées dans ce manuscrit).

L'étude de lignées surexprimant *MYB118* était censée conforter les phénotypes observés chez les mutants. Malheureusement, MYB118 faisant partie d'une famille multigénique et possédant de nombreux paralogues proches, la surexpression de *MYB118* dans la plante a conduit à de nombreux effets pléiotropes et fortement délétères pour la plante, que nous pensons dûs à l'activation de gènes cibles non seulement de MYB118 mais aussi de ses paralogues. Ce type de résultats a déjà été documenté abondamment pour des plantes surexprimant des facteurs MYB (Dubos et al., 2008). Une stratégie plus ciblée avec une surexpression de *MYB118* uniquement dans la graine (*Pro_{At2S2}:MYB118*) n'a pas permis de compléter le phénotype mutant, les promoteurs forts dont nous disposons n'ayant pas un patron identique à celui de *MYB118*. L'utilisation d'un système inductible *Pro_{35S}:MYB118::ΔGR* en fond *myb118* a été envisagée. Mais l'exploitation d'un tel matériel n'a de sens que si la fusion MYB118::ΔGR ne perturbe pas la fonction de MYB118, ce que nous n'avons pas été en mesure de démontrer par complémentation du phénotype mutant *myb118*. En effet, nous nous sommes heurtés à de nombreuses difficultés techniques, l'induction du système devant être réalisée au moment précis où le gène *MYB118* endogène est normalement exprimé (l'albumen de la graine âgée de 10 JAF) et le suivi du phénotype de *myb118* demandant des analyses d'une grande précision sur des quantités de matériel très limitées.

Discussion

Mode d'action moléculaire

Enfin, la dernière étape de ce travail a consisté à déterminer le mode d'action de MYB118 et à identifier ses cibles transcriptionnelles. L'analyse transcriptomique réalisée sur des graines sauvages et mutantes *myb118* a permis de sélectionner un grand nombre de cibles régulées négativement par MYB118 et expliquant le phénotype observé chez les mutants. Cependant, cette analyse aurait pu être plus informative si elle avait pu être croisée avec un transcriptome réalisé sur des lignées surexprimant *MYB118* et si les extractions d'ARNm avaient pu être menées précisément sur l'albumen et non la graine entière. Dans un cas comme dans l'autre, le matériel biologique n'était pas disponible (surexprimeurs stériles, quantités d'ARN extraits de fractions albumen trop limitant pour une analyse par puce). Enfin, le recoupement de ces données transcriptomiques obtenues sur des mutants avec des données transcriptomiques obtenues sur de la chromatine immunoprécipitée avec MYB118 (ChIP-seq) aurait permis de réduire encore plus drastiquement le pool de cibles de MYB118. Pour ceci, nous avons généré des lignées exprimant MYB118 étiqueté sous contrôle de son propre promoteur, qui complètent le phénotype du mutant *myb118-1*. Cependant, la mise en oeuvre de ces approches se heurte à des difficultés techniques inhérentes à la taille de l'objet d'étude, la graine d'Arabidopsis. La quantité de matériel nécessaire pour les expériences de ChIP n'a pas pu être obtenue. Enfin, une alternative possible serait l'utilisation de lignées sur- ou sous-exprimant *MYB118* dans des graines de *Brassica napus* ou de *Camelina sativa*, plus grosses et donc plus adaptées à la réalisation d'analyses fines.

Nous avons rencontré des difficultés similaires lors de l'étude du paralogue de *MYB118*, *MYB115*, dont l'expression est spatialement bien plus restreinte encore que celle de *MYB118*. Son étude plus approfondie nécessitera impérativement la mise en oeuvre de techniques plus précises que celles que nous avons pu employer jusqu'à présent, telles celles décrites à la fin du chapitre III (méthode d'analyse lipidique à l'échelle tissulaire, microdissection LASER et analyse transcriptomique).

Néanmoins, malgré ces limitations techniques, un certain nombre de cibles putatives de MYB118 permettant d'expliquer le rôle physiologique de celui-ci ont pu être isolées et validées par RT-PCR quantitative. Comme nous l'avons évoqué à la fin du chapitre II, il reste encore de multiples points à aborder pour comprendre totalement le mode d'action de MYB118. La validation de ses cibles par ChIP dans des protoplastes d'Arabidopsis obtenus à partir de cultures cellulaires et la détermination de la séquence de fixation (élément *cis*) reconnue par MYB118 par la technique de retard sur gel et sa validation par mutagenèse permettront de dresser un état des lieux précis des cibles directes de

Discussion

MYB118. La recherche de ses interactants, partenaires protéiques potentiels des complexes de régulation transcriptionnelle dans lesquels il intervient, par un crible double hybride ou des expériences de co-immunoprécipitation, constitue un axe de recherche envisageable pour compléter cette étude. Ils permettront sans doute d'expliquer et de comprendre comment MYB118 peut à la fois induire certains gènes et en réprimer d'autres.

II - Le développement et la maturation de l'albumen : d'Arabidopsis aux céréales

2.1 Apparition et rôle de l'albumen

Pour comprendre comment et pourquoi l'albumen est apparu, il faut remonter aux origines de la double fécondation. La double fécondation est une synapomorphie (caractère dérivé partagé par deux taxons et leur ancêtre commun) partagée par Angiospermes et Gnétophytes et leur ancêtre commun (Figure 0.1, hypothèse (2)). Chez Ephedra, une Gnétophyte, la double fécondation produit deux noyaux diploïdes dans une seule cellule-œuf : un noyau zygotique « normal » et un noyau zygotique « surnuméraire ». Chaque noyau conduit à la formation d'un embryon. Comme chez les Gymnospermes, les cellules du gamétophyte femelle concourent à la croissance des embryons. Tenant compte de ces données, nous pouvons faire l'hypothèse que l'albumen des Angiospermes (triploïde) est l'héritier d'un embryon surnuméraire diploïde chez l'ancêtre commun. L'albumen n'est donc pas un simple tissu mais bien l'homologue d'un embryon, c'est-à-dire d'un organisme (Lopes et *al.*, 1993 ; Friedman, 1995).

Les modèles proposent que cette seconde fécondation conduisant à un individu triploïde incapable de se reproduire (car n'effectuant pas correctement la méiose) peut être sélectionnée favorablement uniquement si la perte de valeur sélective de ce second individu est compensée par une augmentation de la valeur sélective de l'embryon auquel il est associé : c'est-à-dire si le zygote triploïde participe à la nutrition de l'embryon diploïde principal (Friedman, 1995 ; Friedman et Williams, 2003).

Ces considérations évolutives font de l'embryon et l'albumen deux associés étroits et non deux compétiteurs dans la course à l'accumulation de nutriments maternels. Ensemble, ils constituent

Discussion

une force de puits importante qui tend à emmagasiner rapidement des nutriments au détriment des autres graines en formation. L'albumen peut être ainsi considéré comme un lieu de stockage transitoire de nutriments qui seront par la suite mis à disposition de l'embryon pour sa croissance ou la constitution de ses propres réserves, soit au cours de la maturation, soit au cours de la germination. Le gène *MYB118* s'intègre parfaitement dans cette vision, en limitant l'accumulation de réserves sous forme de TAG et protéines dans l'albumen chez *Arabidopsis*, il met les nutriments maternels à disposition de l'embryon (Figure 1.47). De plus, la chute importante de la masse de la graine et de la quantité de composés de réserve chez les doubles mutants *myb118 lec2* (Figures 1.43 et 1.46) pourrait être la conséquence d'une baisse importante de la force de puits exercée par l'ensemble albumen-embryon.

2.2 Graines albuminées ou exalbuminées ?

Si albumen et embryon coopèrent dans l'assimilation des nutriments maternels, la part stockée par l'un et l'autre diffère fortement selon les espèces. Comme nous l'avons déjà évoqué, les graines peuvent être albuminées ou exalbuminées, c'est-à-dire que les réserves peuvent être majoritairement stockées dans l'albumen ou dans l'embryon, respectivement. Le déterminisme génétique contrôlant la mise en place de l'un ou l'autre type de graine demeure aujourd'hui inconnu. Des analyses phylogénétiques mais aussi cytologiques montrent que l'importance des phases syncytiale et cellularisée de l'albumen varie selon les espèces allant d'un développement purement syncytial à un développement purement cellularisé (Geeta, 2003). Chez les Angiospermes basales, la phase cellularisée prévaut et l'albumen accumule la majorité des réserves de la graine dans ces taxons. Le développement syncytial de l'albumen ainsi que l'accumulation de réserves au sein de l'embryon représenteraient donc une innovation dans l'évolution de l'albumen à partir d'un mode de développement ancestral cellularisé ou héliobial (Figure 6.1a). Des études approfondies montrent que le développement de l'albumen d'*Arabidopsis* n'est pas l'homologue strict de celui des céréales bien qu'ils aient une origine commune (Geeta, 2003 ; Olsen, 2004) (Figure 6.1b).

Il semble donc que le déterminisme de l'aspect albuminé ou exalbuminé des graines soit multifactoriel. Des facteurs contrôlant le développement (prolifération *versus* cellularisation) mais aussi le remplissage et la maturation (nature, composition et teneur en réserves) seraient à l'œuvre. Le facteur de transcription *MYB118* étudié dans cette thèse pourrait être un des éléments de ce puzzle.

Discussion

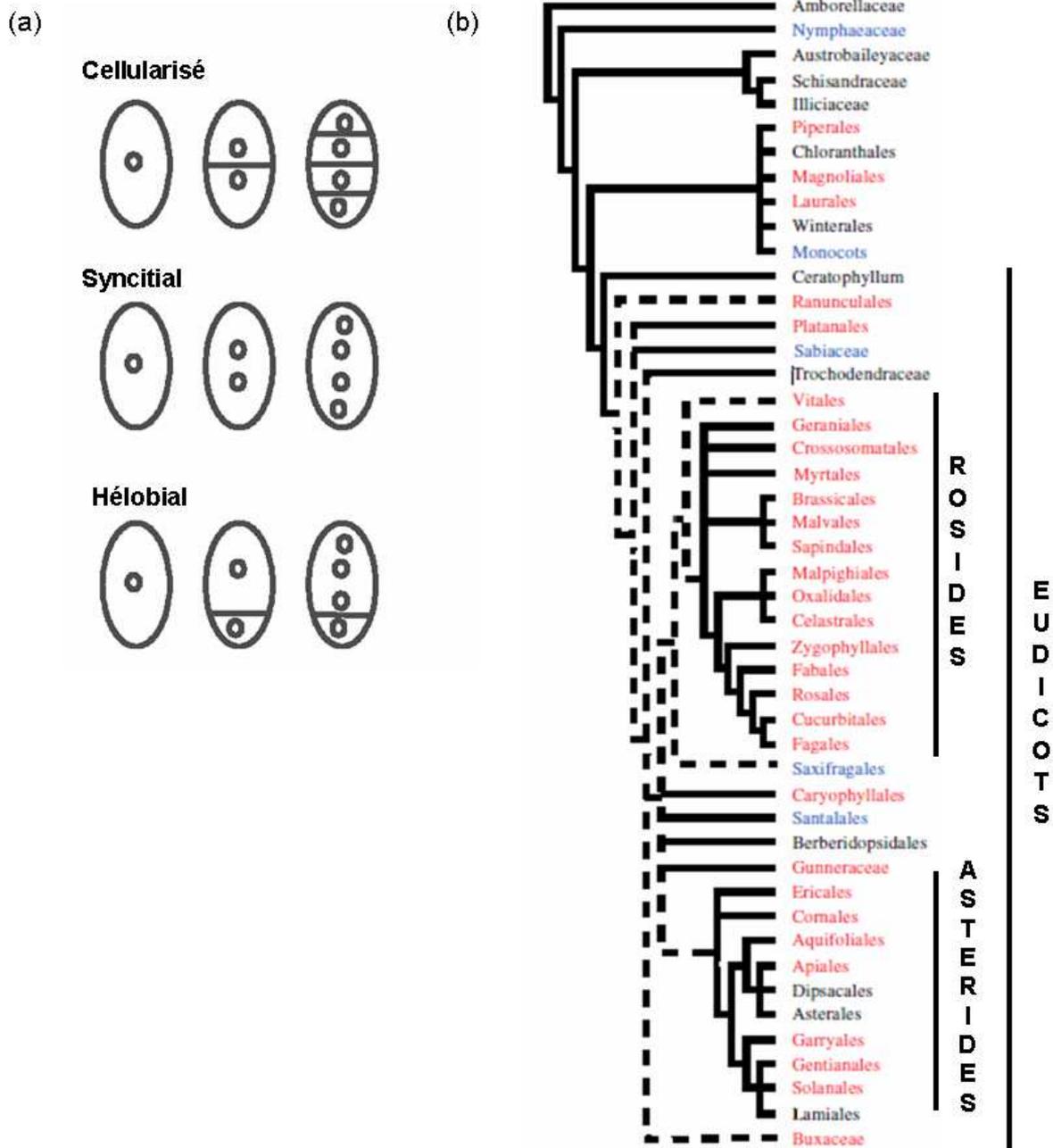


Figure 6.1. Développement et évolution des albumens.

(a) Trois modes de développement de l'albumen : entièrement cellularisé, syncytial ou hélobial. (b) Arbre phylogénétique des Angiospermes (Soltis et *al.*, 2000). Les noms de taxon en noir indiquent un albumen cellularisé, en rouge, un albumen syncytial, en bleu, un albumen hélobial (syncytial ou cellularisé) (Geeta 2003).

Discussion

2.3 Conservation de la fonction des régulateurs transcriptionnels de la maturation entre graines albuminées et exalbuminées

Deux orthologues de *WRI1*, le régulateur de la synthèse *de novo* des acides gras dans la graine d'*Arabidopsis*, nommés *ZmWRI1a* et *ZmWRI1b*, ont été identifiés chez le maïs (*Zea mays*). Comme *WRI1*, ces deux gènes sont exprimés préférentiellement dans l'embryon, mais aussi faiblement dans l'albumen pour *ZmWRI1b* (Pouvreau et al., 2011). Ils présentent un pic d'expression au début de la maturation du grain de maïs. De plus, tous deux complètent la mutation *wri1* chez *Arabidopsis*. *ZmWRI1a* est induit par ZmLEC1 et l'analyse de lignées surexprimeuses a permis d'identifier ses cibles putatives, globalement identiques à celles de *WRI1*. Enfin la surexpression de *ZmWRI1a* augmente la teneur en huile du grain de maïs (Shen et al., 2010 ; Pouvreau et al., 2011 ; Barthole et al., 2010, annexe 12).

De même, les orthologues des régulateurs maîtres du développement de la graine d'*Arabidopsis* chez les céréales sont en cours d'étude. ZmLEC1, l'orthologue de LEC1 chez le maïs, contrôlerait l'accumulation d'huile dans le grain (Shen et al., 2010). *HvFUS3*, l'homologue de *FUS3* chez l'orge (*Hordeum vulgare*), est exprimé à la fois dans l'embryon et l'albumen avec un pic d'expression au milieu de la phase de maturation. Comme *FUS3*, *HvFUS3* se lie à des boîtes RY *in vitro* et active l'expression de gènes de protéines de réserve comme *HOR2* (β -Hordéine) dans l'albumen de l'orge (Moreno-Risueno et al., 2008).

Partant de ce constat, nous pouvons nous interroger sur l'existence d'orthologues de *MYB118* chez les céréales. Le génome de maïs renferme 157 R2R3-MYB. Sur la base d'une analyse phylogénétique (en utilisant la technique de Neighbor Joining), les auteurs les ont regroupés en 18 sous-groupes et ont analysé leur expression dans les différents organes d'une plante sauvage par RT-PCR (Du et al., 2012). 41 d'entre eux sont exprimés préférentiellement dans le grain. Une seconde analyse phylogénétique réalisée par ces mêmes auteurs et prenant en compte les séquences des R2R3-MYB de maïs, d'*Arabidopsis*, et d'autres espèces, indique que quatre ZmMYB sont phylogénétiquement proches de *MYB118* (Figure 6.2a) (Du et al., 2012). Parmi ceux-ci, deux d'entre eux, *ZmMYB014* et *ZmMYB151*, seraient exprimés spécifiquement dans le grain de maïs, constituant de bons gènes candidats pour être les orthologues de *MYB118* (Figure 6.2b). Une étude plus précise du patron d'expression de *ZmMYB014* et *ZmMYB151* dans le grain de maïs par RT-PCR

Discussion

quantitative ou par hybridation *in situ* ainsi qu'un suivi de l'accumulation de composés de réserve et l'expression de gènes de maturation chez des lignées de maïs sur- ou sous-exprimant l'un, l'autre, ou les deux facteurs permettrait de déterminer s'ils ont un rôle proche de *MYB118* dans le grain de maïs.

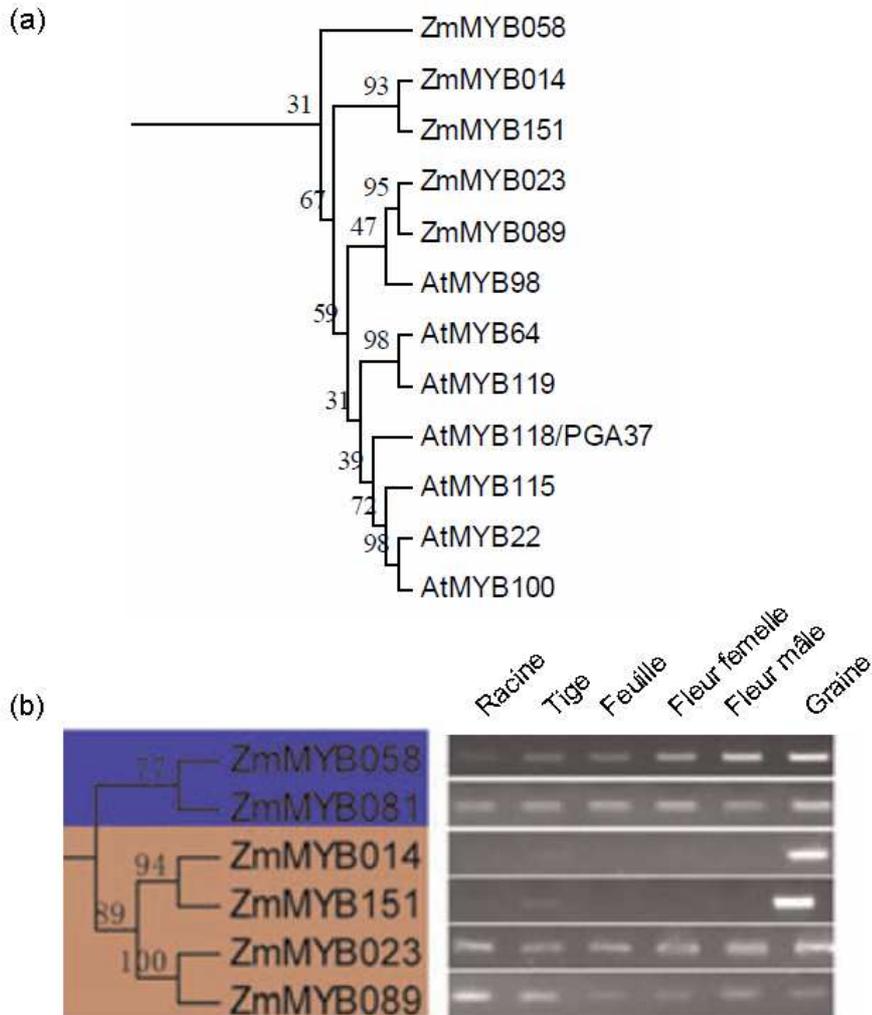


Figure 6.2. Homologues de MYB118 chez le maïs (*Zea mays*).

(a) Détail de l'analyse phylogénétique des R2R3-MYB de maïs (*Zm*), *Arabidopsis* (*At*) et d'autres plantes par maximum de vraisemblance sur la base du domaine R2R3-MYB. Seul le sous-groupe contenant *AtMYB118* est représenté. Les valeurs de bootstrap sont indiquées sur les branches. (b) Patron d'expression des R2R3-MYB de maïs du sous-groupe de *AtMYB118* étudié par RT-PCR dans différents organes d'une plante sauvage (Du et *al.*, 2012).

Discussion

2.4 Contrôle du stockage des réserves dans la graine : albumen ou embryon ?

De nombreuses études montrent qu'un nombre restreint de gènes de protéines de réserve conservées s'expriment à la fois dans l'embryon et l'albumen (Vicente-Cabarosa et Carbonero, 2005). Leur niveau d'expression diffère selon le compartiment : une forte expression dans l'embryon des graines exalbuminées et inversement pour les graines albuminées. Des régulations transcriptionnelles contribuant à déterminer le site de stockage majoritaire des composés de réserve dans la graine sont donc à l'oeuvre.

De multiples facteurs de transcription comme *FUS3* (Chapitre I ; Moreno-Risueno et *al.*, 2008) mais aussi *WRI1* (Chapitre I ; Pouvreau et *al.*, 2011) et l'ensemble des autres régulateurs maîtres de la graine (Chapite I) s'expriment dans les deux compartiments, que ce soit chez *Arabidopsis* ou le maïs. De même, *ABI3* chez les dicotylédones et *VP1* chez les monocotylédones sont exprimés à la fois dans l'embryon et la couche à aleurones de l'albumen. Il est donc difficile d'imaginer que les régulateurs maîtres de la maturation puissent être seuls responsables de la partition des composés de réserves entre les différents compartiments de la graine.

En revanche, d'autres facteurs de transcription ayant un rôle important dans le contrôle de la maturation présentent des patrons d'expression contrastés entre l'embryon et l'albumen. Par exemple, le facteur de transcription codé par *OPAQUE2* (*bZIP*) est exprimé exclusivement dans l'albumen des céréales et serait fonctionnellement remplaçable par *bZIP10/bZIP25*, qui codent des facteurs *OPAQUE2*-like exprimés majoritairement dans l'embryon des dicotylédones (Lara et *al.*, 2003) (Figure 6.3). Ainsi la combinaison de facteurs de transcription de type B3 (ubiquistes) et de type *bZIP* (tissu spécifiques) pourrait être à l'origine d'une accumulation de réserves dans l'embryon ou l'albumen (Vicente-cabarosa et Carbonero, 2005).

MYB118, facteur de transcription de type R2R3-MYB aurait toute sa place dans ce système de régulation. Exprimé spécifiquement dans l'albumen d'*Arabidopsis*, il pourrait se lier aux éléments de type AACA et, seul ou associé à d'autres facteurs, réprimer l'expression des gènes impliqués dans l'accumulation des réserves comme *At2S1* (Figures 6.3).

Discussion

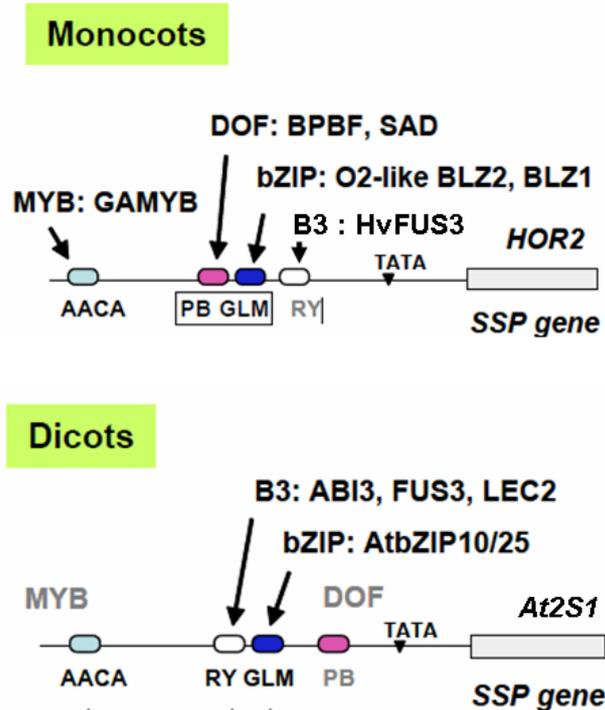


Figure 6.3. Promoteurs de gènes de protéines de réserve : éléments de régulation et facteurs de transcription.

La structure schématique des structures promotrices des principaux gènes codant des protéines de réserve, β -Hordéine (*HOR2*) de l'orge pour les monocotylédones et *At2S1* d'Arabidopsis pour les dicotylédones est représentée. Les éléments *cis* sont représentés sous forme de boîtes : AACA ; PB, boîte Prolamine ; GLM, motif GCN4-like ; RY, élément RY. Les domaines de liaison à l'ADN des différents facteurs sont indiqués ainsi que le nom des facteurs de transcription participant à la reconnaissance de ces boîtes. SSP, protéines de réserve (Vicente-Cabarosa et al., 2005).

III – Des applications biotechnologiques à partir des connaissances acquises chez Arabidopsis

Les applications biotechnologiques dans le domaine des graines à vocation alimentaire et fourragère ou industrielle peuvent avoir plusieurs buts :

- (i) La modification de la teneur en composés de réserve de la graine
- (ii) La modification de la composition de ces composés de réserve (composition en acides gras de l'huile par exemple)
- (iii) La modification de la répartition des composés de réserve au sein de la graine.

3.1 Modification de la teneur en composés de réserve de la graine

L'augmentation de la teneur en composés de réserve de la graine permet d'augmenter le rendement des cultures. Ce caractère agronomique a longtemps été un critère majeur considéré par les sélectionneurs et les créateurs de variétés. Avec l'avènement des biotechnologies dans la deuxième moitié du XXème siècle, de nouvelles pistes destinées à améliorer ce caractère ont été

Discussion

explorées. Par exemple, la surexpression du gène codant la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (*G3PDH*) de levure sous contrôle d'un promoteur d'un gène de napines augmente la teneur en lipides des graines de *Brassica napus* (Vigeolas et al., 2007).

De même, *WRI1*, le régulateur de la biosynthèse *de novo* des acides gras de la graine d'*Arabidopsis* fut une cible privilégiée. Malheureusement, chez *Arabidopsis*, la surexpression de *WRI1* sous contrôle d'un promoteur *35S_{dual}* entraîne de nombreux effets pléiotropes et une réduction importante du nombre de graines par plantes (Baud et al., 2009). En revanche, chez le maïs, la surexpression de *WRI1* sous contrôle du promoteur *OLE* conduit à une augmentation de la teneur en huile de 30% (Shen et al., 2010).

3.2 Modification de la composition des réserves de la graine

Les tentatives de modification de la composition des composés de réserve au sein de la graine a connu son essor avec le génie génétique même si elle fut amorcée, il y a longtemps déjà, par la sélection variétale classique. C'est de cette manière que des variétés de colza toujours cultivées aujourd'hui ont été sélectionnées pour leur faible teneur en acide érucique (C22:1 *cis*- Δ^{13}). L'acide érucique est en effet impropre à la consommation humaine (Stefansson et al., 1961). Inversement, à la fin du XX^{ème} siècle, le potentiel industriel du C22:1 *cis*- Δ^{13} en tant que matière première relança les recherches pour développer des variétés à forte teneur en acide érucique (Han et al., 2001).

C'est dans cette optique que les SAD présentées dans le chapitre IV pourraient faire l'objet d'applications biotechnologiques. En effet, le clade II (SAD2, SAD3, SAD4) serait à l'origine des acides gras monoinsaturés en n-7, isoformes qui pourraient avoir des applications industrielles ou alimentaires. Les acides gras monoinsaturés à longue chaîne peuvent être convertis efficacement en un alcène (C_xH_{2x}) et un acide alcénoïque par des procédés industriels (Ryback et al., 2008 ; Meier, 2009). Ce processus, appliqué à des acides gras monoinsaturés en n-7, produit du 1-octène et de l'acide 9-décénoïque. Le 1-octène représente un marché d'environ 500 000 tonnes par an pour la production de polyéthylène et est aujourd'hui majoritairement produit à partir de dérivés de pétrole. Des produits de substitution renouvelables pourraient être produits à partir de matières premières provenant de végétaux.

Ainsi la surexpression des SAD du clade II d'*Arabidopsis* sous contrôle d'un promoteur *35S* ou du promoteur de *FAB2* chez *Arabidopsis* pourrait conduire à la suraccumulation d'acides gras de type n-7 dans les graines (embryon et albumen) comme nous avons pu le montrer en système

Discussion

hétérologue dans les feuilles de tabac (Figure 4.14). Cette preuve de concept chez *Arabidopsis* pourrait alors être transférée chez le colza soit en introduisant une *SAD* d'*Arabidopsis* sous contrôle d'un promoteur fort de la graine de colza soit en surexprimant les orthologues des *SAD* de type n-7 de colza sous contrôle du même type de promoteur.

Cahoon et Shanklin (2000) ont montré que plusieurs plantes pouvaient produire des acides gras en n-7 dans leurs graines : l'asclépias (*Asclepias syriaca*) produit 10% de 16:1 n-7 et 15% de 18:1 n-7 et la liane patate (*Doxantha unguis-cati*) accumule 55% de 16:1 n-7 et 17% de 18:1 n-7. Cependant, ces plantes ont des rendements très faibles, sont difficiles à cultiver et l'expression hétérologue de la désaturase d'asclépias chez *Arabidopsis* ou de la désaturase de *D. unguis-cati* chez *Brassica napus* ne permet pas d'obtenir des teneurs importantes en acides gras de type n-7 (moins de 7%) (Bondaruk et al., 2007). Ces résultats, ainsi que les difficultés rencontrées par d'autres auteurs pour produire des acides gras originaux chez *Arabidopsis* suggèrent que des modifications métaboliques supplémentaires sont requises pour augmenter significativement l'accumulation des acides gras en n-7 (introduction d'acyltransférases compatibles par exemple). Pour contourner cette barrière métabolique, à savoir cette incapacité de l'embryon à accumuler des acides gras en n-7, nous pourrions tirer parti des capacités d'accumulation de ces acides gras dans l'albumen. Pour augmenter la teneur en acides gras de type n-7, nous pourrions surexprimer spécifiquement les *SAD* requises dans l'albumen (en augmentant le nombre de copie du gène ou en y associant un promoteur plus fort) et/ou jouer sur les volumes d'huile stockés dans chaque compartiment (voir 3.3).

3.3 Modification de la répartition des composés de réserve au sein de la graine, un enrichissement en composés tissus spécifiques

Enfin, la modification de la répartition des composés de réserve au sein de la graine pourrait permettre de transformer une graine à réserves embryonnaires en graine à réserves albuminées et vice versa. MYB118 pourrait jouer un rôle central dans ce processus en tant que régulateur négatif de l'accumulation de composés de réserve dans l'albumen. Des constructions génétiques chez *Arabidopsis* sont en cours en ce sens au laboratoire. MYB118 et WRI1 régulent tous les deux l'accumulation de TAG de manière opposée au sein de la graine. Le promoteur de *MYB118* permet une expression spécifiquement dans l'albumen quand celui de *WRI1* permet une expression du

Discussion

gène à la fois dans l'embryon et l'albumen. Ainsi l'introduction d'un transgène *Pro_{MYB118}:WRI1* en fond *myb118 wri1* devrait permettre de réduire très fortement le contenu en acides gras de l'embryon (80% de diminution) grâce à la mutation *wri1* et d'augmenter celui de l'albumen grâce à l'action combinée de la mutation *myb118* et du transgène *Pro_{MYB118}:WRI1* (Figure 6.4). Si cette construction génétique procure les résultats escomtés, la régulation de la répartition des TAG entre albumen et embryon *via* la balance MYB118/WRI1 pourrait être transposée chez des espèces d'intérêt agronomique possédant des orthologues de ces deux facteurs de transcription.

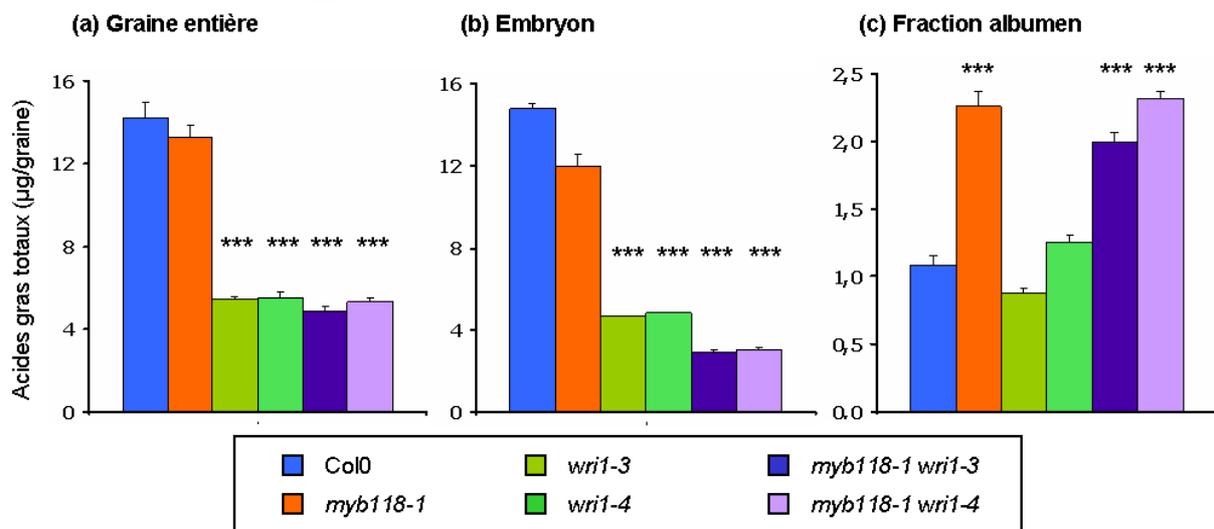


Figure 6.4. Contenu en acides gras de graines sèches de type sauvage (Col-0), *myb118-1*, *wri1-3*, *wri1-4* et des doubles mutants *myb118-1 wri1-3* et *myb118-1 wri1-4*.

La teneur en acides gras totaux a été analysée sur des graines sèches entières (a), des embryons excisés (b) et des fractions albumen (c) par chromatographie en phase gazeuse. Chaque point correspond à la moyenne de cinq répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un test de Student. *** indique une différence significative par rapport au sauvage avec une *p*-value inférieure à 0,1%.

Matériels et méthodes

I - Matériels

1.1 Matériel végétal

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. appartient à la famille des Brassicacées. L'écotype Columbia 0 (Col-0), qui a été utilisé pour générer la collection de transformants par insertion d'un ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens* du SALK (Alonso et al., 2003) constitue le matériel végétal principal de cette étude. L'écotype Wassilievska (Ws) et le mutant d'insertion ADN-T de la collection de Versailles (*wb3-3*) ont été utilisés spécifiquement dans le chapitre V (Bechtold et al., 1993). Le tableau de l'Annexe 7 présente la liste des génotypes et écotypes utilisés pour ce travail de thèse. Des plants de tabacs sauvages (*Nicotiana benthamiana*) ont été utilisés pour des expériences d'expression transitoire.

1.2 Souches bactériennes

Les souches d'*Escherichia coli* sont mises en culture à 37°C et la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* est cultivée à 28°C.

Escherichia coli souche DH10B

Génotype : F⁻, *mcrA*, $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$, $\phi 80d\text{lacZ}\Delta M15$, $\Delta lacX74$, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, $\Delta(ara, leu)7697$, *galU*, *galK*, λ^- , *rpsL*, *nupG* (Invitrogen).

Escherichia coli souche DB3.1

Génotype : F⁻, *gyrA462*, *endA1*, $\Delta(sr1\text{-}recA)$, *mcrB*, *mrr*, *hsdS20*(rB⁻, mB⁻), *supE44*, *ara14*, *galK2*, *lacY1*, *proA2*, *rpsL20*(Sm^r), *xyf5*, Δleu , *mtl1* (Invitrogen). Porteuse d'une mutation affectant un gène codant une gyrase (*gyrA462*), cette souche est résistante à l'effet du *ccdB* des vecteurs Gateway (Bernard and Couturier, 1992; Bernard et al., 1993; Miki et al., 1992)

Matériels et méthodes

Agrobacterium tumefaciens

La souche C58C1Rif (pmp90) a été utilisée pour la transformation des plantes (Koncz *et al.*, 1986). Cette souche dérive de la souche sauvage C58. Elle possède un gène de résistance à la rifampicine sur son chromosome et l'ADN de transfert (ADN-T) du plasmide Ti a été remplacé par un gène conférant la résistance à la gentamycine.

1.3 Souches de levures

Saccharomyces cerevisiae souche YM4271

Génotype : MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, leu2-3, 112, trp1-901, tyr1-501, gal4-D512, gal80-D538, ade5::hisG (Liu *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1991). Cette souche est utilisée pour les tests d'interaction en simple hybride.

1.4 Vecteurs

Plasmide *pDONR207* Gateway (Annexe 9)

Le *pDONR207* (Qiagen) est le vecteur d'entrée utilisé par la technologie Gateway. Il possède des séquences de recombinaison *attP1* et *attP2* permettant le clonage de produits de PCR amplifiés avec des amorces spécifiques de cette technique. Il possède en outre une origine de réplication issue de *pUC19* ainsi que deux séquences de terminaison de la transcription T1 et T2 et une cassette de résistance à la gentamycine.

Plasmide *pBI101* (Annexe 9)

Le plasmide *pBI101* (Ozyme) est un plasmide binaire de 12,2 kb. Il possède une origine de réplication RK2 lui permettant de se maintenir aussi bien dans *E. coli* que dans *A. tumefaciens*. Le gène *NPTIII* (Néomycine PhosphatidylTransféraseIII) conférant la résistance à la kanamycine est utilisé pour la sélection des clones dans *E. coli* et *A. tumefaciens*. Le gène *NPTII* (Néomycine PhosphatidylTransféraseII) sous contrôle du promoteur *NOS*, porté par l'ADN-T, permet la sélection *in vitro* des transformants primaires sur kanamycine. Enfin, ce vecteur comporte une cassette *GUS* située en amont d'un site multiple de clonage. Cette cassette n'étant précédée d'aucun promoteur, ce plasmide permet de caractériser des séquences promotrices en insérant celles-ci en 5' de la cassette.

Matériels et méthodes

Plasmide *pBI101* Gateway (Dubreucq et Divol, communication personnelle)

Ce plasmide a été obtenu à partir du vecteur *pBI101* en insérant en amont du gène *GUS* une cassette de contre-sélection de type *ccdB* bordée par les sites de recombinaison *attR1* et *attR2* spécifiques à la technique Gateway. Cette cassette a été amplifiée à partir du plasmide *pBS* (Stratagène). Une recombinaison de type LR entre le vecteur d'entrée (*pDONR207*) et ce vecteur de destination permet d'introduire un promoteur d'intérêt en amont du gène *GUS*.

Plasmide *pGWB3* Gateway (Annexe 9) (Nakagawa *et al.*, 2007)

Ce plasmide dérive du *pBI101*. Il possède un gène de résistance à la kanamycine auquel a été ajouté un second marqueur de sélection, le gène *HPT*, conférant la résistance à l'hygromycine sous contrôle du promoteur *CaMV35S*. Enfin, une cassette de contre-sélection de type *ccdB* bordée par les sites de recombinaison *attR1* et *attR2* spécifique à la technique Gateway, insérée en amont du gène *GUS* permet d'y recombinaison le promoteur à étudier. Une recombinaison de type LR entre le vecteur d'entrée (*pDONR207*) et ce vecteur de destination permet d'introduire un promoteur d'intérêt en amont du gène *GUS*.

Plasmide *pBIB-HYG* (Becker D., 1990)

Ce plasmide binaire dérive du vecteur *pBI101*. Il a été obtenu en insérant un gène de résistance à l'hygromycine sous contrôle du promoteur *NOS* au sein de l'ADN-T permettant ainsi une sélection des plantules *in vitro* sur milieu MS (Annexe 8.1) additionné d'hygromycine. De plus, le gène *GUS* a été remplacé par un site multiple de clonage issu du *pUC19*.

Plasmide *pBIB-HYG* Gateway (Dubos C., communication personnelle) (Annexe 7)

Ce plasmide dérive du vecteur *pBIB-HYG* et a été obtenu en insérant une cassette de type *ccdB* encadrée par les sites de recombinaison *attR1* et *attR2* au site *SmaI* du site multiple de clonage de l'ADN-T. Ce vecteur ne comportant ni promoteur ni séquence codante, il permet d'insérer un gène d'intérêt sous contrôle de sa propre séquence promotrice.

Plasmide *pMDC32* Gateway (Annexe 9)

Le plasmide *pMDC32* (Curtis and Grossniklaus, 2003) est un plasmide binaire de 11,8 kb. Il possède une origine de réplication *pBR3222* lui permettant de se maintenir aussi bien dans *E. coli*

Matériels et méthodes

que dans *A. tumefaciens*, ainsi que le gène de résistance à la kanamycine (*NPTII*). L'ADN-T situé entre les bordures LB et RB contient le gène *HPT* (*Hygromycine Phosphotransférase*) conférant la résistance à l'hygromycine et permettant une sélection des plantes transfectées *in vitro*. En outre, le promoteur *CaMV35S_{dual}* situé juste en amont d'une cassette de type *ccdB* bordée par les séquences de recombinaison *attR1* et *attR2* permet la surexpression de séquences codantes d'intérêt chez *Arabidopsis*.

Plasmide *pDEST22* Gateway (Annexe 9)

Le *pDEST22* (Invitrogen) est un vecteur de destination utilisé pour les tests d'interaction en levure (simple et double hybride). Il possède une cassette de recombinaison de type *ccdB* bordée par les séquences de recombinaison *attR1* et *attR2* permettant une fusion traductionnelle en N-terminal entre le fragment d'ADNc inséré dans cette cassette et le domaine de transactivation du facteur de transcription GAL4 (GAL4-AD). Ce transgène est sous le contrôle du promoteur du gène *ADH1*. En outre, il possède une origine de réplication *pUC* lui permettant de se maintenir dans *E. coli* et les séquences *ARS4-CEN6* correspondant respectivement à une origine de réplication et à un centromère de chromosome de levure, lui permettant ainsi d'être répliqué dans *S. cerevisiae*. Enfin, un gène de résistance à l'ampicilline (*β -lactamase*) permet sa sélection dans *E. coli* et le gène *TRP1* codant une enzyme de la voie de biosynthèse du Trp lui confère une auxotrophie pour le Trp.

Plasmide *pHISi LIC* (Kelemen Z., communication personnelle) (Annexe 9)

Le plasmide *pHISi LIC* dérive du plasmide *pHISi* (Clontech) par insertion du site de restriction de l'enzyme *PmlI* entre les sites *EcoRI* et *XbaI* du site multiple de clonage de ce vecteur. En outre, il porte une origine de réplication *Col E1 ori* lui permettant de se maintenir chez *E. coli* et un gène de résistance à l'ampicilline permettant sa sélection dans la bactérie. Le gène *URA3*, un des gènes de la voie de biosynthèse de l'uracile, lui confère une auxotrophie pour ce nucléotide et permet sa sélection dans la levure. Le gène *HIS3*, un des gènes de la voie de biosynthèse de l'histidine chez la levure, est positionné en aval du site multiple de clonage, permettant d'y insérer un promoteur d'intérêt susceptible de contrôler son expression.

II - Méthodes

2.1 Conditions de culture

2.1.1 *In vitro*

Germination *in vitro*

Les graines sont stérilisées par incubation dans une solution de chlore/éthanol (3,75 mg de chlore actif par millilitre d'éthanol à 96 %) durant 7 min, puis rincées deux fois dans l'éthanol absolu. Mises à sécher sous une hotte à flux laminaire, elles sont ensuite semées en conditions stériles sur un milieu MS gélosé (Annexe 8.1) préalablement coulé en boîtes de Pétri (60 mm ou 145 mm de diamètre ; Greiner), en présence ou non d'un agent de sélection (Annexe 8.1). Le semis réalisé, les boîtes de Pétri sont scellées à l'aide de sparadrap, puis placées à l'obscurité, à 4°C, durant 48 h, afin de lever la dormance résiduelle des lots de graines et de synchroniser leur germination. Après cette étape de stratification, les boîtes de Pétri sont transférées dans une chambre de culture *in vitro* dont les conditions d'hygrométrie, de photo- et thermo-périodes sont contrôlées (60 % d'humidité relative ; 16 h de lumière à 20°C / 8 h d'obscurité à 18°C ; intensité lumineuse de 200 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ au niveau des boîtes). Au bout de 10 jours, les jeunes plantules qui se développent seront soit repiquées en serre, soit repiquées en conditions stériles sur une autre boîte de Pétri avec milieu MS gélosé et cultivées ainsi quelques semaines.

Cas particulier des sélections sur antibiotique : les graines sont semées à la volée sur un milieu MS gélosé (Annexe 8.1) additionné d'un antibiotique (kanamycine, hygromycine). Environ une semaine après germination, les individus sensibles présentent des cotylédons blanchâtres (semis sur kanamycine) ou un développement interrompu de leur système racinaire (semis sur hygromycine). Les individus résistants se développent normalement et sont aisément repérables grâce à la couleur verte de leurs cotylédons ou la présence d'un appareil racinaire.

2.1.2 En serre

Arabidopsis thaliana

Après 10 à 15 jours de culture *in vitro*, les jeunes plantules sont repiquées en serre (humidité relative variable ; 16 h de lumière à 21°C / 8 h d'obscurité à 19°C) ou en chambre de culture (65

Matériels et méthodes

% d'humidité relative ; 16 h de lumière à 21°C / 8 h d'obscurité à 19°C ; 200 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) dans du terreau enrichi en NPK composé de tourbe de sphaigne et de sable à pH 6,2 (Stender, Allemagne), et régulièrement arrosées avec une solution nutritive à pH 6,5 et riche en azote (Lesaint et Coïc, 1983).

Pour les plantes destinées à la production de graines ou à l'analyse, le repiquage s'effectue dans des pots carrés de 5 cm de côté. Dès l'apparition de la première hampe florale, les plantes sont tuteurées régulièrement jusqu'à la fin de leur croissance.

Pour la récolte de siliques et de graines à des stades de développement définis, tous les deux jours, les boutons floraux s'ouvrant (un point blanc apparaît à l'extrémité du bouton) sont marqués à l'aide d'une bande de sparadrap de couleur fixée sur le pédoncule floral. Ce stade de développement coïncide avec l'étape de pollinisation de la fleur et sert de référence pour la datation des siliques et des graines qu'elles contiennent. L'unité de développement utilisée est le Jour Après Floraison (JAF).

Nicotiana benthamiana

En serre, les graines sont semées directement en barquettes (12 X 14 cm) et les plantules âgées d'une semaine sont repiquées dans un mélange de terreau et de sable volcanique (TREF) en pot individuel (6.5 X 6.5 cm). Ces jeunes plants sont cultivés pendant 4 à 5 semaines en serre (humidité relative 45% ; 16 h de lumière à 25°C / 8 h d'obscurité à 22°C) et arrosés une fois par semaine à la solution nutritive de pH 6,5 et riche en azote (Lesaint et Coïc, 1983).

2.1.3 Agroinfiltration

2.1.3.1 Agroinfiltration d'Arabidopsis

La transfection d'Arabidopsis repose sur la méthode d'inoculation au silwet (Clough et Bent, 1998). Le sylwet (Witco, Tarrytown) est un puissant agent mouillant qui facilite la pénétration des agrobactéries dans les interstices cellulaires par les lésions tissulaires qu'il engendre.

Le plasmide binaire recombiné qui doit servir à la transformation est donc introduit dans la souche C58C1Rif (pmp90) d'*A. tumefaciens* (voir paragraphe 1.2) par électroporation. Les bactéries recombinantes sont sélectionnées sur milieu LB (Annexe 8.3) supplémenté en rifampicine, gentamycine, ainsi qu'en un antibiotique de sélection spécifique du plasmide recombiné. Un clone isolé sert à l'ensemencement d'une préculture de 5 ml conduite sur une nuit en présence des

Matériels et méthodes

mêmes antibiotiques de sélection. Cette préculture permettra d'ensemencer une culture finale de 500 mL, conduite durant 18 h et contenant elle aussi les antibiotiques précédemment évoqués. Les bactéries sont ensuite culottées par centrifugation ($6\ 500 \times g$, 10 min, 4°C) et reprises dans 250 mL de milieu d'infiltration (saccharose 50g.L⁻¹). Le sylwet (75 µL) est alors ajouté à la suspension bactérienne.

Les plantes à transformer ont été cultivées en barquettes (12 x 14 cm) ; elles forment une population dense de 30 à 50 individus par barquette et commencent à fleurir depuis quelques jours. Les hampes portant les fleurs sont immergées 7 min dans la suspension bactérienne pour transfection (Bechtold et *al.*, 1993) puis les plantes sont remises en culture. Les graines qui seront récoltées sont semées sur un milieu de sélection qui permet d'isoler les transformants primaires (T1). Ceux-ci seront repiqués en serre pour la production des graines de la génération T2.

2.1.3.2 Agroinfiltration de feuilles de tabac

La transfection transitoire de feuilles de tabacs repose sur l'injection d'une suspension d'agrobactéries dans les espaces intercellulaires des feuilles. Comme pour *Arabidopsis*, le plasmide binaire recombiné est introduit dans la souche C58C1Rif (pmp90) d'*A. tumefaciens* (voir paragraphe 1.2) par électroporation. Après sélection sur milieu LB additionné de rifampicine, gentamycine et d'un antibiotique adéquat, un clone isolé ensemence une préculture de 5 mL. Celle-ci servira à ensemencer une culture finale de 10 mL, conduite durant 18 h en milieu LB supplémenté avec les mêmes antibiotiques. Les bactéries sont ensuite culottées par centrifugation ($5\ 000 \times g$, 10 min, 4°C) et reprises dans 10 mL de milieu d'infiltration pour tabacs (Annexe 8.1). A nouveau centrifugées ($5\ 000 \times g$, 10 min, 4°C), elles sont reprises dans 11 mL du même milieu d'infiltration pour tabac : la DO_{600nm} de chaque suspension est mesurée et ajustée à 0,5 par dilution avec du milieu d'infiltration. Ces suspensions sont alors incubées 2 h à température ambiante. Les tabacs (*Nicotiana benthamiana*) ont été cultivés en pots individuels jusqu'au stade 4-5 feuilles. Après avoir percé délicatement la face inférieure des feuilles avec une aiguille, la suspension d'agrobactéries est injectée dans les interstices des cellules foliaires à l'aide d'une seringue (Che et *al.*, 2009). Les plants sont alors remis en culture pendant 3 à 5 jours sous faible luminosité. Les feuilles seront ensuite prélevées pour analyses.

En cas de cotransfection, les différentes suspensions d'agrobactéries contenant chacune l'un des plasmides sont mélangées à volume équivalent. Pour éviter le silencing des transgènes transfectés,

Matériels et méthodes

une souche d'agrobactéries contenant le vecteur helper *p19* (Vanhercke et al., 2013) est systématiquement coinoculée. Le gène *p19* est un gène viral supprimant tout mécanisme de silencing.

2.1.4 Culture *in vitro* et système inductible à la dexaméthasone

Principe

L'utilisation d'un système inductible nécessite de cultiver les plantes en présence de la molécule inductrice. Le système utilisé ici repose sur la fusion de la protéine d'intérêt (un facteur de transcription) à un fragment du récepteur aux glucocorticoïdes de rat (*Ratus norvegicus*). En l'absence de son ligand, ce récepteur est séquestré au sein du cytoplasme par une protéine chaperonne (HSP90). En présence de son ligand, un glucocorticoïde ou un analogue comme la dexaméthasone, le récepteur est libéré par HSP90 et migre vers le noyau. La protéine d'intérêt à laquelle il est fusionné pourra alors jouer son rôle de facteur de transcription.

Protocole

Les plantes portant le système inductible sont mises à germer *in vitro* comme présenté en 2.1.1. Après 10 à 15 jours de culture, lorsque les deux premières feuilles émergent, elles sont repiquées en conditions stériles sur un milieu MS (Annexe 8.1) contenant de la dexaméthasone (Sigma-Aldrich) à une concentration finale de 10^{-5} M (5 plantules par boîte de 60 mm de diamètre) puis remises en culture en chambre *in vitro* jusqu'à leur récolte.

2.2 Analyses moléculaires

2.2.1 Extraction d'acides nucléiques

2.2.1.1 Extraction rapide d'ADN génomique

Cette méthode requiert une faible quantité de matériel (une feuille de jeune plantule par exemple). L'échantillon est broyé dans de l'azote liquide en tube, puis suspendu dans 600 μ L de tampon d'extraction (NaCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 50 mM, β -mercaptoéthanol 10 mM). La suspension obtenue est portée à ébullition durant 7 min puis centrifugée ($13\ 000 \times g$, 15 min, 4°C). 450 μ L de surnageant sont prélevés et additionnés de 45 μ L d'acétate d'ammonium 10 M et

Matériels et méthodes

de 1 mL d'éthanol anhydre. L'ADN est précipité durant 30 min à -80°C , puis culotté par une nouvelle centrifugation ($13\ 000 \times g$, 15 min, 4°C), avant d'être séché à l'air libre, et finalement repris dans 30 à 50 μL d'eau.

2.2.1.2 Extraction d'ADN plasmidique : minipréparation (préparation de 2 à 5 μg d'ADN plasmidique)

Une culture bactérienne est réalisée pendant une nuit dans 5 mL de milieu LB (Annexe 8.3) contenant l'agent de sélection approprié à 37°C sous agitation. Après centrifugation ($6\ 500 \times g$, 2 min, 4°C), l'extraction proprement dite est réalisée grâce au kit NucleoSpin Plasmid, selon les instructions du fournisseur (Macherey-nagel). L'ADN plasmidique est élué dans 50 μL de tampon d'éluion puis conservé à -20°C .

2.2.1.3 Extraction d'ARN totaux

Le matériel végétal est congelé immédiatement après récolte dans l'azote liquide et conservé à -80°C . Les tissus végétaux (moins de 100 mg) sont broyés à l'aide d'un mortier et d'un pilon refroidis à l'azote liquide. Le tampon d'extraction (450 μL de tampon RLC du kit d'extraction RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) additionné de β -mercaptoéthanol 0,1 mM) est alors ajouté à la poudre et le tout est à nouveau broyé pendant une à deux minutes. La suite de l'extraction proprement dite est réalisée grâce au kit RNeasy Plant Mini Extraction Kit, selon les instructions du fournisseur (Qiagen). Une étape de dégradation de l'ADN génomique a été réalisée systématiquement, sur la colonne d'extraction, au tout début des étapes de lavage, en utilisant 30 U de DNase I RNase-free (Qiagen), conformément au protocole fourni. Les ARNs sont élués dans 30 μL d'eau RNase-free. Ils sont ensuite conservés à -80°C .

Cas particulier des extractions d'ARN effectuées sur graines en développement, entières ou disséquées : dans ce cas précis, les siliques sont récoltées au stade désiré (voir paragraphe 2.1.2) et conservées dans la glace. Elles sont disséquées sous une loupe binoculaire avec du matériel RNase-free et leur contenu en graines (entières ou disséquées) est immédiatement congelé dans l'azote liquide avant d'être conservé à -80°C . Au cours de l'étape du broyage, du polyvinyl polypyrrolidone (PVP), un composé piégeant les polyphénols, est ajouté pour faciliter l'extraction et les étapes ultérieures d'amplification.

Matériels et méthodes

2.2.2 La transcription inverse

L'étape de transcription inverse a pour objectif de synthétiser un brin d'ADN, appelé ADN complémentaire (ADNc) en utilisant de l'ARN comme matrice et une polymérase spécifique : la transcriptase inverse.

Pour la synthèse des ADNc simples brins, le kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) a été utilisé selon les instructions du fabricant. Brièvement, la rétrotranscription se décompose en quatre étapes. Premièrement, les ARNs sont chauffés à 65°C puis refroidis immédiatement sur de la glace afin d'éliminer les structures secondaires. Puis une étape d'inhibition des RNases a été systématiquement réalisée en utilisant 40 U de RiboLock RNase Inhibitor (Fermentas) dans le tampon approprié. Après avoir préchauffé le milieu réactionnel pendant 2 min à 42°C, la RevertAid H Minus Reverse Transcriptase est ajoutée. Un oligonucléotide poly(dT)₂₂, complémentaire de l'extrémité poly(A) des ARNm, sert d'amorce pour cette réaction ; seuls les ARNm sont ainsi rétrotranscrits. La synthèse est stoppée en dénaturant l'enzyme 15 min à 70°C.

2.2.3 PCR

Principe

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une réaction enzymatique qui permet d'amplifier de manière sélective et exponentielle une séquence d'ADN donnée, conduisant à l'accumulation d'un grand nombre de copies du fragment d'ADN considéré, lesquelles peuvent être simplement visualisées sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose, clonées ou séquencées. Dans le cas particulier de la PCR en temps réel, le suivi de l'accumulation des copies permettra d'évaluer la richesse relative d'une séquence d'ADN d'intérêt comparée à une séquence de référence au sein d'un mélange d'ADNc. Cette réaction enzymatique nécessite une bonne connaissance de la séquence des bordures flanquant le fragment d'ADN amplifié. Des oligonucléotides s'hybridant spécifiquement de part et d'autre de la séquence cible, une fois celle-ci dénaturée, sont utilisés (MWG Eurofins). Ces amorces, dont les extrémités 3'-OH sont orientées en direction du fragment à amplifier, constituent un point d'ancrage pour l'ADN polymérase thermostable qui copie les matrices d'ADN simple brin.

Matériels et méthodes

PCR classique non quantitative

La réaction est menée dans un volume de 20 μL . Celui-ci contient 0,2 mM d'un mélange des quatre dNTPs (Invitrogen), 0,5 μM de chaque amorce, 5 U. μL^{-1} d'ADN polymérase thermostable (Taq Fermentas), 2 μl d'un tampon 10X spécifique de la Taq ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Fermentas), 2,5 mM de MgCl_2 , et 0,4 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ d'ADN matrice.

Les microtubes de 0,2 mL contenant les produits de la réaction sont placés dans un thermocycleur programmable (Applied Biosystem) et l'amplification s'effectue au cours d'une série de cycles successifs :

- dénaturation de l'ADN à 95 °C (30 s)
- hybridation des oligonucléotides sur la matrice à une température spécifique des amorces (30 s)
- élongation par ajout de dNTPs libres aux extrémités 3'-OH du brin complémentaire en cours de synthèse à 72 °C (1 min pour 1 000 paires de bases)

Après environ 35 cycles, le système d'amplification arrive à saturation du fait de l'épuisement du milieu réactionnel en dNTPs et de la baisse d'efficacité de l'ADN polymérase. Au terme de n cycles d'amplifications, la théorie prévoit l'obtention de $(1+\text{Eff})^n$ copies du fragment cible, où Eff représente l'efficacité de l'amplification (dépendante de l'efficacité de l'ADN polymérase, de la séquence des amorces, de la taille du fragment d'ADN à amplifier...). La représentation théorique de la quantité de copies synthétisées en fonction du nombre de cycles d'amplification est une courbe exponentielle. La courbe obtenue dans la pratique est une sigmoïde, dont le plateau reflète la saturation du processus d'amplification.

Cas particulier de la PCR semi-quantitative

Il est possible d'évaluer la quantité relative d'une séquence d'ADN d'intérêt par rapport à une séquence de référence en utilisant la technique de PCR : c'est la PCR semi-quantitative. Elle repose sur deux principes :

- La quantité d'ADN (Q_n) de la séquence amplifiée après n cycles est proportionnelle à sa quantité initiale (Q_0) selon la relation suivante : $Q_n = Q_0 \cdot (1+\text{Eff})^n$ (avec Q , la quantité d'ADN ; Eff, l'efficacité de la PCR ; n , le nombre de cycles). Ceci étant vrai uniquement dans la partie exponentielle de la courbe comme évoqué ci-dessus, il est nécessaire d'ajuster le nombre de cycles pour ne pas atteindre la saturation.

Matériels et méthodes

- L'intensité de la bande observée après électrophorèse sur gel d'agarose est proportionnelle à la quantité d'ADN déposé.

Ainsi l'intensité d'une bande d'un produit PCR observé après électrophorèse reflète l'abondance initiale de cette séquence dans l'échantillon d'ADN utilisé comme matrice. Pour pouvoir comparer l'abondance d'une séquence donnée dans divers échantillons, il faut préalablement s'assurer que les divers échantillons d'ADN utilisés comme matrice contiennent une même quantité d'ADN total. Pour cela, l'amplification d'une séquence de référence (un gène de ménage) dont la quantité ne varie pas entre les différents échantillons est utilisée.

2.2.4 RT-PCR quantitative

Principe

Au cours de la PCR en temps réel, ou PCR quantitative, un suivi du nombre de copies synthétisées au cours du temps va permettre d'estimer la richesse relative d'une séquence d'ADN d'intérêt comparée à une séquence de référence au sein d'un mélange d'ADNc servant de matrice. Ainsi, il sera possible d'évaluer le niveau d'expression relatif d'un gène par rapport à un autre gène utilisé comme référence.

Le suivi du nombre de copies synthétisées est permis par la présence d'un agent intercalant, le Sybr Green I, dans le milieu réactionnel. Lorsqu'il est lié à l'ADN double brin, celui-ci devient fluorescent (maximum d'émission à 530 nm) après excitation, et la fluorescence détectée est directement proportionnelle à la quantité d'ADN présente. Au cours de la phase de dénaturation de l'ADN, le Sybr Green est libéré dans le milieu réactionnel et cesse d'émettre jusqu'à la séquence d'élongation suivante. Le suivi de la fluorescence à la fin de chaque cycle d'amplification permet de construire la cinétique d'accumulation des produits de la PCR, qui a la forme d'une sigmoïde. Dans la portion linéaire de cette courbe, le nombre de copies synthétisées Q_n peut être calculé de la manière suivante :

$$Q_n = Q_0 \cdot (1 + \text{Eff})^n$$

(Q_0 représente le nombre de copies de la matrice initialement introduites dans le milieu réactionnel, Eff l'efficacité de la réaction, et n le nombre de cycles d'amplification réalisés)

En comparant le nombre de cycles nécessaires à l'obtention d'une même quantité Q_n de copies dans deux réactions conduites en parallèle sur un même mélange d'ADNc et avec deux couples d'oligonucléotides distincts, il est possible d'évaluer la richesse relative d'une séquence d'ADNc par

Matériels et méthodes

rapport à une autre au sein du mélange. Le rapport des concentrations entre les deux séquences considérées est calculé de la manière suivante :

$$Q_{n1} = Q_{n2} \Rightarrow Q_{01}/Q_{02} = (1+Eff)^{(n2-n1)}$$

avec n_1 et n_2 nombres de cycles tels que $Q_{n1} = Q_{n2}$, et en considérant que $Eff_1 = Eff_2 = Eff$ (voir ci-après)

Protocole

Les réactions de PCR sont réalisées dans un thermocycleur à air pulsé couplé à un microfluorimètre (Light Cycler ; Roche Diagnostics). Le volume réactionnel de 20 μ L comprend 5 μ L d'un mélange d'ADNc (obtenu par une dilution plus ou moins poussée d'un produit de reverse transcription (voir paragraphe 2.2.2)), 1 μ L de chacune des deux amorces à 10 μ M, 9 μ L d'eau stérile et 4 μ L de LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche) contenant la FastStart DNA polymérase, les dNTP et le Sybr Green I dans un tampon de réaction. Chaque cycle de PCR comprend une phase de dénaturation de l'ADN à 95°C (10 s), une étape d'hybridation des amorces à 60°C (10 s) et une phase d'élongation à 72°C (15 s). Au préalable, les ADNc ont été dénaturés pendant 8 min à 95°C, ce qui permet également d'activer la Taq polymérase utilisée (dite "hot start"). Afin de vérifier la spécificité du produit amplifié, la PCR à proprement parler est suivie d'une lente montée en température (0,1°C par seconde, de 60°C jusqu'à 95°C). Au cours de cette rampe de température, la fluorescence va diminuant ; elle chute brusquement lorsque la température de fusion (T_m) du produit de PCR est atteinte. Il est ainsi possible de déterminer la nature et la pureté du produit PCR, chaque fragment amplifié ayant une T_m spécifique.

Choix des amorces

Les amorces utilisées ont une longueur de 20 pb en moyenne et permettent d'amplifier un fragment de 100 à 200 pb. La spécificité de chaque couple d'amorces est vérifiée pour chaque réaction grâce à la courbe de fusion : si l'amplification est spécifique, la dérivée seconde de la fluorescence par rapport au temps ne doit présenter qu'un seul pic.

Pour l'ensemble des études d'expression menées, le gène de référence utilisé est *EF1 α 4* (*At5g60390*, *EF*), qui code un facteur d'élongation exprimé de manière ubiquiste (Nesi et al., 2000). La détermination du niveau d'expression d'un gène relativement à *EF* implique que l'efficacité de la PCR menée avec les amorces spécifiques de ce gène soit identique à l'efficacité de la réaction menée avec les amorces servant à amplifier l'ADNc de *EF*. Toutes choses étant

Matériels et méthodes

identiques par ailleurs, cela revient à vérifier que les couples d'amorces utilisés ont des efficacités comparables. Aussi détermine-t-on l'efficacité de chaque couple. Pour cela, une gamme décroissante de concentrations en ADNc est réalisée et le couple d'amorce dont on souhaite déterminer l'efficacité est testé sur chaque dilution. A chaque dilution correspond un nombre spécifique de cycles (croissant avec la dilution) nécessaire pour l'obtention d'une même quantité arbitraire Q de copies. La représentation graphique de ce nombre de cycles en fonction du logarithme de la concentration en ADNc permet tout d'abord de déterminer dans quelle gamme de concentrations ces deux variables sont liées par une relation linéaire. Il conviendra alors de travailler avec des dilutions en ADNc appartenant à cette zone. Ensuite, la pente de la droite obtenue nous permet de calculer l'efficacité du couple d'oligonucléotides testé.

2.2.5 Electrophorèse d'acides nucléiques

Principe

Les acides nucléiques (ADN et ARN) peuvent être visualisés sous UV sur gel d'agarose en présence d'un agent intercalant fluorescent après électrophorèse. Le principe de l'électrophorèse consiste à faire migrer les acides nucléiques au sein d'un gel baigné dans un tampon conducteur entre deux électrodes. Les acides nucléiques étant chargés négativement, ils migreront vers le pôle positif du bain. Les pores du gel se comportant comme un filtre, la vitesse de migration des fragments dépendra de leur taille, de leur charge (aussi proportionnelle à leur taille) et de la concentration du gel en agarose.

Protocole

Les acides nucléiques (ADN amplifié par PCR, ARN extraits,...) additionnés de tampon de charge (Annexe 8.2) sont déposés sur gel d'agarose 1% (Sigma) (Annexe 8.2) en présence de bromure d'éthidium (aMRESCO), un agent intercalant. Après migration dans un tampon Tris/acétate/EDTA (TAE) (Invitrogen) pendant 20 min à 135 V, ils sont révélés sous UVs.

Matériels et méthodes

2.2.6 Clonage

2.2.6.1 PCR à haute fidélité

Lorsque la séquence amplifiée par PCR est destinée à être clonée, la Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen) est utilisée. Son activité de relecture des brins néosynthétisés limite les erreurs de réplication. Contrairement aux autres Taq d'usage courant, qui ont tendance à ajouter des nucléotides (des adénines en particulier) aux extrémités 3'-OH des fragments néosynthétisés, la polymérase Phusion génère des fragments d'ADN à bouts francs. La réaction enzymatique est menée dans un volume de 50 μ L comprenant 2 μ L d'un mélange à 5 mM des quatre dNTPs (Invitrogen), 1 μ L de chacune des amorces à 10 μ M, 1 U de Phusion, 5 μ L de tampon de réaction HF 10X (à 2,5 mM $MgCl_2$) et 10 à 100 ng d'ADN.

Les microtubes de 0,2 ml contenant les produits de la réaction sont placés dans un thermocycleur programmable (Applied Biosystem) et l'amplification s'effectue au cours d'une série de cycles successifs dont les caractéristiques sont spécifiques à cette enzyme :

- dénaturation de l'ADN à 98 °C (7 s)
- hybridation des oligonucléotides à une température spécifique des amorces (15 s)
- élongation à 72 °C (20 s pour 1 000 paires de bases)

2.2.6.2 Clonage Gateway

Dans cette technique de clonage par recombinaison, la séquence à cloner est amplifiée par PCR avec la Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen) en utilisant un couple d'amorces ancrées dans la séquence du gène et auxquelles ont été ajoutées les séquences de recombinaison *attB1* (5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT-3') et *attB2* (5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT-3'). S'ensuit une recombinaison entre les sites *attB1* et *attB2*, d'une part, et les sites *attP1* et *attP2* présents sur le vecteur d'entrée *pDONR207* (voir paragraphe 1.4), d'autre part. Cette réaction est catalysée par la BP clonase selon les instructions du constructeur (Invitrogen). Le construit obtenu sert à la transformation de la souche DH10B d'*E. Coli* (voir paragraphe 1.2), lesquelles sont sélectionnées sur gentamycine. Seules les bactéries porteuses d'un vecteur ayant recombiné vont croître. En effet, la cassette de contre-sélection *ccdB* présente dans les plasmides n'ayant pas recombiné est toxique pour les bactéries. Lorsqu'il s'exprime, *ccdB* provoque l'insertion d'une arginine dans la protéine A de la gyrase, bloquant ainsi les processus de réplication de l'ADN.

Matériels et méthodes

Une seconde recombinaison, de type LR, permettra ensuite de transférer la séquence d'intérêt du vecteur *pDONR207* dans un vecteur de destination du type *pBI101 Gateway* ou *pMDC32 Gateway* (Annexe 9). Cette réaction sera catalysée par la LR clonase, qui recombine les sites *attL* issus de la précédente recombinaison (BP) et les sites *attR* du vecteur de destination. De la même manière que pour une recombinaison de type BP, seules les bactéries DH10B transformées par un vecteur recombiné sont capables de pousser sur l'antibiotique adéquat.

2.2.6.3 Clonage sans ligation (*Ligation independent cloning*)

Ce type particulier de clonage rapide et directionnel repose sur l'association spécifique d'extrémités d'ADN simple brin complémentaires de plus de neuf nucléotides. Il nécessite un vecteur particulier modifié par l'insertion du site de restriction de l'enzyme *PmlI* associé à un environnement riche en A d'un coté du site et riche en T du coté opposé (5' - TT CGA CAA GAA **CAC GTG** CTC TTC TTC AA - 3'), tel le *pHISi LIC* (Annexe 9) (le site de l'enzyme *PmlI* est indiqué en gras). Des amorces dédiées arborant à leur extrémité 5' la séquence complémentaire de l'une ou l'autre des extrémités du *pHISi LIC* digéré par *PmlI* sont utilisées pour amplifier le fragment d'ADN à cloner.

Le vecteur est tout d'abord digéré avec 20 U d'enzyme *PmlI* (Biolabs) dans le tampon approprié pendant 3 h à 37°C puis traité à la polymérase T4 en présence de dTTP dans un volume de 20 µL (9 µL d'ADN digéré, 2 µL de tampon NEB2 10X (Biolabs), 2 µL de dTTP 25mM, 5 U de polymérase T4) pendant 30 min à 22°C et enfin placé à 75°C pendant 20 min pour inactiver les enzymes. La polymérase T4 possède une activité exonucléase 3' → 5' créant ainsi une portion d'ADN simple brin à l'extrémité du vecteur digéré. L'activité exonucléasique de la polymérase T4 est inhibée lorsqu'elle entre en compétition avec son activité polymérase au niveau du premier T rencontré.

Le fragment d'ADN à cloner, amplifié par PCR, est lui aussi traité à la polymérase T4 en présence de dATP dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

Finalement, 1 µL du vecteur traité et 1 µL du fragment d'ADN traité sont mélangés, chauffés à 65°C pendant 2 min pour éliminer les structures secondaires et incubés 20 min à 20°C pour permettre l'association des brins complémentaires. Le vecteur ainsi obtenu sert à la transformation de la souche DH10B d'*E. Coli* (voir paragraphe 1.2), sélectionnée ensuite sur milieu LB gélosé (Annexe 8.3) additionné de l'antibiotique adéquat.

Matériels et méthodes

2.2.6.4 Préparation des bactéries électrocompétentes

Une culture bactérienne est réalisée sous agitation dans 3 x 500 mL de milieu LB (Annexe 8.3) inoculés par 1 mL d'une préculture de 5 mL d'*E.coli* ou d'agrobactéries (avec les agents de sélection appropriés). Lorsque la culture est en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} \sim 0,6$), les bactéries sont centrifugées ($6\ 500 \times g$, 10 min, 4°C) et les culots obtenus repris dans 500 mL d'une solution stérile aqueuse de glycérol à 10% (v/v) à 4°C. Cette étape est répétée quatre fois dans des conditions de centrifugation identiques ($6\ 500 \times g$, 10 min, 4°C), les culots bactériens étant repris dans des volumes décroissants de glycérol à 10%, successivement égaux à 250 mL, 125 mL, 62,5 mL, et 200 μ L. Les bactéries sont ensuite aliquotées en microtubes par 10 μ L et stockées à -80°C avant utilisation.

2.2.6.5 Transformation par électroporation

La transformation des bactéries par un plasmide recombiné est réalisée par un choc électrique, selon la technique de l'électroporation (Potter, 1993). Dans une cuve à électroporation (contenu de 1 mL, largeur de 0,2 cm), 0,8 μ L de produit de recombinaison sont mélangés à 20 μ L de bactéries électrocompétentes (*E. coli* ou *A. tumefaciens*). La cuve est ensuite placée dans un électroporateur (Gene Pulser II System ; Bio-Rad) où une tension de 1,25 kV lui est appliquée. Après ajout rapide de 1 mL de milieu LB (Annexe 8.3), celles-ci sont transférées dans un tube de 13 mL, qui est incubé sous agitation durant 1 h à 37°C pour *E.coli*, ou durant 2 h à 28°C pour *A. tumefaciens*. Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur boîtes de Pétri contenant du milieu LB solide additionné du ou des antibiotique(s) adéquat(s) (Annexe 8.3) et incubées 16 h à 37°C pour *E.coli*, ou 2 jours à 28°C pour *A. tumefaciens*.

2.2.7 Séquençage

La technique utilisée pour le séquençage d'ADN est basée sur la méthode de Sanger et sous-traitée à la société Genoscreen. Une quantité minimale de 50 ng de produit PCR ainsi que la ou les amorces adéquates sont fournies à la société qui délivre en retour un chromatogramme brut.

Matériels et méthodes

2.2.8 Analyse transcriptomique sur puce CATMA

Principe

Une puce à ADN permet de comparer la richesse relative en ARNm de deux échantillons, pour un set de gènes donné. La puce est constituée de puits au fond desquels sont fixés des oligonucléotides spécifiques de chaque ARNm du set de gènes considéré. Chaque puce permet de comparer le contenu relatif en ARNm d'un échantillon par rapport à un autre, qui sert de référence. Pour ce faire, les ARNm extraits de chaque échantillon sont rétrotranscrits en ADNc. Au cours de cette étape, chaque ADNc est couplé à un fluorochrome (fixé sur l'uracile) : tous les ADNc de l'échantillon témoin sont marqués avec un premier fluorochrome (vert par exemple) et ceux de l'échantillon testé avec un second (rouge par exemple).

Un mélange d'une quantité équivalente des ADNc marqués provenant des deux échantillons est alors hybridé sur la puce. Dans chaque puits, seuls les ADNc pouvant s'hybrider avec les oligonucléotides fixés sont retenus. La lecture des résultats nécessite un LASER qui excite successivement les deux fluorochromes choisis et un détecteur qui enregistre l'intensité de fluorescence correspondante dans chaque puits. Dans une loge donnée, l'intensité de fluorescence d'un fluorochrome est directement proportionnelle à la quantité d'ADNc fixée portant ce même fluorochrome. Ainsi pour chaque loge, c'est-à-dire pour chaque gène représenté sur la puce, la différence d'intensité de fluorescence émise par les deux fluorochromes reflète directement la différence d'expression de ce gène entre les deux échantillons.

Protocole

L'analyse transcriptomique a été réalisée à l'Unité de Recherche en Génomique Végétale (URGV) d'Evry sur des puces de type CATMA qui contiennent des oligonucléotides spécifiques de 24 576 gènes d'*A. thaliana* (Hilson et al., 2003). Les ARNs totaux des échantillons de chaque répétition biologique ont été extraits suivant le protocole décrit précédemment (voir 2.2.1) afin d'obtenir une concentration minimale de 200 ng.µL⁻¹ et une quantité minimale de 4 µg.

La transcription inverse des ARNm en présence des fluorochromes Cy3-dUTP (vert) ou Cy5-dUTP (rouge) (Perkin-Elmer-NEN Life Science Products), l'hybridation des échantillons sur les puces ainsi que leur lecture ont été réalisés comme décrit par Lurin et al. (2004). Une répétition technique avec échange des fluorochromes a été menée pour chaque hybridation.

Matériels et méthodes

Pour chaque puce, un tableau contenant le logarithme (\log_2) de l'intensité de fluorescence de chaque puits à 635 nm (rouge) et 532 nm (vert) est généré. Aucun bruit de fond n'est soustrait aux mesures, mais une normalisation puce par puce permet d'éliminer les biais techniques. Tout d'abord, une normalisation globale dépendante de l'intensité et utilisant la procédure loess (Yang et al., 2002) permet de corriger les biais liés aux fluorochromes. Ensuite, le log-ratio (différence entre le logarithme de l'intensité de fluorescence de chaque fluorochrome) est calculé pour chaque puits. La médiane de l'ensemble des log-ratio d'une puce est alors déterminée et retranchée au log-ratio de chaque puits.

Après normalisation et correction, la moyenne des log-ratio des 4 hybridations (2 répétitions biologiques et 2 répétitions techniques) calculée pour chaque comparaison sert de base aux analyses suivantes. L'utilisation d'un test de Student apparié permet d'attribuer une p -value à chaque valeur. Cependant, étant dans un contexte de comparaisons multiples utilisant le même jeu de données, un ajustement de cette dernière par une méthode permettant de corriger les faux positifs s'impose. Ainsi la liste des p -values obtenue par le test de Student a par la suite été corrigée suivant la méthode de Benjamini & Hochberg.

Nous considérons qu'un gène est différentiellement exprimé entre deux échantillons si la p -value corrigée associée à son log-ratio est inférieure à 0,05.

2.2.9 Simple hybride

Principe

Le simple hybride est une méthode permettant de tester l'interaction physique (fixation) entre un facteur de transcription et un fragment d'ADN. Le fragment d'ADN d'intérêt est inséré dans le plasmide *pHISi LIC* (Annexe 9) en amont du gène *HIS3*, un des gènes de la voie de biosynthèse de l'histidine. Le facteur de transcription est quant à lui fusionné au domaine d'activation de GAL4 (GAL4-AD) dans le vecteur *pDEST22* (Annexe 9).

Ces deux transgènes transfectés dans une souche de levure incapable de croître sur milieu minimum, la capacité des cellules à former des colonies sur un milieu sans histidine est alors testée. Si les levures transfectées sont capables de se développer sur un milieu sans histidine alors cela signifie que le facteur de transcription se fixe sur le fragment d'ADN testé et induit l'expression du gène *HIS3* via GAL4-AD. Dans le cas contraire, rien ne peut être conclu quant à la fixation ou non du facteur de transcription d'intérêt sur le fragment d'ADN cible.

Matériels et méthodes

Transfection des levures

Pour une transfection intégrative du promoteur à tester, le plasmide *pHISi LIC* (Annexe 9) dans lequel il a été cloné est dans un premier temps linéarisé. Pour cela, 1 µg du vecteur est digéré avec *ApaI* ou *XhoI* pendant 3 h à 37°C dans le tampon approprié. La qualité de la digestion est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose : une bande bien nette est alors visible à environ 6 kb. Selon l'enzyme utilisée, le *pHISi LIC* linéarisé s'intégrera au locus *HIS3* (*XhoI*) ou *URA3* (*ApaI*) du génome de la levure *S. cerevisiae*.

Pour une transfection sans intégration du plasmide *pDEST22* dans lequel le facteur de transcription a été cloné, la linéarisation n'est pas requise.

Le jour précédent la transfection, une préculture de 10 mL de YPDA (Annexe 8.3)ensemencée avec la souche YM4271 (Voir paragraphe 1.3) est incubée sous agitation à 28°C pendant 16 h. Le lendemain, une culture de 50 mL de YPDA est alorsensemencée avec $2,5 \cdot 10^8$ cellules provenant de cette préculture et incubée 4 à 5 h à 28°C sous agitation. En pratique, une unité à DO_{600nm} correspond $1 \cdot 10^7$ cellules.mL⁻¹, le volume de préculture utilisé pour l'ensemencement est alors calculé de la manière suivante : $(5 \times V_{\text{culture finale}}) / (DO_{600 \text{ mesurée}} \times 10)$.

Lorsque la DO_{600nm} de la culture est comprise entre 1 et 2, les levures sont récoltées par centrifugation (3 000 x g pendant 5 min à 4°C). Le surnageant éliminé, les cellules sont lavées dans 25 mL d'eau distillée stérile et de nouveau culottées par centrifugation (3 000 x g pendant 5 min à 4°C). Ce culot est alors lavé dans 1 mL d'acétate de lithium (LiAc) 100 mM puis repris dans 400 à 500 µL de LiAc 100 mM. Pour chaque transfection, 50 µL de cette suspension cellulaire est aliquotée dans un nouveau tube et culottée, le surnageant est alors éliminé. Sont alors ajoutés dans l'ordre 240 µL de PEG (3350) 50% (p/v), 36 µL de LiAc 1M et 84 µL d'un mélange comprenant 17 µL du plasmide, 10 µL d'ADN de sperme de saumon (Invitrogen) et 57 µL d'eau stérile. Chaque tube est alors vortexé 1 min jusqu'à la resuspension complète du culot et incubé à 28°C pendant 30 min. Puis les cellules sont à nouveau vortexées pour homogénéiser la suspension et placées à 42°C pendant 25 min. A l'issue du choc thermique, les cellules sont culottées (13 000 x g, 1min) et le surnageant contenant le PEG est éliminé. Reprises dans 200 µL d'eau stérile, les levures sont étalées sur un milieu sélectif SD-U (U, Uracile ; Annexe 8.3) (pour une transfection intégrative du construit rapporteur) ou sur SD-U-W (W, Tryptophane ; Annexe 8.3) (pour une transfection non intégrative du *pDEST22* dans une souche ayant au préalable été transformée avec un construit rapporteur intégré de manière stable) et cultivée à 28°C pendant 72 h.

Matériels et méthodes

Test d'autoactivation

Seules les levures ayant intégré dans leur génome un promoteur d'intérêt fusionné au gène rapporteur *HIS3* (au locus *URA3* ou *HIS3*) ont pu croître sur un milieu sans uracile. Un test d'autoactivation est alors conduit afin de déterminer si le gène *HIS3* est exprimé en l'absence de tout facteur de transcription exogène. Pour ce faire, six clones sont repiqués sur un milieu dépourvu d'histidine auquel est ajouté du 3-aminotriazol (3-AT, Sigma), un inhibiteur de la synthèse d'histidine, à différentes concentrations : 0, 5, 10, 15, 25, 50 mM. Chaque clone est resuspendu dans 60 µL d'eau stérile puis une goutte de cette suspension cellulaire est déposée sur chaque milieu. La quantité de levure repiquée sur chaque milieu étant identique, il sera possible d'évaluer leurs vitesses de croissance relatives après 24, 48 ou 72 h d'incubation à 28°C. Au-delà d'une croissance sur 15 ou 25 mM de 3-AT, les clones sont considérés comme s'autoactivant et sont écartés. Inversement, les clones ne s'autoactivant pas sont sélectionnés pour une seconde étape de transfection avec le *pDEST22*.

Test d'interaction

Les clones sélectionnés sur SD-U-W (Annexe 8.3) contiennent à la fois le promoteur d'intérêt fusionné au gène rapporteur *HIS3* issu de l'intégration du *pHISi LIC* et le vecteur *pDEST22* exprimant le facteur de transcription à tester sous contrôle du promoteur *ADH1*. Pour chaque interaction à tester, six clones sont repiqués comme décrit précédemment sur des milieux dépourvus d'histidine (SD-U-W-H ; H, Histidine ; Annexe 8.3) auquel est ajouté du 3-AT à 0, 5, 10, 15, 25 ou 50 mM, puis incubés 48 h à 28°C. Si les clones sont capables de croître sur un milieu dont la concentration en 3-AT est supérieure à celle relevée lors du test d'autoactivation, cela signifie que le facteur de transcription testé interagit physiquement avec le promoteur d'intérêt en système hétérologue levure. Si, en revanche, les clones ne sont pas capable de croître sur un milieu dont la concentration en 3-AT est supérieure à celle notée lors du test d'autoactivation, cela signifie qu'il n'y a pas d'interaction physique entre le facteur de transcription et le promoteur testé dans ce système.

Matériels et méthodes

2.3 Analyses biochimiques

2.3.1 Analyses lipidiques

Extraction et dérivatisation des acides gras totaux

Les acides gras totaux sont extraits à partir de lots de 20 graines (ou 20 embryons ou 200 fractions albumen) sèches ou lyophilisées par incubation à 94°C pendant 1 h 30 min dans un mélange de méthanol/acide sulfurique/toluène (100:2,5:30, v/v/v) en présence de 17:0 utilisé comme étalon interne. Les acides gras, libres ou estérifiés sous forme de lipides, sont ainsi transformés en esters méthyliques. Ces esters, après ajout de 450 µl d'hexane et de 1,5 mL d'eau salée (NaCl 9 g.L⁻¹), suivi d'une agitation vigoureuse et d'une centrifugation (1000 × g, 3 min, 4°C), sont extraits dans la phase organique. Celle-ci est plus ou moins concentrée sous diazote selon la nature des échantillons analysés.

Chromatographie en phase gazeuse

Pour chaque échantillon, 1 µL d'extrait est analysé, après dérivatisation, par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne 30 m x 0,53 mm EC-wax (Alltech) ; la détection et la quantification des esters méthyliques est réalisée par ionisation de flamme (Browse *et al.*, 1986). Une température initiale de 175°C est appliquée durant 1 min, puis une rampe de température (0,5°C par min) est appliquée jusqu'à 190°C, suivie d'une seconde (3°C par min) jusqu'à 240°C. Cette température finale est maintenue 10 min. Ces différentes rampes de températures sont appliquées sous un flux constant d'hélium de 3 mL.min⁻¹. Une quantité déterminée d'un acide gras absent chez les plantes (17:0) ajoutée à chaque échantillon au moment de la dérivatisation sert d'étalon interne.

2.3.2 Analyses des protéines

2.3.2.1 Extraction des protéines

Les protéines de la graine sont extraites à partir de lots de 50 graines sèches (50 embryons ou 200 fractions albumen pour les graines disséquées) dans 250 µL de tampon Laemmli (Annexe 8.4). Chaque échantillon est broyé au Fastprep à l'aide d'une bille en céramique pendant 30 s trois fois de suite. Les extraits sont ensuite purifiés par centrifugations successives (13 000 × g, 15 min,

Matériels et méthodes

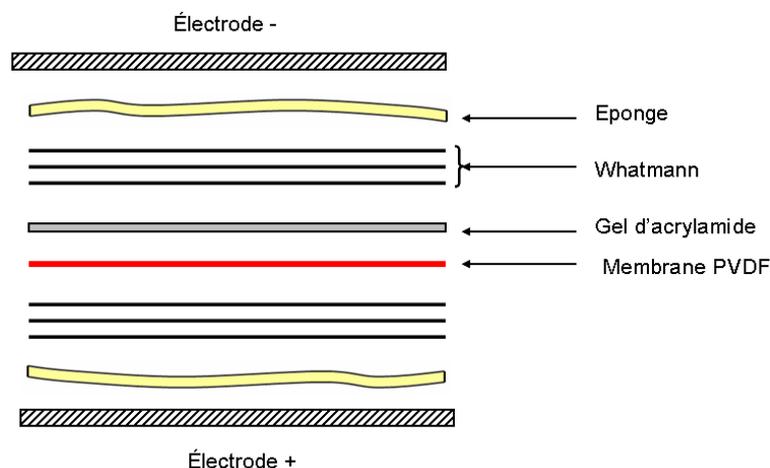
15°C) afin d'éliminer les débris tissulaires et la phase organique, puis chauffés 5 min à 100°C pour dénaturer les protéines.

2.3.2.2 Electrophorèse SDS-PAGE

Les protéines extraites sont séparées par électrophorèse sur un gel NuPAGE Novex 12% Bis-Tris dans un tampon de migration NuPAGE MOPS (Invitrogen) additionné d'un agent antioxydant selon les recommandations du fournisseur, pendant 1 h 30 min à 90 V. Le gel est coloré avec du bleu de Coomassie G-250 (Neuhoff et *al.*, 1988) (Annexe 8.4). Le marqueur de poids moléculaire Mark12 (Invitrogen) est utilisé pour une coloration du gel au bleu de Coomassie. Le marqueur Seebblue Plus 2 (Invitrogen) est utilisé pour un transfert ultérieur sur membrane PVDF.

2.3.2.3 Western blot

Dans un premier temps, les extraits protéiques sont séparés sur gel d'acrylamide puis le gel est équilibré quelques minutes dans le tampon de transfert (Annexe 8.4). Extemporément, la membrane PVDF (GE Healthcare) est rincée 10 s dans de l'éthanol 100% puis équilibrée dans le tampon de transfert pendant 15 min au minimum. Le transfert est réalisé en conditions semi-sèches grâce au Minicriterion (Biorad), des éponges imbibées de tampon assurant l'humidification. La membrane PVDF ainsi préparée est positionnée du côté de l'électrode positive et le gel du côté de l'électrode négative comme présenté dans la figure ci-dessous. De part et d'autre du couple gel-membrane, une série d'éponges et de papiers Whatmann imbibés forment un pont salin conducteur entre les électrodes, permettant ainsi le passage du courant. Les protéines chargées négativement migreront vers le pôle positif, c'est-à-dire vers la membrane. Pour assurer un transfert optimal, une tension de 15V est appliquée pendant 1h.



Matériels et méthodes

A l'issue de l'étape de transfert, la membrane est incubée pendant une nuit à 4°C dans du TBS (Annexe 8.4) contenant 5% de lait écrémé en poudre (Régia) pour bloquer les sites aspécifiques. Le lendemain, la membrane est transférée dans une solution de TBS contenant l'anticorps primaire à la dilution adéquate (Annexe 8.4) pendant 2 h puis rincée trois fois de suite pendant 15 min dans du TBS-Tween (Annexe 8.4). Enfin la même opération est répétée avec l'anticorps secondaire, couplé à la HRP (Horse Radish Peroxydase) et dirigé contre les fragments constants des anticorps primaires (IgG).

La révélation s'effectue grâce au kit Enhanced ChimiLumiscence (ECL, GE Healthcare) et à la caméra LAS4000 (Fujifilm). Brièvement, lorsque le luminol et le réactif au peroxyde d'hydrogène sont mis au contact de la HRP, cette dernière oxyde le luminol grâce au H₂O₂ produisant un composé excité qui se désexcite en émettant des photons. Détectée par la caméra, la quantité de photons reçue est convertie en niveaux de gris pour chaque pixel.

2.4 Analyses morphologiques et cytologiques

2.4.1 Suivi de la morphogenèse de l'embryon

Des siliques immatures sont disséquées et les graines qu'elles contiennent sont décolorées entièrement par une solution de chloral hydraté/glycérol/eau (8:2:1, p/v/v) pendant 3 à 5 h, cette solution possédant la propriété de vider les cellules de leur contenu. Les graines sont montées entre lame et lamelle et observées au microscope (Axioplan 2 ; Zeiss) avec des objectifs Nomarski (objectifs à contraste de phase). Les images ont été numérisées en utilisant le système de capture d'image ProgresResC10Plus (Jenoptik).

2.4.2 Suivi du développement de l'albumen

Des graines sont récoltées à partir de siliques immatures (14 jours après floraison) et disséquées de manière à prélever uniquement la monocouche cellulaire qui constitue l'albumen. Ce tissu est alors monté entre lame et lamelle dans une goutte d'eau et observé au microscope (Axioplan 2 ; Zeiss) avec des objectifs Nomarski.

Matériels et méthodes

2.4.3 Observation de la morphologie des graines et estimation de leurs dimensions

La morphologie des graines est observée sous loupe binoculaire. Les images ont été numérisées en utilisant le système de capture d'images ProgresResC10Plus (Jenoptik). Les dimensions des graines, largeur et longueur ont été mesurées sur les images numérisées à l'aide du Logiciel ImageJ. Un étalon placé sur chaque image permet de convertir les dimensions exprimées en pixel en unités de longueur.

2.4.4 Activité GUS

La détection de l'activité GUS au niveau tissulaire nécessite l'utilisation de l'acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique (X-Gluc), dissout dans la diméthylformamide à une concentration stock de 10 mg pour 100 μ L. Celui-ci est transformé par la β -glucuronidase en acide glucuronique et en un précipité bleu. Les tissus à analyser sont incubés dans un tampon d'infiltration (tampon GUS) préparé extemporanément (tampon phosphate 0,1 M pH 7,2, Na₂-EDTA 10 mM, Triton X-100 1%, X-Gluc 2 mM). Lorsque l'activité GUS étudiée est particulièrement forte, l'ajout de ferricyanide et de ferrocyanide (K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆, 25 mM/25 mM) dans le tampon permet d'éviter la diffusion du précipité. Après infiltration des échantillons sous vide pendant 1 h, ceux-ci sont placés à 37°C, à l'obscurité, durant 16 h. Après incubation, les tissus sont décolorés dans de l'éthanol 70% et observés sous loupe binoculaire ou au microscope optique (Axioplan 2 ; Zeiss).

2.4.5 Coloration d'Alexander : test de viabilité du pollen

Cette technique repose sur la coloration différentielle des grains de pollen fertiles et stériles (Alexander, 1969). Des boutons floraux sont récoltés et incubés une semaine dans de l'éthanol 10%. Les étamines sont alors disséquées et montées entre lame et lamelle dans la solution de coloration d'Alexander (Ethanol 10% (v/v), vert malachite 0,01% (v/v), acide fuschine 0,05% (v/v), orange G 0,005% (v/v), phénol 5,5% (v/v), chlorale hydraté 50 g.L⁻¹, acide acétique glacial 2% (v/v), glycérol 25% (v/v)) (Alexander, 1969). Après 24 h de coloration, les échantillons sont observés au microscope optique, seuls les grains de pollen colorés en magenta sont viables.

Matériels et méthodes

2.4.6 Observation de graines au Microscope Electronique à Balayage (MEB)

Les échantillons à observer sont fixés sur un plot à l'aide de ruban adhésif puis introduits dans la chambre du MEB. Une fois le vide effectué, un faisceau d'électrons balaye les échantillons et un détecteur capture le signal résultant. L'interface numérique du logiciel MiniSEM permet d'ajuster les paramètres et d'enregistrer les images obtenues.

2.5 Analyses bioinformatiques

2.5.1 Alignement de séquences et phylogénie

L'alignement des séquences protéiques des SAD d'*Arabidopsis* pour l'analyse phylogénétique a été réalisé grâce au programme MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) version 7 en utilisant les paramètres par défaut (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). La construction de l'arbre phylogénétique a été réalisée par Neighbor Joining (NJ) avec 1 000 bootstrap à partir de l'alignement multiple de séquences généré par le programme MAFFT.

2.5.2 Modélisation de la structure tridimensionnelle de protéines

La modélisation de la structure tridimensionnelle des SAD d'*Arabidopsis* a été réalisée à l'aide de l'application SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) en utilisant la structure protéique de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de *Ricinus communis* (Code protein data bank : 1AFR ; <http://www.rcsb.org/>) comme référence et les paramètres par défaut. La visualisation de la structure tridimensionnelle obtenue est permise par le logiciel RasWin version 2.7.5. Seule la structure d'un monomère et des deux hétéroatomes de Fe associés a été conservée pour la représentation.

Références bibliographiques

- Abe M, Katsumata H, Komeda Y, Takahashi T** (2003) Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in *Arabidopsis*. *Development* **130**: 635–643
- 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
- Adamski NM, Anastasiou E, Eriksson S, O'Neill CM, Lenhard M** (2009) Local maternal control of seed size by KLUH/CYP78A5-dependent growth signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **106**: 20115–20120
- Aichinger E, Villar CBR, Di Mambro R, Sabatini S, Kohler C** (2011) The CHD3 chromatin remodeler PICKLE and polycomb group proteins antagonistically regulate meristem activity in the *Arabidopsis* root. *The Plant Cell* **23**: 1047–1060
- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M** (1997) Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *The Plant Cell* **9**: 841–857
- Aida M, Ishida T, Tasaka M** (1999) Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development* **126**: 1563–1570
- Aida M, Vernoux T, Furutani M, Traas J, Tasaka M** (2002) Roles of PIN-FORMED1 and MONOPTEROS in pattern formation of the apical region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* **129**: 3965–3974
- Alexander, MP** (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Spain Technology* **44** : 117–122.
- Alonso R, Onate-Sanchez L, Weltmeier F, Ehlert A, Diaz I, Dietrich K, Vicente-Carbajosa J, Droge-Laser W** (2009) A pivotal role of the basic leucine zipper transcription factor bZIP53 in the regulation of *Arabidopsis* seed maturation gene expression based on heterodimerization and protein complex formation. *The Plant Cell* **21**: 1747–1761
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kom CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR** (2003) Genome wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 643–657
- Andre C, Froehlich JE, Moll MR, Benning C** (2007) A heteromeric plastidic pyruvate kinase complex involved in seed oil biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**: 2006–2022
- Angelovici R, Galili G, Fernie AR, Fait A** (2010) Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in Plant Science* **15**: 211–218
- Avila J, Neto C, Canas L, Benito MJ, Paz-Ares J** (1993) *Petunia hybrida* genes related to the maize regulatory C1 gene and to animal myb proto-oncogenes. *The Plant Journal* **3**: 553–562
- Bailly C, Audigier C, Ladonne F, Wagner M-H, Coste F, Corbineau F, Côme D** (2001) Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *Journal of Experimental Botany* **52**: 701–708
- Barthole G, Lepiniec L, Rogowsky PM, Baud S** (2012) Controlling lipid accumulation in cereal grains. *Plant Science* **185–186**: 33–39
- Baud S, Boutin J-P, Miquel M, Lepiniec L, Rochat C** (2002) An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 151–160
- 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* **63**: 1
- Baud S, Graham IA** (2006) A spatiotemporal analysis of enzymatic activities associated with carbon metabolism in wild-type and mutant embryos of *Arabidopsis* using *in situ* histochemistry. *The Plant Journal* **46**: 155–169
- Baud S, Lepiniec L** (2009) Regulation of de novo fatty acid synthesis in maturing

Références bibliographiques

- oilseeds of *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 448–455
- Baud S, Lepiniec L** (2010) Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Progress in Lipid Research* **49**: 235–249
- Baud S, Santos Mendoza M, To A, Harscoët E, Lepiniec L, Dubreucq B** (2007) WRINKLED1 specifies the regulatory action of LEAFY COTYLEDON2 towards fatty acid metabolism during seed maturation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **50**: 825–838
- 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
- Baud S, Wuillème S, To A, Rochat C, Lepiniec L** (2009) Role of WRINKLED1 in the transcriptional regulation of glycolytic and fatty acid biosynthetic genes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **60**: 933–947
- Baudry A, Heim MA, Dubreucq B, Caboche M, Weisshaar B, Lepiniec L** (2004) TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **39**: 366–380
- Bauer MJ, Fischer RL** (2011) Genome demethylation and imprinting in the endosperm. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 162–167
- Baumbusch LO** (2003) *LEC1*, *FUS3*, *ABI3* and *Em* expression reveals no correlation with dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **55**: 77–87
- Bäumlein H, Miséra S, Luerßen H, Kölle K, Horstmann C, Wobus U, Müller AJ** (1994) The *FUS3* gene of *Arabidopsis* is a regulator of gene expression during late embryogenesis. *The Plant Journal* **6**: 379–387
- Bechtold N, Ellis J, Pelletier G** (1993) In planta infiltration of adult *Arabidopsis* plants. *Compte Rendu Académie Sciences - Paris Life Sciences* **316**: 1194–1199
- Becker D** (1990) Binary vectors which allow the exchange of plant selectable markers and reporter genes. *Nucleic Acids Research* **18**: 203
- Belmonte MF, Kirkbride RC, Stone SL, Pelletier JM, Bui AQ, Yeung EC, Hashimoto M, Fei J, Harada CM, Munoz MD, Le BH, Drews GN, Brady SM, Goldberg RB, Harada JJ** (2013) Comprehensive developmental profiles of gene activity in regions and subregions of the *Arabidopsis* seed. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **110**: E435–E444
- Bentsink L, Jowett J, Hanhart CJ, Koornneef M** (2006) Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**: 17042–17047
- Van den Berg C, Willemsen V, Hage W, Weisbeek P, Scheres B** (1995) Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature* **378**: 62–65
- Berger F** (1999) Endosperm development. *Current opinion in plant biology* **2**: 28–32
- Berger F** (2003) Endosperm: the crossroad of seed development. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 42–50
- Berger F, Grini PE, Schnittger A** (2006) Endosperm: an integrator of seed growth and development. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 664–670
- Berger N, Dubreucq B, Roudier F, Dubos C, Lepiniec L** (2011) Transcriptional regulation of *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON2* involves RLE, a cis-Element that regulates trimethylation of histone H3 at lysine-27. *The Plant Cell* **23**: 4065–4078
- Berleth T, Jurgens G** (1993) The role of the *MONOPTEROS* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* **118**: 575–587
- Bernard P, Couturier M** (1992) Cell killing by the F plasmid ccdB protein involves poisoning of DNA - topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology* **226**: 735–745
- Bernard P, Kezdy KE, Melderer LV, Steyaert J, Wyns L, Pato ML, Higgins PN, Couturier M** (1993) The F plasmid ccdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by *g* yrase. *Journal of Molecular Biology* **234**: 534–541
- Bemer M, Wolters-Arts M, Grossniklaus U, Angenent G** (2008) The MADS domain protein DIANA acts together with AGAMOUS-LIKE80 to specify the central cell

Références bibliographiques

- in *Arabidopsis* ovules. *The Plant Cell* **20**: 2088-2101.
- Bewley JD** (1997) Seed germination and dormancy. *The plant Cell* **9**: 1055-1066
- Blacklock BJ, Jaworski JG** (2006) Substrate specificity of *Arabidopsis* 3-ketoacyl-CoA synthases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **346**: 583-590
- Bloomfield DK, Bloch K** (1959) The formation of Δ^9 -unsaturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* **235**: 337-345
- Boisnard-Lorig C, Colon-Carmona A, Bauch M, Hodge S, Doerner P, Bancharel E, Dumas C, Haseloff J, Berger F** (2001) Dynamic analyses of the expression of the HISTONE::YFP fusion protein in *Arabidopsis* show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains. *The Plant Cell* **13**: 495-509
- Bondaruk M, Johnson S, Degafu A, Boora P, Bilodeau P, Morris J, Wiehler W, Foroud N, Weselake R, Shah S** (2007) Expression of a cDNA encoding palmitoyl-acyl carrier protein desaturase from cat's claw (*Doxantha unguis-cati* L.) in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* leads to accumulation of unusual unsaturated fatty acids and increased stearic acid content in the seed oil. *Plant Breeding* **126**: 186-194
- Bouyer D, Roudier F, Heese M, Andersen ED, Gey D, Nowack MK, Goodrich J, Renou J-P, Grini PE, Colot V, Schnittger A** (2011) Polycomb repressive complex 2 controls the embryo-to-seedling phase transition. *PLoS Genetics* **7**: e1002014
- 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 USA* **103**: 3468-3473
- Brocard-Gifford IM, Lynch TJ, Finkelstein RR.** (2003) Regulatory networks in seeds integrating developmental, abscisic acid, sugar, and light signaling. *Plant Physiology* **131**: 78-92
- Brown RC, Lemmon BE, Nguyen H, Olsen O-A** (1999) Development of endosperm in *Arabidopsis thaliana*. *Sexual Plant Reproduction* **12**: 32-42
- Browse J, McCourt PJ, Somerville C** (1986) Fatty acid composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methyl ester formation from fresh tissue. *Analytical Biochemistry* **152**: 141-145
- Byrne ME, Barley R, Curtis M, Arroyo JM, Dunham M, Hudson A, Martienssen RA** (2002) Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* **408**: 967-971
- Cahoon EB, Cranmer AM, Shanklin J, Ohlrogge JB** (1994) Hexadecenoic acid is synthesized by the activity of a soluble delta 6 palmitoyl-acyl carrier protein desaturase in *Thunbergia alata* endosperm. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 27519-27526
- Cahoon EB, Lindqvist Y, Schneider G, Shanklin J** (1997) Redesign of soluble fatty acid desaturases from plants for altered substrate specificity and double bond position. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94**: 4872-4877
- Cahoon EB, Ohlrogge JB** (1994) Metabolic evidence for the involvement of a Δ^4 -palmitoyl-acyl carrier protein desaturase in petroselinic acid synthesis in coriander endosperm and transgenic tobacco cells. *Plant Physiology* **104**: 827-837
- Cahoon EB, Shah S, Shanklin J** (1998) A determinant of substrate specificity predicted from the acyl-acyl carrier protein desaturase of developing cat's claw seed. *Plant Physiology* **117**: 593-598
- Cahoon EB, Shanklin J** (2000) Substrate-dependent mutant complementation to select fatty acid desaturase variants for metabolic engineering of plant seed oils. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 12350-12355
- Cahoon EB, Shanklin J, Ohlrogge JB** (1992) Expression of a coriander desaturase results in petroselinic acid production in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**: 11184-11188
- Cao Y, Xian M, Yang J, Xu X, Liu W, Li L** (2010) Heterologous expression of stearoyl-acyl carrier protein desaturase (S-ACP-DES) from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **69**: 209-214
- Capron A, Chatfield S, Provart N, Berleth T** (2009) Embryogenesis: pattern formation from a single cell. *The Arabidopsis book* **7**: e0126
- Casson SA, Lindsey K** (2006) The *turnip* mutant of *Arabidopsis* reveals that *LEAFY COTYLEDON1* expression mediates the effects of auxin and sugars to promote embryonic cell identity. *Plant physiology* **142**: 526-541

Références bibliographiques

- Cernac A, Benning C** (2004) WRINKLED1 encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal* **40** : 575-185
- Chaudhury AM, Ming L, Miller C, Craig S, Dennis ES, Peacock WJ** (1997) Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94**: 4223-4228
- Che N, Yang Y, Li Y, Wang L, Huang P, Gao Y, An C** (2009) Efficient LEC2 activation of *OLEOSIN* expression requires two neighboring RY elements on its promoter. *Science in China Series C: Life Sciences* **52**: 854-863
- Choi Y, Gehring M, Johnson L, Hannon M, Harada JJ, Goldberg RB, Jacobsen SE, Fischer RL** (2002) DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in Arabidopsis. *Cell* **110**: 33-42
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip : a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**: 735-743
- Colombo L, Franken J, Van der Krol AR, Wittich PE, Dons HJ, Angenent GC** (1997) Downregulation of ovule-specific MADS box genes from petunia results in maternally controlled defects in seed development. *The Plant Cell* **9**: 703-715
- 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
- Curtis MD, Grossniklaus U.** (2003) A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes *in planta*. *Plant Physiology* **133**: 462-469
- D'Andréa S, Jolivet P, Boulard C, Larré C, Froissard M, Chardot T** (2007) Selective one-step extraction of *Arabidopsis thaliana* seed oleosins using organic solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 10008-10015
- Day RC, Herridge RP, Ambrose BA, Macknight RC** (2008) Transcriptome analysis of proliferating Arabidopsis endosperm reveals biological implications for the control of syncytial division, cytokinin signaling, and gene expression regulation. *Plant Physiology* **148**: 1964-1984
- Debeaujon I, Nesi N, Perez P, Devic M, Grandjean O, Caboche M, Lepiniec L** (2003) Proanthocyanidin-accumulating cells in Arabidopsis testa: regulation of differentiation and role in seed development. *The Plant Cell* **15**: 2514-2531
- Debeaujon I, Lepiniec L, Pourcel L, Routaboul J-M** (2007) Seed coat development and dormancy. Seed development, Dormancy and Germination
- Diaz I, Vicente-Carbajosa J, Abraham Z, Martínez M, Isabel-LaMoneda I, Carbonero P** (2002) The GAMYB protein from barley interacts with the DOF transcription factor BPBF and activates endosperm-specific genes during seed development. *The Plant Journal* **29** :453-464
- Dilkes BP, Spielman M, Weizbauer R, Watson B, Burkart-Waco D, Scott RJ, Comai L** (2008) The maternally expressed WRKY transcription factor TTG2 controls lethality in interploidy crosses of Arabidopsis. *PLoS Biology* **6**: e308
- Drews GN, Lee D, Christensen CA** (1998) Genetic analysis of female gametophyte development and function. *The Plant Cell* **10**: 5-17
- Drews GN, Yadegari R** (2002) Development and function of the angiosperm female gametophyte. *Annual Review of Genetics* **36**: 99-124
- Du H, Feng B-R, Yang S-S, Huang Y-B, Tang Y-X** (2012) The R2R3-MYB transcription factor gene family in maize. *PLoS one* **7**: e37463
- Dubos C, Le Gourrierc J, Baudry A, Huet G, Lanet E, Debeaujon I, Routaboul JM, Alboresi A, Weisshaar B, Lepiniec L** (2008) MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **55**: 940-953
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L** (2010) MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* **15**: 573-581
- Dubreucq B, Berger N, Vincent E, Boisson M, Pelletier G, Caboche M, Lepiniec L** (2000) The Arabidopsis *AtEPR1* extensin-like gene is specifically expressed in endosperm during seed germination. *The Plant Journal* **23**: 643-652
- Dyer JM, Stymne S, Green AG, Carlsson AS** (2008) High-value oils from plants. *The Plant Journal* **54**, 640-655

Références bibliographiques

- Endress PK** (2011) Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. *Annals of Botany* **107**: 1465–1489
- Ezcurra I, Wycliffe P, Nehlin L, Ellerström M, Rask L** (2000) Transactivation of the *Brassica napus* napin promoter by ABI3 requires interaction of the conserved B2 and B3 domains of ABI3 with different cis-elements: B2 mediates activation through an ABRE, whereas B3 interacts with an RY/G-box. *The Plant Journal* **24**: 57–66
- Fang W, Wang Z, Cui R, Li J, Li Y** (2012) Maternal control of seed size by EOD3/CYP78A6 in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **70**: 929–939
- Farrona S, Hurtado L, Bowman JL, Reyes JC** (2004) The *Arabidopsis thaliana* SNF2 homolog *AtBRM* controls shoot development and flowering. *Development* **131**: 4965–4975
- Faure J-E** (2001) Double fertilization in flowering plants: discovery, study methods and mechanisms. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie* **324**: 551–558
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C** (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 387–415
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD** (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell* **14**: S15–S45
- Finkelstein RR, Lynch TJ** (2000) The *Arabidopsis* abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *The Plant Cell* **12**: 599–609
- Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, Goodman HM** (1998) The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA2 domain protein. *The Plant Cell* **10**: 1043–1054
- FitzGerald J, Luo M, Chaudhury A, Berger F** (2008) DNA Methylation causes predominant maternal controls of plant embryo growth. *PLoS ONE* **3**: e2298
- Fiume E, Fletcher JC** (2012) Regulation of *Arabidopsis* embryo and endosperm development by the polypeptide signaling molecule CLE8. *The Plant Cell* **24**: 1000–1012
- Focks N., Benning C.** (1998) *Wrinkled1*: a novel, low-seed-oil mutant of *Arabidopsis* with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant physiology* **118**: 91–101
- De Folter S, Immink RG, Kieffer M, Parenicová L, Henz SR, Weigel D, Busscher M, Kooiker M, Colombo L, Kater MM, Davies B, Angenent GC** (2005) Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS box transcription factors. *The Plant Cell* **17**: 1424–1433
- Fossi BT, Jiwoua C, Tavea F, Tatsadjieu L** Production directe d'éthanol à partir de l'amidon par co-culture de deux souches de levures *Schwanniomyces sp* et *Saccharomyces cerevisiae*: application à la bioconversion de l'amidon de manioc et de maïs.
- Fox BG, Shanklin J, Somerville C, Münck E** (1994) Stearoyl-acyl carrier protein delta 9 desaturase from *Ricinus communis* is a diiron-oxo protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **90**: 2486–2490
- Frandsen GI, Mundy J, Tzen JT** (2001) Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. *Physiologia Plantarum* **112**: 301–307
- Friedman WE** (1995) Organismal duplication, inclusive fitness theory, and altruism: understanding the evolution of endosperm and the angiosperm reproductive syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**: 3913–3917
- Friedman WE, Williams JH** (2003) Modularity of the angiosperm female gametophyte and its bearing on the early evolution of endosperm in flowering plants. *Evolution* **57**: 216–230
- Fujiwara T, Nambara E, Yamagishi K, Goto DB, Naito S** (2002) Storage Proteins. *The Arabidopsis Book* **25**: 1
- Gao M-J, Li X, Lui H, Gropp GM, Lydiate DD, Wei S, Hegedus DD** (2011) ASIL1 is required for proper timing of seed filling in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 1886–1888
- Gao M-J, Lydiate DJ, Li X, Lui H, Gjetvaj B, Hegedus DD, Rozwadowski K** (2009) Repression of seed maturation genes by a trihelix transcriptional repressor in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Cell* **21**: 54–71
- Garcia D, Saingery V, Chambrier P, Mayer U, Jürgens G, Berger F** (2003) *Arabidopsis haiku* mutants reveal new controls of seed size by endosperm. *Plant Physiology* **131**: 1661–1670
- Garcia D, Fitz Gerald JN, Berger F** (2005) Maternal control of integument cell elongation and zygotic control of endosperm growth are coordinated to

Références bibliographiques

- determine seed size in *Arabidopsis*. The Plant Cell **17**: 52–60
- Gasser CS, Broadhvest J, Hauser BA** (1998) Genetic analysis of ovule development. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **49**: 1-24
- Gazzarrini S, McCourt P** (2001) Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. Current opinion in Plant Biology **4**: 387–391
- Gazzarrini S, Tsuchiya Y, Lumba S, Okamoto M, McCourt P** (2004) The Transcription factor *FUSCA3* controls developmental timing in *Arabidopsis* through the hormones gibberellin and abscisic acid. Developmental Cell **7**: 373–385
- Geeta R** (2003) The origin and maintenance of nuclear endosperms: viewing development through a phylogenetic lens. Proceedings of the Royal Society : Biological Sciences **270**: 29–35
- Gehring M, Huh JH, Hsieh T-F, Penterman J, Choi Y, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL** (2006) DEMETER DNA glycosylase establishes *MEDEA* polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. Cell **124**: 495–506
- 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
- Giraudat J, Hauge BM, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman HM** (1992) Isolation of the *Arabidopsis* *ABI3* gene by positional cloning. The Plant Cell **4**: 1251–1261
- Graeber K, Nakabayashi K, Miatton E, Leubner-Metzger G, Soppe WJJ** (2012) Molecular mechanisms of seed dormancy. Plant, Cell & Environment **35**: 1769–1786
- Grossniklaus U, Schneitz K** (1998) The molecular and genetic basis of ovule and megagametophyte development. Seminars in cell & developmental biology. 227–238
- Grossniklaus U, Spillane C, Page DR, Köhler C** (2001) Genomic imprinting and seed development: endosperm formation with and without sex. Current Opinion in Plant Biology **4**: 21–27
- Gruis D, Schulze J, Jung R** (2004) Storage protein accumulation in the absence of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases. The Plant Cell **16**: 270–290
- Gubler F, Raventos D, Keys M, Watts R, Mundy J, Jacobsen JV** (1999) Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone. The Plant Journal **17**: 1-9
- Guerche P, Tire C, De Sa FG, De Clercq A, Van Montagu M, Krebbers E** (1990) Differential expression of the *Arabidopsis* 2S albumin genes and the effect of increasing gene family size. The Plant Cell **2**: 469–478
- Guitton A-E, Page DR, Chambrier P, Lionnet C, Faure JE, Grossniklaus U, Berger F** (2004) Identification of new members of Fertilisation Independent Seed Polycomb Group pathway involved in the control of seed development in *Arabidopsis thaliana*. Development **131**: 2971–2981
- Guy JE, Whittle E, Kumaran D, Lindqvist Y, Shanklin J** (2007) The crystal structure of the Ivy Δ^4 -16:0-ACP desaturase reveals structural details of the oxidized active site and potential determinants of regioselectivity. Journal of Biological Chemistry **282**: 19863–19871
- Haas JA, Fox BG** (2002) Fluorescence anisotropy studies of enzyme–substrate complex formation in stearyl-ACP desaturase. Biochemistry **41**: 14472–14481
- Haecker A, Gross-Hardt R, Geiges B, Sarkar A, Breuninger H, Herrmann M, Laux T** (2004) Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. Development **131**: 657–668
- Hamamura Y, Nagahara S, Higashiyama T** (2011) Double fertilization on the move. Current Opinion in Plant Biology **15**: 70–77
- Hamann T, Benkova E, Bäurle I, Kientz M, Jürgens G** (2002) The *Arabidopsis* *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting *MONOPTEROS*-mediated embryo patterning. Genes & Development **16**: 1610–1615
- Han J, Lühs W, Sonntag K, Zähringer U, Borchardt DS, Wolter FP, Heinz E, Frentzen M** (2001) Functional characterization of β -ketoacyl-CoA synthase genes from *Brassica napus* L. Plant Molecular Biology **46**: 229–239
- Haughn G, Chaudhury A** (2005) Genetic analysis of seed coat development in *Arabidopsis*. Trends in Plant Science **10**: 472–477
- Hehenberger E, Kradolfer D, Kohler C** (2012) Endosperm cellularization defines an important developmental transition for embryo development. Development **139**: 2031–2039

Références bibliographiques

- Henderson JT** (2004) PICKLE acts throughout the plant to repress expression of embryonic traits and may play a role in gibberellin-dependent responses. *Plant Physiology* **134**: 995–1005
- Hill K, Wang H, Perry SE** (2008) A transcriptional repression motif in the MADS factor AGL15 is involved in recruitment of histone deacetylase complex components. *The Plant Journal* **53**: 172–185
- Hill LM, Morley-Smith ER, Rawsthorne S** (2003) Metabolism of sugars in the endosperm of developing seeds of oilseed rape. *Plant Physiology* **131**: 228–236
- Hills MJ** (2004) Control of storage-product synthesis in seeds. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 302–308
- Hilson P, Small I, Kuiper MT** (2003) European consortia building integrated resources for Arabidopsis functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 426–429
- Hirner B, Fischer WN, Rentsch D, M. Kwart, Frommer WB** (1998) Developmental control of H⁺/amino acid permease gene expression during seed development of Arabidopsis. *The Plant Journal* **14**: 535–544
- Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J** (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* **6**: 431–438
- Horn PJ, Korte AR, Neogi PB, Love E, Fuchs J, Strupat K, Borisjuk L, Shulaev V, Lee Y-J, Chapman KD** (2012) Spatial mapping of lipids at cellular resolution in embryos of cotton. *The Plant Cell* **24**: 622–636
- Ten Hove CA, Heidstra R** (2008) Who begets whom? Plant cell fate determination by asymmetric cell division. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 34–41
- Huang AH** (1996) Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiology* **110**: 1055–1061
- Huh JH, Bauer MJ, Hsieh T-F, Fischer R** (2007) Endosperm gene imprinting and seed development. *Current Opinion in Genetics & Development* **17**: 480–485
- Ingouff M, Gerald JNF, Guérin C, Robert H, Sørensen MB, Damme DV, Geelen D, Blanchoin L, Berger F** (2005) Plant formin AtFH5 is an evolutionarily conserved actin nucleator involved in cytokinesis. *Nature Cell Biology* **7**: 374–380
- Ingouff M, Haseloff J, Berger F** (2005) Polycomb group genes control developmental timing of endosperm. *The Plant Journal* **42**: 663–674
- Jacobson BS, Jaworski JG, Stumpf PK** (1974) Fat metabolism in higher plants LXII. Stearyl-acyl carrier protein desaturase from spinach chloroplasts. *Plant Physiology* **54**: 484–486
- Jenik PD, Irish VF** (2000) Regulation of cell proliferation patterns by homeotic genes during Arabidopsis floral development. *Development* **127**: 1267–1276
- Jofuku KD, Omidyar PK, Gee Z, Okamoto JK** (2005) Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene *APETALA2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**: 3117–3122
- Jolivet P, Boulard C, Bellamy A, Larré C, Barre M, Rogniaux H, d'Andréa S, Chardot T, Nesi N** (2009) Protein composition of oil bodies from mature *Brassica napus* seeds. *Proteomics* **9**: 3268–3284
- Jolivet P, Boulard C, Bellamy A, Valot B, d'Andréa S, Zivy M, Nesi N, Chardot T** (2011) Oil body proteins sequentially accumulate throughout seed development in *Brassica napus*. *Journal of Plant Physiology* **168**: 2015–2020
- Jolivet P, Roux E, d'Andrea S, Davanture M, Negroni L, Zivy M, Chardot T** (2004) Protein composition of oil bodies in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 501–509
- Jullien PE, Kinoshita T, Ohad N, Berger F** (2006) Maintenance of DNA methylation during the Arabidopsis life cycle is essential for parental imprinting. *The Plant Cell* **18**: 1360–1372
- Kachroo A, Lapchyk L, Fukushige H, Hildebrand D, Klessig D, Kachroo P** (2003a) Plastidial fatty acid signaling modulates salicylic acid- and jasmonic acid-mediated defense pathways in the Arabidopsis *ssi2* mutant. *The Plant Cell* **15**: 2952–2965
- Kachroo A, Shanklin J, Whittle E, Lapchyk L, Hildebrand D, Kachroo P** (2007) The Arabidopsis stearyl-acyl carrier protein-desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis. *Plant Molecular Biology* **63**: 257–271
- Kachroo A, Venugopal SC, Lapchyk L, Falcone D, Hildebrand D, Kachroo P** (2004) Oleic acid levels regulated by glycerolipid metabolism modulate defense gene expression in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**: 5152–5157
- Kachroo P, Kachroo A, Lapchyk L, Hildebrand D, Klessig DF** (2003b)

Références bibliographiques

- Restoration of defective cross talk in *ssi2* mutants: role of salicylic acid, jasmonic acid, and fatty acids in SSI2-mediated signaling. *Molecular Plant-microbe Interactions* **16**: 1022–1029
- Kachroo P, Shanklin J, Shah J, Whittle EJ, Klessig DF** (2001) A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**: 9448–9453
- Kagaya Y, Okuda R, Ban A, Toyoshima R, Tsutsumida K, Usui H, Yamamoto A, Hattori T** (2005a) Indirect ABA-dependent regulation of seed storage protein genes by FUSCA3 transcription factor in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **46**: 300–311
- Kagaya Y, Toyoshima R, Okuda R, Usui H, Yamamoto A, Hattori T** (2005b) LEAFY COTYLEDON1 controls seed storage protein genes through its regulation of *FUSCA3* and *ABSCISIC ACID INSENSITIVE3*. *Plant and Cell Physiology* **46**: 399–406
- Kagaya Y, Ohmiya K, Hattori T** (1999) RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Research* **27**: 470–478
- Kang I-H, Steffen JG, Portereiko MF, Lloyd A, Drews GN** (2008) The AGL62 MADS domain protein regulates cellularization during endosperm development in Arabidopsis. *The Plant Cell* **20**: 635–647
- Kang X, Ni M** (2006) Arabidopsis SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1 contains SPX and EXS domains and acts in cryptochrome signaling. *The Plant Cell* **18**: 921–934
- Kang X, Li W, Zhou Y, Ni M** (2013) A WRKY transcription factor recruits the SYG1-Like protein SHB1 to activate gene expression and seed cavity enlargement. *PLoS Genetics* **9**: e1003347
- Keith AD, Resnick MR, Haley AB** (1969) Fatty acid desaturase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* **98**: 415–420
- Keith K, Kraml M, Dengler NG, McCourt P** (1994) *Fusca3*: a heterochronic mutation affecting late embryo development in Arabidopsis. *The Plant Cell* **6**: 589–600
- Kelley DR, Arreola A, Gallagher TL, Gasser CS** (2012) ETTIN (ARF3) physically interacts with KANADI proteins to form a functional complex essential for integument development and polarity determination in Arabidopsis. *Development* **139**: 1105–1109
- Khandeal A, Cho SH, Marella H, Sakata Y, Perroud P-F, Pan A, Quatrano RS** (2010) Role of ABA and ABI3 in desiccation tolerance. *Science* **327**: 546
- Kim HU, Hsieh K, Ratnayake C, Huang AH** (2002) A novel group of oleosins is present inside the pollen of Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 22677–22684
- Kim I, Zambryski PC** (2005) Cell-to-cell communication via plasmodesmata during Arabidopsis embryogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 593–599
- Kiyosue T, Ohad N, Yadegari R, Hannon M, Dinneny J, Wells D, Katz A, Margossian L, Harada JJ, Goldberg RB** (1999) Control of fertilization-independent endosperm development by the *MEDEA* polycomb gene in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**: 4186–4191
- Van der Klei H, Van Damme J, Casteels P, Krebbers E** (1993) A fifth 2S albumin isoform is present in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **101**: 1415
- Knutzon DS, Thompson GA, Radke SE, Johnson WB, Knauf VC, Kridl JC** (1992) Modification of Brassica seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**: 2624–2628
- Kohler C, Hennig L, Spillane C, Pien S, Gruitsem W, Grossniklaus U** (2003) The Polycomb-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene *PHERES1*. *Genes & Development* **17**: 1540–1553
- Köhler C, Hennig L, Bouveret R, Gheyselinck J, Grossniklaus U, Gruitsem W** (2003) Arabidopsis MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development. *The EMBO Journal* **22**: 4804–4814
- Köhler C, Makarevich G** (2006) Epigenetic mechanisms governing seed development in plants. *EMBO reports* **7**: 1223–1227
- Koncz C, Schell J** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular Genetics Genomics* **204**: 383–396.
- Kondou Y, Nakazawa M, Kawashima M, Ichikawa T, Yoshizumi T, Suzuki K, Ishikawa A, Koshi T, Matsui R, Muto S, Matsui M** (2008) RETARDED GROWTH OF EMBRYO1, a new basic helix-loop-helix protein, expresses in endosperm to control

Références bibliographiques

- embryo growth. *Plant Physiology* **147**: 1924–1935
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H** (2002) Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 33–36
- Koornneef M, Hanhart CJ, Hilhorst HW, Karssen CM** (1989) *In vivo* inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **90**: 463–469
- Kranz HD, Denekamp M, Greco R, Jin H, Leyva A, Meissner RC, Petroni K, Urzaingu A, Bevan M, Martin C, Smmekens S, Tonelli C, Paz-Ares J, Weishaar B** (1998) Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**: 263–276
- Krebbes E, Herdies L, De Clercq A, Seurinck J, Leemans J, Van Damme J, Segura M, Gheysen G, Van Montagu M, Vandekerckhove J** (1988) Determination of the processing sites of an *Arabidopsis* 2S albumin and characterization of the complete gene family. *Plant Physiology* **87**: 859–866
- Kroj T, Savino G, Valon C, Giraudat J, Parcy F** (2003) Regulation of storage protein gene expression in *Arabidopsis*. *Development* **130**: 6065–6073
- Kwong RW, Bui AQ, Lee H, Kwong LW, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (2002) LEAFY COTYLEDON1-LIKE defines a class of regulators essential for embryo development. *The Plant Cell* **15**: 5–18
- Lafon J-P, Tharaud-Prayer C, Lévy G** (1996). *Biologie des plantes cultivées - Tome 1 – Organisation et physiologie de la nutrition*. Paris : Technique et documentation, 233p.
- Lara P, Oñate-Sánchez L, Abraham Z, Ferrándiz C, Díaz I, Carbonero P, Vicente-Carbajosa J** (2003) Synergistic activation of seed storage protein gene expression in *Arabidopsis* by ABI3 and two bZIPs related to OPAQUE2. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 21003–21011
- Le BH, Cheng C, Bui AQ, Wagmaister JA, Henry KF, Pelletier J, Kwong L, Belmonte M, Kirkbride R, Horvath S, Drews GN, Fischer RL, Okamoto JK, Harada JJ, Goldberg RB** (2010) Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**: 8063–8070
- Lee H, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (2003) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 represents a functionally specialized subunit of the CCAAT binding transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **100**: 2152–2156
- Léon-Kloosterziel KM, Keijzer J, Koornneef M** (1994) A seed shape mutant of *Arabidopsis* that is affected in integument development. *The Plant Cell* **6**: 385–392
- Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul J-M, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M** (2006) Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 405–430
- Lepiniec L, Berger F, Devic M** (2005) Genetic and molecular control of seed development in *Arabidopsis* “Plant functional genomics”. D. Leister, Food ProductPress
- Leprince O, van Aelst AC, Pritchard HW, Murphy DJ** (1998) Oleosins prevent oil-body coalescence during seed imbibition as suggested by a low-temperature scanning electron microscope study of desiccation-tolerant and -sensitive oilseeds. *Planta* **204**: 109–119
- Lesaint C, Coïc Y** (1983) *Cultures hydroponiques*. La maison rustique, Paris.
- Li H-C, Chuang K, Henderson JT, Rider SD, Bai Y, Zhang H, Fountain M, Gerber J, Ogas J** (2005) PICKLE acts during germination to repress expression of embryonic traits. *The Plant Journal* **44**: 1010–1022
- Li J, Berger F** (2012) Endosperm: food for humankind and fodder for scientific discoveries. *New Phytologist* **195**: 290–305
- 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-Beisson, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, Baud S, Bird D, Debono A, Durrett TP, Franke RB, Graham IA, Katayama K, Kelly AA, Larson T, Markham JE, Miquel M, Molina I, Nishida I, Rowland O, Samuels L, Schmid KM, Wada H, Welti R, Xu C, Zallot R, Ohlrogge J** (2013) Acyl-Lipid metabolism. *The Arabidopsis Book*. **11**: e0161
- Lid SE, Olsen L, Nestestog R, Aukerman M, Brown RC, Lemmon B, Mucha M, Opsahl-Sorteberg H-G, Olsen O-A** (2005) Mutation in the *Arabidopsis thaliana* *DEK1* calpain gene perturbs endosperm and embryo development while over-expression

Références bibliographiques

- affects organ development globally. *Planta* **221**: 339–351
- Lightner J, Wu J, Browse J** (1994) A mutant of *Arabidopsis* with increased levels of stearic acid. *Plant Physiology* **106**: 1443–1451
- Lindqvist Y, Huang W, Schneider G, Shanklin J** (1996) Crystal structure of delta9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. *The EMBO Journal* **15**: 4081–4092
- Liu CM, Meinke DW** (1998) The *titan* mutants of *Arabidopsis* are disrupted in mitosis and cell cycle control during seed development. *The Plant Journal* **16**: 21–31
- Liu J, Wilson TE, Milbrandt J, Johnston M** (1993) Identifying DNA-binding sites and analyzing DNA-binding domains using a yeast selection system. *Methods* **5**: 125–137
- Lopes MA, Larkins BA** (1993) Endosperm origin, development, and function. *The Plant Cell* **5**: 1383–1399
- Lopez-Molina L, Mongrand S, McLachlin DT, Chait BT, Chua N-H** (2002) ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *The Plant Journal* **32**: 317–328
- Lotan T, Ohto M, Yee KM, West MA, Lo R, Kwong RW, Yamagishi K, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (1998) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* **93**: 1195–1205
- Luerssen H, Kirik V, Herrmann P, Misera S** (1998) *FUS3* encodes a protein with a conserved VP1/ABI3-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **15**: 755–764
- Luo M, Bilodeau P, Dennis ES, Peacock WJ, Chaudhury A** (2000) Expression and parent-of-origin effects for *FIS2*, *MEA*, and *FIE* in the endosperm and embryo of developing *Arabidopsis* seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 10637–10642
- Luo M, Bilodeau P, Koltunow A, Dennis ES, Peacock WJ, Chaudhury AM** (1999) Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**: 296–301
- Luo M, Dennis ES, Berger F, Peacock WJ, Chaudhury A** (2005) *MINISEED3* (*MINI3*), a WRKY family gene, and *HAIKU2* (*IKU2*), a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene, are regulators of seed size in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**: 17531–17536
- Lurin C, Andrés C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyère C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Le Ret M, Martin-Magniette ML, Mireau H, Peeters N, Renou JP, Szurek B, Taconnat L, Small I** (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *The Plant Cell* **16**: 2089–2103
- Macquet A, Ralet M-C, Kronenberger J, Marion-Poll A, North HM** (2007) *In situ*, chemical and macromolecular study of the composition of *Arabidopsis thaliana* seed coat mucilage. *Plant and Cell Physiology* **48**: 984–999
- Maeo K, Tokuda T, Ayame A, Mitsui N, Kawai T, Tsukagoshi H, Ishiguro S, Nakamura K** (2009) An AP2-type transcription factor, *WRINKLED1*, of *Arabidopsis thaliana* binds to the AW-box sequence conserved among proximal upstream regions of genes involved in fatty acid synthesis. *The Plant Journal* **60**: 476–487
- Mahonen AP, Bonke M, Kauppinen L, Riikonen M, Benfey PN, Helariutta Y** (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes & Development* **14**: 2938–2943
- Makarevich G, Leroy O, Akinci U, Schubert D, Clarenz O, Goodrich J, Grossniklaus U, Köhler C** (2006) Different Polycomb group complexes regulate common target genes in *Arabidopsis*. *EMBO reports* **7**: 947–952
- Mayer KF, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgens G, Laux T** (1998) Role of *WUSCHEL* in Regulating Stem Cell Fate in the *Arabidopsis* Shoot Meristem. *Cell* **95**: 805–815
- Mayer U, Jürgens G** (1998) Pattern formation in plant embryogenesis: a reassessment. *Seminars in cell & developmental biology*. **9**: 187–193
- McAbee JM, Hill TA, Skinner DJ, Izhaki A, Hauser BA, Meister RJ, Venugopala Reddy G, Meyerowitz EM, Bowman JL, Gasser CS** (2006) *ABERRANT TESTA SHAPE* encodes a KANADI family member, linking polarity determination to separation

Références bibliographiques

- and growth of *Arabidopsis* ovule integuments. *The Plant Journal* **46**: 522–531
- Meier MAR** (2009) Metathesis with oleochemicals: new approaches for the utilization of plant oils as renewable resources in polymer science. *Macromolecular Chemistry and Physics* **210**: 1073–1079
- Meinke DW** (1992) A homoeotic mutant of *Arabidopsis thaliana* with leafy cotyledons. *Science* **258**: 1647–1650
- Meinke DW, Franzmann LH, Nickle TC, Yeung EC** (1994) *Leafy cotyledon* mutants of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **6**: 1049–1064
- Meyer S, Reeb C, Bosdeveix R** (2008) *Botanique : Biologie et physiologie végétale*. Paris : Maloine, 350p.
- Miki T, Park JA, Nagao K, Murayama N, Horiuchi T** (1992) Control of segregation of chromosomal DNA by sex factor F in *Escherichia coli*. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress *letD* (*ccdB*) product growth inhibition. *Journal of Molecular Biology* **225**: 39–52
- Millar AA, Kunst L** (1997) Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *The Plant Journal* **12**: 121–131
- Mönke G, Altschmied L, Tewes A, Reidt W, Mock H-P, Bäumllein H, Conrad U** (2004) Seed-specific transcription factors *ABI3* and *FUS3*: molecular interaction with DNA. *Planta* **219**: 158–166
- Mönke G, Seifert M, Keilwagen J, Mohr M, Grosse I, Hahnel U, Junker A, Weisshaar B, Conrad U, Baumlein H, Altschmied L** (2012) Toward the identification and regulation of the *Arabidopsis thaliana ABI3* regulon. *Nucleic Acids Research* **40**: 8240–8254
- Moreno-Risueno MÁ, González N, Díaz I, Parcy F, Carbonero P, Vicente-Carbajosa J** (2008) *FUSCA3* from barley unveils a common transcriptional regulation of seed-specific genes between cereals and *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **53**: 882–894
- Morot-Gaudry J-F, Prat R, Bohn-Courseau I, Jullien M, Parcy F, Perrot-Rechenmann C, Reisdorf-Cren M, Richard L, Savouré A** (2009) *Biologie végétale – Croissance et développement*. Paris : Dunod, 241p.
- Mu J, Tan H, Zheng Q, Fu F, Liang Y, Zhang J, Yang X, Wang T, Chong K, Wang X-J, Zuo J** (2008) *LEAFY COTYLEDON1* is a Key regulator of fatty acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **148**: 1042–1054
- Nagai J, Bloch K** (1966) Enzymatic desaturation of stearyl acyl carrier protein. *Journal of Biological Chemistry* **241**: 1925–1927
- Nagai J, Bloch K** (1968) Enzymatic desaturation of stearyl acyl carrier protein. *Journal of Biological Chemistry* **243**: 4626–4633
- Nakabayashi K, Bartsch M, Xiang Y, Miatton E, Pellengahr S, Yano R, Seo M, Soppe WJJ** (2012) The time required for dormancy release in *Arabidopsis* is determined by *DELAY OF GERMINATION1* protein Levels in freshly harvested seeds. *The Plant Cell* **24**: 2826–2838
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T** (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **104**: 34–41
- Nakamura S, Lynch TJ, Finkelstein RR** (2001) Physical interactions between ABA response loci of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **26**: 627–635
- Nakaune S, Yamada K, Kondo M, Kato T, Tabata S, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2005) A vacuolar processing enzyme, VPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. *The Plant Cell* **17**: 876–887
- Nambara E, Hayama R, Tsuchiya Y, Nishimura M, Kawaide H, Kamiya Y, Naito S** (2000) The role of *ABI3* and *FUS3* loci in *Arabidopsis thaliana* on phase transition from late embryo development to germination. *Developmental Biology* **220**: 412–423
- Nambara E, McCourt P, Naito S** (1995) A regulatory role for the *ABI3* gene in the establishment of embryo maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **121**: 629–636
- Nambara E, Okamoto M, Tatematsu K, Yano R, Seo M, Kamiya Y** (2010) Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Science Research* **20**: 55–67
- Napier JA, Michaelsont LV, Stobart AK** (1999) Plant desaturases: harvesting the fat of the land. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 123–127

Références bibliographiques

- Napier JA, Stobart AK, Shewry PR** (1996) The structure and biogenesis of plant oil bodies: the role of the ER membrane and the oleosin class of proteins. *Plant Molecular Biology* **31**: 945–956
- Nesi N, Debeaujon I, Jond C, Pelletier G, Caboche M, Lepiniec L** (2000) The *TT8* gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis* siliques. *The Plant Cell* **12**: 1863–1878
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W** (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**: 255–262
- Nguyen HT, Mishra G, Whittle E, Pidkowich MS, Bevan SA, Merlo AO, Walsh TA, Shanklin J** (2010) Metabolic engineering of seeds can achieve levels of ω -7 fatty acids comparable with the highest levels found in natural plant sources. *Plant Physiology* **154**: 1897–1904
- Nodine M D, Bartel D P** (2010) MicroRNAs prevent precious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes & Development* **24**: 2678–2692.
- Norton G, Harris JF** (1975) Compositional changes in developing rape seed (*Brassica napus* L.). *Planta* **123**: 163–174
- Nowack MK, Ungru A, Bjerkan KN, Grini PE, Schnittger A** (2010) Reproductive cross-talk: seed development in flowering plants. *Biochemical Society Transactions* **38**: 604–612
- O'Neill CM, Gill S, Hobbs D, Morgan C, Bancroft I** (2003) Natural variation for seed oil composition in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **64**: 1077–1090
- Ogas J, Kaufmann S, Henderson J, Somerville C** (1999) PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**: 13839–13844
- Ogata K, Kanei-Ishii C, Sasaki M, Hatanaka H, Nagadoi A, Enari M, Nakamura H, Nishimura Y, Ishii S, Sarai A** (1996) The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and transactivation. *Nature Structural Biology* **3**: 178–187
- Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S** (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Cell* **15**: 1591–1604
- Ohad N, Margossian L, Hsu Y, Williams C, Repetti P, Fischer RL** (1996) A mutation that allows endosperm development without fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**: 5319–5324
- Ohad N, Yadegari R, Margossian L, Hannon M, Michaeli D, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL** (1999) Mutations in *FIE*, a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *The Plant Cell* **11**: 407–415
- Ohto M, Floyd SK, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (2009) Effects of *APETALA2* on embryo, endosperm, and seed coat development determine seed size in *Arabidopsis*. *Sexual Plant Reproduction* **22**: 277–289
- Olsen O-A** (2004) Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **16**: S214–S227
- Olsen O-A** (2001) Endosperm development: cellularization and cell fate specification. *Annual Review of Plant Biology* **52**: 233–267
- Ooms JJ, Leon-Kloosterziel KM, Bartels D, Koornneef M, Karssen CM** (1993) Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana* (a comparative study using abscisic acid-insensitive *abi3* mutants). *Plant Physiology* **102**: 1185–1191
- Otegui M, Staehelin LA** (2000) Syncytial-type cell plates: a novel kind of cell plate involved in endosperm cellularization of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **12**: 933–947
- Otegui MS, Herder R, Schulze J, Jung R, Staehelin LA** (2006) The proteolytic processing of seed storage proteins in *Arabidopsis* embryo cells starts in the multivesicular bodies. *The Plant Cell* **18**: 2567–2581
- Otegui MS, Mastronarde DN, Kang B-H, Bednarek SY, Staehelin LA** (2001) Three-dimensional analysis of syncytial-type cell plates during endosperm cellularization visualized by high resolution electron tomography. *The Plant Cell* **13**: 2033–2051
- Parcy F, Valon C, Kohara A, Miséra S, Giraudat J** (1997) The *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3*, *FUSCA3*, and *LEAFY COTYLEDON1* loci act in concert to control multiple aspects of *Arabidopsis* seed development. *The Plant Cell* **9**: 1265–1277

Références bibliographiques

- Parcy F, Valon C, Raynal M, Gaubier-Comella P, Delseny M, Giraudat J** (1994) Regulation of gene expression programs during Arabidopsis seed development: roles of the *ABI3* locus and of endogenous abscisic acid. *The Plant Cell* **6**: 1567–1582
- Paz-Ares J, The REGIA Consortium** (2002) REGIA, an EU project on functional genomics of transcription factors from *Arabidopsis thaliana*. *Comparative and Functional Genomics* **3**: 102–108
- Penfield S, Rylott EL, Gilday AD, Graham S, Larson TR, Graham IA** (2004) Reserve mobilization in the Arabidopsis endosperm fuels hypocotyl elongation in the dark, is independent of abscisic acid, and requires *PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE1*. *The Plant Cell* **16**: 2705–2718
- Perruc E, Kinoshita N, Lopez-Molina L** (2007) The role of chromatin-remodeling factor PKL in balancing osmotic stress responses during Arabidopsis seed germination. *The Plant Journal* **52**: 927–936
- Perry SE, Lehti MD, Fernandez DE** (1999) The MADS-domain protein AGAMOUS-like 15 accumulates in embryonic tissues with diverse origins. *Plant Physiology* **120**: 121–130
- Perry SE, Nichols KW, Fernandez DE** (1996) The MADS domain protein AGL15 localizes to the nucleus during early stages of seed development. *The Plant Cell* **8**: 1977–1989
- Pien S, Grossniklaus U** (2007) Polycomb group and trithorax group proteins in Arabidopsis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1769**: 375–382
- Pignocchi C, Minns GE, Nesi N, Koumproglou R, Kitsios G, Benning C, Lloyd CW, Doonan JH, Hills MJ** (2009) ENDOSPERM DEFECTIVE1 is a novel microtubule-associated protein essential for seed development in Arabidopsis. *The Plant Cell* **21**: 90–105
- Pollard M, Beisson F, Li Y, Ohlrogge JB** (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science* **13**: 236–246
- Pommerrenig B, Popko J, Heilmann M, Schulmeister S, Dietel K, Schmitt B, Stadler R, Feussner I, Sauer N** (2013) SUCROSE TRANSPORTER 5 supplies Arabidopsis embryos with biotin and affects triacylglycerol accumulation. *The Plant Journal* **73**: 392–404
- Portereiko MF, Lloyd A, Steffen JG, Punwani JA, Otsuga D, Drews GN** (2006) AGL80 is required for central cell and endosperm development in Arabidopsis. *The Plant Cell* **18**: 1862–1872
- Potter H** (1993) Application of electroporation in recombinant DNA technology. *Methods in Enzymology* **217**: 461–478
- Pouvreau B, Baud S, Vernoud V, Morin V, Py C, Gendrot G, Pichon J-P, Rouster J, Paul W, Rogowsky PM** (2011) Duplicate maize *wrinkled1* transcription factors activate target genes involved in seed oil biosynthesis. *Plant Physiology* **156**: 674–686
- Ray S, Golden T, Ray A** (1996) Maternal effects of the *short integument* mutation on embryo development in Arabidopsis. *Developmental biology* **180**: 365–369
- Raz V, Bergervoet JH, Koornneef M** (2001) Sequential steps for developmental arrest in Arabidopsis seeds. *Development* **128**: 243–252
- Reidt W, Wohlfarth T, Ellerström M, Czihal A, Tewes A, Ezcurra I, Rask L, Bäumllein H** (2000) Gene regulation during late embryogenesis: the RY motif of maturation-specific gene promoters is a direct target of the *FUS3* gene product. *The Plant Journal* **21**: 401–408
- Rider S, Hemm M, Hostetler H, Li H-C, Chapple C, Ogas J** (2004) Metabolic profiling of the Arabidopsis *pkl* mutant reveals selective derepression of embryonic traits. *Planta* **219**: 489–499
- Robinson-Beers K, Pruitt RE, Gasser CS** (1992) Ovule development in wild-type Arabidopsis and two female-sterile mutants. *The Plant Cell* **4**: 1237–1249
- Rohde A, Kurup S, Holdsworth M** (2000) *ABI3* emerges from the seed. *Trends in Plant Science* **5**: 418–419
- Romanel EAC, Schrago CG, Couñago RM, Russo CAM, Alves-Ferreira M** (2009) Evolution of the B3 DNA binding superfamily: new insights into REM family gene diversification. *PLoS ONE* **4**: e5791
- Russell SD** (1993) The egg cell: development and role in fertilization and early embryogenesis. *The Plant Cell* **5**: 1349
- Ruska SA, Girke T, Benning C, Ohlrogge JB** (2002) Contrapuntal networks of gene expression during Arabidopsis seed filling. *The Plant Cell* **14**: 1191–1206
- Rybak A, Fokou PA, Meier MAR** (2008) Metathesis as a versatile tool in oleochemistry. *European Journal of Lipid Science and Technology* **110**: 797–804

Références bibliographiques

- Sakata Y, Nakamura I, Taji T, Tanaka S, Quatrano RS** (2010) Regulation of the ABA-responsive Em promoter by ABI3 in the moss *Physcomitrella patens*: Role of the ABA response element and the RY element. *Plant Signaling & Behavior* **5**: 1061–1066
- Santos Mendoza M, Dubreucq B, Miquel M, Caboche M, Lepiniec L** (2005) *LEAFY COTYLEDON 2* activation is sufficient to trigger the accumulation of oil and seed specific mRNAs in Arabidopsis leaves. *FEBS Letters* **579**: 4666–4670
- Santos Mendoza M, Dubreucq B, Baud S, Parcy F, Caboche M, Lepiniec L** (2008) Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in Arabidopsis. *The Plant Journal* **54**: 608–620
- Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, Lenhard M, Hashimoto T, Nakajima K, Scheres B, Heidstra R, Laux T** (2007) Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**: 811–814
- Scheres B, Wolkenfelt H, Willemsen V, Terlouw M, Lawson E, Dean C, Weisbeek P** (1994) Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initials. *Development* **120**: 2475–2487
- Schmidt H, Heinz E** (1990) Desaturation of oleoyl groups in envelope membranes from spinach chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **87**: 9477–9480
- 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, Hülskamp M, Pruitt RE** (1995) Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount tissue. *The Plant Journal* **7**: 731–74
- Schruff MC** (2006) The *AUXIN RESPONSE FACTOR 2* gene of Arabidopsis links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development* **133**: 251–261
- Schultz DJ, Cahoon EB, Shanklin J, Craig R, Cox-Foster DL, Mumma RO, Medford JI** (1996) Expression of a delta 9 14:0-acyl carrier protein fatty acid desaturase gene is necessary for the production of omega 5 anacardic acids found in pest-resistant geranium (*Pelargonium xhortorum*). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**: 8771–8775
- 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** (2002) Probing *in vivo* metabolism by stable isotope labeling of storage lipids and proteins in developing *Brassica napus* embryos. *Plant Physiology* **130**: 347–361
- 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, Bailey J, Dickinson HG** (1998) Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **125**: 3329–3341
- Sessions A, Weigel D, Yanofsky MF** (1999) The *Arabidopsis thaliana* *MERISTEM LAYER 1* promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *The Plant Journal* **20**: 259–263
- Shanklin J, Cahoon EB** (1998) Desaturation and related modifications of fatty acids 1. *Annual Review of Plant Biology* **49**: 611–641
- Shanklin J, Somerville C** (1991) Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**: 2510–2514
- Shen B, Allen WB, Zheng P, Li C, Glassman K, Ranch J, Nubel D, Tarczynski MC** (2010) Expression of *ZmLEC1* and *ZmWRI1* increases seed oil production in maize. *Plant Physiology* **153**: 980–987
- Shirzadi R, Andersen ED, Bjerkan KN, Gloeckle BM, Heese M, Ungru A, Winge P, Koncz C, Aalen RB, Schnittger A, Grini PE** (2011) Genome-wide transcript profiling of endosperm without paternal contribution identifies parent-of-origin-dependent regulation of *AGAMOUS-LIKE36*. *PLoS Genetics* **7**: e1001303
- da Silva PMFR, Eastmond PJ, Hill LM, Smith AM, Rawsthorne S** (1997) Starch metabolism in developing embryos of oilseed rape. *Planta* **203**: 480–487
- Sjödahl S, Rödin J, Rask L** (1991) Characterization of the 12S globulin complex of *Brassica napus*. *European Journal of Biochemistry* **196**: 617–621
- Solstis DE, Solstis PS, Chase MW, Mort ME, Albach DC, Zanis M, Savolainen V,**

Références bibliographiques

- Hahn WH, Hoot SB, Fay MF, Axtell M, Swensen SM, Prince LM, Kress WJ, Nixon KC, Farris JS** (2000) Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcL*, and *atpB* sequences. *The Journal of the Linnean Society Botany* **133**: 381-461
- Song W, Koh S, Czako M, Marton L, Drenkard E, Becker JM, Stacey G** (1997) Antisense expression of the peptide transport gene *AtPTR2-B* delays flowering and arrests seed development in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Physiology* **114**: 927-935
- Sorensen 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
- Springer PS, Holding DR, Groover A, Yordan C, Martienssen RA** (2000) The essential Mcm7 protein PROLIFERA is localized to the nucleus of dividing cells during the G1 phase and is required maternally for early *Arabidopsis* development. *Development* **127**: 1815-1822
- Stefansson BR, Hougen FW, Downey RK** (1961) Note on the isolation of rape plants with seed oil free from erucic acid. *Canadian Journal of Plant Science* **41**: 218-219
- Steffen JG, Kang I-H, Portereiko MF, Lloyd A, Drews GN** (2008) AGL61 interacts with AGL80 and is required for central cell development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **148**: 259-268
- Steinmann T, Geldner N, Grebe M, Mangold S, Jackson CL, Paris S, Gälweiler L, Palme K, Jürgens G** (1999) Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* **286**: 316-318
- Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (2001) *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**: 11806-11811
- Stracke R, Werber M, Weisshaar B** (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current opinion in plant biology* **4**: 447-456
- Streb S, Zeeman SC** (2012) Starch metabolism in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*. doi: 10.1199/e0160
- Sun X, Shantharaj D, Kang X, Ni M** (2010) Transcriptional and hormonal signaling control of *Arabidopsis* seed development. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 611-620
- Suzuki M, Kao CY, McCarty DR** (1997) The conserved B3 domain of VIVIPAROUS1 has a cooperative DNA binding activity. *The Plant Cell* **9**: 799-807
- Suzuki M, McCarty DR** (2008) Functional symmetry of the B3 network controlling seed development. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 548-553
- Suzuki M, Wang HH-Y, McCarty DR** (2006) Repression of the LEAFY COTYLEDON 1/B3 Regulatory network in plant embryo development by *VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3* genes. *Plant Physiology* **143**: 902-911
- Swaminathan K, Peterson K, Jack T** (2008) The plant B3 superfamily. *Trends in Plant Science* **13**: 647-655
- Tanaka H, Onouchi H, Kondo M, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Machida C, Machida Y** (2001) A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in *Arabidopsis* embryos and juvenile plants. *Development* **128**: 4681-4689
- Tanaka M, Kikuchi A, Kamada H** (2008) The *Arabidopsis* histone deacetylases HDA6 and HDA19 contribute to the repression of embryonic properties after germination. *Plant Physiology* **146**: 149-161
- Tang X, Bian S, Tang M, Lu Q, Li S, Liu X, Tian G, Nguyen V, Tsang EWT, Wang A, et al** (2012) MicroRNA-mediated repression of the seed maturation program during vegetative development in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* **8**: e1003091
- Tang X, Hou A, Babu M, Nguyen V, Hurtado L, Lu Q, Reyes JC, Wang A, Keller WA, Harada JJ, Tsang EW, Cui Y** (2008) The *Arabidopsis* BRAHMA chromatin-remodeling ATPase is involved in repression of seed maturation genes in leaves. *Plant Physiology* **147**: 1143-1157
- The Arabidopsis genome initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis*. *Nature* **408**: 796-815
- Thelen JJ, Ohlrogge JB** (2002) Both antisense and sense expression of biotin carboxyl carrier protein isoform 2 inactivates the plastid acetyl-coenzyme A carboxylase in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **32**: 419-431

Références bibliographiques

- Thompson RD, Hueros G, Becker H-A, Maitz M** (2001) Development and functions of seed transfer cells. *Plant Science* **160**: 775–783
- Tiedemann J, Rutten T, Mönke G, Vorwieger A, Rolletschek H, Meissner D, Milkowski C, Petereck S, Mock H-P, Zank T, Bäumllein H** (2008) Dissection of a complex seed phenotype: Novel insights of *FUSCA3* regulated developmental processes. *Developmental Biology* **317**: 1–12
- To A, Joubès J, Barthole G, Lécureuil A, Scagnelli A, Jasinski S, Lepiniec L, Baud S** (2012) WRINKLED transcription factors orchestrate tissue-specific regulation of fatty acid biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* **24**:5007–5023
- To A, Valon C, Savino G, Guillemint 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
- Tsukagoshi H, Saijo T, Shibata D, Morikami A, Nakamura K** (2005) Analysis of a sugar response mutant of Arabidopsis identified a novel B3 domain protein that functions as an active transcriptional repressor. *Plant Physiology* **138**: 675–685
- Tzafrir I, McElver JA, Liu C -m., Yang LJ, Wu JQ, Martinez A, Patton DA, Meinke DW** (2002) Diversity of TITAN functions in Arabidopsis seed development. *Plant Physiology* **128**: 38–51
- Tzen JTC, Lie GC, Huang AHC** (1992) Characterization of the charged components and their topology at the surface of plant seed oil bodies. *The Journal of Biological Chemistry* **267**: 15626–15634
- Vanhercke T, El Tahchy A, Shrestha P, Zhou X-R, Singh SP, Petrie JR** (2013) Synergistic effect of WRI1 and DGAT1 coexpression on triacylglycerol biosynthesis in plants. *FEBS Letters* **587**: 364–369
- Vaucheret H, Béclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel J-B, Mourrain P, Palauqui J-C, Vernhettes S** (1998) Transgene-induced gene silencing in plants. *The Plant Journal* **16**: 651–659
- Veerappan V, Wang J, Kang M, Lee J, Tang Y, Jha AK, Shi H, Palanivelu R, Allen RD** (2012) A novel *HSI2* mutation in Arabidopsis affects the PHD-like domain and leads to derepression of seed-specific gene expression. *Planta* **236**: 1–17
- Vicente-carbajosa J, Carbonero P** (2005) Seed maturation: developing an intrusive phase to accomplish a quiescent state. *International Journal of Developmental Biology* **49**: 645–651
- Vigeolas H, Waldeck P, Zank T, Geigenberger P** (2007) Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus* L.) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter. *Plant Biotechnology Journal* **5**: 431–441
- Wang A, Garcia D, Zhang H, Feng K, Chaudhury A, Berger F, Peacock WJ, Dennis ES, Luo M** (2010) The VQ motif protein IKU1 regulates endosperm growth and seed size in Arabidopsis. *The Plant Journal* **63**: 670–679
- Wang F, Perry SE** (2013) Identification of direct targets of FUSCA3, a key regulator of Arabidopsis seed development. *Plant Physiology* **161**: 1251–1264
- Wang X, Niu Q-W, Teng C, Li C, Mu J, Chua N-H, Zuo J** (2008) Overexpression of *PGA37/MYB118* and *MYB115* promotes vegetative-to-embryonic transition in Arabidopsis. *Plant Cell Research* **19**: 224–235
- West MA, Yee KM, Danao J, Zimmerman JL, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (1994) LEAFY COTYLEDON1 is an essential regulator of late embryogenesis and cotyledon identity in Arabidopsis. *The Plant Cell* **6**: 1731–1745
- Whittle E, Shanklin J** (2001) Engineering Δ^9 -16:0-acyl carrier protein (ACP) desaturase specificity based on combinatorial saturation mutagenesis and logical redesign of the castor Δ^9 -18:0-ACP desaturase. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 21500–21505
- Willmann MR, Mehalick AJ, Packer RL, Jenik PD** (2011) MicroRNAs regulate the timing of embryo maturation in Arabidopsis. *Plant Physiology* **155**: 1871–1884
- Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J** (1991) Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* **252** : 1296–1300.
- Winkel-Shirley B** (2001) Flavonoid biosynthesis. A colourful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* **126**: 485–493
- Withana-Gamage TS, Hegedus DD, Qiu X, McIntosh T, Wanasundara JPD** (2013) Structural and physicochemical property relationships of cruciferin homohexamers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**: 5848–5859

Références bibliographiques

- Wobus U, Weber H** (1999) Seed maturation: genetic programmes and control signals. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 33–38
- Xiao W, Brown RC, Lemmon BE, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL** (2006) Regulation of seed size by hypomethylation of maternal and paternal genomes. *Plant Physiology* **142**: 1160–1168
- Xiao W, Gehring M, Choi Y, Margossian L, Pu H, Harada JJ, Goldberg RB, Pennell RI, Fischer RL** (2003) Imprinting of the *MEA* polycomb gene is controlled by antagonism between MET1 methyltransferase and DME glycosylase. *Developmental Cell* **5**: 891–901
- Xing Q, Creff A, Waters A, Tanaka H, Goodrich J, Ingram GC** (2013) ZHOUP1 controls embryonic cuticle formation via a signalling pathway involving the subtilisin protease ABNORMAL LEAF-SHAPE1 and the receptor kinases GASSHO1 and GASSHO2. *Development* **140**: 770–779
- Yamamoto A, Kagaya Y, Toyoshima R, Kagaya M, Takeda S, Hattori T** (2009) Arabidopsis NF-YB subunits LEC1 and LEC1-LIKE activate transcription by interacting with seed-specific ABRE-binding factors. *The Plant Journal* **58**: 843–856
- Yamasaki K** (2004) Solution structure of the B3 DNA binding domain of the Arabidopsis cold-responsive transcription factor RAV1. *The Plant Cell* **16**: 3448–3459
- Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP** (2002) Normalization for cDNA microarray data: A robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Research* **30**: e15.
- Yang S, Johnston N, Talideh E, Mitchell S, Jeffrey 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
- Yeung EC, Meinke DW** (1993) Embryogenesis in angiosperms: development of the suspensor. *The Plant Cell* **5**: 1371–1381
- Zhang Y, Cao G, Qu L-J, Gu H** (2009) Involvement of an R2R3-MYB transcription factor gene *AtMYB118* in embryogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell Reports* **28**: 337–346
- Zheng J, Chen F, Wang Z, Cao H, Li X, Deng X, Soppe WJJ, Li Y, Liu Y** (2012) A novel role for histone methyltransferase KYP/SUVH4 in the control of Arabidopsis primary seed dormancy. *New Phytologist* **193**: 605–616
- Zheng Y, Ren N, Wang H, Stromberg AJ, Perry SE** (2009) Global identification of targets of the Arabidopsis MADS domain protein AGAMOUS-LIKE15. *The Plant Cell* **21**: 2563–2577
- Zhou Y, Tan B, Luo M, Li Y, Liu C, Chen C, Yu C-W, Yang S, Dong S, Ruan J, et al** (2013) HISTONE DEACETYLASE19 interacts with HSL1 and participates in the repression of seed maturation genes in Arabidopsis seedlings. *The Plant Cell* **25**: 134–148
- Zhou Y, Zhang X, Kang X, Zhao X, Zhang X, Ni M** (2009) SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1 associates with *MINISEED3* and *HAIKU2* promoters *in vivo* to regulate Arabidopsis seed development. *The Plant Cell* **21**: 106–117
- Zuber H, Davidian J-C, Aubert G, Aime D, Belghazi M, Lugan R, Heintz D, Wirtz M, Hell R, Thompson R, et al** (2010) The Seed composition of Arabidopsis mutants for the group 3 sulfate transporters indicates a role in sulfate translocation within developing seeds. *Plant Physiology* **154**: 913–926

Annexe 1. Figure supplémentaire du chapitre I

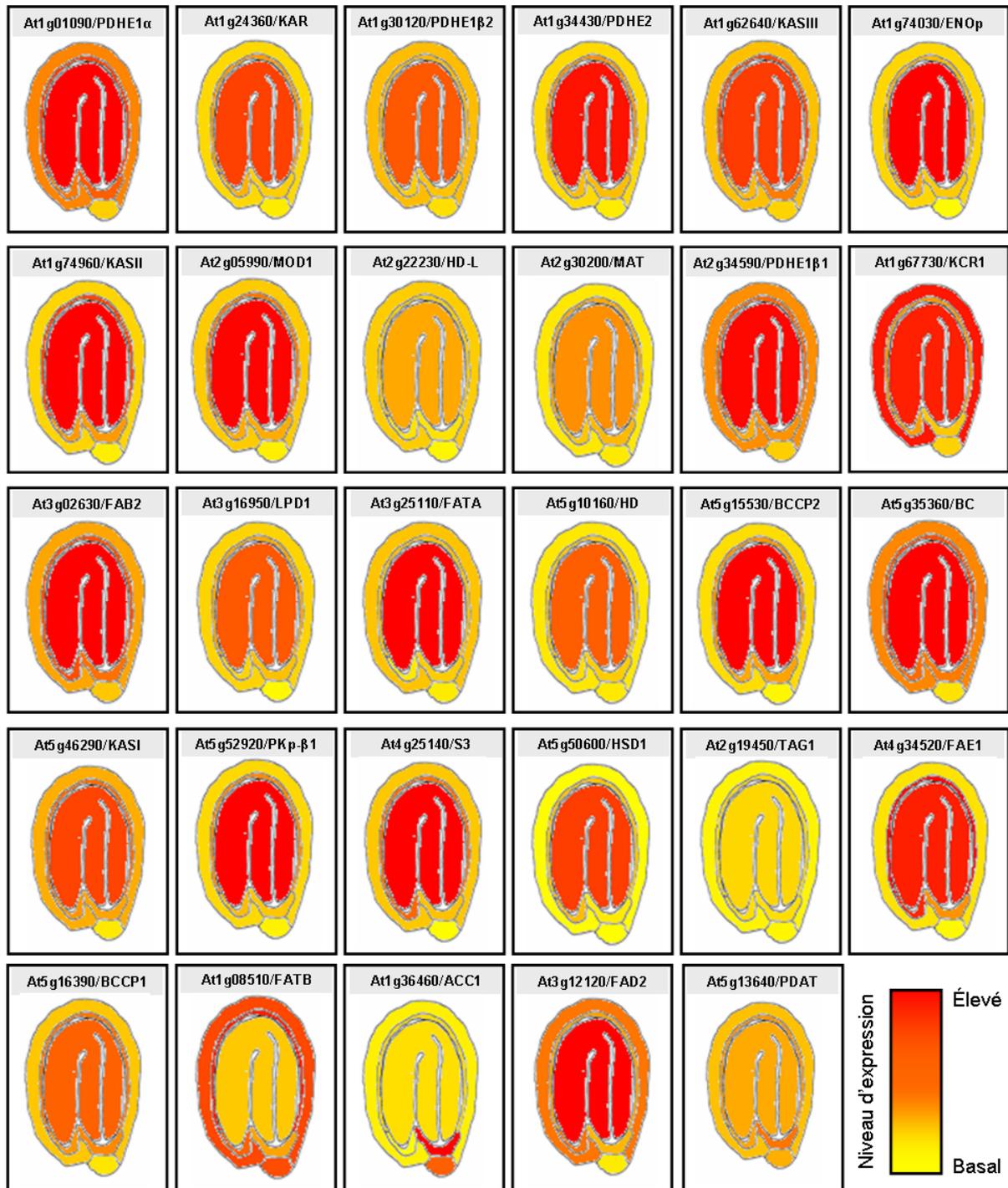


Figure A1.1. Patron d'expression au stade embryon retourné (environ 12 à 14 jours après floraison) de quelques gènes impliqués dans le métabolisme des TAG (Le et al., 2010).

Les noms des gènes font référence aux figures 0.24, 0.26 et 0.27 (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

Annexe 1

Annexe 2

Annexe 2. Figures supplémentaires du chapitre II

AGI	ANNOTATION	Comparaison Col-0 - myb118-1					Comparaison Col-0 - OE3				
		Red	Green	Log Ratio	Bonferroni	BH	Red	Green	Log Ratio	Bonferroni	BH
AT2G43880	"polygalacturonase, putative / pectinase, putative"	12,08	7,41	4,68	0,00E+00	0,00E+00	12,25	7,64	4,61	0,00E+00	0,00E+00
AT4G22230	"unknown protein"	12,04	7,55	4,39	0,00E+00	0,00E+00	12,02	8,01	4,01	0,00E+00	0,00E+00
AT1G71692	"AGL12 (AGAMOUS-LIKE 12); transcription factor"	12,78	8,83	4,15	0,00E+00	0,00E+00	12,49	8,26	4,20	0,00E+00	0,00E+00
AT5G07550	"GRP19 (glycine rich protein 19)"	12,04	8,35	3,69	0,00E+00	0,00E+00	11,93	8,54	3,40	0,00E+00	0,00E+00
AT2G03850	"late embryogenesis abundant domain-containing protein / LEA domain-containing protein"	12,18	8,87	3,60	0,00E+00	0,00E+00	12,57	8,68	3,89	0,00E+00	0,00E+00
AT1G28430	"CYP705A24 (cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 24); oxygen binding"	11,62	8,07	3,55	0,00E+00	0,00E+00	11,33	8,07	3,26	0,00E+00	0,00E+00
AT2G21720	"unknown protein"	11,36	7,82	3,54	0,00E+00	0,00E+00	12,07	7,58	4,21	0,00E+00	0,00E+00
AT3G02885	"GASAS (GAST1 PROTEIN HOMOLOG 5)"	11,33	8,21	3,52	0,00E+00	0,00E+00	11,21	7,76	3,44	0,00E+00	0,00E+00
AT3G16470	"JR1 (Jacalin lectin family protein)"	14,98	11,62	3,36	0,00E+00	0,00E+00	14,75	12,03	2,72	0,00E+00	0,00E+00
AT2G03850	"late embryogenesis abundant domain-containing protein / LEA domain-containing protein"	13,57	10,27	3,30	0,00E+00	0,00E+00	13,44	10,42	3,02	0,00E+00	0,00E+00
AT1G07175	"unknown protein"	12,26	8,99	3,28	0,00E+00	0,00E+00	12,23	8,82	3,42	0,00E+00	0,00E+00
AT2G16210	"transcriptional factor B3 family protein"	10,43	7,45	2,99	0,00E+00	0,00E+00	11,10	7,54	3,57	0,00E+00	0,00E+00
AT5G53730	"harpin-induced family protein / HIN1 family protein / harpin-responsive family protein"	10,64	7,74	2,90	0,00E+00	0,00E+00	11,12	7,59	3,13	0,00E+00	0,00E+00
AT4G09600	"GASAS3 (GAST1 PROTEIN HOMOLOG 3)"	10,48	7,72	2,76	0,00E+00	0,00E+00	11,08	7,63	3,25	0,00E+00	0,00E+00
AT4G24450	"ATGWD2/GWD3/PWD (PHOSPHOGLUCAN, WATER DIKINASE)"	10,94	8,25	2,67	0,00E+00	0,00E+00	11,50	8,68	2,81	0,00E+00	0,00E+00
AT1G13420	"sulfotransferase family protein"	12,49	9,84	2,64	0,00E+00	0,00E+00	12,72	10,43	2,29	3,22E-10	4,53E-12
AT5G28646	"WVD2 (wave-dampened2)"	10,01	7,35	2,63	0,00E+00	0,00E+00	10,30	7,48	2,82	0,00E+00	0,00E+00
AT5G39120	"germin-like protein, putative"	11,29	8,71	2,57	0,00E+00	0,00E+00	11,20	8,78	2,42	1,63E-11	2,37E-13
AT3G60520	"zinc ion binding"	12,80	10,07	2,53	0,00E+00	0,00E+00	12,68	10,03	2,65	0,00E+00	0,00E+00
AT4G01350	"DC1 domain-containing protein"	12,33	9,58	2,47	0,00E+00	0,00E+00	12,06	9,72	2,33	1,14E-10	1,53E-12
AT4G25490	"CBF1 (C-REPEAT/DRE BINDING FACTOR 1);"	13,37	10,91	2,46	0,00E+00	0,00E+00	11,72	10,43	1,30	3,05E-11	3,70E-13
AT1G19460	"kelch repeat-containing F-box family protein"	11,73	8,24	2,39	0,00E+00	0,00E+00	12,15	9,72	2,41	1,53E-11	2,35E-13
AT4G08290	"nodulin Mtn21 family protein"	12,84	10,27	2,38	0,00E+00	0,00E+00	12,75	10,69	2,06	1,40E-11	1,40E-13
AT1G76800	"nodulin, putative"	10,24	7,91	2,37	0,00E+00	0,00E+00	10,02	7,98	2,08	1,56E-11	1,67E-13
AT2G15830	"unknown protein"	11,84	9,07	2,36	0,00E+00	0,00E+00	10,92	9,94	1,98	9,84E-11	8,79E-13
AT3G60780	"unknown protein"	11,26	8,93	2,34	0,00E+00	0,00E+00	11,49	9,14	2,35	5,58E-11	1,06E-12
AT3G58060	"cation efflux family protein / metal tolerance protein, putative (MTPc3)"	11,11	8,70	2,32	0,00E+00	0,00E+00	11,38	8,65	2,74	0,00E+00	0,00E+00
AT1G66760	"MATE efflux family protein"	10,93	7,97	2,31	0,00E+00	0,00E+00	10,98	7,98	2,02	3,23E-11	3,34E-13
AT5G39180	"germin-like protein, putative"	10,93	8,95	2,30	0,00E+00	0,00E+00	10,95	8,77	2,18	7,02E-11	8,83E-13
AT4G26770	"phosphatidate cytidyltransferase, putative / CDP-diglyceride synthetase, putative"	12,47	10,18	2,30	0,00E+00	0,00E+00	12,85	10,55	2,30	2,28E-10	5,32E-12
AT1G62410	"MIF4G domain-containing protein"	10,25	7,58	2,27	0,00E+00	0,00E+00	10,27	7,58	2,29	3,44E-10	4,74E-12
AT5G26730	"unknown protein"	12,09	9,92	2,26	0,00E+00	0,00E+00	12,07	10,08	1,99	7,09E-11	6,57E-13
AT5G01215	"transferase family protein"	13,38	11,11	2,25	0,00E+00	0,00E+00	13,45	11,30	2,15	1,42E-10	1,62E-12
AT2G38320	"unknown protein"	10,91	7,50	2,25	0,00E+00	0,00E+00	10,29	7,58	2,71	0,00E+00	0,00E+00
AT1G74460	"GDSL-motif lipase/hydrolase family protein"	10,01	7,77	2,25	0,00E+00	0,00E+00	10,37	8,04	2,32	1,48E-10	2,38E-12
AT4G24120	"YSL1 (YELLOW STRIPE LIKE 1); oligopeptide transporter"	9,93	7,35	2,24	0,00E+00	0,00E+00	10,04	7,52	2,52	0,00E+00	0,00E+00
AT1G62540	"flavin-containing monooxygenase family protein / FMO family protein"	11,78	9,54	2,23	0,00E+00	0,00E+00	11,85	9,61	2,04	1,84E-11	1,93E-13
AT3G20130	"CYP705A22 (cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 22)"	12,84	10,62	2,22	0,00E+00	0,00E+00	13,20	11,01	2,19	4,33E-11	5,63E-13
AT2G37440	"endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein"	9,94	7,85	2,18	0,00E+00	0,00E+00	10,31	7,79	2,52	0,00E+00	0,00E+00
AT3G04410	"transcription factor"	9,94	7,14	2,12	0,00E+00	0,00E+00	9,94	7,18	2,82	0,00E+00	0,00E+00
AT1G78490	"CYP708A3 (cytochrome P450, family 708, subfamily A, polypeptide 3); oxygen binding"	9,91	7,73	2,11	0,00E+00	0,00E+00	9,91	7,82	2,07	1,00E-10	1,02E-12
AT5G03860	"malate synthase, putative"	10,81	8,20	2,10	0,00E+00	0,00E+00	10,72	8,55	2,17	7,84E-11	3,64E-13
AT3G46680	"UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein"	10,12	8,03	2,09	0,00E+00	0,00E+00	10,24	8,33	1,90	5,23E-11	4,43E-13
AT5G24090	"acidic endochitinase (CHIB1)"	13,28	11,21	2,07	0,00E+00	0,00E+00	13,20	11,32	1,88	8,10E-11	6,70E-13
AT4G23720	"unknown protein"	9,93	7,25	2,07	0,00E+00	0,00E+00	9,93	7,31	2,14	1,02E-10	2,04E-12
AT5G44630	"terpene synthase/cyclase family protein"	11,21	9,14	2,06	0,00E+00	0,00E+00	11,44	9,30	2,14	1,76E-11	1,95E-13
AT5G24530	"oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein"	11,19	9,15	2,04	0,00E+00	0,00E+00	11,41	9,25	2,15	1,03E-11	1,52E-13
AT1G01380	"ETC1 (ENHANCER OF TRY AND CPC 1); DNA binding / transcription factor"	10,27	8,24	2,03	0,00E+00	0,00E+00	10,09	8,20	1,79	6,94E-11	4,93E-13
AT5G07160	"DNA binding / transcription factor"	11,49	9,45	2,02	0,00E+00	0,00E+00	11,49	9,20	2,18	5,91E-11	7,19E-13
AT2G13400	"unknown protein"	10,11	8,09	2,02	0,00E+00	0,00E+00	10,15	8,26	1,90	5,45E-11	4,62E-13
AT5G39150	"germin-like protein, putative", "germin-like protein, putative"	11,68	9,57	1,99	0,00E+00	0,00E+00	11,62	9,60	2,02	3,25E-11	3,34E-13
AT4G04070	"myb family transcription factor"	12,08	10,10	1,98	0,00E+00	0,00E+00	11,77	9,99	1,78	8,37E-11	6,27E-13
AT1G74540	"CYP98A8 (cytochrome P450, family 98, subfamily A, polypeptide 8); oxygen binding"	10,03	8,07	1,96	0,00E+00	0,00E+00	10,45	7,89	2,55	0,00E+00	0,00E+00
AT3G57600	"AP2 domain-containing transcription factor, putative"	9,93	7,97	1,96	0,00E+00	0,00E+00	9,93	7,87	1,98	4,10E-11	7,44E-13
AT5G07520	"GRP18 (glycine rich protein 18); nutrient reservoir"	13,11	11,15	1,96	0,00E+00	0,00E+00	12,81	10,83	1,98	3,27E-11	6,35E-13
AT2G19060	"transferase family protein"	10,59	8,53	1,96	0,00E+00	0,00E+00	10,85	8,70	2,07	1,03E-11	1,04E-13
AT3G04720	"PR4 (PATHOGENESIS-RELATED 4)"	10,21	8,26	1,96	0,00E+00	0,00E+00	10,21	8,27	1,66	1,03E-10	6,42E-12
AT4G23670	"major latex protein-related / MLP-related"	12,49	10,54	1,94	1,63E-11	1,49E-11	12,53	10,90	1,63	1,14E-10	9,72E-12
AT3G48185	"unknown protein"	11,54	9,61	1,93	1,63E-11	1,49E-11	11,27	9,75	1,55	3,46E-11	4,40E-13
AT1G60650	"glycine-rich RNA-binding protein, putative"	11,76	9,65	1,91	3,25E-11	2,83E-11	11,90	10,03	1,81	3,96E-11	2,83E-13
AT1G19470	"kelch repeat-containing F-box family protein"	10,27	8,97	1,90	4,88E-11	4,28E-11	10,38	9,59	2,33	1,14E-10	1,69E-12
AT5G40360	"MYB115 (myb domain protein 115); DNA binding / transcription factor"	12,50	10,81	1,88	8,35E-11	7,03E-11	12,65	11,07	1,59	5,43E-11	2,33E-13
AT5G26730	"unknown protein"	11,33	9,45	1,88	9,76E-11	8,41E-11	11,25	9,32	1,93	3,92E-11	2,74E-13
AT1G52410	"TSA1 (TSK-ASSOCIATING PROTEIN 1)"	10,65	8,77	1,87	1,44E-10	1,37E-10	10,59	8,67	1,81	4,18E-11	3,93E-13
AT5G06839	"bZIP family transcription factor"	9,91	7,70	1,84	3,48E-10	2,82E-10	10,08	7,55	2,54	0,00E+00	0,00E+00
AT5G59820	"RHL41 (RESPONSIVE TO HIGH LIGHT 41); nucleic acid binding / transcription factor"	14,41	12,68	1,83	4,78E-10	3,60E-10	14,26	12,90	1,35	3,49E-11	3,33E-13
AT4G27140	"2S seed storage protein 1 / 2S albumin storage protein / NWMU1-2S albumin 1"	13,50	11,69	1,81	1,04E-10	8,00E-10	13,20	11,43	1,78	6,94E-11	5,90E-13
AT5G54740	"protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein"	11,88	10,18	1,80	1,02E-10	8,70E-10	12,24	10,36	1,88	6,94E-11	7,98E-13
AT1G49980	"unknown protein"	12,48	10,69	1,79	1,78E-10	1,57E-10	12,60	10,99	1,81	3,16E-11	1,57E-13
AT1G03890	"cupin family protein"	13,25	11,46	1,79	1,88E-10	1,50E-10	13,71	11,54	2,17	3,91E-11	1,09E-13
AT3G54040	"photoassimilate-responsive protein-related"	12,18	10,38	1,78	2,36E-10	1,76E-10	12,00	10,55	1,45	4,03E-11	2,40E-13
AT4G22630	"protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein"	9,93	8,17	1,78	2,37E-10	1,90E-10	9,93	8,26	1,58	4,03E-11	2,33E-13
AT3G28540	"AAA-type ATPase family protein"	11,83	10,16	1,76	4,36E-10	3,16E-10	12,16	10,59	1,56	3,03E-11	3,39E-13
AT1G33100	"MATE efflux family protein"	10,18	8,41	1,76	4,43E-10	3,23E-10	10,51	8,35	2,16	1,07E-10	1,29E-12
AT1G16960	"unknown protein"	12,58	10,83	1,76	5,63E-10	3,99E-10	12,62	10,89	1,73	2,94E-11	1,65E-13
AT4G30280	"ATXTH18/XTH18 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 18)"	9,94	7,73	1,72	1,07E-10	1,25E-10	9,94	7,56	1,46	4,03E-11	1,00E-13
AT1G21360	"GLTP2 (GLYCOLIPID TRANSFER PROTEIN 2)"	9,91	7,24	1,71	2,52E-10	1,67E-10	9,91	7,24	1,81	4,18E-11	3,04E-13
AT5											

Annexe 2

AT5G62350	"invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein / DC 1.2 homolog (FL5-2122)"	12,71	11,19	1,52	7.8E-4	3.5E-9	12,56	11,34	1,22	1.0E+0	5.9E-3
AT2G14692	"unknown protein"	7,59	7,75	1,50	1.9E-5	3.5E-9	7,59	7,65	1,43	3.1E-2	3.3E-1
AT4G10020	"short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein"	12,10	10,61	1,49	1.9E-5	6.5E-9	12,56	10,74	1,82	3.4E-5	2.5E-1
AT1G59930	"unknown protein"	12,03	10,55	1,47	2.6E-5	1.8E-1	11,89	10,70	1,19	1.0E+0	3.3E-2
AT4G24480	"serine/threonine protein kinase, putative"	11,16	9,68	1,47	2.6E-5	1.8E-1	11,85	10,40	1,25	1.0E+0	3.1E-1
AT5G55750	"hydroxyproline-rich glycoprotein family protein"	10,27	9,52	1,46	4.2E-5	2.0E-1	10,62	9,53	1,88	3.0E-4	3.9E-4
AT5G10140	"FLC (FLOWERING LOCUS C)"	11,82	10,38	1,45	5.5E-5	2.6E-1	11,76	10,17	1,59	3.3E-1	2.0E-5
AT2G30660	"3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase, putative / CoA-thioester hydrolase, putative"	8,77	7,33	1,44	5.9E-5	2.6E-1	9,13	7,37	2,16	3.9E-3	1.9E-10
ATC0G1050	"Represents a plastid-encoded subunit of a NAD(P)H dehydrogenase complex."	4,39	7,58	1,42	3.9E-5	4.3E-1	9,00	7,53	1,37	3.9E-1	7.0E-4
AT5G59990	"unknown protein"	4,37	7,50	1,41	1.9E-4	5.6E-1	9,13	7,94	1,34	3.0E-1	1.0E-1
AT3G52810	"ATPAP21/PAP21 (purple acid phosphatase 21)"	4,39	7,48	1,40	1.9E-4	7.8E-1	9,13	7,52	1,63	3.9E-1	3.4E-4
AT5G26310	"UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein"	12,82	11,43	1,39	2.4E-4	1.0E-4	12,73	11,34	1,39	1.4E-1	1.5E-4
AT1E25930		10,73	9,35	1,38	3.9E-4	1.2E-4	10,52	9,29	1,23	1.0E+0	5.9E-1
AT1G73120	"unknown protein"	10,24	8,87	1,37	3.0E-4	1.4E-4	10,41	8,93	1,47	3.4E-2	1.9E-4
AT2G14680	"endo-1,4-beta-xylanase/ hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds"	14,86	13,30	1,37	4.9E-4	1.9E-4	14,89	13,55	1,34	3.2E-1	1.9E-1
AT3G11420	"fringe-related protein"	10,79	9,43	1,35	6.9E-4	2.9E-4	11,21	9,47	1,74	3.9E-4	1.2E-4
AT5G07510	"GRP14 (Glycine rich protein 14)"	14,33	12,99	1,35	1.4E-4	2.9E-4	14,26	13,08	1,20	1.0E+0	5.2E-1
AT5E57360		10,63	9,19	1,34	4.9E-4	3.2E-4	10,79	9,41	1,38	1.9E-1	5.0E-1
AT5G59920	"ULI3 (UV-B light insensitive 3)"	11,95	10,63	1,33	1.0E-3	4.5E-4	12,31	10,80	1,51	1.0E-2	7.9E-4
AT4G15230	"ATPDR2/PDR2 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 2)"	8,95	7,99	1,32	1.9E-3	5.9E-4	9,12	7,27	1,65	3.0E-3	3.9E-4
AT5G57500	"transferase, transferring glycosyl groups"	12,51	11,19	1,32	1.4E-3	5.4E-4	12,50	11,31	1,19	1.0E+0	3.9E-1
AT5G35490	"unknown protein"	10,15	8,97	1,32	1.9E-3	5.4E-4	10,40	8,97	1,43	6.9E-2	3.1E-4
AT3G59510	"leucine-rich repeat family protein"	8,13	7,95	1,31	1.9E-3	6.2E-4	8,13	7,93	1,31	5.7E-1	1.9E-1
AT5G63230	"glycosyl hydrolase family protein 17"	8,58	8,26	1,31	1.9E-3	6.6E-4	8,58	8,16	1,06	1.0E+0	5.9E-1
AT3G21550	"unknown protein"	12,76	11,45	1,31	2.9E-3	6.9E-4	12,64	11,42	1,21	1.0E+0	3.0E-1
AT4G00770	"unknown protein"	10,27	8,97	1,30	2.9E-3	1.7E-4	10,72	8,93	1,78	1.4E-5	5.9E-1
AT2G15010	"thionin, putative"	12,99	11,69	1,30	3.9E-3	1.4E-4	13,42	12,00	1,42	6.4E-2	3.4E-1
AT5G50070	"invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein"	8,95	8,35	1,30	3.9E-3	1.4E-4	9,13	8,30	1,37	1.9E-1	1.9E-1
AT4G22790	"MATE efflux family protein"	13,57	12,28	1,29	2.9E-3	1.0E-4	13,54	12,19	1,15	1.0E+0	1.5E-1
AT5G35120	"unknown protein"	14,29	13,01	1,28	3.9E-3	1.9E-4	14,37	13,19	1,17	1.0E+0	3.9E-1
AT1G60460	"ATGOLS4 (ARABIDOPSIS THALIANA GALACTINOL SYNTHASE 4)"	8,13	7,95	1,28	3.9E-3	1.2E-4	8,13	7,95	1,12	1.0E+0	3.9E-1
AT5G06839	"bZIP family transcription factor"	11,89	10,66	1,28	3.9E-3	1.2E-4	11,89	10,66	1,22	3.9E-5	2.9E-1
AT1G72630	"unknown protein"	11,89	10,18	1,28	3.9E-3	1.0E-4	11,52	10,27	1,25	1.0E+0	3.9E-1
AT2G25770	"unknown protein"	11,89	10,66	1,27	4.9E-3	1.4E-4	12,20	10,89	1,31	3.9E-1	3.9E-1
AT1G78530	"protein kinase family protein"	8,95	7,99	1,27	4.9E-3	1.6E-4	9,13	7,99	1,59	1.0E+0	3.9E-1
AT5G22545	"unknown protein"	10,14	7,99	1,27	5.9E-3	1.9E-4	9,13	7,97	1,23	1.0E+0	3.9E-1
AT3G30833		8,13	7,95	1,27	5.9E-3	1.0E-4	8,13	7,29	1,23	1.0E+0	3.9E-1
AT1G58807	"disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative / PRM1 homolog, putative"	11,53	10,28	1,26	6.9E-3	2.1E-4	10,85	9,79	1,15	1.0E+0	3.9E-1
AT4G09930	"avirulence-responsive family protein / avirulence induced gene (AIG1) family protein"	8,13	7,95	1,26	6.9E-3	2.1E-4	10,07	8,99	1,41	1.0E-1	3.9E-1
AT2G14680	"endo-1,4-beta-xylanase/ hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds"	13,91	12,68	1,25	1.9E-3	3.2E-4	14,27	12,80	1,37	3.9E-1	1.9E-4
AT4G18170	"WRKY28 (WRKY DNA-binding protein 28); transcription factor"	8,13	7,95	1,25	2.9E-3	3.2E-4	8,13	7,95	1,35	3.9E-1	3.9E-1
AT1G34047	"unknown protein"	11,96	10,71	1,25	1.9E-3	2.5E-4	12,21	10,58	1,65	1.0E-5	1.2E-4
AT1G29395	"COR414-TH1 (cold regulated 414 thylakoid membrane 1)"	15,13	13,88	1,25	6.9E-3	2.9E-4	14,86	13,75	1,22	1.0E+0	3.9E-1
AT1G61110	"ANAC025 (Arabidopsis NAC domain containing protein 25); transcription factor"	8,13	8,00	1,23	1.9E-3	3.4E-4	8,13	8,00	1,51	1.0E+0	3.9E-1
AT5G39720	"avirulence-responsive protein-related / avirulence induced gene (AIG) protein-related"	8,13	7,16	1,23	1.9E-3	4.0E-4	8,13	7,16	1,83	2.8E-5	2.9E-1
AT1G14700	"ATPAP3/PAP3 (purple acid phosphatase 3)"	8,13	7,97	1,22	1.9E-3	4.8E-4	8,13	7,97	1,31	5.7E-1	1.9E-1
AT1G78770	"pathogenesis-related family protein"	13,43	12,22	1,21	1.9E-3	5.9E-4	13,42	12,34	1,08	1.0E+0	3.9E-1
AT2G21045	"unknown protein"	8,13	7,16	1,21	1.9E-3	5.5E-4	8,13	7,16	1,27	1.0E+0	3.9E-1
AT1G53390	"ATPase, coupled to transmembrane movement of substances"	13,01	11,81	1,21	1.9E-3	5.9E-4	12,93	11,76	1,17	1.0E+0	3.9E-1
AT3G28010		8,13	7,97	1,21	1.9E-3	5.9E-4	8,13	7,97	1,35	1.0E+0	3.9E-1
AT4G08300	"nodulin MtN21 family protein"	8,13	7,75	1,20	2.9E-3	1.4E-4	8,13	7,70	1,43	1.4E-2	1.9E-1
AT5G05290	"ATEXPA2 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A2)"	8,13	7,71	1,19	2.9E-3	6.4E-4	8,13	7,39	1,50	1.0E-2	3.9E-4
AT1G12030	"unknown protein"	8,13	8,38	1,19	3.9E-3	6.7E-4	8,13	8,12	1,41	1.0E-1	4.9E-1
AT4G74760	"MADS-box protein (AGL102)"	10,21	9,03	1,18	3.9E-3	1.0E-4	10,71	9,30	1,41	1.0E-1	1.9E-1
AT5G60510	"undecaprenyl pyrophosphate synthetase family protein / UPP synthetase family protein"	8,13	7,68	1,17	4.9E-3	1.9E-4	8,13	7,41	1,33	4.2E-1	1.9E-1
AT1G77960	"unknown protein"	8,13	7,08	1,18	5.9E-3	1.4E-4	8,13	7,23	1,67	1.0E-4	1.4E-4
AT5G16360	"NC domain-containing protein"	10,01	8,55	1,18	6.9E-3	1.0E-4	10,20	8,88	1,33	3.9E-1	1.9E-1
AT2G32370	"homeobox-leucine zipper family protein / lipid-binding START domain-containing protein"	13,04	11,89	1,15	6.9E-3	1.4E-4	13,09	11,68	1,41	1.0E-1	4.9E-1
AT3G06890	"unknown protein"	13,53	12,38	1,15	7.9E-3	2.0E-4	13,59	12,43	1,16	1.0E+0	1.9E-1
AT1G28130	GH3.17	11,55	10,41	1,14	8.9E-3	2.4E-4	11,87	10,27	1,60	3.9E-1	1.9E-1
AT1G73370	"SU56; UDP-glycosyltransferase/ sucrose synthase"	10,36	9,22	1,14	9.9E-3	2.4E-4	10,46	9,30	1,16	1.0E+0	3.9E-1
AT1G78320	"ATGSTU23 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class tau) 23)"	8,13	8,43	1,13	1.0E-1	2.1E-4	10,27	8,70	1,57	3.9E-1	2.9E-4
AT1G66130	"oxidoreductase N-terminal domain-containing protein"	11,47	10,34	1,12	1.9E-1	2.4E-4	11,80	10,64	1,16	1.0E+0	3.9E-1
AT1G52890	"ANAC019 (Arabidopsis NAC domain containing protein 19); transcription factor"	12,67	11,56	1,11	1.6E-1	4.0E-4	12,97	11,82	1,16	1.0E+0	1.9E-1
AT4G37570		8,13	8,41	1,10	1.9E-1	4.9E-4	8,13	8,34	1,11	1.0E+0	3.9E-1
AT3G11720	"unknown protein"	8,13	8,88	1,09	2.9E-1	5.9E-4	10,18	9,02	1,15	1.0E+0	1.9E-1
AT2G35910	"zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein"	8,13	8,34	1,09	2.9E-1	5.4E-4	8,13	8,08	1,06	1.0E+0	3.9E-1
AT1G02220	"ANAC003 (Arabidopsis NAC domain containing protein 3); transcription factor"	11,17	10,08	1,09	2.4E-1	3.9E-4	11,28	9,85	1,64	3.9E-1	6.9E-4
AT4G03620	"myosin heavy chain-related"	8,13	7,45	1,09	2.4E-1	3.4E-4	8,13	7,10	1,39	4.9E-1	3.9E-1
AT4G12580	"unknown protein"	10,33	9,24	1,09	2.4E-1	4.4E-4	10,19	9,07	1,11	1.0E+0	3.9E-1
AT2G16960	"importin beta-2 subunit family protein"	8,13	8,14	1,08	2.9E-1	4.9E-4	8,13	8,14	1,32	4.9E-1	1.9E-1
AT1E59800	"CYP98A8 (cytochrome P450, family 98, subfamily A, polypeptide 8); oxygen binding"	8,13	7,16	1,08	2.9E-1	4.4E-4	8,13	7,07	1,21	1.0E+0	3.9E-1
AT5G65165	"SDH2-3 (Succinate dehydrogenase 2-3)"	11,16	10,09	1,07	3.9E-1	4.9E-4	11,69	9,96	1,83	3.9E-5	2.0E-1
AT5G48850	"male sterility MS5 family protein"	13,21	12,15	1,06	4.9E-1	1.0E-4	13,44	12,16	1,28	3.9E-1	1.9E-1
AT4G20520	"unknown protein"	8,13	7,75	1,05	5.9E-1	1.0E-4	8,13	7,45	1,18	1.0E+0	1.9E-1
AT2G36550	"unknown protein"	10,36	7,93	1,05	5.9E-1	1.2E-4	10,36	7,14	1,36	2.9E-1	3.9E-1
AT4G37400	"CYP81F3 (cytochrome P450, family 81, subfamily F, polypeptide 3); oxygen binding"	10,22	9,17	1,05	5.9E-1	1.2E-4	10,12	9,01	1,12	1.0E+0	3.9E-1
AT4G14815	"protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein"	8,13	7,26	1,04	4.9E-1	1.4E-4	8,13	7,21	1,07	1.0E+0	3.9E-1
AT2G43535	"trypsin inhibitor, putative"	12,65	11,62	1,03	3.9E-1	1.0E-4	12,68	11,59	1,08	1.0E+0	3.9E-1
AT5G56100	"glycine-rich protein / oleosin"	8,13	8,98	1,02	3.9E-1	2.0E-4	8,13	8,57	1,29	6.9E-1	1.9E-1
AT4G31320	"auxin-responsive protein, putative / small auxin up RNA (SAUR_C)"	10,67	9,65	1,02	3.9E-1	2.0E-4	10,89	9,76	1,13	1.0E+0	3.9E-1
AT3G11210	"GDSL-motif lipase/hydrolase family protein"	8,13	7,80	1,02	1.0E+0	2.0E-4	8,13	7,69	1,36	2.9E-1	3.9E-1
AT5G57630	"CIPK21 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 21); kinase"	11,17	10,16	1,02	1.0E+0	2.0E-4	11,33	9,92	1,41	3.9E-1	3.9E-1
AT2G19770	"PRF5 (PROFILINS); actin binding / actin monomer binding"										

Annexe 2

AT1G23510	"unknown protein"	11,23	10,40	0,84	100E-0	100E-0	11,68	10,46	1,22	100E-0	100E-0
AT3G45130	"LAS1 (Lanosterol synthase 1); catalytic/ lyase"	11,00	10,18	0,83	100E-0	100E-0	11,81	10,64	1,17	100E-0	100E-0
AT1G49000	"unknown protein"	9,17	8,36	0,83	100E-0	100E-0	9,77	8,93	0,84	100E-0	100E-0
ATC000920	"chloroplast-encoded 16S ribosomal RNA"; "chloroplast-encoded 16S ribosomal RNA"	11,14	10,32	0,82	100E-0	100E-0	11,07	10,02	1,06	100E-0	100E-0
AT5G59750	"riboflavin biosynthesis protein, putative"	9,37	8,73	0,61	100E-0	100E-0	9,96	9,70	0,27	100E-0	100E-0
AT2G45570	"CYP76C2 (cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 2); oxygen binding"	9,97	10,45	-0,48	100E-0	100E-0	9,90	10,58	-0,68	100E-0	100E-0
ATC000120	"Encodes the ATPase alpha subunit"	9,47	9,65	-0,18	100E-0	100E-0	9,42	9,53	-0,11	100E-0	100E-0
AT4G33666	"unknown protein"	9,36	10,20	-0,84	100E-0	100E-0	9,73	10,11	-0,38	100E-0	100E-0
AT5G62070	"IQD23 (IQ-domain 23); calmodulin binding"	11,44	12,30	-0,86	100E-0	100E-0	11,35	12,43	-1,08	100E-0	100E-0
AT1G72610	"GLP1 (GERMIN-LIKE PROTEIN 1); manganese ion binding / metal ion binding "	11,55	12,42	-0,87	100E-0	100E-0	11,16	12,26	-1,11	100E-0	100E-0
AT4G37580	"HLS1 (HOOKLESS 1); N-acetyltransferase"	9,12	9,99	-0,87	100E-0	100E-0	9,71	9,98	-0,27	100E-0	100E-0
AT1G47655	"Dof-type zinc finger domain-containing protein"	10,36	11,25	-0,89	100E-0	100E-0	10,20	11,27	-1,07	100E-0	100E-0
AT1G70560	"alliinase C-terminal domain-containing protein"	10,80	11,79	-0,99	100E-0	100E-0	10,86	11,96	-1,10	100E-0	100E-0
AT2G46140	"late embryogenesis abundant protein, putative / LEA protein, putative"	9,14	10,08	-0,90	100E-0	100E-0	9,99	10,13	-0,14	100E-0	100E-0
AT2G45210	"auxin-responsive protein-related"	10,31	11,01	-0,90	100E-0	100E-0	9,99	11,14	-1,24	100E-0	100E-0
AT3G21620	"early-responsive to dehydration protein-related / ERD protein-related"	9,36	10,24	-0,90	100E-0	100E-0	9,99	10,48	-0,49	100E-0	100E-0
AT5E16700		9,90	10,70	-0,90	100E-0	100E-0	9,77	10,85	-1,09	100E-0	100E-0
AT3G02610	"acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase"	13,20	14,12	-0,91	100E-0	100E-0	13,11	14,18	-1,07	100E-0	100E-0
AT1G32520	"unknown protein"	11,36	12,28	-0,92	100E-0	100E-0	11,43	12,49	-1,06	100E-0	100E-0
AT4G08685	SAH7	12,13	13,05	-0,92	100E-0	100E-0	11,80	12,83	-1,23	100E-0	100E-0
AT5G58640	"unknown protein"	10,41	11,34	-0,94	100E-0	100E-0	9,96	11,15	-1,23	100E-0	100E-0
AT1G14720	"XTR2 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE RELATED 2)	12,00	12,94	-0,94	100E-0	100E-0	12,00	13,21	-1,21	100E-0	100E-0
AT4G31805	"WRKY family transcription factor"	10,29	11,23	-0,94	100E-0	100E-0	10,38	11,55	-1,18	100E-0	100E-0
AT1G65230	"aspartyl protease family protein" aspartic proteinase-like protein 2	11,26	12,23	-0,98	100E-0	100E-0	11,28	12,38	-1,11	100E-0	100E-0
AT1G68400	"leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative"	12,71	13,66	-0,95	100E-0	100E-0	12,71	13,80	-1,09	100E-0	100E-0
AT5G56480	"protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein"	9,95	9,73	0,22	100E-0	100E-0	9,99	9,92	0,07	100E-0	100E-0
AT1G76520	"auxin efflux carrier family protein"	10,89	11,86	-0,97	100E-0	100E-0	10,59	11,80	-1,21	100E-0	100E-0
AT1G53170	"ATERF-8/ATERF8 (ETHYLENE RESPONSE ELEMENT BINDING FACTOR 4)	11,08	12,06	-0,97	100E-0	100E-0	10,84	12,12	-1,28	100E-0	100E-0
AT1G12845	"unknown protein"	10,90	10,85	0,05	100E-0	100E-0	10,76	10,76	0,00	100E-0	100E-0
AT4G30650	"hydrophobic protein, putative / low temperature and salt responsive protein, putative"	12,81	13,49	-0,68	100E-0	100E-0	12,29	13,68	-1,39	100E-0	100E-0
AT5G04140	"GLU1 (FERREDOXIN-DEPENDENT GLUTAMATE SYNTHASE 1)"	10,17	11,16	-0,99	100E-0	100E-0	10,22	11,28	-1,14	100E-0	100E-0
AT1G09370	"enzyme inhibitor/pectinesterase"	11,74	12,73	-0,99	100E-0	100E-0	11,75	12,98	-1,23	100E-0	100E-0
AT3G43600	"AAO2 (ALDEHYDE OXIDASE 2)"	10,87	11,67	-0,80	100E-0	100E-0	10,82	12,16	-1,25	100E-0	100E-0
AT4G10265	"wound-responsive protein, putative"	9,76	10,57	-0,81	100E-0	100E-0	9,76	10,57	-0,81	100E-0	100E-0
AT3G24600	"unknown protein"	12,16	13,17	-1,02	100E-0	100E-0	11,88	13,13	-1,15	100E-0	100E-0
AT2G33880	"WOX9 (STIMPY); transcription factor"	10,14	11,16	-1,02	100E-0	100E-0	10,10	11,29	-1,19	100E-0	100E-0
AT3G61220	"LIM domain-containing protein"	10,92	9,15	1,77	100E-0	100E-0	10,64	12,00	-1,36	100E-0	100E-0
AT2G45450	"unknown protein"	10,92	11,85	-0,93	100E-0	100E-0	10,64	12,00	-1,36	100E-0	100E-0
AT5G01030	"unknown protein"	10,92	11,85	-0,93	100E-0	100E-0	10,64	12,00	-1,36	100E-0	100E-0
AT3G25030	"calmodulin binding / protein binding / zinc ion binding"	10,31	11,34	-1,03	100E-0	100E-0	10,31	11,15	-0,84	100E-0	100E-0
AT5G46880	"HB-7 (homeobox-7); DNA binding / transcription factor"	10,03	11,06	-1,03	100E-0	100E-0	10,02	11,28	-1,27	100E-0	100E-0
AT3G56220	"unknown protein"	11,12	12,16	-1,04	100E-0	100E-0	11,28	12,51	-1,22	100E-0	100E-0
AT1G65486	"unknown protein"	9,99	9,95	0,04	100E-0	100E-0	9,99	9,93	0,06	100E-0	100E-0
AT4G23070	"rhomboid family protein" RBL7	9,99	9,91	0,08	100E-0	100E-0	9,99	9,93	0,06	100E-0	100E-0
AT2G47890	"zinc finger (B-box type) family protein"	9,99	9,91	0,08	100E-0	100E-0	9,99	9,91	0,08	100E-0	100E-0
AT3G21755	"UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein"	9,99	10,32	-0,33	100E-0	100E-0	9,99	10,42	-0,43	100E-0	100E-0
AT1G11460	"nodulin MtN21 family protein"	9,99	9,95	0,04	100E-0	100E-0	9,99	9,91	0,08	100E-0	100E-0
AT1G67340	"zinc finger (MYND type) family protein / F-box family protein"	10,02	11,13	-1,11	100E-0	100E-0	9,99	11,29	-1,30	100E-0	100E-0
AT2G47860	"phototropic-responsive NPH3 family protein"	9,99	10,81	-0,82	100E-0	100E-0	9,99	11,12	-1,13	100E-0	100E-0
AT1G76020	"unknown protein"	12,35	13,47	-1,12	100E-0	100E-0	12,30	13,39	-1,10	100E-0	100E-0
AT5G07280	"EMS1 (EXCESS MICROSPOROCTES1); kinase"	11,29	12,42	-1,13	100E-0	100E-0	11,81	12,76	-1,14	100E-0	100E-0
AT4G28270	"zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein"	12,72	13,86	-1,14	100E-0	100E-0	12,74	13,81	-1,06	100E-0	100E-0
AT1E04000	"unknown protein"	9,99	9,95	0,04	100E-0	100E-0	9,99	9,91	0,08	100E-0	100E-0
AT5G51860	"MADS-box protein (AGL72)"	9,99	9,91	0,08	100E-0	100E-0	9,99	9,91	0,08	100E-0	100E-0
AT1G32280	"protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein"	11,73	12,88	-1,15	100E-0	100E-0	11,68	13,11	-1,43	100E-0	100E-0
AT1G48480	"RKL1 (Receptor-like kinase 1); ATP binding / kinase/ protein serine/threonine kinase"	9,99	10,82	-0,83	100E-0	100E-0	9,99	10,41	-0,42	100E-0	100E-0
AT4G00540	"PC-MYB2 (PUTATIVE C-MYB-LIKE TRANSCRIPTION FACTOR)"	9,99	9,97	0,02	100E-0	100E-0	9,99	9,91	0,08	100E-0	100E-0
AT5G46871	"unknown protein"	10,80	11,89	-1,09	100E-0	100E-0	10,53	11,96	-1,43	100E-0	100E-0
AT4G37360	"CYP81D2 (cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 2); oxygen binding"	10,80	11,78	-0,98	100E-0	100E-0	10,89	12,02	-1,13	100E-0	100E-0
ATC000530	"hypothetical protein"	10,36	11,56	-1,20	100E-0	100E-0	10,36	11,08	-0,72	100E-0	100E-0
AT5G16010	"3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase family protein / steroid 5-alpha-reductase family protein"	10,17	11,37	-1,20	100E-0	100E-0	10,40	11,58	-1,18	100E-0	100E-0
AT2G32340	"TraB family protein"	10,87	12,07	-1,20	100E-0	100E-0	10,89	12,26	-1,37	100E-0	100E-0
AT5G26000	"TGG1 (THIOGLUCOSIDE GLUCOHYDROLASE 1); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds"	9,99	9,95	0,04	100E-0	100E-0	9,99	9,94	0,05	100E-0	100E-0
AT2G23250	"UGT84B2 (UDP-glucosyl transferase 84B2)"	9,99	10,09	-0,10	100E-0	100E-0	9,99	9,92	0,07	100E-0	100E-0
AT4G28400	"unknown protein"	9,99	9,97	0,02	100E-0	100E-0	9,99	9,91	0,08	100E-0	100E-0
AT4G43800	"acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase, putative / stearyl-ACP desaturase, putative"	11,88	12,91	-1,23	100E-0	100E-0	11,26	12,55	-1,29	100E-0	100E-0
AT1G05810	"ARA/ARA-1/ARABAB5/ARAB11D (Arabidopsis Rab GTPase homolog A5e); GTP binding"	9,99	9,95	0,04	100E-0	100E-0	9,99	9,91	0,08	100E-0	100E-0
AT4G02780	"GA1 (GA REQUIRING 1); ent-copalyl diphosphate synthase"	9,99	10,15	-0,16	100E-0	100E-0	9,99	10,10	-0,11	100E-0	100E-0
AT5G07030	"pepsin A"	12,17	13,42	-1,25	100E-0	100E-0	11,67	12,93	-1,26	100E-0	100E-0
AT5G15070	"acid phosphatase"	9,99	10,67	-0,68	100E-0	100E-0	9,99	10,95	-0,96	100E-0	100E-0
AT4G13990	"exostosin family protein"	9,99	10,22	-0,23	100E-0	100E-0	9,99	10,45	-0,46	100E-0	100E-0
AT2G23260	"UGT84E1 (UDP-glucosyl transferase 84E1); UDP-glucosyl transferase, glucosylating alpha-D-glucopyranosyl/putrescine 2-oxoglutarate/transferase, transferase"	11,94	13,20	-1,26	100E-0	100E-0	12,02	13,54	-1,53	100E-0	100E-0
AT1G55970	"histone acetyltransferase 4 (HAC4)"	11,23	11,13	0,10	100E-0	100E-0	10,16	11,38	-1,22	100E-0	100E-0
AT3G52540	"unknown protein"	9,99	9,97	0,02	100E-0	100E-0	9,99	9,91	0,08	100E-0	100E-0
AT1G07240	"UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein"	10,12	11,38	-1,27	100E-0	100E-0	10,22	11,69	-1,46	100E-0	100E-0
AT2G15480	"UGT73B5 (UDP-glucosyl transferase 73B5)"	9,99	9,95	0,04	100E-0	100E-0	9,99	9,91	0,08	100E-0	100E-0
AT3G11310	"unknown protein"	10,98	11,87	-0,89	100E-0	100E-0	10,55	11,89	-1,34	100E-0	100E-0
AT1G05370	"unknown protein"	9,99	9,95	0,04	100E-0	100E-0	9,99	9,91	0,08	100E-0	100E-0
AT1G52910	"unknown protein"	9,99	9,91	0,08	100E-0	100E-0	9,99	9,91	0,08	100E-0	100E-0
AT4G29400	"oxidoreductase/ transition metal ion binding"	10,03	11,33	-1,29	100E-0	100E-0	10,29	11,55	-1,26	100E-0	100E-0
AT2G47930	"AGP26/ATAGP26 (ARABINOGLACTAN PROTEINS 26)"	11,88	13,18	-1,30	100E-0	100E-0	11,49	12,93	-1,45	100E-0	100E-0
AT1G52190	"proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein"	10,89	12,21	-1,32	100E-0	100E-0	10,48	12,02	-1,54	100E-0	100E-0
AT3G54490	"eukaryotic rp55 RNA polymerase subunit family protein"										

Annexe 2

AT5G27350	"SFP1; carbohydrate transporter/ sugar porter"	5,40	10,48	-1,55	2,80E-6	1,47E-6	8,71	10,88	-1,76	1,03E-4	3,10E-7
AT1G52740	"hydrolase, alpha/beta fold family protein"	5,40	10,37	-1,56	1,96E-6	1,07E-6	8,70	10,59	-2,10	4,43E-8	4,38E-9
AT2G15440	"unknown protein"	11,86	13,57	-1,81	4,38E-7	2,30E-5	12,05	13,88	-1,83	3,13E-5	2,90E-7
AT1G75440	"UBC16 (ubiquitin-conjugating enzyme 15); ubiquitin-protein ligase"	10,73	12,35	-1,62	3,84E-7	2,28E-5	10,71	12,36	-1,65	1,02E-5	7,74E-6
AT1G80540	"unknown protein"	5,44	11,14	-1,64	1,88E-7	1,19E-5	10,13	11,40	-1,27	3,34E-1	2,94E-2
AT1G05420	"ATOPF12/OPF12 (Arabidopsis thaliana ovate family protein 12)"	5,25	10,93	-1,65	1,72E-7	1,05E-5	9,26	10,17	-1,13	1,00E-6	1,00E-2
AT3G19370	"unknown protein"	10,81	12,56	-1,65	1,48E-7	9,16E-6	11,25	13,03	-1,77	3,17E-5	6,50E-7
AT1G11450	"nodulin MN21 family protein"	4,95	11,25	-1,69	4,33E-8	2,78E-10	9,46	11,21	-1,73	3,05E-7	1,52E-6
AT5G25900	"GA3 (GA REQUIRING 3); oxygen binding"	13,33	15,02	-1,69	3,38E-8	2,59E-10	13,49	14,95	-1,46	4,17E-7	1,57E-6
AT1G15772	"unknown protein"	4,95	10,65	-1,72	1,73E-7	1,16E-5	9,26	10,52	-1,48	2,05E-2	1,60E-2
AT3G23167	"LCR39 (Low-molecular-weight cysteine-rich 39)"	10,80	12,70	-1,72	1,58E-8	1,07E-10	10,50	12,59	-2,08	1,17E-8	7,55E-10
AT2G22942	"unknown protein"	9,89	10,32	-1,73	1,44E-8	9,34E-11	9,76	10,10	-2,17	1,24E-8	3,04E-11
AT2G34780	"EDA28/MEE23 (embryo sac development arrest 28, maternal effect embryo arrest 23)"	4,75	9,43	-1,73	1,33E-8	8,43E-11	5,26	5,56	-1,66	3,43E-6	5,30E-6
AT5G64230	"unknown protein"	11,65	13,39	-1,73	1,15E-8	7,52E-11	11,89	13,65	-1,77	3,15E-7	6,24E-7
AT5G56970	"CKX3 (CYTOKININ OXIDASE 3); cytokinin dehydrogenase"	9,91	10,94	-1,75	6,50E-9	4,51E-11	10,50	11,42	-1,73	3,11E-1	1,67E-6
AT2G37025	"TRFL8 (TRF-LIKE 8); DNA binding"	11,25	13,04	-1,75	6,00E-9	4,28E-11	11,80	13,05	-1,54	3,10E-1	4,75E-5
AT5G49990	"xanthine/uracil permease family protein"	12,03	13,79	-1,76	5,54E-9	3,89E-11	12,07	13,75	-1,68	3,00E-1	4,28E-6
AT5G58050	"glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein"	9,91	10,71	-1,77	3,63E-9	2,64E-11	9,76	10,71	-1,44	1,03E-2	2,53E-6
AT5G17000	"NADP-dependent oxidoreductase, putative"	10,24	12,03	-1,80	1,48E-9	1,14E-11	10,41	12,44	-2,03	2,56E-7	2,88E-9
AT3G21790	"UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein"	9,89	10,99	-1,80	1,00E-9	6,30E-12	9,76	10,76	-2,12	3,00E-6	3,56E-9
AT3G50430	hydrolase	11,80	13,68	-1,82	7,48E-10	5,39E-12	11,84	13,84	-1,80	5,38E-6	5,03E-8
AT2G21740	"unknown protein"	9,75	9,71	-1,84	3,30E-10	3,18E-12	9,75	9,53	-1,70	4,89E-4	2,73E-4
AT2G22420	"peroxidase 17 (PER17) (P17)"	10,79	12,62	-1,84	3,30E-10	3,18E-12	10,84	12,72	-1,88	6,38E-6	1,24E-8
AT3G47190	"oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein"	11,83	13,68	-1,85	2,44E-10	2,03E-12	11,58	13,68	-2,09	5,62E-8	5,59E-10
AT3G59370	"unknown protein"	11,59	13,44	-1,86	1,95E-10	1,64E-12	11,20	13,21	-2,01	4,04E-7	3,18E-9
AT5G16235	"acyl-acyl-carrier-protein) desaturase, putative / stearyl-ACP desaturase, putative" (DES3)	10,86	12,82	-1,87	1,30E-10	1,10E-12	11,71	13,05	-1,34	3,16E-1	1,10E-2
AT1G26208	"unknown protein"	10,79	12,70	-1,91	3,25E-11	2,83E-13	11,15	13,02	-1,87	1,10E-5	8,12E-8
AT1G74890	"ARR15 (RESPONSE REGULATOR 15); transcription regulator"	9,70	10,09	-1,94	1,63E-11	1,48E-13	9,76	9,58	-2,13	2,87E-8	2,52E-10
AT1G69890	"unknown protein"	9,71	11,67	-1,94	1,63E-11	1,48E-13	9,71	12,00	-2,49	0,00E+0	0,00E+0
AT1G70800	"C2 domain-containing protein"	9,71	10,67	-1,96	0,00E+0	0,00E+0	9,50	11,26	-2,41	1,63E-11	2,76E-13
AT1G26208	"unknown protein"	10,17	12,15	-1,97	0,00E+0	0,00E+0	10,24	12,46	-2,22	2,50E-9	3,34E-11
AT4G30090	"EMB1353 (EMBRYO DEFECTIVE 1353)"	9,70	11,19	-1,99	0,00E+0	0,00E+0	9,50	10,83	-1,87	1,05E-5	8,42E-8
AT1G68220	"unknown protein"	13,67	15,75	-2,08	0,00E+0	0,00E+0	13,73	15,42	-1,69	1,10E-1	3,17E-6
AT4G39650	"gamma-glutamyltransferase/ glutathione gamma-glutamylcysteinyltransferase"	9,70	12,01	-2,08	0,00E+0	0,00E+0	9,50	12,38	-2,69	0,00E+0	0,00E+0
AT1G18090	"E12A11; phosphatidylethanolamine binding"	12,01	14,10	-2,09	0,00E+0	0,00E+0	12,23	14,19	-1,96	1,52E-6	1,33E-8
AT4G20030	"unknown protein"	9,70	10,56	-2,10	0,00E+0	0,00E+0	9,50	10,96	-2,42	1,63E-11	2,76E-13
AT4G22105	"SCRLE26 (SCR-Like 26)"	10,01	12,11	-2,10	0,00E+0	0,00E+0	9,50	12,26	-2,38	3,25E-11	5,20E-13
AT3G27785	"MYB118 (myb domain protein 118); DNA binding / transcription factor"	12,23	14,38	-2,15	0,00E+0	0,00E+0	12,84	14,51	-1,58	2,10E-1	2,83E-1
AT4G02520	"ATG5TF2 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class phi) 2); glutathione transferase"	11,14	13,33	-2,18	0,00E+0	0,00E+0	10,87	12,85	-1,98	3,27E-7	8,42E-9
AT2G25930	"ALPHA-VPE (ALPHA-VACUOLAR PROCESSING ENZYME); cysteine-type endopeptidase"	12,85	15,04	-2,19	0,00E+0	0,00E+0	13,02	15,19	-2,16	3,84E-9	1,19E-10
AT1G12080	"unknown protein"	13,36	15,58	-2,22	0,00E+0	0,00E+0	13,15	15,60	-2,45	6,30E-6	0,00E+0
AT2G21750	"unknown protein"	10,64	12,87	-2,23	0,00E+0	0,00E+0	10,14	12,49	-2,35	6,50E-11	1,06E-13
AT3G14210	"ESM1 (EPITHIOSPECIFIC MODIFIER 1); carboxylic ester hydrolase"	9,70	10,73	-2,24	0,00E+0	0,00E+0	9,50	11,10	-2,47	0,00E+0	0,00E+0
AT1G13140	"CYP86C3 (cytochrome P450, family 86, subfamily C, polypeptide 3); oxygen binding"	9,70	9,58	-2,29	0,00E+0	0,00E+0	9,50	9,57	-2,37	3,25E-11	5,20E-13
AT4G33600	"unknown protein"	11,55	13,89	-2,34	0,00E+0	0,00E+0	11,42	13,91	-2,48	0,00E+0	0,00E+0
AT3G22800	"leucine-rich repeat family protein / extensin family protein"	9,70	11,12	-2,44	0,00E+0	0,00E+0	9,50	11,54	-3,04	0,00E+0	0,00E+0
AT3G23360	"protein phosphatase 2C, putative / PP2C, putative"	9,70	11,20	-2,45	0,00E+0	0,00E+0	9,50	11,08	-2,58	0,00E+0	0,00E+0
AT1G64420	"VHA-E3 (VACUOLAR H+-ATPASE SUBUNIT E ISOFORM 3)"	12,17	14,71	-2,49	0,00E+0	0,00E+0	12,20	14,68	-2,48	0,00E+0	0,00E+0
AT4G31060	"AP2 domain-containing transcription factor, putative"	9,70	11,44	-2,49	0,00E+0	0,00E+0	9,50	11,35	-2,34	3,16E-11	1,46E-12
AT5G25310	"exostosin family protein"	9,70	12,29	-2,56	0,00E+0	0,00E+0	9,50	12,03	-2,70	0,00E+0	0,00E+0
AT1G18520	"TET11 (TETRASPANIN11)"	11,43	14,00	-2,57	0,00E+0	0,00E+0	11,37	13,57	-2,20	3,33E-8	4,28E-11
AT2G02930	"ATG5TF3 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 16); glutathione transferase"	11,14	13,73	-2,59	0,00E+0	0,00E+0	11,19	13,78	-2,59	0,00E+0	0,00E+0
AT1G07476	"unknown protein"	9,70	10,36	-2,61	0,00E+0	0,00E+0	9,50	10,21	-2,67	0,00E+0	0,00E+0
AT3G03240	"esterase/lipase/thioesterase family protein"	9,70	11,47	-2,68	0,00E+0	0,00E+0	9,71	11,65	-2,83	0,00E+0	0,00E+0
AT3G17640	"leucine-rich repeat family protein"	9,70	11,67	-2,70	0,00E+0	0,00E+0	9,50	11,81	-3,01	0,00E+0	0,00E+0
AT1G47980	"unknown protein"	9,70	10,79	-2,71	0,00E+0	0,00E+0	9,70	10,22	-2,75	0,00E+0	0,00E+0
AT5G57260	"CYP71B10 (cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 10); oxygen binding"	9,70	12,69	-2,79	0,00E+0	0,00E+0	9,50	13,10	-3,21	0,00E+0	0,00E+0
AT1G78770	"pathogenesis-related family protein"	9,70	11,07	-3,19	0,00E+0	0,00E+0	9,50	11,34	-3,74	0,00E+0	0,00E+0
AT3G62230	"F-box family protein"	9,70	12,32	-3,32	0,00E+0	0,00E+0	9,50	12,11	-3,17	0,00E+0	0,00E+0
AT3G12880	"invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein"	9,70	12,00	-3,42	0,00E+0	0,00E+0	9,50	12,18	-3,80	0,00E+0	0,00E+0
AT5G28000	"Bet v 1 allergen family protein"	9,70	13,39	-3,46	0,00E+0	0,00E+0	9,50	13,80	-3,97	0,00E+0	0,00E+0
AT2G23410	"ACPT (ARABIDOPSIS CIS-PRENYLTRANSFERASE); dehydrodolichyl diphosphate synthase"	11,25	14,73	-3,47	0,00E+0	0,00E+0	10,87	14,86	-3,99	0,00E+0	0,00E+0
AT2G34960	"CAT5 (CATIONIC AMINO ACID TRANSPORTER 5); cationic amino acid transporter"	9,50	10,74	-3,78	0,00E+0	0,00E+0	9,54	10,90	-3,96	0,00E+0	0,00E+0
AT2G23400	"dehydrodolichyl diphosphate synthase, putative / DEDOL-PP synthase, putative"	9,70	13,41	-3,80	0,00E+0	0,00E+0	9,75	13,46	-4,69	0,00E+0	0,00E+0
AT2G20562	"unknown protein"	9,70	12,32	-3,88	0,00E+0	0,00E+0	9,50	12,44	-4,55	0,00E+0	0,00E+0
AT2G36870	"xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative / xyloglucan endotransglycosylase, putative "	9,70	11,71	-3,93	0,00E+0	0,00E+0	9,50	12,01	-4,36	0,00E+0	0,00E+0

Figure A2.1. Liste des gènes différentiellement exprimés en fond mutant *myb118* (*myb118-1* et OE3) par rapport au type sauvage dans des graines âgées de 10 JAF d'après l'analyse transcriptomique réalisée sur puce à ADN CATMA.

Les moyennes des résultats des deux répétitions biologiques, des comparaisons d'expression menées entre le sauvage Col-0 et le mutant *myb118-1* d'une part et le sauvage Col-0 et le mutant OE3 sont présentées. Pour chaque comparaison, les valeurs du logarithme (\log_2) de l'intensité de fluorescence (rouge ou vert), le $\log(\text{ratio})$ (différence entre le logarithme de l'intensité de fluorescence de chaque fluorochrome) et les résultats des tests statistiques réalisés avec une correction de Bonferroni et de Benjamini&Hochberg (BH) sont présentés. Seuls les gènes dont la p -value est inférieure à 0,05 ont été considérés.

Annexe 2

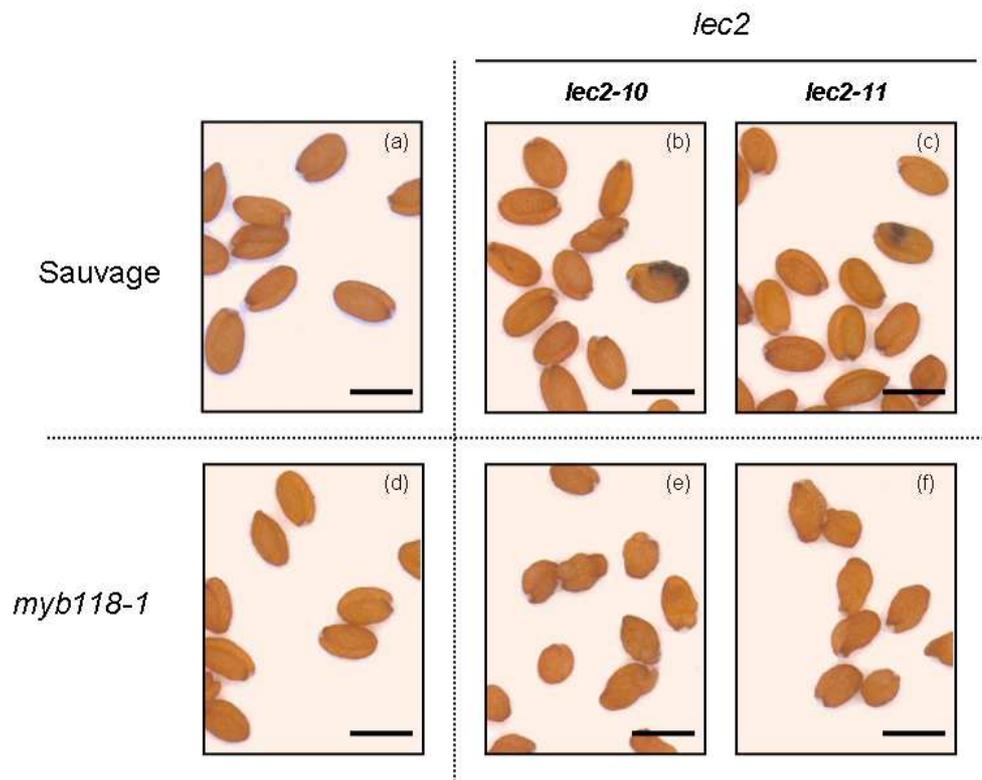


Figure A2.2. Morphologie des graines des doubles mutants *myb118 lec2*.

Observations sous loupe binoculaire des graines sèches sauvage (Col-0) (a), *lec2-10* (b), *lec2-11* (c), *myb118-1* (d), *myb118-1 lec2-10* (e) et *myb118-1 lec2-11* (f). Barre = 0,5 mm.

Annexe 2

Annexe 3. Numéros AGI des principaux gènes

Les numéros AGI des principaux gènes présentés sont répertoriés dans cette annexe.

Nom abrégé	Nom du gène	Numéro AGI
<u>Régulateurs maîtres</u>		
<i>ABI3</i>	<i>ABSCISIC ACIDE INSENSITIVE3</i>	<i>At3g24650</i>
<i>FUS3</i>	<i>FUSCA3</i>	<i>At3g26790</i>
<i>LEC1</i>	<i>LEAFY COTYLEDON1</i>	<i>At1g21970</i>
<i>L1L</i>	<i>LEAFY COTYLEDON1 LIKE</i>	<i>At5g47670</i>
<i>LEC2</i>	<i>LEAFY COTYLEDON2</i>	<i>At1g28300</i>
<u>Facteurs de transcription divers</u>		
<i>MYB22</i>	-	<i>At5g40430</i>
<i>MYB100</i>	-	<i>At2g25230</i>
<i>MYB115</i>	-	<i>At5g40360</i>
<i>MYB118</i>	-	<i>At3g27785</i>
<i>AtREM17/WB3</i>	-	<i>At1g26680</i>
<i>WRI1</i>	<i>WRINKLED1</i>	<i>At3g54320</i>
<i>ZOU/RGE1</i>	<i>ZHOUP1</i>	<i>At1g49770</i>
<u>Protéines de réserve - cruciférines</u>		
<i>CRA1</i>	-	<i>At5g44120</i>
<i>CRB/CRU2</i>	-	<i>At1g03880</i>
<i>CRC/CRU3</i>	-	<i>At4g28520</i>
-	-	<i>At1g03890</i>
<u>Protéines de réserve - napines</u>		
<i>At2S1</i>	-	<i>At4g27140</i>
<i>At2S2</i>	-	<i>At4g27150</i>
<i>At2S3</i>	-	<i>At4g27160</i>
<i>At2S4</i>	-	<i>At4g27170</i>
<i>At2S5/At2S-like</i>	-	<i>At5g54740</i>
<u>Oléosines</u>		
<i>S1/OLEO5</i>	-	<i>At3g01570</i>
<i>S2/OLEO4</i>	-	<i>At3g27660</i>
<i>S3/OLEO1</i>	-	<i>At4g25140</i>
<i>S4/OLEO2</i>	-	<i>At5g40420</i>
<i>S5/OLEO3</i>	-	<i>At5g51210</i>
<i>SM3</i>	-	<i>At2g25890</i>
<u>Gènes cibles de MYB118</u>		
<i>ACPT3</i>	<i>ARABIDOPSIS CIS-PRENYL TRANSFERASE3</i>	<i>At2g23410</i>
<i>APL4</i>	<i>AGPase LARGE SUBUNIT 4</i>	<i>At2g21590</i>
<i>ARR15</i>	<i>RESPONSE REGULATOR15</i>	<i>At1g74890</i>
<i>CKX3</i>	<i>CYTOKININE OXYDASE3</i>	<i>At5g56970</i>
<i>EMB1353</i>	<i>EMBRYO DEFECTIVE 1353</i>	<i>At4g30090</i>
<i>AtERF8</i>	<i>ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR8</i>	<i>At1g53170</i>
<i>GRP19</i>	<i>GLYCIN RICH PROTEIN19</i>	<i>At5g07550</i>
<i>ODD</i>	-	<i>At1g04380</i>
<i>PER17</i>	<i>PEROXIDASE17</i>	<i>At2g22420</i>

Annexe 3

<i>PWD</i>	<i>PHOSPHOGLUCANES WATER DIKINASE</i>	<i>At4g24450</i>
<i>RLK1</i>	<i>RECEPTOR LIKE KINASE1</i>	<i>At1g48480</i>
-	-	<i>At2g03850</i>
-	-	<i>At4g21020</i>
-	-	<i>At5g53730</i>
-	-	<i>At5g56100</i>
<u>Stéaroyl-ACP désaturases</u>		
<i>FAB2/SSI2</i>	<i>FATTY ACID BIOSYNTHESIS 2</i>	<i>At2g43710</i>
<i>SAD1</i>	<i>STEAROYL-ACP-DESATURASE1</i>	<i>At5g16240</i>
<i>SAD2</i>	<i>STEAROYL-ACP-DESATURASE2</i>	<i>At3g02610</i>
<i>SAD3</i>	<i>STEAROYL-ACP-DESATURASE3</i>	<i>At5g16230</i>
<i>SAD4</i>	<i>STEAROYL-ACP-DESATURASE4</i>	<i>At3g02620</i>
<i>SAD5</i>	<i>STEAROYL-ACP-DESATURASE5</i>	<i>At3g02630</i>
<i>SAD6</i>	<i>STEAROYL-ACP-DESATURASE6</i>	<i>At1g43800</i>
<u>Enzymes diverses</u>		
<i>BCCP2</i>	<i>BIOTIN CARBOXYL CARRIER PROTEIN2</i>	<i>At5g15530</i>
<i>EF1aA4</i>	<i>ELONGATION FACTOR 1aA4</i>	<i>At5g60390</i>
<i>KCS7</i>	<i>3-KETOACYL-CoA SYNTHASE7</i>	<i>At1g71160</i>
<i>PKp-b1</i>	<i>PYRUVATE KINASE plastidial β1 subunit</i>	<i>At5g52920</i>
-	-	<i>At2g23230</i>

Annexe 4. Figures supplémentaires du chapitre IV

```

AtSAD4      --MALLLNSTMTVAMKQNPATAVSFMQTTCLGSSFSPPRHLQVS----- 42
AtSAD2      MKMALLLNSTITVAMKQNPVAVSFPRTTCLGSSFSPPRLLRVSCVA--TNPSTKSEETD 58
AtSAD3      MSMALLLTS---PAMKQKPAVITSPRR----GS--SPSRRLRVSCVT--TNPARKKNE-T 48
AtFAB2      --MALKFNPLVASQPKYKFPSPSTRPPTPSF-----RSPKFLCLASSPALSSGPKVEESL 52
SAD.R. communis
AtSAD5      MAMAMDRI-VFSPSSVYVRP--CQARGS-----RSSRVSMASST----IRSATTEVTNG 46
AtSAD1      MVMAMDRIALFSSSSSVYHHGSSSHSGS-----KSSRV---FT----IRSDSTAV--G 44
AtSAD6      -MLAHKSLLSFTTQWATLMPSPSTFLAS-----RPRGPAKISA-----V 38
          :*

AtSAD4      -KTFRPIKEVSNQVTHITITQEKLEIFKSMENWAQENLLSYLKPVETSQWQPQDFLPET-KD 100
AtSAD2      KKKFRPIKEVNPQVTHITITQEKLEIFKSMENWAQENLLSYLKPVEASWQPQDFLPET-ND 117
AtSAD3      CNHFRPIKEVNNQLTHTITPQEKLEIFKSMENWAEQKLLPYLKPVEDSWQPQDFLPAP-EN 107
AtFAB2      KKPFTPPREVVHVQVLSMPPQKLEIFKSMENWAEENLLIHLKDVESWQPQDFLPDP-AS 111
SAD.R. communis
AtSAD5      KKPFTPPREVVHVQVTHSMPPQKLEIFKSLDNWAEENILVHLKPVKQWQPQDFLPDP-AS 106
AtSAD1      RKLYIPPREVVHVQVKSMPQKLEIFKSLEGWADETLLTYLKPVEKSWQPTDFLEP-ES 105
AtSAD6      AAPVRP-ALKHQNKIHTMPPEKMEIFKSLDQWAKDLPLLLKPVQDQWQASFLPDPALP 97
          * : : : : : * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

AtSAD4      EDRFYEQVKELRDRITKEIPDDYFVVLVGDMITTEALPTYQTMINTLDGVRDETGASPTSW 160
AtSAD2      EDRFYEQVKELRDRITKEIPDDYFVVLVGDMITTEALPTYQTMINTLDGVRDETGASPTSW 177
AtSAD3      DDEFYDRVKEIRERTKEIPDDYFVVLVGDMITTEALPTYQTMINTLDGVRDETGASPTSW 167
AtFAB2      DG-FEDQVRELRRERARELPDDYFVVLVGDMITTEALPTYQTMINTLDGVRDETGASPTSW 170
SAD.R. communis
AtSAD5      DG-FDEQVRELRRERAKEIPDDYFVVLVGDMITTEALPTYQTMINTLDGVRDETGASPTSW 165
AtSAD1      EG-FYDQVKELRERCKELPDDYFVVLVGDMITTEALPTYQTMINTLDGVRDETGASPTSW 164
AtSAD6      EG-FYDQVKELRERCKELSDDYLVIVLGDMITTEALPTYQTMINTLDGVRDETGASPTSW 162
AtSAD6      FSEFTDQVRELRERTASLPDEYFVVLVGDMITTEALPTYQTMINTLDGVRDETGASPTSW 157
          . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

AtSAD4      AVWLRAWTAENRHRGDLNKKYLYLSGRVDMRQIEKTIQYLLIGSGMDTKYENNPYNGFIYT 220
AtSAD2      AVWVRAWTAENRHRGDLNKKYLYLSGRVDMRHVEKTIQYLLIGSGMDSKFENNPYNGFIYT 237
AtSAD3      AVWIRAWTAENRHRGDLNKKYLYLGRVDMRHVEKTIQYLLIGSGMDSKFENNPYNGFIYT 227
AtFAB2      AIWTRAWTAENRHRGDLNKKYLYLSGRVDMRQIEKTIQYLLIGSGMDPTENNPYNGFIYT 230
SAD.R. communis
AtSAD5      AIWTRAWTAENRHRGDLNKKYLYLSGRVDMRQIEKTIQYLLIGSGMDPTENNPYNGFIYT 225
AtSAD1      AVWTRAWTAENRHRGDLNKKYLYLSGRVDMRQIEKTIQYLLIGSGMDPTENNPYNGFIYT 224
AtSAD6      ASWTRAWTAENRHRGDLNKKYLYLSGRVDMRQIEKTIQYLLIGSGMDPTENNPYNGFIYT 217
          * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

AtSAD4      SFQERATFISHANTAKLATTYGDITLAKICGTIAADEKRHEMAYTRIVEKLEIDPDGTV 280
AtSAD2      SFQERATFISHGNTAKLATTYGDITLAKICGTIAADEKRHETAYTRIVEKLEIDPDGTV 297
AtSAD3      SFQERATFISHGNTARLATTYGDITLAKICGTIAADEKRHETAYTRIVEKLEIDPDGTV 287
AtFAB2      SFQERATFISHGNTARQAKEHGDIKLAQICGTIAADEKRHETAYTRIVEKLEIDPDGTV 290
SAD.R. communis
AtSAD5      SFQERATFISHGNTARLAKDRGDLKLAQICGTIAADERRHETAYTRIVEKLEIDPDGTV 284
AtSAD1      SFQERATFISHGNTARLAKDLGDLTLGKICGTIAADERRHEHAYTRIVEKLEIDPDGTV 282
AtSAD6      SFQERATFISHGNTARLAKSAGDPLVLAICGTIAADEKRHENAYVRIVEKLEIDPNGAV 277
          ***** : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

AtSAD4      QALASMMRKRITMPAHLMDGRDDNLFHDHYAAVAQRIGVYATDYAGILEFLLRRWEVEK 340
AtSAD2      QALASMMRKRITMPAHLMDGRDDDLFDHYAAVAQRIGVYATDYAGILEFLLRRWEVEK 357
AtSAD3      QALASMMRKRITMPAHLMDGRDDNLFHDHYAAVAQRIGVYATDYAGILEFLLRRWEVEK 347
AtFAB2      MAFADMMRKKISMPAHLMYDGRDDNLFDFNSVAQRLGVYATDYADILEFLVGRWIKQD 350
SAD.R. communis
AtSAD5      LAFADMMRKKISMPAHLMYDGRDDNLFDFNSVAQRLGVYATDYADILEFLVGRWIKQD 345
AtSAD1      LGLADMMRKKISMPAHLMYDGRDDNLFDFNSVAQRLGVYATDYADILEFLVGRWIKQD 344
AtSAD6      VGFADMMRKKISMPAHLMYDGRDDNLFDFNSVAQRLGVYATDYADILEFLVGRWIKQD 342
          SAVADMMRKKITMPAHLMTDGRDMLFEHFSVAQRLGVYATDYADILEFLVGRWIKQD 337
          ..* : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

AtSAD4      LGMGLSGEGRAQDYLCPLPQIRIRLEERADRVKRSKSPSVSFSWIYGREVEL 396
AtSAD2      LGMGLSGEGRAQDYLCPLPQIRIRLEERANDRVKRSKSPSVSFSWIYGREVEL 413
AtSAD3      LGLGLSGEGRAQDYLCPLPQIRIRLEERANDRVKRSKSPSVSFSWIYGREVEL 401
AtFAB2      L-TGLSGEGRAQDYLCPLPQIRIRLEERANDRVKRSKSPSVSFSWIYGREVEL 401
SAD.R. communis
AtSAD5      L-TGLSAEGQKAQDYVCRLLPQIRIRLEERANDRVKRSKSPSVSFSWIYGREVEL 396
AtSAD1      L-TDLSSEGHRAQDYVCRLLPQIRIRLEERANDRVKRSKSPSVSFSWIYGREVEL 396
AtSAD6      L-EGTGLGQRAQDYVCRLLPQIRIRLEERANDRVKRSKSPSVSFSWIYGREVEL 391
          * . * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

```

Figure A4.1. Alignement des séquences protéiques des différentes SAD d'Arabidopsis avec la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de *Ricinus communis*.

L'alignement a été réalisé grâce au programme ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Annexe 4

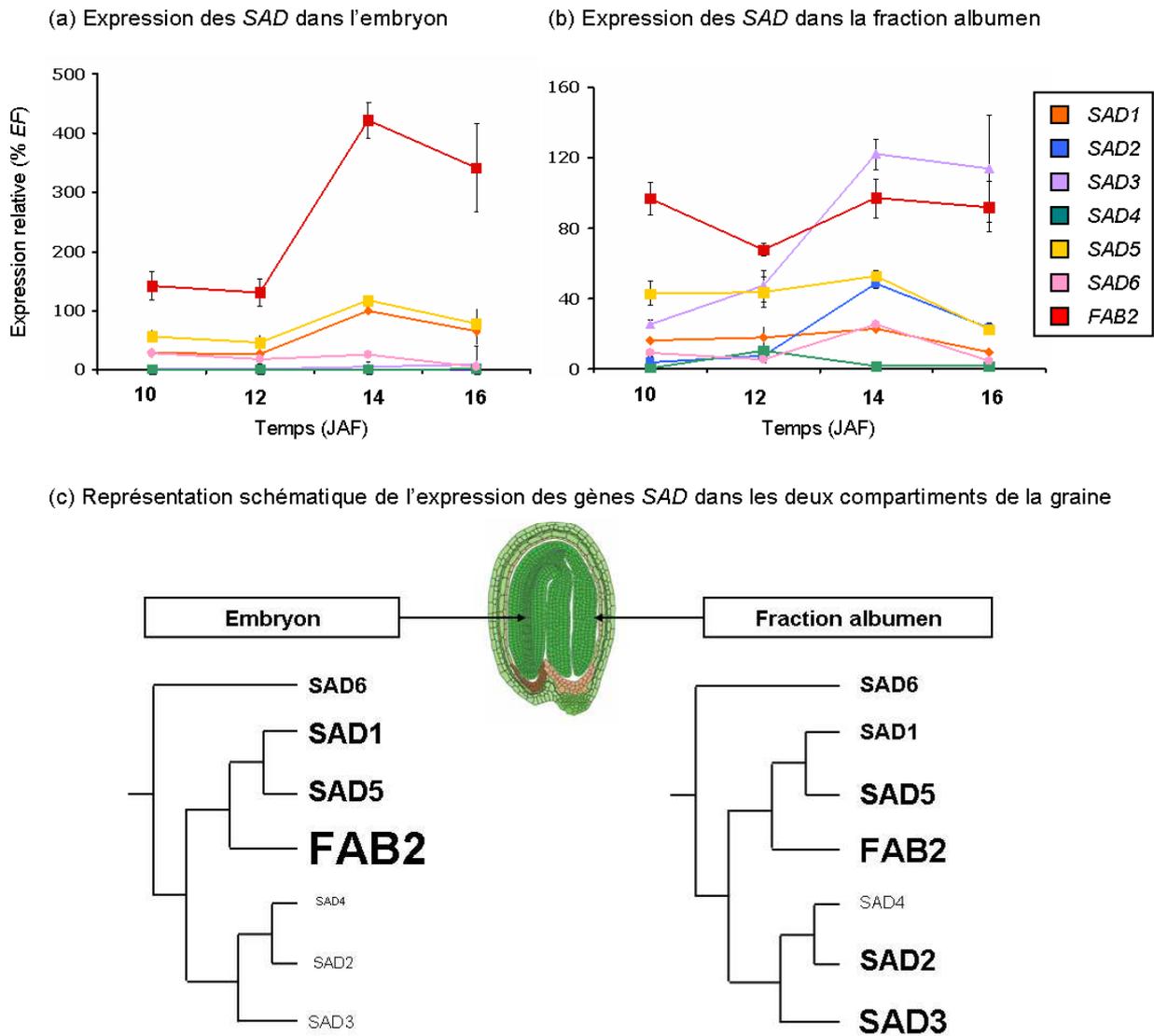
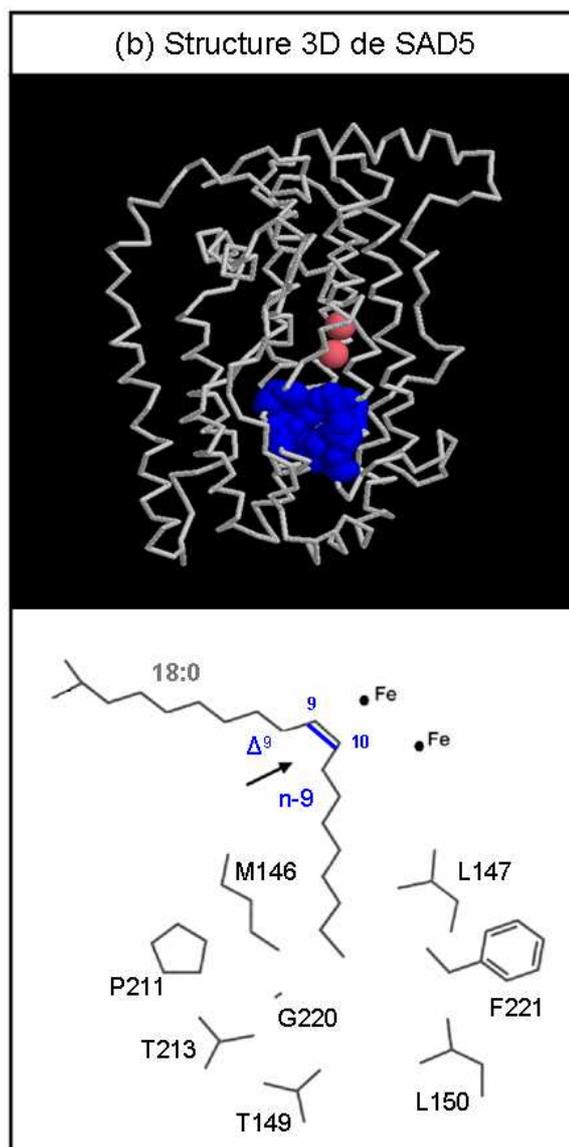
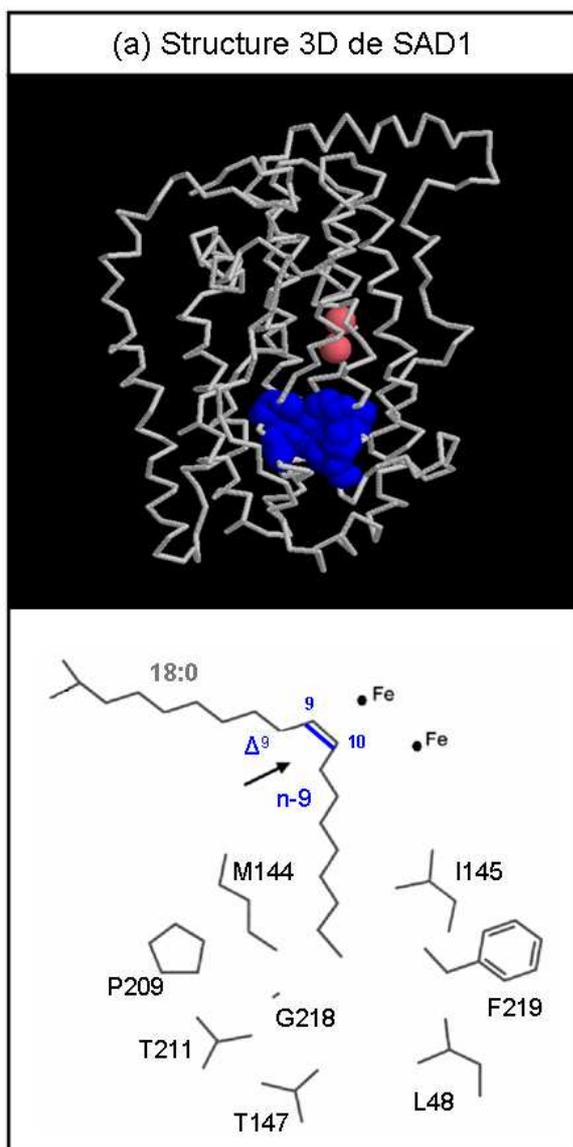


Figure A4.2. Expression des sept gènes *SAD* d'Arabidopsis dans la fraction albumen et dans l'embryon.

La cinétique d'expression de *SAD1*, *SAD2*, *SAD3*, *SAD4*, *SAD5*, *SAD6* et *FAB2* dans l'embryon (a) et la fraction albumen (b) est présentée. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *EF1aA4* (*EF*). Les oligonucléotides utilisés font référence à l'annexe 10. Chaque barre correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions biologiques. L'erreur standard associée est présentée. (c) Représentation schématique de l'expression des gènes *SAD* dans les deux compartiments de la graine. La taille des caractères est proportionnelle à l'abondance des transcrits. JAF, Jours après floraison.

Annexe 4



Annexe 4

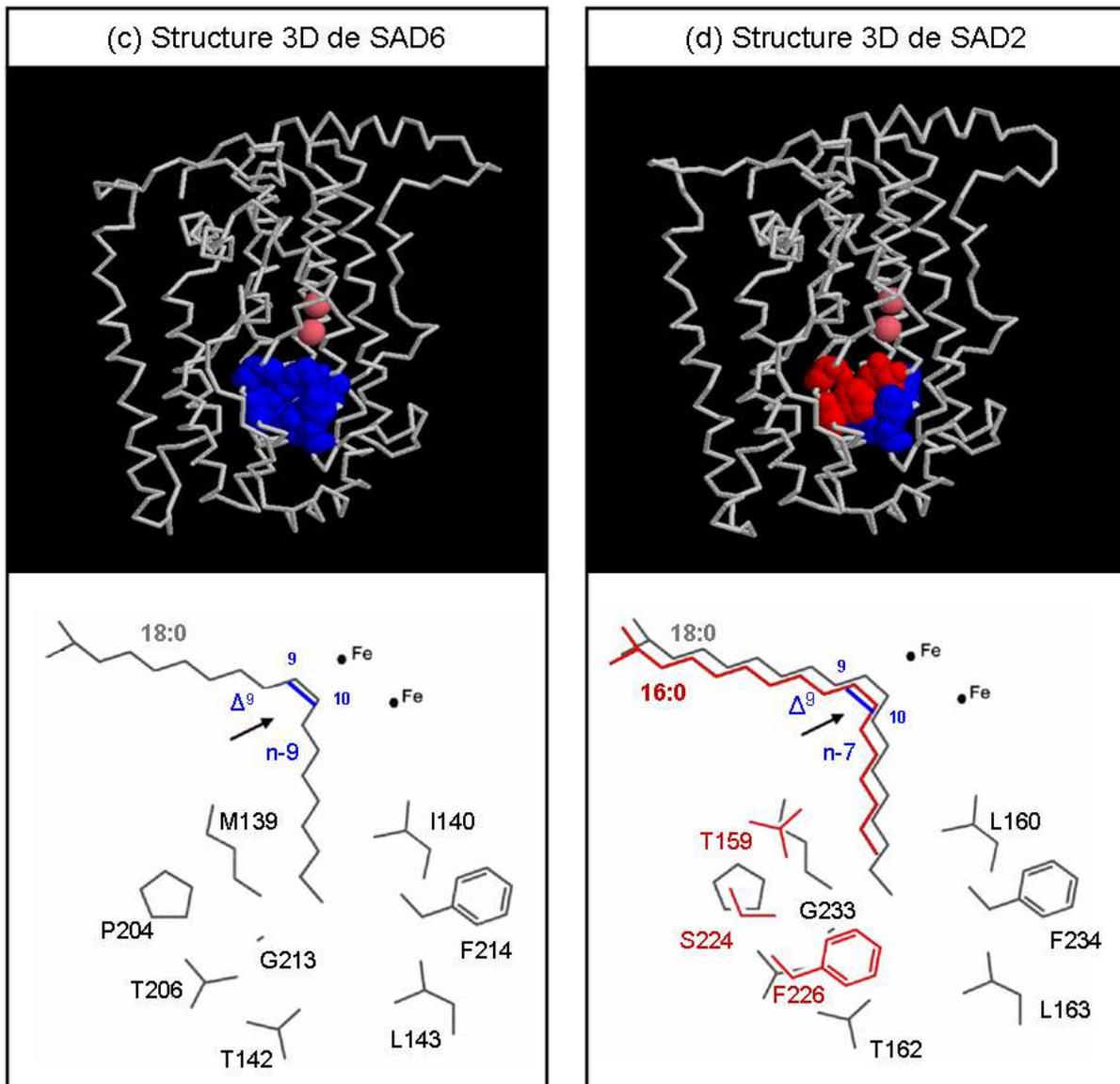


Figure A4.3. Modélisation de la structure tridimensionnelle d'un monomère de SAD1, SAD2, SAD5 et SAD6 d'Arabidopsis.

Les structures tridimensionnelles de SAD1 (a), de SAD5 (b), de SAD6 (c) et de SAD2 (d) sont présentées. La structure des SAD d'Arabidopsis a été modélisée grâce à l'application SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) en utilisant la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin (*Ricinus communis*) comme référence. Le squelette carboné de la chaîne polypeptidique est représenté sous forme de bâtonnets. Les deux atomes de fer sont figurés en rose. Les résidus formant l'extrémité de la poche hydrophobe sont représentés sous forme de sphères colorées. Les diagrammes associés présentent uniquement les résidus formant l'extrémité de la poche du substrat et les deux atomes de fer du site catalytique. Les résidus présentés en gris sont identiques à ceux de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin utilisée comme référence. Les résidus représentés en rouge sont ceux qui diffèrent. Le positionnement du substrat 16:0 et 18:0 au sein de la poche est matérialisé (Diagramme modifié d'après Cahoon et al., 2000).

Annexe 4

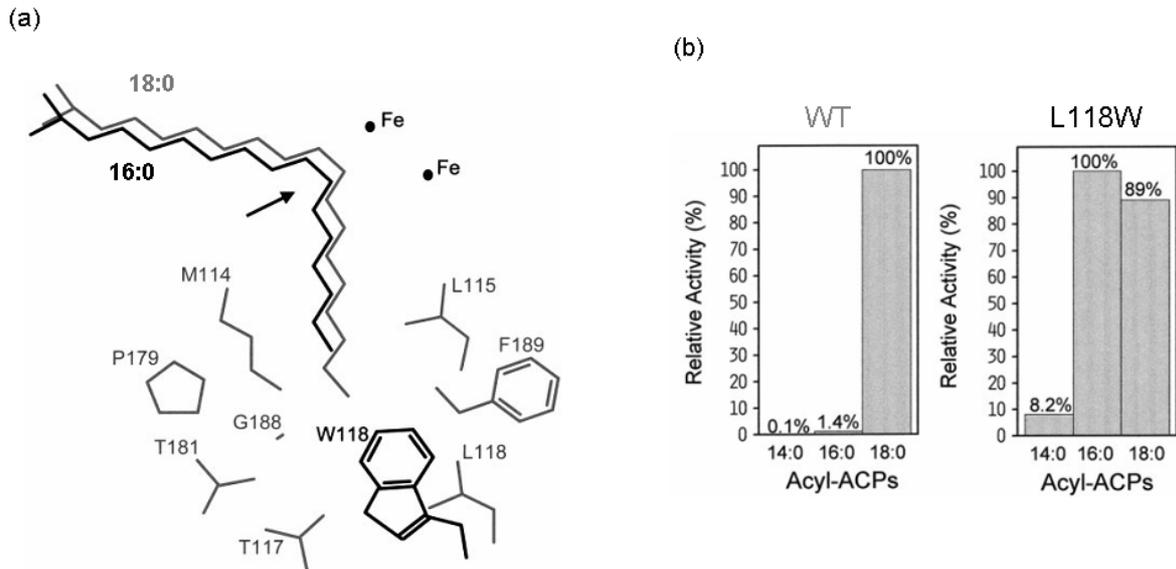


Figure A4.4. Activité catalytique de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin (*Ricinus communis*), de la désaturase de *Doxantha unguis-cati* et de la forme mutée L118W de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin.

(a) Représentation schématique du 18:0 (gris) et 16:0 (noir) dans le site actif de l'acyl-ACP désaturase. La structure de sept résidus communs à *Ricinus communis* et *Doxantha unguis-cati* bordant la poche hydrophobe de l'enzyme sont représentés en gris. Le résidu L118 propre à l'enzyme de *Ricinus communis* est représenté en gris. Le résidu W118 de l'enzyme de *Doxantha unguis-cati* et du mutant L118W de l'enzyme de ricin sont représentés en noir. La position des deux atomes de fer est indiquée et la flèche présente la position de la double liaison. Les numéros des acides aminés correspondent à la séquence de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin.

(b) Spécificité de substrat de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin recombinante et du mutant L118W vis-à-vis du 14:0-, 16:0- et 18:0-ACP. Le taux de réaction maximal est de 823 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines pour le sauvage et 28,8 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines pour le mutant L118W (Cahoon et al., 1998).

Annexe 4

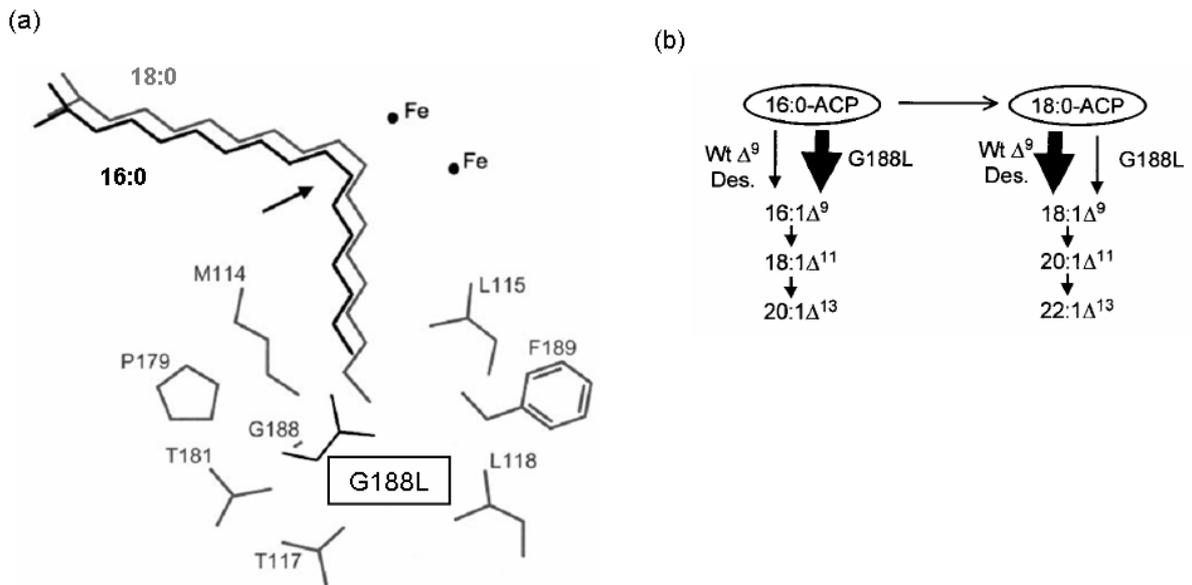


Figure A4.5. Activité catalytique de la forme mutée G188L de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin (*Ricinus communis*).

(a) Représentation schématique des résidus formant l'extrémité de la poche du substrat et des deux atomes de fer du site catalytique de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin. La mutation G188L est représentée. Le positionnement du substrat 16:0 et 18:0 au sein de la poche est matérialisé.

(b) Expression du mutant G188L de la Δ^9 -18:0-ACP désaturase de ricin dans des graines d'Arabidopsis. Le mutant utilise préférentiellement le pool de 16:0-ACP pour produire du 16:1 Δ^9 , 18:1 Δ^{11} et 20:1 Δ^{13} . La forme sauvage de l'enzyme utilise préférentiellement le pool de 18:0-ACP pour produire du 18:1 Δ^9 , 20:1 Δ^{11} et 22:1 Δ^{13} (Cahoon et al., 2000).

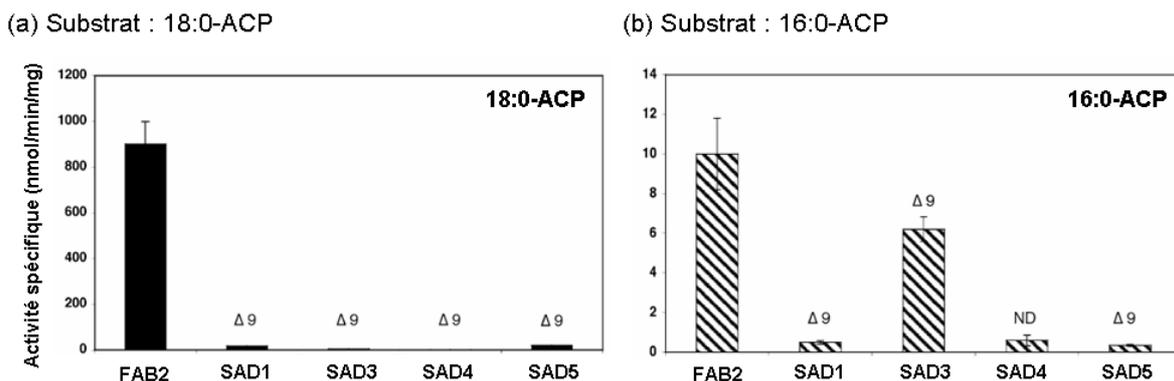
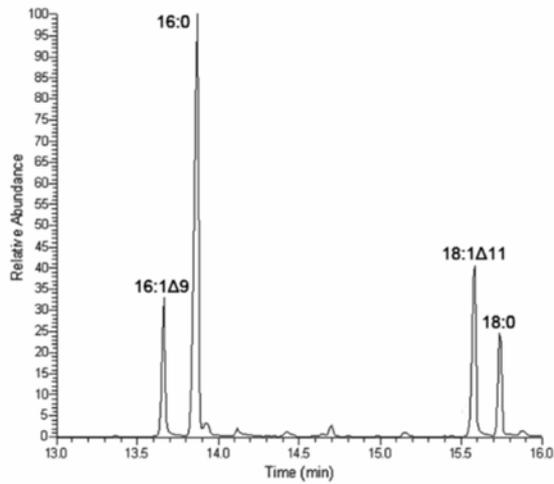


Figure A4.6. Activité enzymatique, spécificité de substrat et régiospécificité de cinq des SAD d'Arabidopsis.

Les études ont été menées en utilisant des SAD recombinantes et du 18:0-ACP (a) ou du 16:0-ACP (b) comme substrat. La régiospécificité de SAD1, SAD3, SAD4, SAD5 et FAB2 a été déterminée par spectrométrie de masse et est indiquée au dessus de chaque barre sauf pour SAD4 en présence de 16:0-ACP, la quantité de produit synthétisé ayant été insuffisante (Kachroo et al., 2007).

Annexe 4

(a) Vecteur *pET30a* vide et 18:0 dans le milieu de culture



(b) *FAB2* dans le vecteur *pET30a* et 18:0 dans le milieu de culture

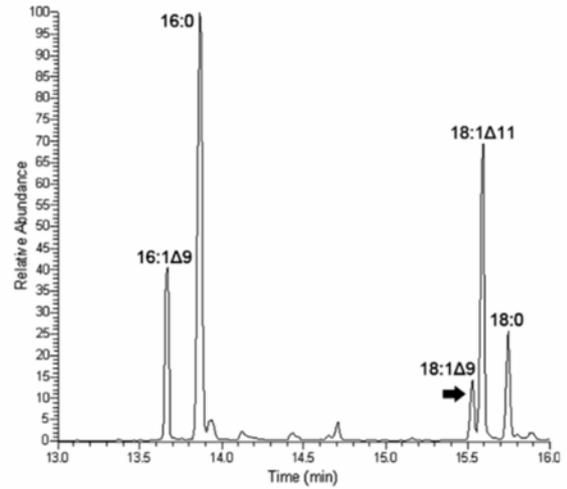


Figure A4.7. Expression hétérologue de *FAB2* dans *E. coli* et modification de son profil en acides gras.

Chromatogrammes présentant le contenu en acides gras de la souche BL21 d'*E. coli* transformée avec le vecteur *pET30a* vide (a) ou exprimant *FAB2* (b) lorsque du 18:0 est ajouté au milieu de culture. La flèche indique l'apparition d'un nouvel acide gras (Ciao et *al.*, 2010).

Annexe 4

Annexe 5. Séquence de *WB3* en fond *Ws*

Cette annexe présente la séquence nucléotidique du gène *WB3* en fond *Ws*

Promoteur de *WB3* (1 kb)

AAATAATCTTTAATGATCAAGAATTCCTCCCATTTCGCCGAAATAATTCACTTAACCACC
AAATGAAAGAGTTTTGAGATTAATTAATCTACTCTTTAAAATTTTAGGCATATACACTTGA
TTGATGTGATGACAAAATGATTTGAGTACTAATCAAGTACAATACTACTACAAAAAAAT
GTGTGTTTTTACATCATTTATTTTATATATTTTTATTAGTTATAAACTTATAATTGATGGA
AGAAAAACATTTACATCACTAAAAAGTGACTTTTGAAAGTAGTGATGCAAATATTTTGT
ATCGATTCTTGTAATCGATCTTAACATATATCAATTACAAAAATAATGTTAAAATTCGC
ATCATTTAATTTAAATGATGTTAATATTTGTAACATATATAATAATTTATGCATGCCAATA
TTTCTATTACTTGTAACAATTGATGTTAAATTAGTTATCAGTTTTTCATAATTGATTCAAAT
AATTGTGTGATTTGAAATAATTAATTTCTACATTAATTTAAAACATTGTAATTTCATAATT
AATTTGTAGATACTAGTGCATTGAAAAGAAGCGAAAAAAGACGTCAGCAGTCTATAAGA
TGGATTAGCTTCATCTCCAAGGCATATAAACCCATTCGTGTCAATCACAAGTCACACCTTA
CAATTTCAAAAAAAGTTTCTGAAACTTGGTCTTTCTTGTGCTATCATTTTGATTCTTGTGCTA
AGATTCTTCACGAAGATCAACAACCTCTAAAAAGAAGAGGAAAGATAACTTTAATGGATA
GAAATGGTGAAGGAGAGGTTCGAAAATCTGGCTTTAGATAAAGTTTCTGTA AAAAGGTGTT
AAAGAAAAAAAACACTAGTCAGAAACATTAATCAAACTATTCAACCATCAATGTCTA
CCTCGAGAGATTCAAGACGTAGAAGAAGAAGACAAACGTGAACGTCTTTAAATTATGAA
ACCTCTTTCTTAAAGTTCTCAAGAGGTGCTCAACAATG

ADN génomique de *WB3*

ATGGCGGATCAATCTCTTCTACACTCTCCGATCAACCCACATTTCTTTCAGCCTATTCTTA
CAGAATCTCGCACTCACCTCgtactctgttctgtctgttttcttatatcttaccaaaatgattcgtttggttagtttttgttgcattgtt
gcagAACATTCCCTGTAGCTTTCTTCTCGAAGCATGTTGAAGGAAGAAACAACCAAAAACAAG
ACTGTGACGCTAAGATCAGACGCGCGGATAAACTTGGTTAGTGAAGATGGACGGTCT
AAAATAACCGACGGATGGGAAGATTTTGCCTTTGCACATGATCTCCGAAGTGGTACAT
CGTCGTTTTTACACTTGAAGGAGAAATGGTGTTCATGTACAGCTTTAGGACCAAGCTG
TTGTGAGATTCACTATATACATCATCTCACAATATCAATGATGATGATCGTAATGATCAG
ATCAACATTGgtaagcttttgccttatataactctgtagaaaaagcaaaactgagattctgttttttagcttagCTTCAAGAA

Annexe 5

ACAATTCAAGAGTAAGAAGAATCCACGAAAGAAAGTAGAGTCTTCTTTAGACCATTCTC
GTTTTGTGGCAAAAGTCTCAGCTTGGTGCCTAAGAATGATAGACTGgtagattagatttctacaattta
agcaaaaatctcttttagcttcgagacattaacctaactttgatgggattttgcagTATATACTACTAAGTTTCGCCAGGT
TAAACGGTCTGAACAAAATCAACAGTAAGAAAATCTATCTTCAGAACGAA AAGGAAGA
TCATGGAAGTTAGCTTTGAAACACCAATTTCTCCTTCAAATCAGGCATGCAAACCTTTTGTC
AATCCGGTTGGAGAAGATTCTGCTCTGAAAATGGGATTAGCCGAGGTCAATATACATTAA
AACTTGTCCGAAAATCCGCACCACCTGTCATCCGTTTGTGCCGCGCGAAA ACTAGACAAA
AACAAAGATCAGTTGCAGAATCTTCATCAGACCATTCTTGTTTTGAATGGATCTGTCACTCC
TTCAAGCCTAAGAAATGATCAACTGgtagtacaaactttgttttatgccactaagtgtttttcttgattgtttatgatgcaa
agtgtgtcttgaatgtgttaatgtggcgttttgcagTATCTTCCAAGGAGCTTTTGAACTCAAATGTCTGGA
CAAAGATGCAGTGAGATAGTTCTAAAGAATGAACAGGGAGTCAAATGGCCTTTAGTTT
TGAAACGTTTCAAATCAGTCACTTATCTCAAAAAGGCTGGACTAGTTTCTGTCAAGTAC
ACAGGATCAAAGCAGGAGATTCTTCAAGTTTAACTGGTTGGAACCTGGAAAAAACCT
GTTCTTTCTTTGTGTCTTACACAATCCAACAATCACAAAACCTCATTAGAAATGTTTCAAGAG
GTAACAAATCCGAAGAAAGTGAAGAGGATTGCTTGGAGGTAAAGAAAAGGAAGTATCGG
TCGAGATGCAGAGCTTCTGTAGAAAACATGGATGATGATCAGACCAACATTGgtaagcttttgc
tatgaatgtactcaaattctgtagaaaagatgcaaaactgagaattttgattgtttctattcacagGAAACAGTTCAAGAAAGAAG
AGAGTGAGTAAGAATCCAAGAGAGAAAGTAGAGTCTTCATCAGACCATTCTAGTTTTGTG
GGATCTGTCAATCCTTCAAGCCTATCAAAGATCAACTGgtgagtacaaactttgtttttgagccattatcttaa
ataaaactgacactatagttcactacactcattgctaagaaaggatcattggaacttagaagattttttctgatgtgttaatgacatgcaaaactgtg
tcttcttgatgtgtcataatctggcggttctgcagTATCTTCAAGGAATTTTGTGAGCTCAAATTTTCTGGAC
AAAAGATGCAGTGAGATAGTTTTAAAGAATGAACGGGGAGAAAAAAGGACTTTAGTTTT
GAAACACTTCAAAAAGACCTTACTTTTCTCAAAAAGGCTGGACTAGTTTCTGTCAAGT
AAATAGGATCAAAGCTGGAGATTCCTTCAAGTTTAACTGGTTGGAACATGGAACAAACC
TGTTCTTTCTTTGTGCCCTACAGAAACCAACTATCACAAAACCTCATTAGCGTGTTTCAAG
GGTAACAAATCCGAAGAAAGTGAAGAGGAGGGTACTGAAGACAAGAATACCTCACAAG
ATTGCTTGGAGGTGAAGAAAAGGAAGTATTGGTCAACATGCAGAGCTTCTGCAAGAAC
ATAGATGATGATCAGACCAATATTGgtaaacctttaatctatgaatgtactcaaactgtagaaaattgcaaaactgagat
ataaattgttcttattgacagGAAACAGTTCAAAAAGAAGAGAGTGAAGAAAAATCCAGTAAAGAAA
GCAGAGTCTTCATCAGACCATTCTAGTTTTGTGGCTAATGTCACAGCTTCAAGCCTAAACT
ATGATCGACTGgtaagattagattccacatttaagcaaalattctcttagattggtttaaattgttagtctgtgatggtattttgcagTATTT
ACCTAAGTTTTCGCGAGTTCAAACGGTCTAGACAAAATGAGCGGTAAGACGATTGTTCT
TCTTAAAGAAGAGACGATCATGGAAGTTACATTTGAAGTACAACCAAGCTTGAAGC
ATACTTATGTCAGATCTGGTTGGAACAATATTCTGTGCTGAAAATGGAATGAGCCAGGGTC
AACAAATTAATTCAAACCTGGTCCAAAAAATGGACAACTGTGATGATTTGAGCCTCA
GTGAACATAGACCAAAGTCAGAATCTTCATCGCAACGTTTCTATTGTGTGGATCTGTCA
CTGCTTCAAGCATAAAGAAAGATAAACTGgtaaatcaaaactttggtttattccactatcttaactaacactcctttcttac

Annexe 5

agaagatcatatagtggtcttcttgattggtgattgatatgcaatgtttgcagTATTTATGGAAGAGTTTTGTGAGCTCTA
ATGGTCTGGACAAAGGATGCAAGAAGATAATTTTAAAGAATGAATGGGGAAGAGAATGG
AAATTTGGTCTTGAAACACTACAAATCAACTGCTTTACTATTATCAAACGAGGCTGGGCC
AGTTTCTGCCAAGCAACGGATTAAAGCTGGAGAATCCTTCAAGTTCAAACCTGGTTGGA
ACCAGGGAAAAGCCTGTTCTTTCTTTGTGCCCTGCAGAATCCAGCCATGACAAAACCTCCA
TTAGAGTGTCCAGAAGGTAGTGATGATGTAAATCACTCTCCTCAAATCCTAGCAGCGGGA
GATGACAGTAGAGATCCGAAGCAAGCGAAGAGGAGAATATGGAAGACAAGAACATCT
CACAGGATTGCTTGAAACCAAGAAAAGGAAGTATTGCTCTTCATCGTCATATAGTCAAA
ACCGATTTGTGACATTAACCTTACACGGTCCGCTTTTCAAACCTATAAACTGgtaagcttctca
catatgcctcaaggtgcttagtatattttgcccaaaatcaatttttcgcagTTTCTTCCGAGCGGTTTCACGCAGGTGA
ATGGCATCAACAAGCCAAGGAAGATAACTCTACTGGGTCAAGATGGAGTAAAAACGGTG
GTGGATCTCTATAAGGAAAGTAGTAGAGAAATGAGATTTGGAAAAGGCTGGAGAGA
GTTCTTTGAGCTCAAGGCATGAAGATAGACGACTCCTTTGTGTTGGAACCTCATTGGGA
GAAAGAAGCAAGTCCGGTGCTTAAGTTCTGCACCAAAGTACCAAAGTAAACTCTGCTTGA
AACTGTTCCAGAGAAGTAGCTTGTGGTGGTCTCAACACATTCTCTCATTCCCTCGATTT
CTTTAGCTTTGCAACTCTTGACTAGATGTCTACATATCTGAGTCTTGTTTAAGAGTTGAA
GAAAATGTTACGACTTAACTACTTGTGTGTTGTG

Légende :

ATG : codon d'initiation

Stop : codon stop

TC : position de l'insertion du mutant *wb3-3* (d'après T-DNA express)

Substitution

Délétion (Les deux nucléotides surlignés encadrent la portion d'ADN délétée)

Insertion

Annexe 6

Annexe 6. Nomenclature des acides gras

Un acide gras est un acide carboxylique à chaîne aliphatique.

Il peut présenter des structures diverses :

- La longueur de sa chaîne aliphatique, représentée par le nombre d'atomes de carbone (C), est variable (généralement entre 8 et 24 atomes de C). Les acides gras à plus de 18 atomes de C sont dits à très longue chaîne (VLCFA).

- La présence ou non d'une ou plusieurs double(s) liaison(s) encore nommées insaturation(s) dans la chaîne aliphatique.

Les acides gras sans double liaison sont dits saturés.

Les acides gras avec une double liaison sont dits monoinsaturés.

Les acides gras à plus d'une double liaison sont dits polyinsaturés.

- Pour les acides gras insaturés, la/les double(s) liaison(s) peu(ven)t être insérée(s) à différentes positions dans la chaîne aliphatique et peu(ven)t prendre deux configurations différentes : *cis*, encore appelée (*Z*), ou *trans*, (*E*). La configuration *cis* est la plus commune dans les structures biologiques.

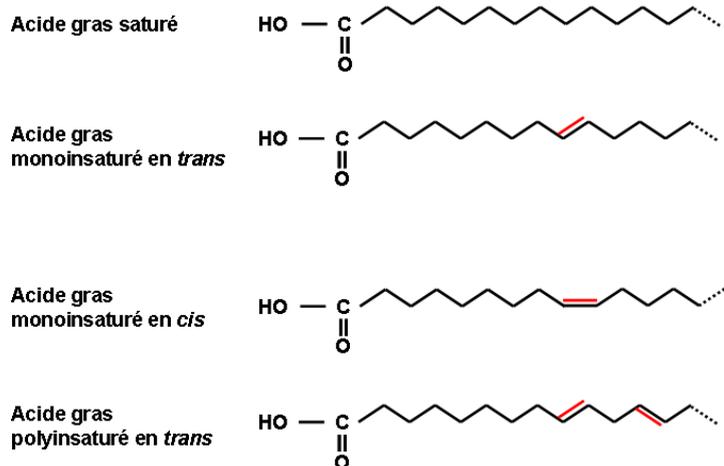


Figure A6.1 : Les différentes catégories d'acides gras

Il existe plusieurs manières de les nommer :

- Nomenclature conventionnelle : les atomes de carbone sont comptés à partir de l'extrémité carboxylique (-COOH), la diastéréoisomérisation des doubles liaisons est indiquée par la notation *cis/trans* ou (*Z*)/(*E*). (Ex : acide *cis*-9-hexadécénoïque ou acide (*Z*)-hexadéc-9-énoïque ou acide palmitoléique)

- Nomenclature Δ^x pour les acides gras insaturés : chaque double liaison est indiquée par un Δ précédé de la configuration *cis* ou *trans* et suivi en exposant de la position de la double liaison au sein de la chaîne aliphatique depuis l'extrémité carboxylique. (Ex : acide *cis*- Δ^9 -hexadécénoïque)

- Nomenclature biochimique : les acides gras sont notés de la forme A:B où A représente le nombre d'atomes de carbone de la chaîne aliphatique et B le nombre de doubles liaisons. De plus, une mention de la forme n-x ou ω -x indique la position de la première double liaison comptée à partir de l'extrémité -CH₃. (Ex : 16:1 n-7 ou 16:1 ω -7)

Annexe 6

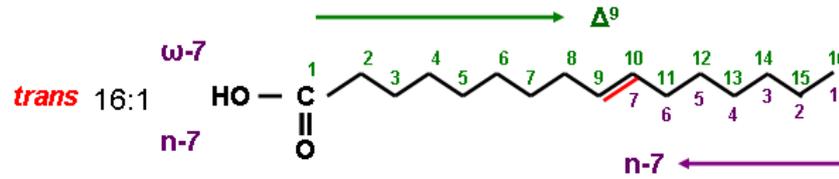


Figure A6.2 : Nomenclature des acides gras insaturés

	18:1	20:1
n-9		
n-7		

Figure A6.3 : Nomenclature des acides gras monoinsaturés

Nomenclature de quelques acides gras courants :

Nom	Structure	Δ^x	n-x	Nomenclature biochimique
Acides gras saturés				
Acide myristique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$			14:0
Acide palmitique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$			16:0
Acide stéarique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$			18:0
Acide arachidique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$			20:0
Acide béhénique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$			22:0
Acide lignocérique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$			24:0
Acides gras insaturés				
Acide myristoléique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis</i> - Δ^9	n-5	14:1
Acide palmitoléique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis</i> - Δ^9	n-7	16:1
Acide sapiénique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	<i>cis</i> - Δ^6	n-10	16:1
Acide oléique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis</i> - Δ^9	n-9	18:1
Acide cis-vaccénique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	<i>cis</i> - Δ^{11}	n-7	18:1
Acide pétrosélinique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	<i>cis</i> - Δ^6	n-12	18:1
Acide linoléique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	tout- <i>cis</i> - $\Delta^{9,12}$	n-6	18:2
Acide α -linoléique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	tout- <i>cis</i> - $\Delta^{9,12,15}$	n-3	18:3
Acide gadoléique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	<i>cis</i> - Δ^{11}	n-9	20:1
Acide paullinique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	<i>cis</i> - Δ^{13}	n-7	20:1
Acide érucique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	<i>cis</i> - Δ^{13}	n-9	22:1

Annexe 7

Annexe 7. Matériel végétal

Nom de la lignée	Ecotype de référence	Origine
Sauvage	Columbia 0 (Col-0)	Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA Versailles
<i>lec1</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N676279)
<i>lec1</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N500450)
<i>lec1</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N870475)
<i>lec1</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N631219)
<i>lec2-10</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N515228)
<i>lec2-11</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N873714)
<i>fus3</i>	Columbia 0 (Col-0)	Genomanalyse im biologischensystem Pflanze (GABI_612E06)
<i>fus3-3</i>	Columbia 0 (Col-0)	Bäumlein et <i>al.</i> , 1994
<i>abi3</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N523411)
<i>abi3</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N677134)
<i>lec1l</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N667131)
<i>myb118-1</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N660108)
<i>myb115-1</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N544168)
<i>wri1-3</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N585693)
<i>wri1-4</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N508559)
<i>sad1-1</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N666506)
<i>sad1-2</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N858166)
<i>sad2-1</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N670942)
<i>sad2-2</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N584160)
<i>sad3-1</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N567280)
<i>sad3-2</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N825777)
<i>sad4-1</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N658009)
<i>sad4-2</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N827489)
<i>sad5-1</i>	Columbia 0 (Col-0)	Genomanalyse im biologischensystem Pflanze (GABI_537F01)
<i>sad5-2</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N535968)
<i>sad6-1</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N570018)
<i>fab2-1</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N872133)
<i>fab2-2</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N536854)
<i>wb3-1</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N538469)
<i>wb3-2</i>	Columbia 0 (Col-0)	European Arabidopsis Stock Centre (NASC ; N877134)
Sauvage	Wassilewskija (Ws)	Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA Versailles
<i>wb3-3</i>	Wassilewskija (Ws)	Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA Versailles ; FLAG_494E02

Annexe 7

Annexe 8. Milieux et solutions

Annexe 8.1 Culture des plantes

Milieu de culture *in vitro* d'*Arabidopsis thaliana* d'après Murashige et Skoog, 1962

(MS avec vitamines et tampon MES, Duchefa n°M0255)

4,9 g.L⁻¹ de poudre, 10 g.L⁻¹ de saccharose et 7 g.L⁻¹ d'agar sont dissous dans de l'eau distillée. 5 mL d'une solution stock de BCP à 0,16% sont ajoutés puis le milieu est autoclavé 20 min à 120°C.

Solution stock de Pourpre de bromocrésol (BCP) à 0,16% (p/v)

1,8 g de poudre de BCP (Merck) sont dissous dans 15 mL d'éthanol à 96% puis 985 mL d'eau distillée sont ajoutés. Le milieu est autoclavé 20 min à 120°C.

Agents de sélection

Kanamycine	(Duchefa)	100 mg.mL ⁻¹ dans H ₂ O (stock)	0,1 mg.mL ⁻¹ final
Hygromycine	(Duchefa)	100 mg.mL ⁻¹ dans H ₂ O (stock)	0,1 mg.mL ⁻¹ final

Milieu d'infiltration pour tabac

13 g.L⁻¹ de milieu de bouturage de tabac (Duchefa) et 40 g.L⁻¹ de saccharose sont dissous dans de l'eau distillée. Le pH de la solution est alors ajusté à 5,7.

Annexe 8

Annexe 8.2 Biologie moléculaire

Gel d'électrophorèse

Agarose (Sigma) 1% (p/v)

TAE (Invitrogen) 0,5X

BET (bromure d'éthydiu) 0,5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$

Tampon de charge 10X

Bleu de bromophéno (Sigma) 0,25% (p/v)

EDTA 100 mM

Glycérol 40% (v/v)

Annexe 8

Annexe 8.3 Microbiologie

8.3.1 Milieux pour bactéries

Milieu LB (Luria Bertani) solide

35 g de LB Agar Low salt (Duchefa) dissous dans 1 L d'eau distillée. Le milieu est autoclavé 20 min à 120°C.

Milieu LB liquide

25 g de LB Broth Low salt (Duchefa) dissous dans 1 L d'eau distillée. Le milieu est autoclavé 20 min à 120°C.

Agents de sélection des bactéries

Ampicilline	(Duchefa)	50 mg.mL ⁻¹ dans H ₂ O (stock)	50 mg.L ⁻¹ final
Kanamycine	(Duchefa)	100 mg.mL ⁻¹ dans H ₂ O (stock)	100 mg.L ⁻¹ final
Rifampicine	(Duchefa)	50mg.mL ⁻¹ dans DMSO (stock)	50 mg.L ⁻¹ final
Gentamycine (Duchefa)		50 mg.mL ⁻¹ dans H ₂ O (stock)	50 mg.L ⁻¹ final

8.3.2 Milieux pour levure

(H, histidine ; L, Leucine ; U, uracile ; W, tryptophane)

Milieu YPDA

YPD 12,5 g (Clontech), adénine hémisulfate 30 mg (Clontech), eau 250 mL. Le milieu est autoclavé 20 min à 120°C.

SD-U

Minimal SD base 8,01 g (Clontech), aa-H-U 225 mg (Clontech), histidine 30 mg (Duchefa), adénine hémisulfate 30 mg (Clontech), agar 6 g (Biomar), eau distillée 300 mL pH 5,8. Le milieu est autoclavé 20 min à 120°C.

SD-U-W

Minimal SD base 8,01g (Clontech), aa-H-L-W-U 225 mg (Clontech), histidine 30 mg (Duchefa), leucine 30 mg (Sigma), adénine hémisulfate 30 mg (Clontech), agar 6 g (Biomar), eau distillée 300 mL pH 5,8. Le milieu est autoclavé 20 min à 120°C.

SD-U-H

Minimal SD base 8,01g (Clontech), aa-H-U 225 mg (Clontech), adénine hémisulfate 30 mg (Clontech), agar 6 g (Biomar), eau distillée 300 mL pH 5,8. Le milieu est autoclavé 20 min à 120°C

SD-U-W-H

Minimal SD base 8,01g (Clontech), aa-H-W-U 225 mg (Clontech), adénine hémisulfate 30 mg (Clontech), agar 6 g (Biomar), eau distillée 300 mL pH 5,8. Le milieu est autoclavé 20 min à 120°C

Annexe 8

Annexe 8.4 Biochimie

Tampon Laemmli 2X

Tris HCl pH 6,8 125 mM
SDS (Sodium Dodécyl-Sulfate) 4% (v/v)
Glycérol 20% (v/v)
Bleu de bromophénol (Sigma) 0,01%
DDT (dithiothréitol) 100 mM

TBS 1X pH 7,6

Tris 24.2 g.L⁻¹
NaCl 84 g.L⁻¹

TBS-Tween

TBS 1X 1 L
Tween 20 1 mL

Tampon de transfert

Tris HCl 3,03 g.L⁻¹
Glycine 14,4 g.L⁻¹
Ethanol 20% (v/v)

Bleu de Coomassie R-250

Bleu de Coomassie R-250 (Biorad, 161-0400) 5 g.L⁻¹
Ethanol 40% (v/v)
Acide acétique 10% (v/v)

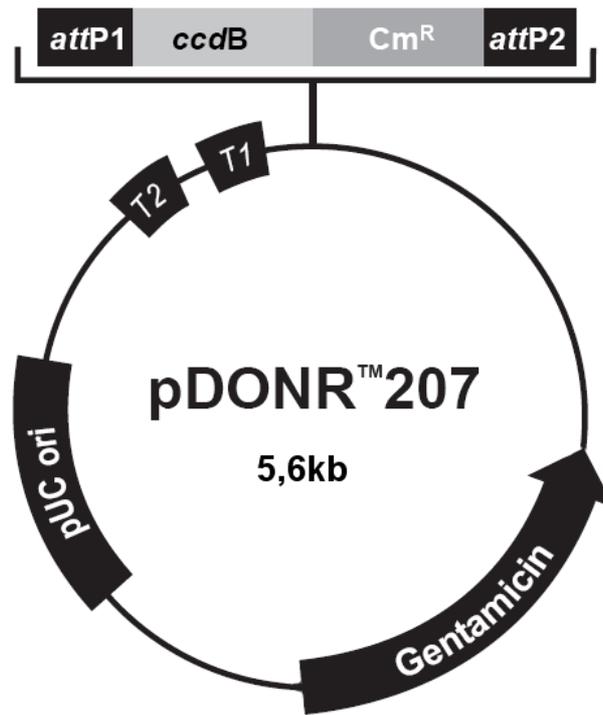
Solution de décoloration

Ethanol 2,5% (v/v)
Acide acétique glacial 5% (v/v)

Anticorps

Protéine cible	Origine	Dilution d'utilisation
Anti-cruciférines (Jolivet et <i>al.</i> , 2009)	Lapin	1:5000
Anti-napines (Jolivet et <i>al.</i> , 2009)	Lapin	1:2000
Anti-oléosine S3/OLEO1 (D'andrea et <i>al.</i> , 2007)	Lapin	1:5000
Anti-lapin IgG (Santa Cruz)	Chèvre	1:10000

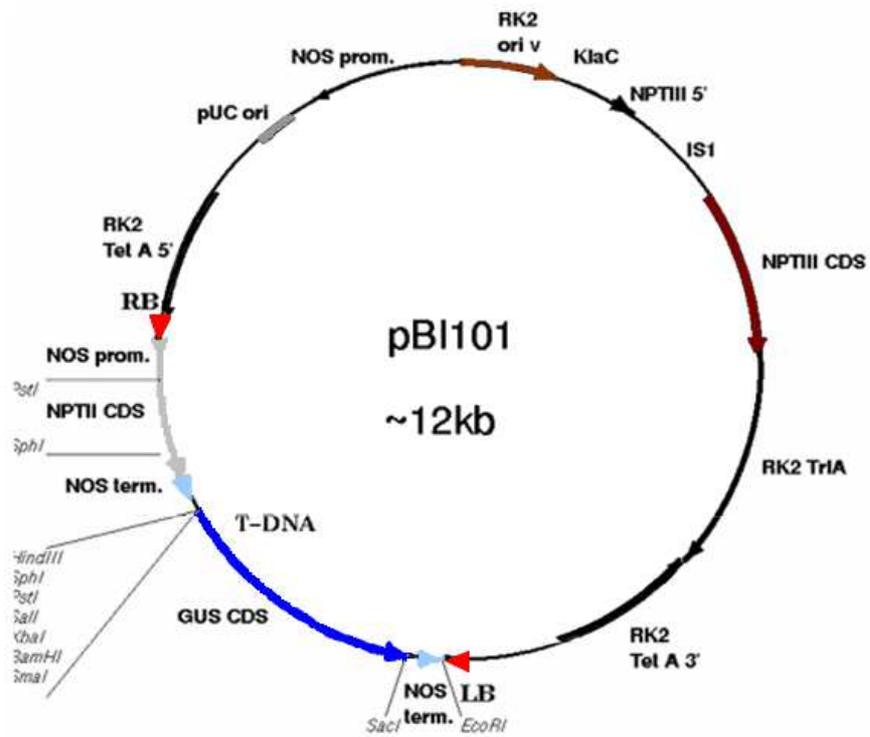
Annexe 9. Cartes des vecteurs utilisés



Carte du *pDONR207*

(Qiagen)

Annexe 9



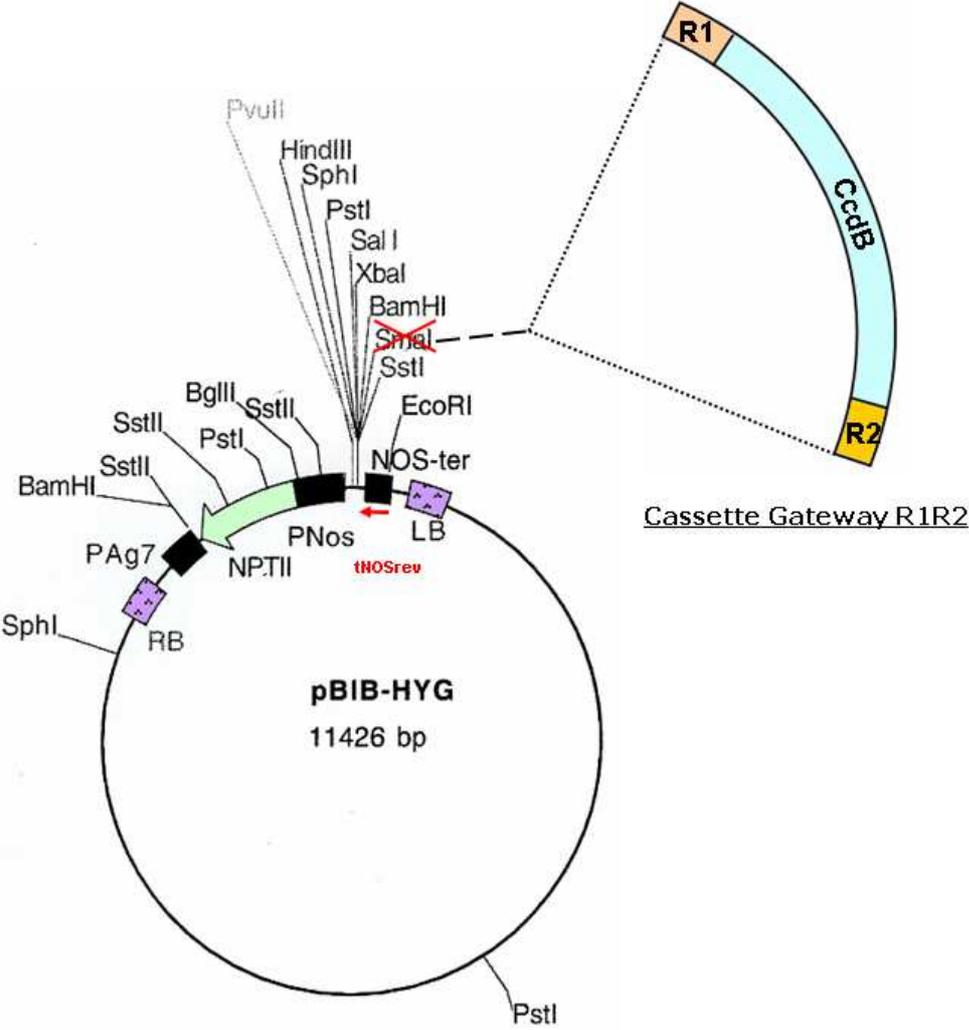
Carte du *pBI101*

(Ozyme)



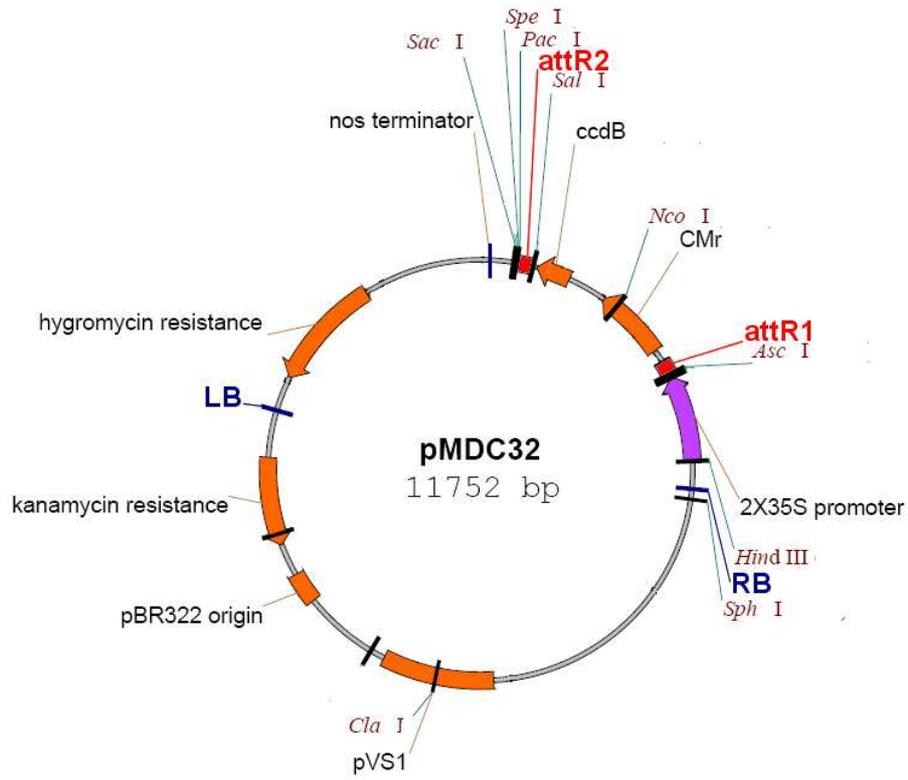
Carte de l'ADN-T du *pGWB3*

(Nakagawa et al., 2007)



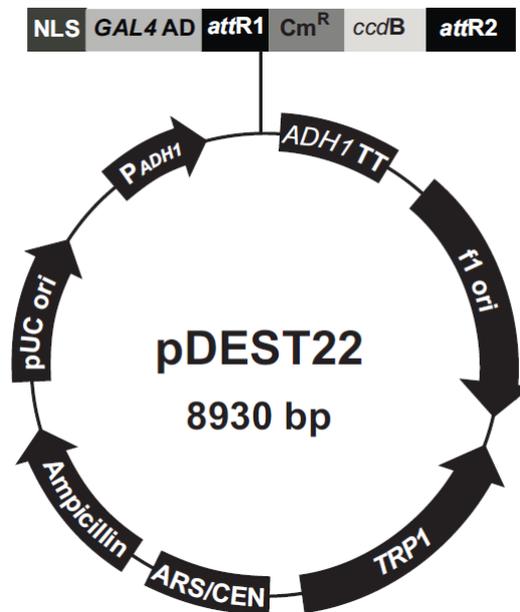
Carte du *pBIB-HYG* Gateway
(Dubos C.)

Annexe 9



Carte du *pMDC32*

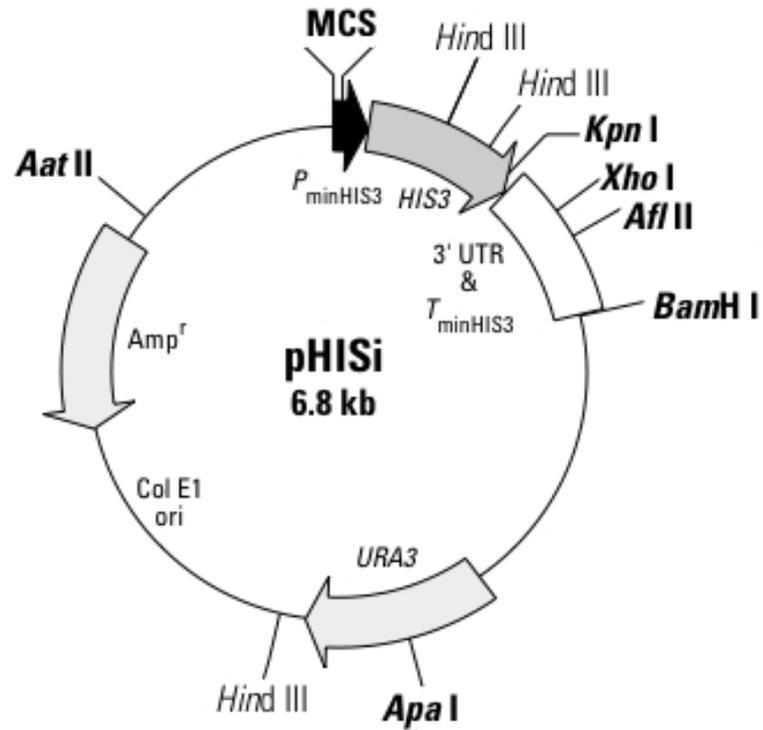
(Curtis et Grossniklaus, 2003)



Carte du *pDEST22*

(Invitrogen)

Annexe 9



MCS (site multiple de clonage) modifié

GAATTCGACAAGAACACGTGCTCTTCTTCAACTAGA
EcoRI *Pml* *XbaI*

Carte du *pHISi*

(Clontech, modifié)

Annexe 9

Annexe 10

Annexe 10. Amorces utilisées

Toutes les amorces sont présentées selon l'orientation 5' → 3'

Amorces pour la caractérisation de lignées mutantes

Des régulateurs maîtres

LEC2.F : CAAGAGAGAGGTGGTTTTTC

LEC2.R : ATAGTGATCGTTTAGATTTCCG

FUS3.F : CAGCGTCCATTTTAAGC

FUS3.R : CGATGCTTTTCTTGCTTG

ABI3.F1 : AAACATCCGCCACAGC

ABI3.R1 : GATGATTGTGCATGTCTACC

ABI3.F2 : GATATGATGGAGACTTTCCG

ABI3.R2 : CGGTGGAGATTCAAGTAAAG

LEC1.F : GGCAGAGAAACAATGGAAC

LEC1.R : TTTGGGTAAATCATTGTC

LEC1L.F : CTCCTTCTCCACCAGGTAG

LEC1L.R : CATCTTAGAATTAGGTTTCGTTACC

De MYB118 et de MYB115

MYB118.F : GAAAACGATCAAACCAAG

MYB118.R : CTGCACTGTTTTCCAACCTC

MYB115.F : GGGCAATGGACTCCTAC

MYB115.R : ATTTTTCTGAAAACACACATTC

De WB3

WB3.F1 : ATGTATTTGAGCCTCAGTG

WB3.R1 : CAACACACAAGTAGTTAAGTCGTAAC

WB3.F2 : AGAGAAAGTAGAGTCTTCATCAG

WB3.R2 : GCGTGTTTCAGAGGGTAA

Annexe 10

Amorces pour le clonage d'ADNc ou de séquences promotrices

Clonage de l'ADNc MYB118

gwMYB118.atg : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**CATG**GGAGTTCGAGTCAGTG

gwMYB118.stop : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT**CTA**AAGACGACCATGAGC

gwMYB118.atg.as : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT**CATG**GGAGTTCGAGTCAGTG

gwMYB118.stop.as : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**CTA**AAGACGACCATGAGC

Clonage des ADNc de SAD

gwSAD2.atg : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT**CATG**AAGATGGCTCTTCTCTTG

gwSAD2.stop : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**Cat**gtgtcgtt**TTA**TAGTTCAACTTC

gwSAD3.atg : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT**CATG**TCGATGGCTT

gwSAD3.stop : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**Cat**ctat**CTA**TAGTTTCACATCTCTACC

gwSAD4.atgB : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT**CATG**GCTCTGCTCTTGAACCTCGACGATG

gwSAD4.stopB : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**CTA**GAGTTCAACTTCTCTCCCG

gwSAD5.atg : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT**CATG**GCGATGGCTATGGAT

gwSAD5.stop : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**Cgt**gtagtaaactt**TTA**AGCCCTG

gwSAD6.atg : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT**CATG**CTTGCGCACAAGTCTC

gwSAD6.stop : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**CTA**CACACTAATCTGCTTATCG

gwFAB2.atg : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT**CATG**GCTCTAAAGTTTAAACCCTTTG

gwFAB2.stop : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**Cc**ctt**TTA**GAGCTGCACTTCTC

Clonage de l'ADNc version Col-0 de WB3

gwWB3.atg : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT**CATG**GCGGATCAATCTC

gwWB3.stop : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**CTA**AGACAACCTTGAGGCATAG

Clonage des ADNc version Ws de WB3

gwWB3.atg : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT**CATG**GCGGATCAATCTC

gwWB3.stop2 : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**CT****TTA**CTTTGGTACTTTGGTGC

Clonage du promoteur de MYB118

gwPro_{MYB118}.970up : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT**CAA**ATCACATATATTATTTAGATAAAGGG

gwPro_{MYB118}.low : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**CAT**GATTATGATGGCAAAAA

gwPro_{MYB118}.2535up : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT**CT**CCCCATTTTAAATGATTCTC

Annexe 10

Clonage des promoteurs des cibles de MYB118

gwProODDup : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAACTTGATGAAAATGTTTGAAC
gwProODDlow : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTTTGTGTTTTGTTTATCTCTTTCTTT

gwProERF8up : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACTAAAACATATAGTTTAAAAGGGTG
gwProERF8low : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGGTGAATTAGGAAGAAGAATGG

gwProPER17up : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTTGGTTCTAGCTAGATCATTTCG
gwProPER17low : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCACTTTTTTCTTTTTTGGTGTTG

Clonage du promoteur de MYB115

gwProMYB115.998up : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGCGGTTTTACAATTTAACG
gwProMYB115.low : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTCGAAAACCGATCAAG

Clonage des promoteurs de SAD

Dans le vecteur pGWB3

gwProSAD1up : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCAAACAAATATAAATAAATAAATTATGTTTG
gwProSAD1low : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGTTTCTTCTTAACGAAACAAAAATG

gwProSAD2up : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTTAATCGAAACTCGTAGTCAAC
gwProSAD2low : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATATATCTCTATCTCTCTTTTTCTTC

gwProSAD3up : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCGACCGTGACTTTATTCC
gwProSAD3low : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTTTCTTTTCTCTCTTTCTCTC

gwProSAD4up : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAATGACATTCTTTGTGAAAC
gwProSAD4low : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCATCGTCATTTATCTATCTCTCTC

gwProSAD5up : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAAGTTTATAATTATTTTTTCAGGACAC
gwProSAD5low : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTGATTCTTCTAACAATCG

gwProSAD6up : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTCTATTTGAAAACCTGGTATTGG
gwProSAD6low : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTTTTATGGTGAAGTAGAGAAGAC

gwProFAB2up : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTCAATGAAAACCGAAAAC
gwProFAB2low : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTCTGGATATGATGAATGAATC

Dans le vecteur pHISi LIC

LicProSAD1up : CGACAAGAACACTCCAAACAAATATAAATAAATAAATTATGTTTG
LicProSAD1low : GAAGAAGAGCACTGCTGTTTCTTCTTAACGAAACAAAAATG

Annexe 10

LicProSAD2up : CGACAAGAACAACCTCCTTAATCGAAACTCGTAGTCAAC

LicProSAD2low : GAAGAAGAGCACTGCTTATATATCTCTATCTCTCTCTTTTCTTC

LicProSAD3up : CGACAAGAACAACCTCCGACCGTGACTTTATTCC

LicProSAD3low : GAAGAAGAGCACTGCTTTTCTCTTCTCTCTTTCTCTC

LicProSAD4up : CGACAAGAACAACCTCCAATGACATTCTTTGTGAAAC

LicProSAD4low : GAAGAAGAGCACTGCCATCGTCATTTATCTATCTCTCTC

LicProSAD5up : CGACAAGAACAACCTCCAAGTTTATAATTATTTTTTCAGGACAC

LicProSAD5low : GAAGAAGAGCACTGCTTGATTCTTCTCTAACAATCG

LicProSAD6up : CGACAAGAACAACCTCCTCTATTTGAAAACCTGGTATTGG

LicProSAD6low : GAAGAAGAGCACTGCTTTTTATGGTGAAGTAGAGAAGAC

LicProFAB2up : CGACAAGAACAACCTCCTCAATGAAAAACCGAAAAC

LicProFAB2low : GAAGAAGAGCACTGCTTCTGGATATGATGAATGAATC

Clonage du promoteur de WB3

gwProWB3.1000up : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAAATAATCTTTAATGATCAAGAATTC

gwProWB3.low : GGGGACAAGTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGTTGAGCACCTCTTGAG

Annexe 10

Amorces de PCR quantitative

Gène	AGI	Amorce sens	Amorce reverse
-	<i>At1g03890</i>	ACCATTTTAGCACACGAGCCG	CCTCCTGTGACGTATAGCACCG
<i>ODD</i>	<i>At1g04380</i>	CTCGCTTGACCTCACCAAAACA	CTGCAAGCCACTGGGAGAT
<i>LEC1</i>	<i>At1g21970</i>	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) QT00863352	
<i>LEC2</i>	<i>At1g28300</i>	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) QT00869575	
<i>SAD6</i>	<i>At1g43800</i>	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) QT00875168	
<i>RLK1</i>	<i>At1g48480</i>	ATTGCTATTGGTGCAGCTCGT	AGCTGGGCTAAGCCAAAGT
<i>ZHOUPI</i>	<i>At1g49770</i>	CCATCATCATCCTCTTCTCCAACAGC	GGTAAGGCAGGTTTCGCAGC
<i>AtERF8</i>	<i>At1g53170</i>	CCCAGCCCGGTTGCTCC	GTCGAACGTACCGAGCCAG
<i>KCS7</i>	<i>At1g71160</i>	TGACATTGATTTGCTGCTC	TGAAAGGTTGTTCTACAATGC
<i>ARR15</i>	<i>At1g74890</i>	AGTGGGACTAGGGCTCTGC	ATTTCTCTGAGTGCTGAAGACTCTTTG
-	<i>At2g03850</i>	AGAAGCGGCGTTGGACT	ATCATCGAGCCATTTGGGGT
<i>PER17</i>	<i>At2g22420</i>	ATCTTTCGAAGTCGTTGACGACAT	TGCTGACTCGCTGTAAACTGTCT
-	<i>At2g23230</i>	ATGGTGCATTAGCCGAGCG	CCCTAGCCTTCGGTCCTAACCC
<i>ACPT3</i>	<i>At2g23410</i>	ACTTATGTTGTCCGCGAGGATGG	GCCGTTTAGCTCCC GCC
<i>SM3</i>	<i>At2g25890</i>	TCTGTT CAGCCCGGTGTTGG	CGCTATCCTCATCCTCGCGT
<i>FAB2</i>	<i>At2g43710</i>	CACAGAAGAAGCACTTCCGACC	CTGCCTCATGTCAACACGACC
<i>SAD2</i>	<i>At3g02610</i>	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) QT00769846	
<i>SAD4</i>	<i>At3g02620</i>	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) QT00770042	
<i>SAD5</i>	<i>At3g02630</i>	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) QT00770294	
<i>ABI3</i>	<i>At3g24650</i>	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) QT00778827	
<i>FUS3</i>	<i>At1g26790</i>	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) QT00780311	

Annexe 10

<i>MYB118</i>	<i>At3g27785</i>	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) QT00781018	
<i>WRI1</i>	<i>At3g54320</i>	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) QT0071707	
-	<i>At4g21020</i>	CGCTCTAGTTGGTCTCTCAAAGGC	CCTCCCTCCATTTCTTCGATCCG
<i>S3/OLEO1</i>	<i>At4g25140</i>	AGGCAGATTGCTAAAGCTGCAAC	ACTGTGATGAGAGCCGGG
<i>At2S1</i>	<i>At4g27140</i>	CCATCTACCGCACCGTCG	CTACGGCCTTGCCTTGCT
<i>EMB1353</i>	<i>At4g30090</i>	CGATGGGTGGTTCTTGTCTAAACT	AGGTCATAATCCGGGTCGTGT
<i>GRP19</i>	<i>At5g07550</i>	ATGTTTGAGATTATTCAGGCGGTCTT	GCTGGCACGAGAACGGG
<i>BCCP2</i>	<i>At5g15530</i>	GACCCGGTCAACCCCCT	GTCAACGCTGACTGGTTTTCCAT
<i>SAD3</i>	<i>At5g16230</i>	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) QT00830564	
<i>SAD1</i>	<i>At5g16240</i>	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) QT00830571	
<i>MYB115</i>	<i>At5g40360</i>	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) QT00735623	
<i>CRA1</i>	<i>At5g44120</i>	ATCGTAAACGACAATGGTAACAGAGTG	AGACTGAGGTTTCGTCCCGC
<i>L1L</i>	<i>At5g47670</i>	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) QT01833517	
<i>PKp-b2</i>	<i>At5g52920</i>	AGTCACTATCGTCCTTCCG-3	CTGTACGATTGCTATTTCTC
-	<i>At5g53730</i>	CAAGGGACTGAGCTACCCG	CGGTATGCACCCGAGACCCA
<i>At2S5</i>	<i>At5g54740</i>	ATCCTGCCAGTTCAAGGCAT	ACTCATAACAGTACAAACATTTAT CTACTATACAAACACG
-	<i>At5g56100</i>	CCAGCTTTTATGGTAACGGTAGCG	CTCCCAGCCAGTCCGGT
<i>CKX3</i>	<i>At5g56970</i>	GTTGTGGTCAACATGCGGTCC	CGTTTGATAACGTCCCACCGACTG
<i>EF1aA4</i>	<i>At5g60390</i>	ATGCCCCAGGACATCGTGATTTTCAT	TTGGCGGCACCCTTAGCTGGATCA

Annexe 11

Annexe 11.

WRINKLED Transcription Factors Orchestrate Tissue-Specific Regulation of Fatty Acid Biosynthesis in *Arabidopsis*^W

Alexandra To,^{a,b} Jérôme Joubès,^{c,d} Guillaume Barthole,^{a,b} Alain Lécureuil,^{a,b} Aurélie Scagnelli,^{a,b} Sophie Jasinski,^{a,b} Loïc Lepiniec,^{a,b} and Sébastien Baud^{a,b,1}

^a Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Mixte de Recherche 1318, Institut Jean-Pierre Bourgin, Saclay Plant Sciences, F-78000 Versailles, France

^b AgroParisTech, Unité Mixte de Recherche 1318, Institut Jean-Pierre Bourgin, Saclay Plant Sciences, F-78000 Versailles, France

^c Université de Bordeaux, Laboratoire de Biogenèse Membranaire, Unité Mixte de Recherche 5200, F-33000 Bordeaux, France

^d Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Biogenèse Membranaire, Unité Mixte de Recherche 5200, F-33000 Bordeaux, France

Acyl lipids are essential constituents of all cells, but acyl chain requirements vary greatly and depend on the cell type considered. This implies a tight regulation of fatty acid production so that supply fits demand. Isolation of the *Arabidopsis thaliana* WRINKLED1 (WRI1) transcription factor established the importance of transcriptional regulation for modulating the rate of acyl chain production. Here, we report the isolation of two additional regulators of the fatty acid biosynthetic pathway, WRI3 and WRI4, which are closely related to WRI1 and belong to the APETALA2–ethylene-responsive element binding protein family of transcription factors. These three WRIs define a family of regulators capable of triggering sustained rates of acyl chain synthesis. However, expression patterns of the three WRIs differ markedly. Whereas only WRI1 activates fatty acid biosynthesis in seeds for triacylglycerol production, the three WRIs are required in floral tissues to provide acyl chains for cutin biosynthesis and prevent adherence of these developing organs and subsequent semisterility. The targets of these WRIs encode enzymes providing precursors (acyl chain and glycerol backbones) for various lipid biosynthetic pathways, but not the subsequent lipid-assembling enzymes. These results provide insights into the developmental regulation of fatty acid production in plants.

INTRODUCTION

Acyl lipids, which are derived from fatty acids, are essential constituents of all plant cells, where they have different functions. First, they are basic components used for membrane biosynthesis and repair. Second, triacylglycerols (TAGs; triesters of fatty acids and glycerol) are the major form of carbon and energy storage in the seeds and fruits of several plant species (Baud and Lepiniec, 2010). Third, minor amounts of plant lipids and their metabolic derivatives, like jasmonate, participate in signaling pathways (Wasternack, 2007). Finally, cuticular lipids (cuticular waxes and cutin) coating the surface of epidermal cells serve as a vital hydrophobic barrier preventing water loss, entry of pathogenic microorganisms, and organ adherence (Kunst and Samuels, 2009). Even though the structures and properties of these different acyl lipids vary greatly, they are all derived from the same fatty acid and glycerolipid biosynthesis pathway (Harwood, 1996). The fatty acid biosynthesis pathway is found in the plastids of every plant cell.

Briefly, the pyruvate dehydrogenase complex generates acetyl-CoA, the building block used for fatty acid production. Fatty acid biosynthesis begins with the formation of malonyl-CoA from acetyl-CoA by heteromeric acetyl-CoA carboxylase. The malonyl group of malonyl-CoA is then transferred to an acyl carrier protein (ACP) by a malonyl-CoA:acyl carrier protein malonyltransferase. Acyl chains are produced by the fatty acid synthase complex, which uses acetyl-CoA as a starting unit while malonyl-ACP provides the two-carbon units required for chain elongation. Acyl chains are ultimately hydrolyzed by acyl-ACP thioesterases that release fatty acids.

Whereas mesophyll cells contain 5 to 10% acyl lipids by dry weight, mostly in the form of membrane lipids (Ohlrogge and Browse, 1995), some cells in the fruit mesocarp or in the seed of some plant species can accumulate up to 90% TAGs by dry weight (Bourgis et al., 2011). These observations strongly suggest that the rate of acyl chain production can vary greatly and is tightly regulated, allowing the balancing of carbon supply and demand for acyl chains to meet the requirements of a given cell type (Ohlrogge and Jaworski, 1997). Extensive transcriptomic analyses of *Arabidopsis thaliana* and other plant species have shown that transcript levels of genes encoding core fatty acid biosynthetic enzymes change in a coordinated and proportional manner to the rates of acyl chain production in the tissues analyzed (Baud and Lepiniec, 2009; Barthole et al., 2012). These analyses point out the key role played by transcriptional regulation in the control of fatty acid biosynthesis. They also suggest that the expression of most

¹ Address correspondence to sebastien.baud@versailles.inra.fr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Sébastien Baud (sebastien.baud@versailles.inra.fr).

^W Online version contains Web-only data.
www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.112.106120

fatty acid biosynthetic genes might be coregulated. A large part of our current knowledge regarding these regulations has been generated from the analysis of *Arabidopsis* mutants affected in seed oil content (Focks and Benning, 1998). Whereas early developing seeds exhibit low glycerolipid contents similar to that of foliar tissues, the rate of acyl chain production dramatically increases in maturing seeds as TAGs are massively synthesized and stored in the embryo. The WRINKLED1 (WRI1) transcription factor triggers the concomitant upregulation of genes involved in fatty acid production at the onset of the seed maturation phase (Cernac and Benning, 2004). This member of the APETALA2-ethylene-responsive element binding protein (AP2-EREBP) family binds to promoter sequences of late glycolytic and fatty acid biosynthetic genes (Baud et al., 2007b). A nucleotide sequence [CnTnG(n)₇CG] conserved among proximal upstream regions of several target genes and called the AW-box was proposed to be recognized by WRI1 (Maeo et al., 2009). Recent studies performed in maize (*Zea mays*) and other plant species suggest that these *trans*- and *cis*-regulatory elements might be conserved between dicots and monocots (Shen et al., 2010).

In *wri1* mutant lines, the lack of transcriptional activation of the fatty acid biosynthetic pathway in early maturing embryos is responsible for a severe defect in TAG biosynthesis and results in the production of wrinkled seeds depleted in oil (Focks and Benning, 1998). However, *wri1* knockout mutants maintain a basal level of late glycolytic and fatty acid biosynthetic gene transcriptional activity, so that their vegetative development is not compromised (Baud et al., 2009). This observation, among others, indicates that the transcriptional machinery regulating the fatty acid biosynthetic pathway is probably composed of multiple regulatory proteins. Partners of WRI1, functional homologs, or even transcription factors belonging to redundant regulatory pathways might participate in the control of acyl chain production.

To isolate these unknown regulators, complementary screening procedures have been undertaken. In this article, we report the isolation and functional characterization of WRI3 (At1g16060) and WRI4 (At1g79700). Like WRI1, they belong to the AP2-EREBP family of transcription factors, and they behave as transcriptional activators of the fatty acid biosynthetic pathway. However *WRI1*, *WRI3*, and *WRI4* are clearly differentially expressed, and comprehensive characterization of corresponding single, double, and triple mutants further established that the three transcription factors do not have identical functions in planta. Whereas only WRI1 triggers sustained rates of fatty acid production in TAG-storing seeds, the three WRIs redundantly stimulate acyl chain production in developing flowers, providing precursors for cutin production and thus preventing organ adherence and subsequent semisterility. Taken together, these results establish another physiological consequence of deficiency in *WRI1*-like genes and provide original insights into our understanding of the developmental regulation of fatty acid production in plants.

RESULTS

Isolation of New *ProBCCP2* Binding Proteins

To identify new transcriptional regulators of the fatty acid biosynthetic pathway, a yeast one-hybrid screen was conducted

with a 180-bp promoter fragment of *BIOTIN CARBOXYL CARRIER PROTEIN2* (*BCCP2*), a gene encoding a subunit of heteromeric acetyl-CoA carboxylase. Previous functional analyses revealed that this fragment contained information required for the proper regulation of *BCCP2* expression in planta (Baud et al., 2009). An ordered cDNA expression library for a set of *Arabidopsis* transcription factor open reading frames (REGIA library; Paz-Ares, 2002) was screened by mating with a yeast strain containing the *ProBCCP2:HIS3* construct and subsequent selection on His-free medium. Among the 926 open reading frames composing the library, three candidates were thus isolated. One of the candidates encoded WRI3, a member of the AP2-EREBP family closely related to WRI1 and belonging to the WRI1-like group (Figure 1A). Since two members of this group, namely, WRI1 and WRI4 (At1g79700), were absent from the REGIA library, the four full-length cDNAs (*WRI1*, *WRI2/At2g41710*, *WRI3*, and *WRI4*) were systematically cloned and expressed as GAL4 activating domain fusions in yeast cells. Three of the corresponding proteins, WRI1, WRI3, and WRI4, were able to induce yeast growth on selection medium, demonstrating their interaction with *ProBCCP2* (Figure 1B), whereas WRI2 did not. To further evaluate the strength of these interactions, quantitative β -galactosidase assays were performed in yeast containing the *lacZ* reporter cloned downstream of the *ProBCCP2* promoter sequence (Figure 1C). Both WRI1 and WRI4 could activate the reporter gene at high levels. The reporter activity measured in the presence of WRI3 was weaker, although significantly different from the negative controls. The reporter activity measured in the presence of WRI2 was similar to the control, thus confirming a lack of interaction with *ProBCCP2*.

WRI3 and WRI4 Are Transcriptional Activators of the Fatty Acid Biosynthetic Pathway

In order to determine whether WRI3 and WRI4, like WRI1 (Masaki et al., 2005), possess transcriptional activity, coding regions of *WRIs* were individually cloned in frame with the GAL4 DNA binding domain (GAL4-DBD). The constructs obtained were then introduced into the yeast strain AH109, which carries the *HIS3* and *ADE2* reporter genes under the control of heterologous GAL4-responsive upstream activating sequences and promoter elements. The expression of these two reporters could be activated in the presence of WRI1, WRI3, or WRI4 fused to GAL4-DBD, thus establishing their transcriptional activity (Figure 2A).

To test the ability of WRI3 and WRI4 to interact with the promoter sequence of another gene involved in fatty acid production, a 950-bp promoter fragment relative to the translational start codon of *BCCP1* (At5g16390) was used as bait in a yeast one-hybrid assay (Figure 1B). The expression of WRI1, WRI4, and to a lesser extent WRI3 resulted in the specific growth of the strain on medium lacking His, thus demonstrating the interaction of WRI1 and WRI4 with *ProBCCP1*. The interaction observed with WRI3 was weaker, while no interaction could be detected with WRI2, thus confirming the results obtained with *ProBCCP2*.

To further investigate the transcriptional activation of fatty acid biosynthetic genes by the WRI transcription factors in planta, *WRI* cDNAs were cloned downstream of the strong and seed-specific *AT2S2* (At4g27150) promoter (Pouvreau et al.,

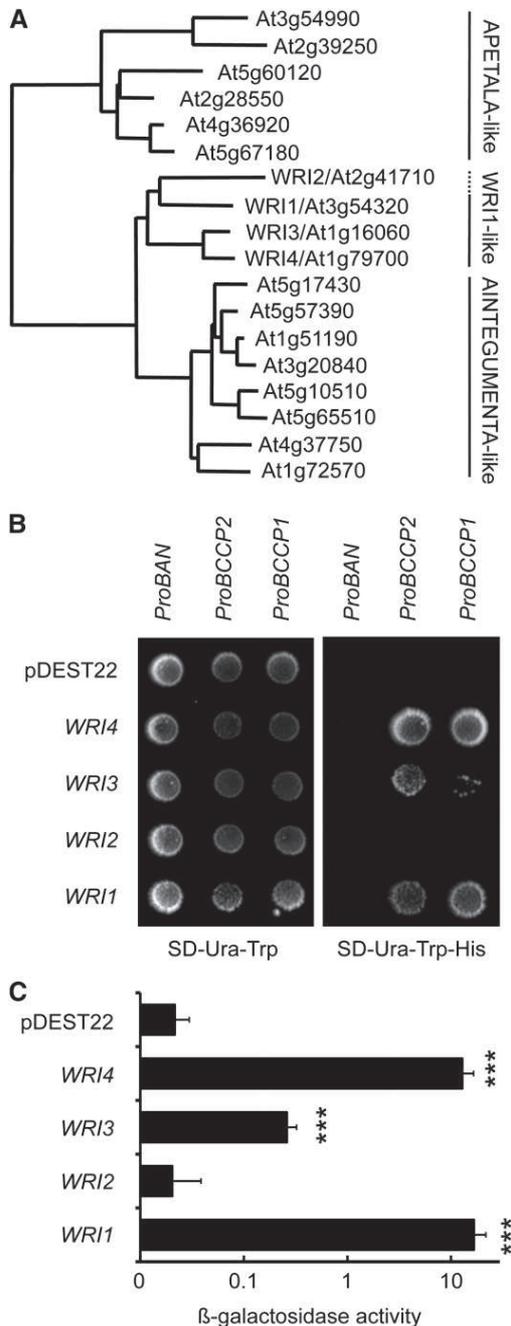


Figure 1. Interaction of the WRI Transcription Factors with Promoters of the BCCP Genes in Yeast.

(A) Phylogram, with branch lengths in arbitrary units, using the alignment generated by the MAFFT program. Sequences of the double AP2 (DNA binding) domains of the transcription factors (with gaps) were used for the distance analyses. A version of this phylogram including statistical support for the nodes is available as Supplemental Figure 9 online.

(B) Analysis of WRI binding to the promoters of *BCCP2* and *BCCP1* in yeast one-hybrid experiments. Yeast strains containing the *HIS3* reporter gene under the control of either the *BANYULS* (*BAN*; negative control), *BCCP2*, or *BCCP1* promoter were transformed with either the empty

2011). The constructs thus obtained were introduced into a *wri1-4* mutant background. Overaccumulation of *WRI* RNA in the transgenic lines was verified by quantitative RT-PCR experiments performed on cDNAs prepared from siliques aged 16 d after anthesis (DAA) (see Supplemental Figure 1 online). To check whether the overexpression of WRI transcription factors could result in an efficient transcriptional activation of fatty acid biosynthetic genes, relative mRNA levels of two of these genes, *BCCP2* and *PYRUVATE DEHYDROGENASE (PDH)-E1a* (At1g01090), were quantified in this material (Figure 2B). RNA accumulation for these two genes was strongly induced in *ProAT2S2:WRI1*, *ProAT2S2:WRI3*, and *ProAT2S2:WRI4* lines. In order to determine whether the WRI transcription factors were able to activate the whole fatty acid biosynthetic pathway, the constructs were tested for their ability to complement the seed phenotype of the *wri1-4* mutant (Baud et al., 2007b). Microscopy observations of mature dry seeds showed a reversion of the wrinkled phenotype of *wri1-4* seeds expressing *WRI1*, *WRI3*, or *WRI4* (Figure 2C). No phenotypic reversion was obtained with *WRI2*. Total fatty acid analyses performed on dry seeds confirmed the ability of *WRI1*, *WRI3*, and *WRI4* to efficiently activate fatty acid biosynthesis and thus to restore normal oil accumulation in *wri1-4* seeds (Figure 2D).

Members of the WRI Clade Are Differentially Expressed

The expression patterns of three WRIs that interact with promoters of fatty acid biosynthetic genes and transcriptionally activate the fatty acid biosynthetic pathway were examined. First, the spatiotemporal activities of *WRI1*, *WRI3*, and *WRI4* promoters were investigated. Promoter fragments corresponding to region -1028 to -1 bp (*WRI1*), -1000 to -1 bp (*WRI3*), and -1000 to -1 bp (*WRI4*) were individually fused translationally to the *uidA* reporter gene. The corresponding constructs were assayed for their *uidA* expression patterns in transgenic *Arabidopsis* lines. As previously reported, *ProWRI1* activity was specifically observed in maturing embryos (Figures 3A to 3E) (Baud et al., 2007b). On the contrary, *ProWRI3* and *ProWRI4* activities were not detected in embryos (Figures 3J and 3O). β -Glucuronidase (*GUS*) staining could be observed only in flowers of the corresponding *ProWRI3:uidA* (Figures 3F) and

pDEST22 expression vector or with a version of this vector allowing the expression of *WRI1*, *WRI2*, *WRI3*, or *WRI4* before being plated on appropriate media to maintain the expression of the vectors (SD-Ura-Trp) and to test the activation of the *HIS3* reporter gene (SD-Ura-Trp-His). Data presented are representative from the results obtained for five independent colonies.

(C) Quantification of WRI binding to the promoter of *BCCP2* in yeast one-hybrid experiments. Yeast strains containing the *LacZi* reporter gene under the control of the *BCCP2* promoter were transformed with either the empty pDEST22 expression vector or with a version of this vector allowing the expression of *WRI1*, *WRI2*, *WRI3*, or *WRI4* before being plated on appropriate media to maintain the expression of the vectors. β -Galactosidase activity was then measured to test the activation of the *LacZi* reporter gene. Values are the means and *se* of between five and six measurements performed on independent colonies. ***Significant difference according to *t* test, $P < 0.001$.

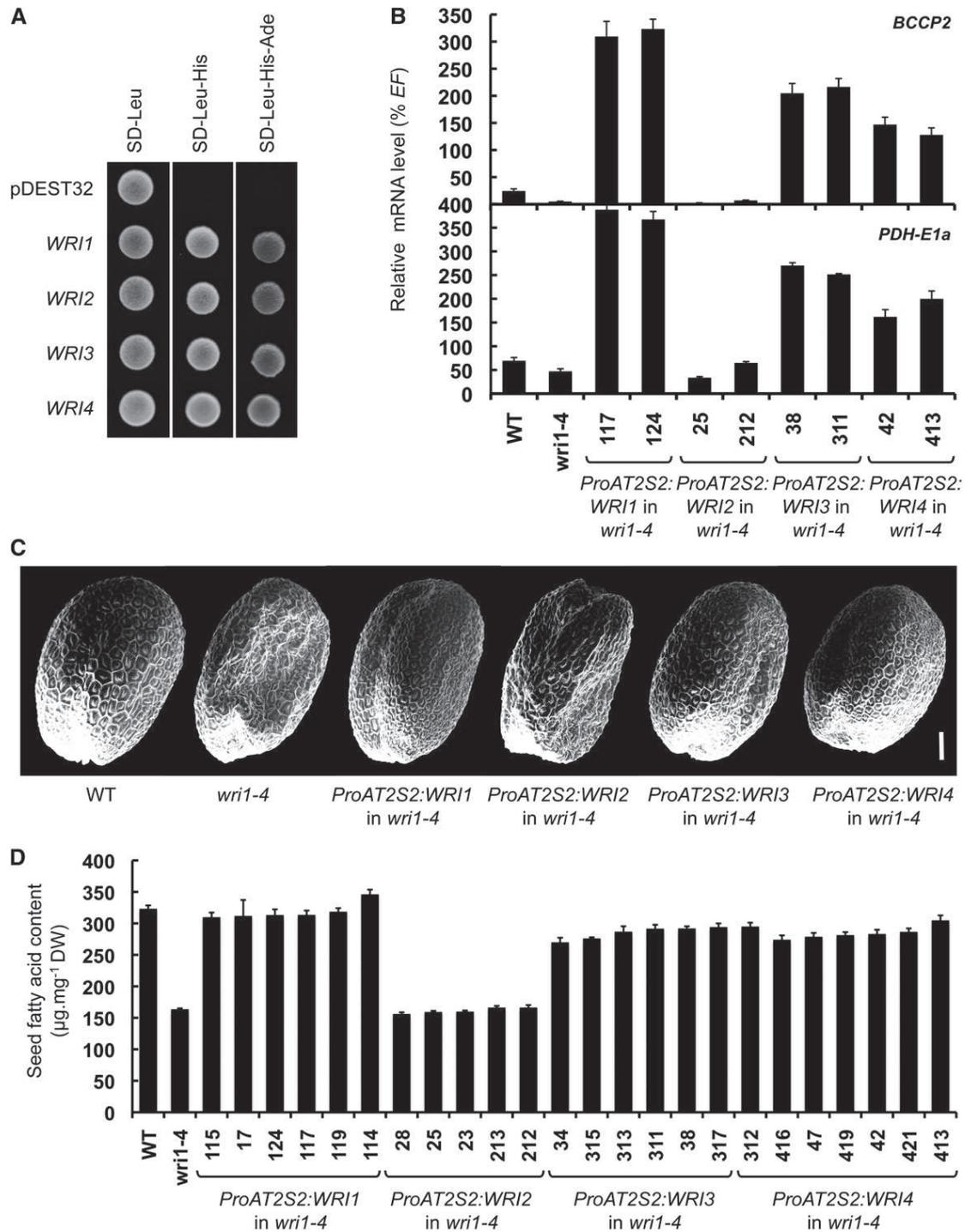


Figure 2. Transcriptional Activation of Fatty Acid Biosynthetic Genes by the WRI Transcription Factors.

(A) Transcriptional activity of the WRIs. *WRI* coding sequences were cloned in frame with GAL4-DBD, and the fusion constructs were introduced into reporter yeast containing the *HIS3* and *ADE2* reporter genes, before being plated on appropriate media to maintain the expression of the vectors (SD-Leu) and to test the activation of the *HIS3* (SD-Leu-His) or *HIS3* and *ADE2* reporter genes (SD-Leu-His-Ade). Data presented are representative from the results obtained for five independent colonies.

(B) Overexpression of fatty acid biosynthetic genes in response to seed-specific overexpression of *WRI* cDNAs. For each cDNA overexpressed, two representative transformants were analyzed. Analyses of the relative mRNA levels in siliques aged 16 DAA of two fatty acid biosynthetic genes (*BCCP2*

ProWRI4:uidA lines (Figures 3K). A closer examination of this material showed that pollen grains were highly stained in these lines, both before and after their release from anthers (Figures 3G to 3I and 3L to 3N). In *ProWRI4:uidA* lines, but not in *ProWRI3:uidA* lines, nectaries of the flowers were also stained (Figures 3H). To gain complementary information about the expression patterns of the *WRIs*, quantitative RT-PCR experiments were performed on cDNAs prepared from various tissues of wild-type plants (ecotype Columbia-0 [Col-0]) (Figure 3P). *WRI3* and *WRI4* mRNA accumulation patterns were clearly distinct from the *WRI1* pattern. They appeared to be ubiquitously accumulated, but at low levels, whereas high *WRI1* mRNA levels were detected in early maturing seeds. The highest *WRI3/WRI4* mRNA levels were measured in plant vegetative parts (e.g., stems) and in flowers.

Functions of *WRI3* and *WRI4* Are Not Redundant with That of *WRI1* in Seeds

To investigate the function of *WRI3* and *WRI4* in planta, T-DNA insertion alleles were isolated and characterized for each gene (Figure 4A). Homozygous lines were generated, and the transcripts in each mutant line were analyzed by RT-PCR on cDNAs prepared from seeds aged 12 DAA (*WRI1* and *WRI3*) and from flowers (*WRI4*). Full-length *WRI3* transcripts were not detectable in the *wri3-1* and *wri3-2* lines. Full-length *WRI4* transcripts were absent in the *wri4-1* and *wri4-3* lines, whereas *wri4-2* mutants exhibited lower *WRI4* transcript levels when compared with the wild type. To test whether the loss of a functional *WRI* gene was compensated for by the overexpression of other family members, a quantitative RT-PCR experiment was performed on cDNAs prepared from maturing seeds of the mutant lines studied (Figure 4B). No such compensatory effect was detected for any of the mutations considered.

WRI1 is a transcriptional enhancer of the fatty acid biosynthetic pathway in maturing seeds, where high rates of fatty acid synthesis are required to sustain important TAG production (Cernac and Benning, 2004; Baud et al., 2009). To determine whether *WRI3* and *WRI4* participate in triggering acyl chain production in seeds, double *wri1 wri3*, *wri1 wri4*, *wri3 wri4* mutants and triple *wri1 wri3 wri4* mutants were obtained. The single, double, and triple mutants (19 genotypes) were grown under controlled conditions, and their mature dry seeds were subjected to biochemical analyses. Determinations of total fatty acid contents demonstrated that only the *wri1* mutation impacted on seed oil content (Figure 4C). To rule out the possibility of an

involvement of *WRI3* and *WRI4* in the transcriptional activation of fatty acid biosynthesis in seeds, relative mRNA levels of two fatty acid biosynthetic genes, *BCCP2* and *PDH-E1a*, were quantified using mRNAs extracted from early maturing seeds aged 12 DAA in a subset of eight genotypes and analyzed by quantitative RT-PCR (Figure 4D). These data confirmed that *wri3* and *wri4* mutations had no effect on the transcriptional activation of fatty acid biosynthetic genes in seeds.

To further elucidate the changes leading to oil depletion observed in seeds exhibiting a *wri1* mutation, a quantitative RT-PCR approach was used to systematically analyze the relative mRNA accumulation of genes encoding enzymes involved in either fatty acid biosynthesis or TAG assembly (Figure 5). All the glycolytic and late fatty acid biosynthetic genes assayed (*PKp2/At5g52920*, *MAT/At2g30200*, *KASI/At5g46290*, *KASIII/At1g62640*, *ENR/At2g05990*, and *FATA/At3g25110*) were significantly downregulated in early-maturing seeds of the triple *wri1 wri3 wri4* mutants. Likewise, genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenases (*At2g41540* and *At3g07690*), the enzymes responsible for the provision of glycerol backbones required for TAG assembly, were repressed in mutant seeds. On the contrary, the relative mRNA levels of genes involved in TAG formation (*GPAT9/At5g60620*, *LPAAT4/At1g75020*, *DAGAT1/At2g19450*, and *PDAT1/At3g44830*) were unchanged in the seeds of mutant lines. Genes encoding prominent enzymes involved in fatty acid modification like *FATTY ACID DESATURASE2* (*FAD2/At3g12120*), *FAD3* (*At2g29980*), or *FATTY ACID ELONGASE1* (*FAE1/KCS18/At4g34520*) were unaffected by the *wri* mutations (see Supplemental Figure 2 online). *REDUCED OLEATE DESATURATION1* (*ROD1/At3g15820*), which encodes an enzyme regulating TAG composition by interconverting diacylglycerol and phosphatidylcholine during TAG biosynthesis, appeared to be downregulated in the triple mutants.

Role of the *WRI* Transcription Factors in the Production of Floral Cutin

While studying the *wri* lines, the 19 mutant genotypes considered were grown together with wild-type plants in a controlled environment (65% relative humidity growth chamber), and clear morphological phenotypes were observed. Whereas no visual change could be seen in these plants during vegetative growth, their reproductive organs were severely affected. The phenotypes included strong adherence between floral organs preventing flower opening (Figures 6A to 6C) and semisterility (Figure 6B). A quantification of these phenotypes (relative

Figure 2. (continued).

and *PDH-E1a*) were performed by quantitative RT-PCR. The results obtained were standardized to the constitutive *EF1 α A4* gene expression level (*EF*; Nesi et al., 2000). Three independent cDNA preparations were analyzed; one or two technical replications were performed with each cDNA population analyzed. Values are the means and \pm SE of between three and six measurements. WT, the wild type (Col-0).

(C) Rescue of the wrinkled phenotype of mature *wri1-4* seeds by seed-specific overexpression of *WRI* cDNAs. Dry seeds from *wri1-4* mutants transformed with *ProAT2S2:WRI* constructs were observed by scanning electron microscopy. Representative seeds are presented. Bar = 100 μ m.

(D) Rescue of the total fatty acid content in mature *wri1-4* seeds by seed-specific overexpression of *WRI* cDNAs. The fatty acid contents of dry seeds from *wri1-4* mutants transformed with *ProAT2S2:WRI* constructs were determined by gas chromatography analysis. Values are the means and \pm SE of five replicates performed on batches of 20 seeds from five distinct individuals. DW, dry weight.

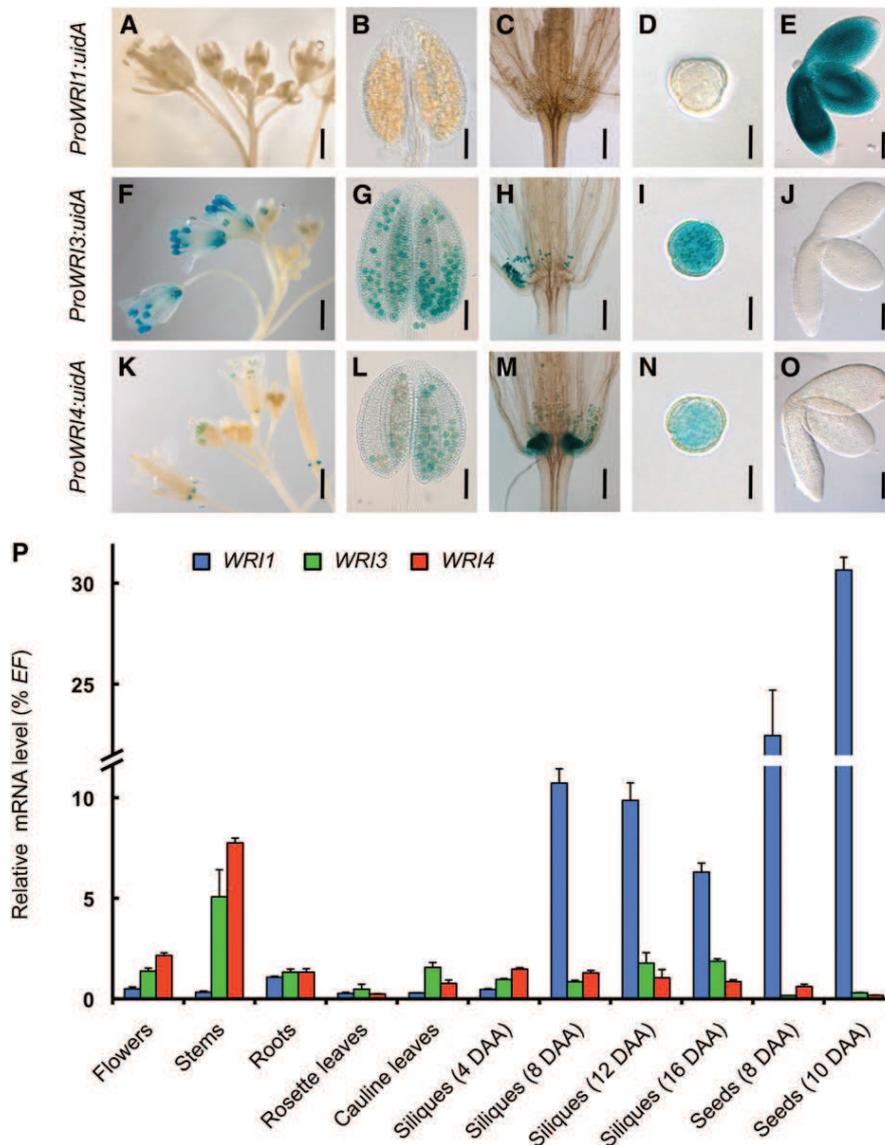


Figure 3. Expression Patterns of *WRI1*, *WRI3*, and *WRI4*.

(A) to (O) Pattern of activity of the *ProWRI1:uidA* ([A] to [E]), *ProWRI3:uidA* ([F] to [J]), and *ProWRI4:uidA* cassettes ([K] to [O]) in various plant organs. For histochemical detection of GUS activity, tissues were incubated 4 h for maturing embryos ([E], [J], and [O]) or overnight for inflorescences ([A], [F], and [K]), flowers ([C], [H], and [M]), stamens ([B], [G], and [L]), and pollen ([D], [I], and [N]) in a buffer containing 2 mM (embryos) or 0.2 mM (inflorescences, flowers, stamens, and pollen) each of potassium ferrocyanide and potassium ferricyanide. The results for GUS activity were first observed on whole-mounted inflorescences; microscopy observations of stamens, flowers, pollen grains, and excised embryos were performed using Nomarski optics. Bars = 5 mm in (A), (F), and (K), 50 μ m in (B), (G), and (L), 200 μ m in (C), (H), and (M), 20 μ m in (D), (I), and (N), and 100 μ m in (E), (J), and (O).

(P) Analyses of *WRI1*, *WRI3*, and *WRI4* relative mRNA accumulation levels were performed in different plant organs and in developing seeds. The results obtained were standardized to the constitutive *EF1 α A4* (*EF*) gene expression level. Values are the means and \pm SE of three to four replicates performed on cDNA dilutions obtained from three independent mRNA extractions. DAA, days after anthesis.

proportions of unopened flowers or aborted siliques) in the 19 mutant genotypes showed that the effects of the three mutations were additive (Figure 6D; see Supplemental Figure 3A online), with the relative impact of the mutations being as follows: *wri3* > *wri4* >> *wri1*. Notably, these phenotypes were barely detectable in greenhouses with an uncontrolled humidity

environment. These severe conditional phenotypes were reminiscent of those described for several mutants affected in cuticle biosynthesis (Bourdenx et al., 2011; Shi et al., 2011). Accordingly, toluidine blue surface permeability assays (Tanaka et al., 2004; Li-Beisson et al., 2009) demonstrated that the cuticle of petals (and sepals to a lesser extent) was perturbed in *wri*

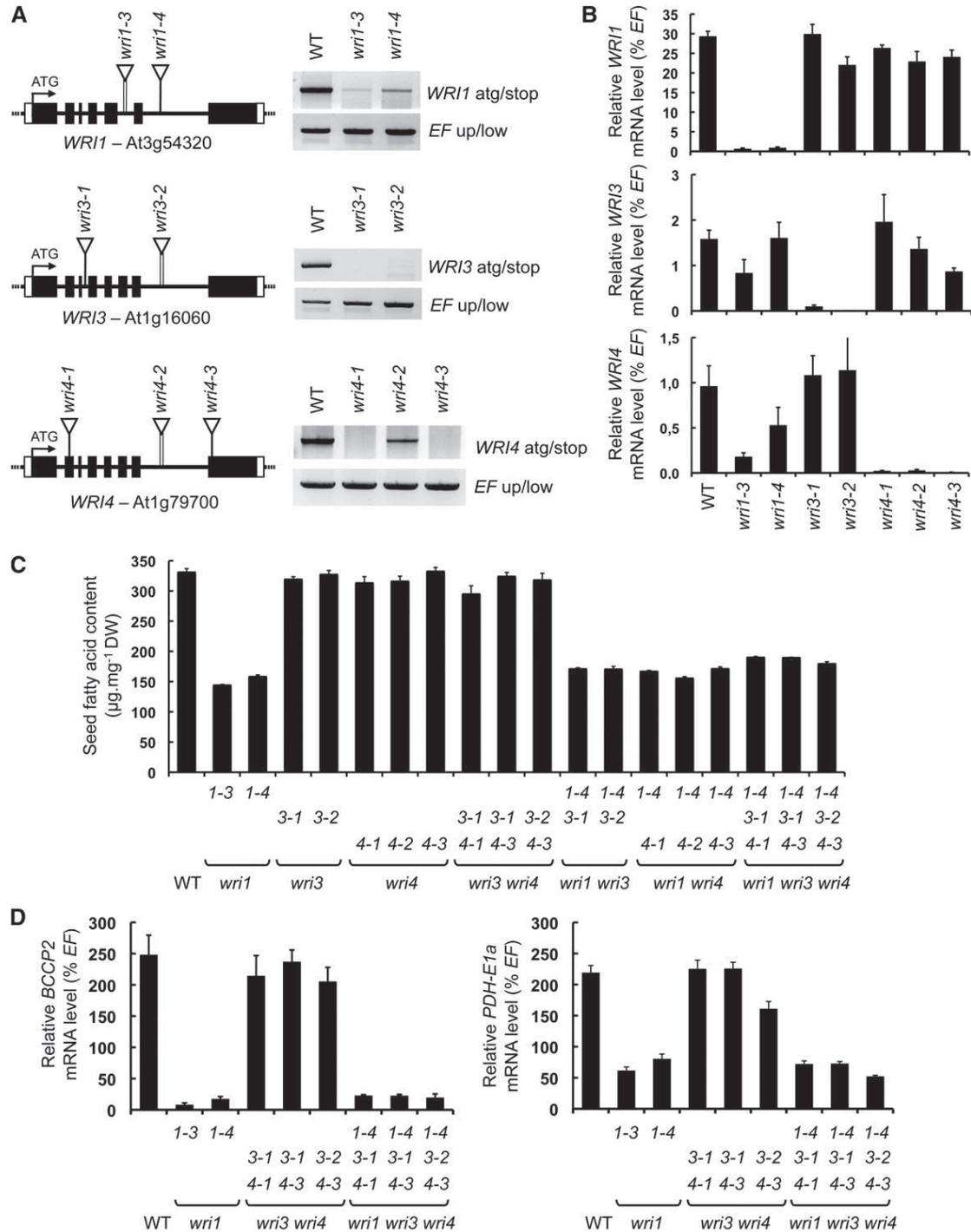


Figure 4. Characterization of *wri* Alleles.

(A) Molecular characterization of the *wri* mutations. Structures of the *WRI1* genes showing the position of T-DNA insertions in *wri1-3*, *wri1-4*, *wri3-1*, *wri3-2*, *wri4-1*, *wri4-2*, and *wri4-3* are presented. For each T-DNA insertion considered, confirmed flanking sequence tag(s) are anchored in the gene structure and represented by vertical bar(s). Closed boxes represent exons, while open boxes represent untranslated regions. Accumulation of *WRI* mRNAs in wild-type and mutant backgrounds was studied by RT-PCR either in developing seeds aged 12 DAA (*WRI1* and *WRI3*) or in flowers (*WRI4*). *EF1 α* (*EF*) gene expression was used as a constitutive control. WT, the wild type (Col-0).

mutants, with these defects being particularly pronounced in the triple mutants (Figure 6D; see Supplemental Figure 3B online). To test whether increased cuticle permeability in flowers of the triple mutants was associated with changes in cutin, flowers were subjected to extensive delipidation, and the amount and composition of residual bound lipids were analyzed by gas chromatography–mass spectrometry. The accumulation of dicarboxylic acids and ω -hydroxy acids, the most abundant cutin constituents, was severely affected in the mutants (Figure 7). By contrast, the amounts of other minor constituents of cutin were not significantly different in the mutants. The total amounts of dicarboxylic and ω -hydroxy fatty acids were then determined for flowers from a subset of genotypes comprising simple, double, and triple mutants (Figure 6E). The results obtained established that the negative impacts of the *wri* mutations on cutin deposition were additive. Complementary analyses showed that cutin deposition was also altered on stems of the triple mutants, but not on rosette leaves (see Supplemental Figure 4 online). As for cuticular waxes, which are usually accumulated at lower amounts than cutin at the surface of epidermal cells, their production was not affected in the triple mutant (see Supplemental Figure 5 online).

To characterize the involvement of WRI1, WRI3, and WRI4 in the transcriptional activation of fatty acid biosynthesis in floral organs, mRNAs were extracted from petals and sepals in the same subset of eight genotypes. We first verified by quantitative RT-PCR that the loss of a functional *WRI* gene in these tissues was not compensated for by the overexpression of other family members (see Supplemental Figure 6 online). Relative *BCCP2* mRNA levels were then quantified (Figure 6F). *wri1*, *wri3*, and *wri4* mutations had additive negative effects on the transcription of this fatty acid biosynthetic gene. To further elucidate the impact of the *wri* mutations on cuticle biosynthesis, relative mRNA levels of genes involved either in acyl chain production or in cuticle biosynthesis were measured by quantitative RT-PCR experiments in petals and sepals of the triple mutants (Figure 8). Most of the glycolytic and late fatty acid biosynthetic genes assayed (*PDH-E1a/At1g01090*, *BCCP2/At5g15530*, *MAT/At2g30200*, *KASI/At5g46290*, and *ENR/At2g05990*) were significantly downregulated in the triple mutants. However, *FATA* (At3g25110) was an exception to this rule. The relative mRNA levels of genes involved in cuticle formation (*CYP86A2/At4g00360*, *CYP86A8/At2g45970*, *CYP77A6/At3g10570*, *GPAT4/At1g01610*, *GPAT6/At2g38110*, and *GPAT8/At4g00400*) were unchanged in the mutant lines.

DISCUSSION

Factors controlling the rate of fatty acid production in plants and the integration of this biochemical process into the framework of plant development have long remained unknown. The isolation and characterization of the WRI1 transcription factor provided important insights into the regulation of acyl chain production (Cernac and Benning, 2004). In particular, these studies highlighted the importance of transcriptional regulation in the coordinated activation of the fatty acid biosynthetic pathway (Baud et al., 2009). Here, we report the identification and comprehensive characterization of WRI3 and WRI4, two transcription factors involved in the regulation of fatty acid biosynthesis in *Arabidopsis*. Like WRI1, they belong to the AP2-EREPB family of transcription factors. Complementary studies performed in yeast and in planta have established that these three factors share common target genes and activate the whole fatty acid biosynthetic pathway. However, the detailed analysis of *WRI1*, *WRI3*, and *WRI4* expression patterns revealed clearly distinct expression profiles, thus suggesting different biological functions of these factors. This was confirmed by the fine characterization of a collection of single, double, and triple knockout mutants. The data obtained indicate that only WRI1 enhances the transcription of fatty acid biosynthetic genes in maturing seeds, while in developing petals and sepals, the three transcription factors are involved in the activation of fatty acid biosynthesis. In seeds, sustained rates of acyl chain production are required for massive TAG storage, whereas in floral organs, high rates of fatty acid production are essential for cutin production. These analyses establish another physiological consequence of deficiency in *WRI1*-like genes and allow us to demonstrate the importance of these WRI transcription factors in the provision of acyl chains for the biosynthesis of different classes of complex lipids. Taken together, these data allow a better understanding of how fatty acid biosynthesis can be developmentally regulated to answer various cellular demands with respect to acyl chain supply.

New Transcriptional Regulators of the Fatty Acid Biosynthetic Pathway

The transcription factor WRI1 was the first positive regulator of fatty acid biosynthesis identified in plants (Cernac and Benning, 2004). However, the only lipid biosynthesis defect in the *wri1* alleles was a severe depletion in storage lipids of maturing seeds (Focks and Benning, 1998). Seed germination and seedling establishment were also altered in these mutants (Cernac et al.,

Figure 4. (continued).

(B) Accumulation of *WRI* mRNAs in mutant *wri* seeds was quantified 12 DAA by quantitative RT-PCR and presented as percentage of the constitutive *EF1 α 4* gene expression. Values are the means and \pm SE of three replicates performed on three independent cDNA preparations obtained from batches of seeds dissected from four to five siliques. The three silique sets were harvested on distinct individuals.

(C) The fatty acid concentrations of dry seeds obtained from *wri* mutants were determined by gas chromatography analysis. Values are the means and \pm SE of five replicates performed on batches of 20 seeds from five distinct individuals. DW, dry weight.

(D) The expression levels of two fatty acid biosynthetic genes, *BCCP2* and *PDH-E1a*, were investigated in developing seeds aged 12 DAA in different *wri* mutant lines by quantitative RT-PCR and presented as percentage of the constitutive *EF1 α 4* gene expression. Values are the means and \pm SE of three replicates performed on cDNA dilutions obtained from three independent mRNA extractions.

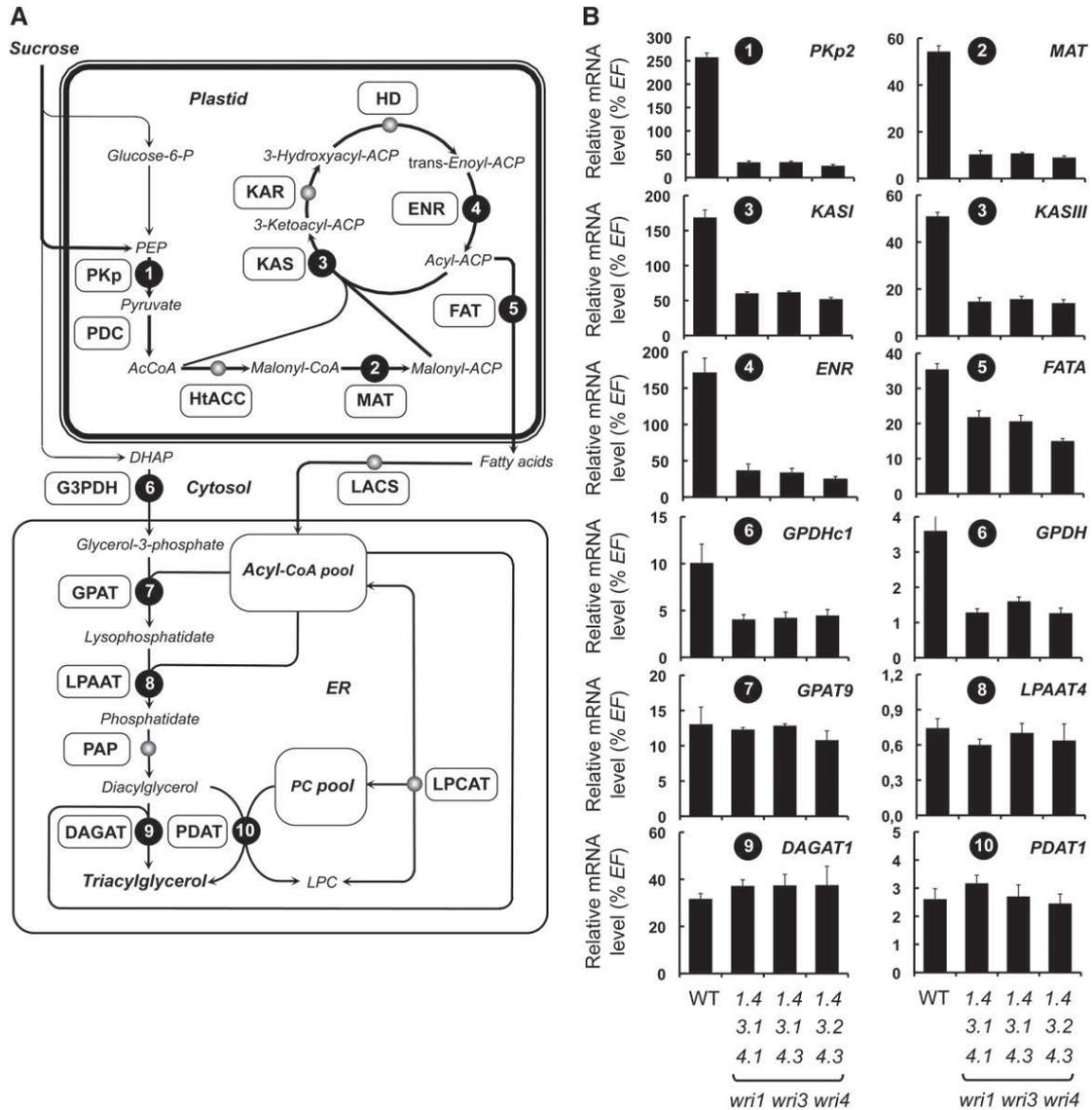


Figure 5. Expression of Genes Involved in Fatty Acid Biosynthesis and TAG Assembly in Maturing Seeds of *wri1 wri3 wri4* Mutants.

(A) Simplified scheme of carbon metabolism leading to TAG synthesis in maturing embryos of *Arabidopsis*. AcCoA, acetyl-CoA; ACP, acyl carrier protein; DAGAT, diacylglycerol acyltransferase; DHAP, dihydroxyacetone-3-phosphate; ENR, enoyl-ACP reductase; FAT, fatty acyl-ACP thioesterase; G3PDH, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase; HD, 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase; HtACC, heteromeric acetyl-CoA carboxylase; KAR, 3-ketoacyl-ACP reductase; KAS, 3-ketoacyl-ACP synthase; LACS, long-chain acyl-CoA synthetase; LPAAT, lysophosphatidic acid acyltransferase; LPC, lysophosphatidylcholine; LPCAT, acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase; MAT, malonyl-CoA: ACP transacylase; PAP, phosphatic acid phosphohydrolase; PC, phosphatidylcholine; PDAT, phospholipid:diacylglycerol acyltransferase; PDC, pyruvate dehydrogenase complex; PEP, phosphoenolpyruvate; PKp, plastidial pyruvate kinase.

(B) The expression patterns of genes encoding several enzymes of fatty acid or TAG biosynthetic pathways were investigated by quantitative RT-PCR and presented as percentage of the constitutive *EF1α4* (*EF*) gene expression. Values are the means and *SE* of three replicates performed on three independent cDNA preparations obtained from batches of seeds dissected from four to five siliques. The three silique sets were harvested on distinct individuals. WT, the wild type (*Col-0*).

2006), while further vegetative development and flowering were unmodified, suggesting that acyl chain production was not significantly altered during the majority of the plant life cycle. Accordingly, transcriptional activity of fatty acid biosynthetic genes was not compromised in the vegetative tissues of *wri1* plants.

These observations led to the conclusion that the transcriptional machinery regulating the fatty acid biosynthetic pathway may contain distinct and partially redundant factors. The yeast one-hybrid screening procedure performed in this study allowed the identification of two new transcription factors regulating the fatty

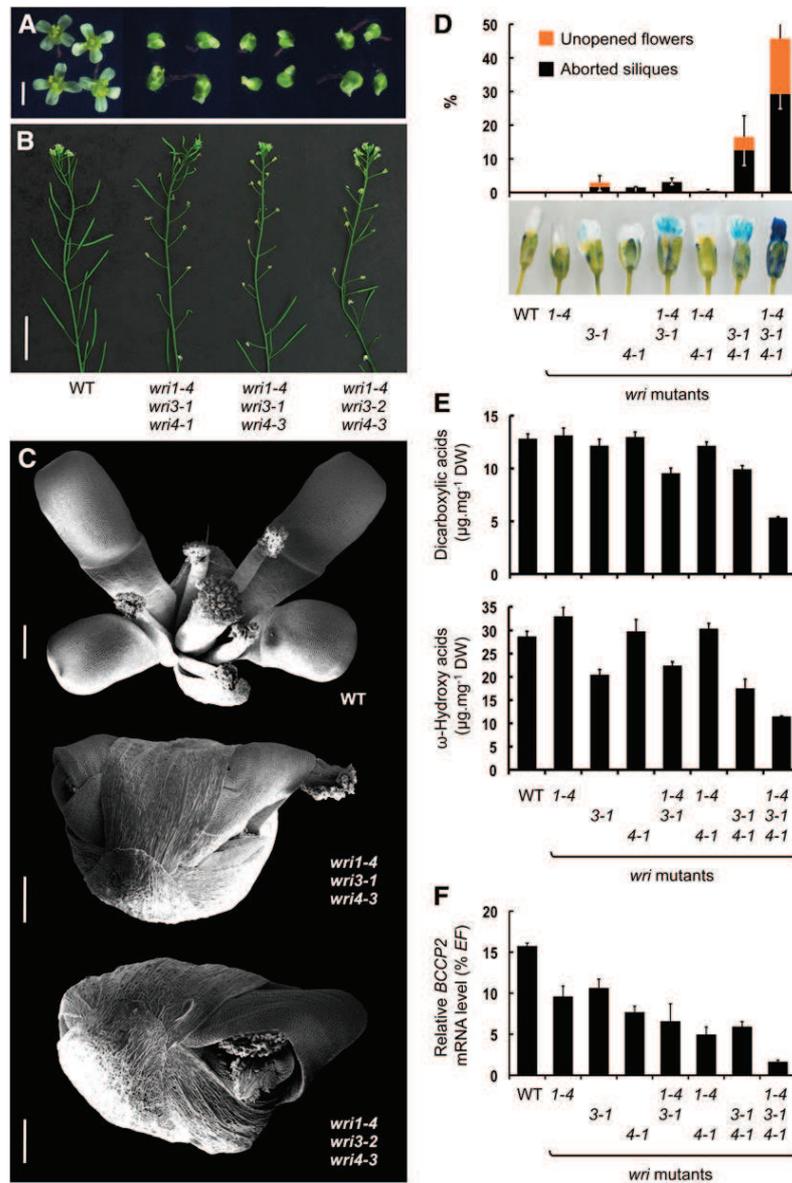


Figure 6. Flower Phenotypes of *wri1 wri3 wri4* Mutants Resulting from Altered Cutin Synthesis in Petals and Sepals.

(A) Microscopy observations of wild-type and mutant flowers. Bar = 2 mm.

(B) Observations of wild-type (WT) and mutant inflorescence stems. Bar = 2 cm.

(C) Scanning electron micrographs of wild-type and mutant flowers. Bars = 300 μm .

(D) Flower phenotypes and floral tissue permeability. Percentages of unopened flowers and aborted siliques on inflorescence stems of wild-type and mutant lines are presented. Values are the means and SE of observations performed on five different plants. On average, 100 to 150 flowers were observed for each plant considered. Permeability to toluidine blue of the epidermis of petals and sepals of wild-type and mutant lines is presented (bottom panel). Representative flowers are shown.

(E) Cutin monomer composition of flowers in a set of *wri* mutant lines: sum of all dicarboxylic and ω -hydroxy acids calculated on a dry weight basis of delipidated material. Values are the means and SE of three replicates performed on different plants.

(F) Accumulation of *BCCP2* mRNA in sepals and petals measured by quantitative RT-PCR. The results obtained were standardized to the constitutive *EF1 α A4* (*EF*) gene expression level. Values are the means and SE of three to six replicates performed on cDNA dilutions obtained from three independent mRNA extractions.

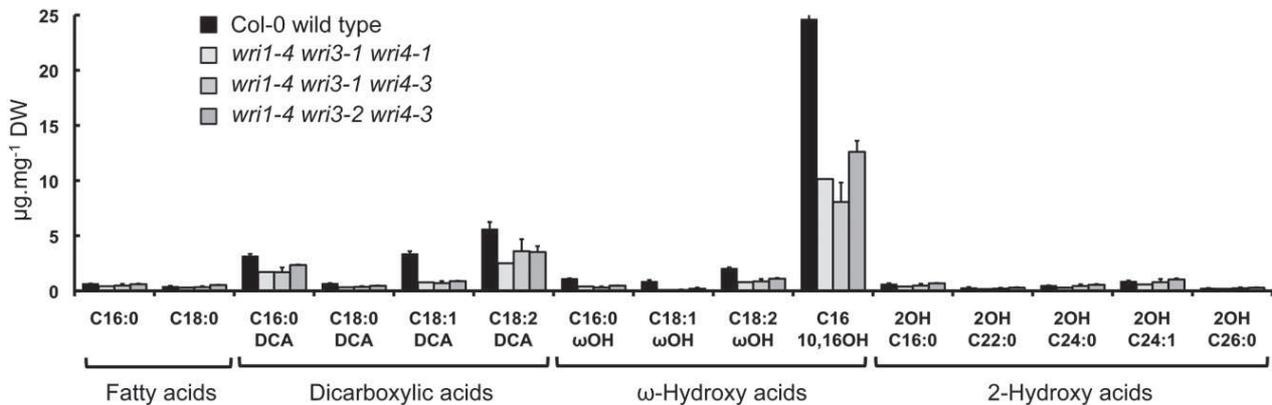


Figure 7. Cutin Production in the Flowers of *wri1 wri3 wri4* Mutants.

Amounts of cutin monomers are expressed on a dry weight basis of delipidated material. Each constituent is designated by carbon chain length and labeled by chemical class along the x axis. Values are the means and SE of three replicates performed on different plants. DW, dry weight.

acid biosynthetic pathway, WRI3 and WRI4. They belong to the AP2-EREBP family of transcription factors, and they are closely related to WRI1. Like WRI1, they are able to interact with promoter sequences of *BCCP1* and *BCCP2* in yeast, while their ectopic expression in transgenic *Arabidopsis* leads to the over-accumulation of several fatty acid biosynthetic mRNAs. Complementation of the *wri1-4* phenotype by seed-specific expression of either *WRI3* or *WRI4* ultimately demonstrated the ability of both factors to efficiently activate the whole fatty acid biosynthetic pathway. Whereas Cernac and Benning (2004) have reported that expression of *WRI1* cDNA under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter leads to slightly increased seed oil content, neither the expression of *Pro35Sdual:WRI1* and *ProS2:WRI1* transgenes in a wild-type background (Baud et al., 2009) nor the introduction of *ProAT2S2:WRI1* in a *wri1-4* mutant background (this study) leads to efficient over accumulation of oil in the corresponding transgenic seeds. Several factors like growth conditions or strength and specificity of the different promoters used may explain these apparent discrepancies.

The high sequence similarity observed between the AP2 DNA binding domains of WRI1, WRI3, and WRI4 proteins suggests that the three factors may recognize and bind to a similar *cis*-regulatory element previously identified (Maeo et al., 2009). If the related WRI2 protein also possesses transcriptional activity (Figure 2A), this factor is neither able to interact with the promoter sequences of the fatty acid biosynthetic genes tested (Figures 1B and 1C) nor able to activate the corresponding biosynthetic pathway (Figures 2B to 2D). One explanation for this may reside in the amino acid sequence of the second AP2 domain of WRI2 which, in contrast with the first AP2 domain, strongly diverges from the other WRIs and may consequently impair the binding of WRI2 to the *cis*-elements recognized by WRI1, WRI3, and WRI4 (see Supplemental Figure 7 online). Nevertheless, *WRI2* mRNA was detected in many plant tissues (see Supplemental Figure 8A online), and a strong induction of this gene was observed in drying siliques. If WRI2 cannot activate fatty acid biosynthesis, the question of its ability to disrupt a functional transcription factor complex involving other WRIs remains an open question.

Many transcriptional activators achieve their function by acting as part of multiprotein complexes, and truncated or modified versions of these transcription factors have been reported to prevent the formation of activating complexes and/or to interfere with subsequent transcriptional activation (Kim et al., 2008; Wang et al., 2009; Zhang et al., 2009). That said, the fine characterization of *wri2* T-DNA insertion alleles and of *WRI2* over-expressing lines allows us to rule out any negative effect of WRI2 on transcriptional activation of fatty acid biosynthesis and oil accumulation in seeds (see Supplemental Figures 8B to 8E online). Therefore, it is tempting to speculate that the function of WRI2, if any, may not be related to fatty acid biosynthesis, and further studies are required to elucidate the role of this transcription factor.

WRI Transcription Factors Are Essential to Ensure Proper Floral Organ Formation

The fine characterization of the collection of *wri* mutants has allowed us to establish a new physiological consequence of deficiency in *WRI1*-like genes. In developing petals and sepals, WRI1, WRI3, and WRI4 are implicated in the activation of the fatty acid biosynthetic pathway. High rates of acyl chain production in these tissues appear to be essential for cutin biosynthesis. The lack of the WRI transcription factors led to significant decreases in the amount of major cutin monomers produced by *wri1 wri3 wri4* flowers. Indeed, the main cutin monomer in flowers (10,16-dihydroxypalmitate) was decreased by more than 50%. Cutin is an insoluble polymer composed of interesterified fatty acids. Present at the surface of epidermal cells, cutin is embedded and overlaid with waxes and constitutes the structural component of the cuticle. In petals and sepals, this thick extracellular lipid barrier not only increases protection against dehydration, but also prevents the adhesion of floral organs between each other during flower development. In *wri1 wri3 wri4* flowers, reduced cutin production altered tissue permeability and dramatically increased the susceptibility of flowers to organ fusion, leading to semisterility. Similar

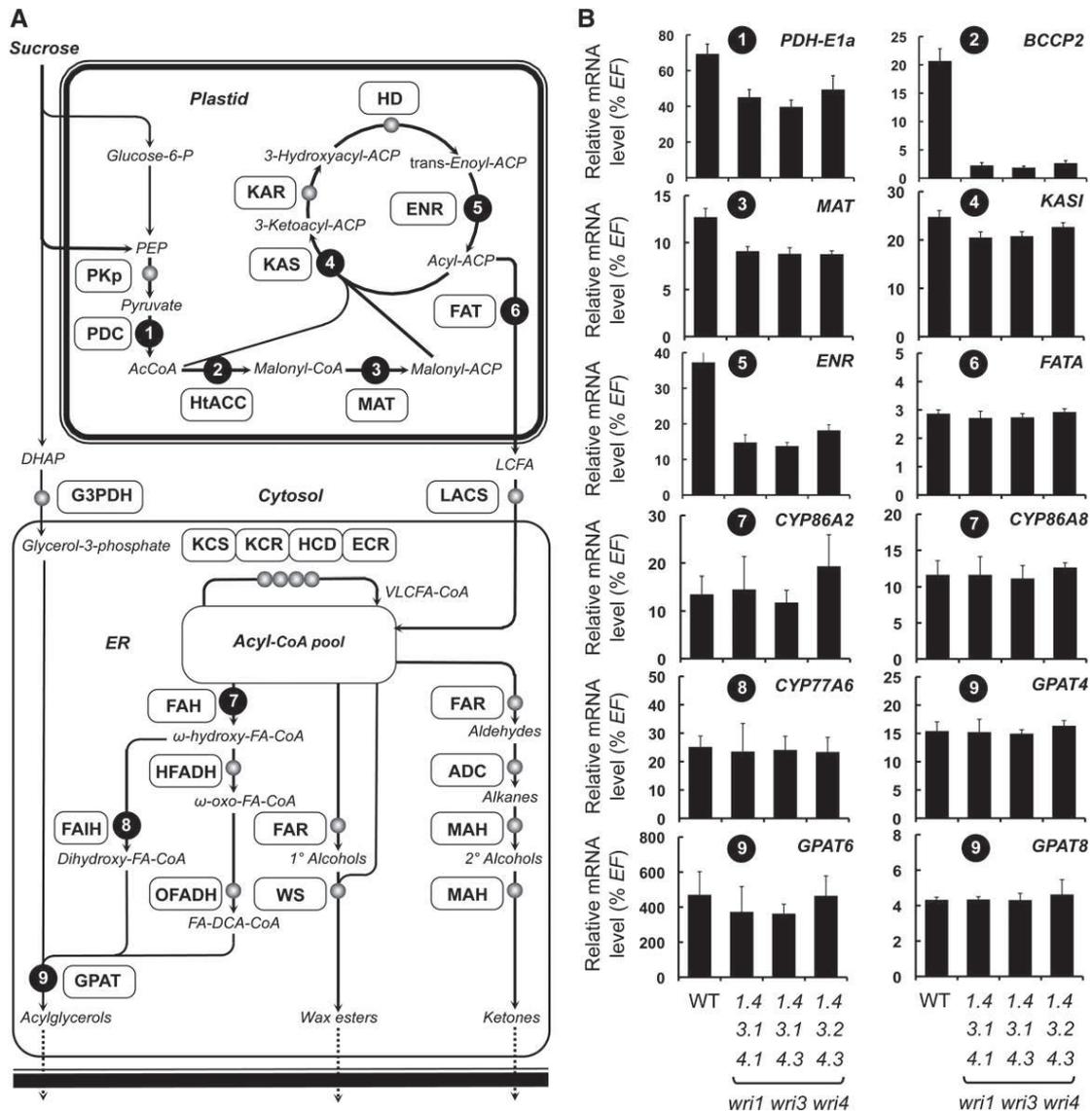


Figure 8. Expression of Genes Involved in Fatty Acid Biosynthesis and Cuticle Production in Petals and Sepals of *wri1 wri3 wri4* Mutants.

(A) Simplified scheme of carbon metabolism leading to cuticle synthesis in sepals and petals of *Arabidopsis*. AcCoA, acetyl-CoA; ACP, acyl carrier protein; ADC, aldehyde decarbonylase; DCA, dicarboxylic acid; ECR, enoyl-CoA reductase; ENR, enoyl-ACP reductase; FA, fatty acid; FAH, fatty acid hydroxylase; FAIH, fatty acyl in-chain hydroxylase; FAR, fatty acid reductase; FAT, fatty acyl-ACP thioesterase; G3PDH, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase; HCD, hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; HD, 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase; HFADH, ω -hydroxy fatty acyl dehydrogenase; HtACC, heteromeric acetyl-CoA carboxylase; KAR, 3-ketoacyl-ACP reductase; KAS, 3-ketoacyl-ACP synthase; KCR, ketoacyl-CoA reductase; KCS, ketoacyl-CoA synthase; LACS, long-chain acyl-CoA synthetase; LCFA, long-chain fatty acid; MAH, mid-chain alkane hydroxylase; MAT, malonyl-CoA:ACP transacylase; OFADH, ω -oxo fatty acyl dehydrogenase; PDC, pyruvate dehydrogenase complex; PEP, phosphoenolpyruvate; PKp, plastidial pyruvate kinase; VLCFA, very-long-chain fatty acid; WS, wax synthase.

(B) The expression patterns of genes encoding several enzymes of fatty acid or cuticle biosynthetic pathways were investigated by quantitative RT-PCR and presented as percentage of the constitutive *EF1 α 4* (*EF*) gene expression. Values are the means and \pm SE of three replicates performed on cDNA dilutions obtained from three independent mRNA extractions. WT, the wild type (Col-0).

phenotypes have been reported for mutants affected in genes encoding enzymes involved in cuticle and wax production or proteins participating in the transport of these molecules (Wellesen et al., 2001; Panikashvili et al., 2010). Interestingly, another group of three transcription factors of the AP2-EREBP

family (namely, SHINE1/WAX INDUCER1, SHINE2, and SHINE3) was previously shown to regulate cutin biosynthesis and to ensure proper floral organ morphology and surface formation (Broun et al., 2004; Shi et al., 2011). Whereas the WRI transcription factors activate genes involved in de novo fatty acid production

in the plastids, SHINE targets encode proteins located further downstream in the cutin biosynthetic network (e.g., formation of acyl-CoA species in the cytosol or fatty acid elongation within the endoplasmic reticulum) (Kannangara et al., 2007). However, members of the SHINE family not only regulate genes encoding cutin biosynthetic enzymes, they also control epidermal cell wall formation through regulating pectin metabolism and structural proteins (Kannangara et al., 2007; Shi et al., 2011). Another transcription factor, MYB30, has been proposed to regulate the biosynthesis of very-long-chain fatty acids and very-long-chain fatty acid-derived lipids, such as cuticular components during the incompatible interaction between *Arabidopsis* and avirulent bacterial pathogens (Raffaele et al., 2008). The list of the putative targets of MYB30, which comprises fatty acid-modifying enzymes and lipid assembling enzymes, is not redundant with that of the WRI family. To date, WRIs thus remain the only known transcriptional regulators of de novo fatty acid synthesis in plants.

WRI1 Is the Only Member of the WRI Clade Triggering High Rates of Acyl Chain Production in Seeds

The involvement of the three WRIs in fatty acid metabolism of petals and sepals is consistent with the comparable *WRI* mRNA levels measured in these organs. However, a characterization of the expression patterns of the *WRI* genes revealed contrasted profiles within some tissues. In developing seeds, for instance, *WRI1* was dramatically induced, whereas *WRI3* and *WRI4* mRNAs were barely detectable (Lee et al., 2009; this study). In agreement with these observations, *WRI1* was the only member of the family participating in the activation of fatty acid biosynthesis in maturing embryos to provide acyl chains for TAG production. These observations show that the respective importance of the WRIs in a given tissue is proportional to their relative mRNA accumulation. The functional dissection and comparison of the three *WRI* promoters would be essential to understand both the basal activity of the *WRIs* in some plant organs and their specific induction in other tissues. Of particular interest would be the elucidation of the activation of *WRI1* in seeds. Previous reports have shown that master regulators of the maturation process like *LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*) or *LEC2* could directly regulate *WRI1* transcription (reviewed in Baud and Lepiniec, 2010). However, a close examination of the *WRI1* minimal promoter reveals that this nucleotide sequence lacks the *cis*-regulatory elements usually recognized by these transcription factors. Further studies are under way to elucidate this original and as yet unknown transcriptional regulatory process involving some of the key master regulators of seed maturation.

Missing Elements in Our Current Understanding of the Regulation of Fatty Acid Biosynthesis in Plants

In maturing embryos, as in floral organs, *WRI* targets consist of enzymes catalyzing late glycolysis and de novo fatty acid synthesis, whereas most enzymes involved in fatty acid modification or lipid (TAG in the seeds or cutin in floral organs) assembly escape this regulation. Importantly, two genes encoding glycerol-3-

phosphate dehydrogenase, the enzyme providing glycerol backbones for the synthesis of TAGs, are also downregulated in the absence of the WRIs (Figure 5). These results are consistent with recent transcriptomic data obtained with transgenic maize lines overexpressing *Zm Wri1a*, one of the orthologs of *At WRI1* in maize (Pouvreau et al., 2011). Members of the *WRI* family thus behave as transcriptional enhancers differentially activated during the course of plant development to provide precursor molecules (acyl chains and glycerol backbones) for lipid biosynthesis. The expression of genes involved in lipid assembling pathways is activated by distinct transcription factors, including members of the SHINE family, MYB30, or master regulators of the seed maturation program (e.g., *LEC2*). The downregulation of *ROD1* observed in the triple mutants highlights the importance of now identifying direct targets of the WRIs in an exhaustive manner, by means of chromatin immunoprecipitation strategies for instance. If the analysis of *Arabidopsis wri* mutants has allowed us to show the importance of the WRIs in the production of seed TAGs or floral cutin, the expression patterns of the WRIs suggest that they might be involved in the production of different types of lipids in other tissues (e.g., pollen grains or nectaries). The limited size of our model species seriously hampers lipidomic analyses of such tissues, but other plant systems could be used for further investigations (e.g., rapeseed).

If the fine characterization of the triple *wri1 wri3 wri4* mutants revealed severe defects in flower development and seed filling, it is interesting to note that transcription of fatty acid biosynthetic genes was not completely abolished in these mutant backgrounds. Accordingly, and once seedling establishment was achieved, vegetative growth of the mutant plants was not altered, at least under controlled growth conditions. These observations demonstrate that the WRIs are transcriptional enhancers of the fatty acid biosynthetic pathway triggering high rates of acyl chain production when/where needed, while other actors may ensure basal transcriptional activity of the fatty acid biosynthetic genes. Both the identity and the mode of action of these actors remain unknown. So far, it is not possible to exclude that other AP2/EREBP proteins related to the WRIs could substitute for them. However, the occurrence of *cis*-regulatory elements different from the AW-box bound by *WRI1* (Maeo et al., 2009) and essential for the activation of fatty acid biosynthetic genes (Baud et al., 2009) suggests the involvement of other classes of transcriptional regulators.

Finally, alterations (resulting from T-DNA insertions or overexpression strategies) of *WRI1* (Cernac et al., 2006) or *WRI3* (Lee et al., 2009) expression levels in *Arabidopsis* have been shown to interfere with abscisic acid signaling, especially in germinating seedlings. Complementary studies would be required to elucidate the molecular mechanism(s) linking fatty acid production and abscisic acid-related phenotypes.

Conclusion and Future Prospects

In summary, we show here that *WRI1*, *WRI3*, and *WRI4* define a class of AP2-EREBP transcription factors involved in the transcriptional activation of the fatty acid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. Their clearly different expression patterns allow triggering of high rates of acyl chain production in a developmentally

regulated manner, thus providing precursors for various lipid biosynthetic pathways. In particular, the demonstration of cutin-deficient phenotype for the triple mutants establishes a new physiological consequence of deficiency in *WRI1*-like genes. This study then suggests that the WRIs behave as transcriptional enhancers, and further work will be required to isolate and characterize transcriptional regulators responsible for basal activation of the fatty acid biosynthetic pathway, if any. Ultimately, the full elucidation of the regulation of fatty acid production in plants will require the further deciphering of posttranscriptional regulations fine-tuning this biosynthetic network. For instance, recent studies have established that plastidial heteromeric acetyl-CoA carboxylase, considered as a key regulatory enzyme of the fatty acid biosynthetic pathway, is subjected to a negative regulation mediated either by regulatory proteins (PII; Feria Bourrellier et al., 2010) or by products of the fatty acid synthase complex (18:1-ACP; Andre et al., 2012).

METHODS

Plant Material and Growth Conditions

Arabidopsis thaliana seeds of Col-0 and Wassilewskija accessions were obtained from the *Arabidopsis thaliana* resource center for genomics at the Institut Jean-Pierre Bourgin, and T-DNA mutant lines were ordered from the Salk Institute. Plants were cultured as described previously (Baud et al., 2007a). Phenotyping of the mutants was performed in growth chambers (16-h-light photoperiod, 18°C night/21°C day, and 65% relative humidity). Material used for RNA extraction was frozen in liquid nitrogen immediately after harvest and then stored at -80°C prior to extraction.

Molecular Characterization of T-DNA Mutants

Plant genomic DNA flanking the left T-DNA borders of the Salk mutants were amplified by PCR and sequenced to confirm the FSTs identified. Molecular characterization of *wri1-3* and *wri1-4* alleles was previously described (Baud et al., 2007b). In the *wri3-1* line (N656326), the T-DNA insertion was located in the 3rd intron of the *WRI3* gene. To amplify the T-DNA left border, WL2R1 (5'-AGTAGCAAAAATGTTGGGG-3') and SigLB2 (5'-TGTTGCCCGTCTCACTGG-3') were used. The right T-DNA border could not be attained in this line. To amplify the T-DNA left border in *wri3-2* (N625491; insertion located in the 7th intron of the *WRI3* gene), WL2R3 (5'-GTTTTACTCCCCAACTATTATG-3') and SigLB2 were used. The opposite border was amplified with WL2F3 (5'-GCATTGAGTT-TATTAGTGTTAG-3') and SigLB1 (5'-CGGAACCACCATCAAACAG-3'); this border appeared to be a second left border, indicating that a complex insertion event had occurred in the *wri3-2* line. In the *wri4-1* line (N518113), the T-DNA insertion was located in the 2nd exon of the *WRI4* gene. To amplify the T-DNA left border, WL3R1 (5'-CTCACCTAGATAAACTGCACCTG-3') and SigLB2 were used. The right T-DNA border could not be attained. To amplify the T-DNA left border in *wri4-2* (N505384; insertion located in the 7th intron of the *WRI4* gene), WL3F3 (5'-ATAATGGGAGATGGGAG-3') and SigLB2 were used. The opposite border was amplified with SigLB1 and WL3R3 (5'-GTTCGTTGACTA-CATTCATG-3'); this border appeared to be a second left border, indicating that a complex insertion event had occurred in the *wri4-2* line. In the *wri4-3* line (N546920), the T-DNA insertion was located in the 8th exon of the *WRI4* gene. To amplify the T-DNA left border, WL3F5 (5'-GAT-CAGATGACATGCATATTC-3') and SigLB2 were used. The right T-DNA border could not be attained in this line. In the *wri2-1* line (N838658), the T-DNA insertion took place in the 2nd exon of the *WRI2* gene. To amplify the

T-DNA left border, WL1F0 (5'-GGAGCTAAATTATCTGGAATCTG-3') and SAILLB1 (5'-GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTCC-3') were used. The right T-DNA border could not be attained in this line. To amplify the T-DNA left border in *wri2-2* (N611105; insertion located in the 6th exon of the *WRI2* gene), WL1R2 (5'-GTATGAATGTTAATTGTGAGAAAG-3') and SigLB1 were used. The opposite border was amplified with SigLB1 and WL1F2 (5'-CACTGTTTTAGCTACATGC-3'); this border appeared to be a second left border, indicating that a complex insertion event had occurred in the *wri2-2* line.

Constructs and Plant Transformation

Construction of the ProWRI:uidA Transgenes

For construction of the *ProWRI3:uidA* transgene, region -1000 to -1 bp relative to the *WRI3* translational start codon was amplified with the proofreading Pfu Ultra DNA polymerase (Stratagene) from Ws genomic DNA using 5'-attB1-TCCATCTAGTTAAGGGGCAG-3' and 5'-attB2-CAAAAGAGAGGAAGAAGAAGA-3', attB1 and attB2 referring to the corresponding Gateway recombination sequences. The PCR product was introduced by BP recombination into the pDONR207 entry vector (Invitrogen) and transferred into the destination vector pBI101-R1R2-GUS (Baud et al., 2007b) by LR recombination.

For construction of the *ProWRI4:uidA* transgene, a similar procedure was adopted. Primer sequences were as follows: 5'-attB1-TCTTAAATGCTT-ACTTATGATTCAG-3' and 5'-attB2-CTACCGGTGAATGAGAAGA-3'. Construction of the *ProWRI1:uidA* transgene was previously described (Baud et al., 2009). Resulting binary vectors were electroporated into *Agrobacterium tumefaciens* C58C¹ strain and used for agroinfiltration of flower buds of *Arabidopsis* (Bechtold et al., 1993). Primary transformants were selected on Murashige and Skoog (MS) medium containing kanamycin ($50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and transferred to soil for further characterization. For each construct, between 17 and 19 independent transgenic lines were considered.

Construction of the Pro35Sdual:WRI Transgenes

For construction of the *Pro35Sdual:WRI2* transgene, *WRI2* cDNA was amplified with 5'-attB1-ATGGCGTCGGTGC-3' and 5'-attB2-TCATTC-TCTTGTTGGGAGG-3', cloned in pDONR207, and finally transferred to the binary vector pMDC32 (Curtis and Grossniklaus, 2003) as previously described. For construction of *Pro35Sdual:WRI3* and *Pro35Sdual:WRI4* transgenes, a similar procedure was adopted. Primer sequences were as follows: 5'-attB1-TCATGTTTCATCGCCGTCGAA-3' (*WRI3* atg) and 5'-attB2-CTTAGCAATCATTTAACTCGC-3' (*WRI3* stop), 5'-attB1-TCATGG-CAAAAGTCTCTGG-3' (*WRI4* atg) and 5'-attB2-CTTAAGTCCATAAT-CAAATC-3' (*WRI4* stop). Construction of the *Pro35Sdual:WRI1* transgene was previously described (Baud et al., 2007b). Resulting binary vectors were electroporated into *Agrobacterium* C58C¹ strain and used for agroinfiltration of *wri1-4* plants. Primary transformants were selected on MS medium containing hygromycin ($50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and transferred to soil for further characterization.

Construction of ProAT2S2:WRI Transgenes

WRI cDNAs were transferred from pDONR207 to the binary vector ProAT2S2-R1R2-HYGRO (Pouvreau et al., 2011) by LR recombination. The corresponding binary vectors were electroporated into *Agrobacterium* C58C¹ strain and used for agroinfiltration of *wri1-4* flower buds. Primary transformants were selected on MS medium containing hygromycin ($50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). The progeny of these primary transformants (T2 seeds) was subjected to segregation analyses for hygromycin resistance, and lines segregating 3:1 were selected (heterozygous lines, one insertion locus). T2 lines were then grown in a greenhouse, and their progeny (T3

seeds) were subjected to segregation analyses. Lines producing 100% resistant plantlets were selected (homozygous lines, single insertion locus) and used for further characterization.

RNA Analyses

RNA extraction, reverse transcription, RT-PCR, and real-time quantitative RT-PCR were performed as previously described (Baud et al., 2004). Primers used for RT-PCR (Figure 4A) were as follows: 5'-GGGGA-CAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAATGAAGAAGCGCTTAACCACT-3' (*WRI1* atg) and 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGTCTCAGACC-3' (*WRI1* stop), *WRI3* atg and *WRI3* stop (see above), *WRI4* atg and *WRI4* stop (see above), 5'-ATGCCCCAGGACATCGTGATTCAT-3' (*EF* up) and 5'-TTGGCGCACCCCTAGCTGGATCA-3' (*EF* low). The sequences of primers used for real-time quantitative RT-PCR are indicated in Supplemental Table 1 online.

Yeast One-Hybrid Experiments

The pHis reporter plasmid containing a 180-bp fragment of the *BCCP2* promoter was constructed as previously described (Baud et al., 2009). This plasmid was integrated into the yeast strains EGY48 (Estojak et al., 1995; for screening of the REGIA cDNA expression library) and YM4271 (Liu et al., 1993; for validation of the candidates). To screen the REGIA cDNA expression library, 8 mL of liquid yeast peptone dextrose adenine medium inoculated with a single prey colony was incubated overnight at 28°C with regular shaking. The yeast strains constituting the REGIA expression library (Paz-Ares, 2002) were grown on solid yeast peptone dextrose adenine and inoculated with 5 µL of prey culture. Mating of yeast strains was allowed by incubation at 28°C during 24 h. Successful mating cells were selected on synthetic dropout medium (SD)-Trp-Ura and then resuspended in 100 µL of sterile water. Finally, 5 µL of yeast suspension were transferred on screening plates (SD)-Trp-Ura-His; several concentrations of 3-aminotriazole were tested, from 0 to 5 mM.

To validate the candidate genes isolated, *WRI1*, *WRI2*, *WRI3*, and *WRI4* cDNAs were cloned into the pDEST22 vector (Invitrogen) to be expressed in yeast as GAL4 activating domain fusions. cDNAs cloned into the pDONR207 (see above) were transferred into the pDEST22 expression vector by LR recombination. YM4271 yeast cells presenting the *HIS3* reporter gene under the control of a functional *BCCP2* promoter (see above) were transformed with pDEST22 according to the AcLi/SSDNA/PEG method (Gietz and Woods, 2002). Transformants were selected on appropriate media. Construction of *ProBAN:HIS* and *ProBCCP1:HIS* was described previously (Baud et al., 2010).

The reporter plasmid used for β -galactosidase assays was made by inserting a 180-bp fragment of the *BCCP2* promoter into the pLacZi vector (Luo et al., 1996). This fragment was amplified by PCR with the proofreading Pfu Ultra DNA polymerase (Stratagene) using 5'-GGA-ATTCCACAAAAGGAGCGGTTTGG-3' and 5'-TCCGTCGACGGATGTTGAGACAGTGGACGATG-3', digested by *EcoRI* and *Sall*, and inserted into pLacZi between the *EcoRI* and *Sall* sites. This plasmid was then digested with *Apal* and integrated into the yeast strain YM4271 at the *URA3* locus. The resulting yeast strains, selected on a medium lacking uracil, were then cotransformed with the pDEST22 vector allowing expression of *WRI1*, *WRI2*, *WRI3*, or *WRI4* using the AcLi/SSDNA/PEG method (Gietz and Woods, 2002). Transformants were selected on appropriate media and β -galactosidase activity was measured on liquid cultures using *o*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside as a substrate, as recommended by the constructor (Yeast Protocol Handbook; Clontech).

To determine whether the candidate transcription factors isolated possessed transcriptional activity, *WRI1*, *WRI2*, *WRI3*, and *WRI4* cDNAs were cloned into the pDEST32 vector (Invitrogen) to be expressed in yeast as fusions with GAL4-DBD. The cDNAs previously cloned in pDONR207

(see above) were transferred into the pDEST32 expression vector by LR recombination. AH109 yeast cells were transformed with pDEST32 according to the AcLi/SSDNA/PEG method (Gietz and Woods, 2002). Transformants were selected on appropriate media.

Lipid Analyses

For determination of seed oil content, total fatty acid analyses were performed on pools of 20 dry seeds as previously described (Li et al., 2006). For determination of flower cutin polyester composition, tissues were collected and immersed in hot isopropanol for 10 min at 80°C. After cooling, samples were extensively delipidated by extracting the soluble lipids, then dried and depolymerized. Extraction, derivatization, and analysis were performed as previously described (Domergue et al., 2010).

Microscopy

To obtain scanning electron micrographs, dry seeds or freshly harvested flowers were mounted onto a Peltier cooling stage using adhesive discs (Deben) and observed with a SH-1500 tabletop scanning electron microscope (Hirox). Histochemical detection of GUS activity and bright-field microscope observations were performed as described by Baud et al. (2007a). To test the permeability of floral tissues, flowers without stamens and pistils were dipped in a 0.05% (w/v) toluidine blue solution containing 0.01% (w/v) Tween 20 for 30 min, rinsed twice in distilled water prior to bright-field microscopy observations (Li-Beisson et al., 2009).

Phylogenetic Analysis

To perform distance analysis among AP2 transcription factors of the AP, AINTEGUMENTA, and WRI families, programs (with default values) proposed at <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/> were used: MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) version 6 for multiple alignments and NJ (Neighbor Joining, with 1000 bootstraps) for tree building. Alignments are provided in Supplemental Data Set 1 online, and a version of the distance tree presenting statistical support for nodes is provided as Supplemental Figure 9 online.

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL data libraries under the following accession numbers: *At2S2*, At4g27150; *BCCP1*, At5g16390; *BCCP2*, At5g15530; *CYP77A6*, At3g10570; *CYP86A2*, At4g00360; *CYP86A8/LCR*, At2g45970; *DAGAT1*, At2g19450; *ENR*, At2g05990; *EF1 α A4*, At5g60390; *FAE1/KCS18*, At4g34520; *FAD2*, At3g12120; *FAD3*, At2g29980; *FATA*, At3g25110; *GPAT*, At5g60620; *GPAT4*, At1g01610; *GPAT6*, At2g38110; *GPAT8*, At4g00400; *GPDH*, At3g07690; *GPDHc1*, At2g41540; *KASI*, At5g46290; *KASIII*, At1g62640; *LPAAT4*, At1g75020; *MAT*, At2g30200; *PDAT1*, At3g44830; *PDH-E1a*, At1g01090; *PKp2*, At5g52920; *ROD1*, At3g15820; *WRI1*, At3g54320; *WRI2*, At2g41710; *WRI3*, At1g16060; and *WRI4*, At1g79700.

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure 1. Relative Accumulation of *WRI* mRNAs in Siliques of Transgenic Lines.

Supplemental Figure 2. Expression of Genes Involved in Fatty Acid Modification in Maturing Seeds of *wri1 wri3 wri4* Mutants.

Supplemental Figure 3. Complementary Results for the Characterization of the Flower Phenotype of *wri* Mutants.

Supplemental Figure 4. Cutin Analyses of Inflorescence Stems and Rosette Leaves of the *wri1-4 wri3-1 wri4-1* Mutant.

Supplemental Figure 5. Cuticular Wax Composition of Wild-Type and *wri1 wri3 wri4* Flowers.

Supplemental Figure 6. *WRI* Relative mRNA Levels of *wri* Mutant Floral Organs.

Supplemental Figure 7. Alignment of Amino Acid Sequences Corresponding to the DNA Binding Domains of *WRI1*, *WRI2*, *WRI3*, and *WRI4*.

Supplemental Figure 8. Characterization of *WRI2*.

Supplemental Figure 9. Version of the Phylogram among AP2 Transcription Factors of the APETALA, AINTEGUMENTA, and WRINKLED Clades Presenting Statistical Support for Nodes.

Supplemental Table 1. Primers Used for Quantitative RT-PCR.

Supplemental Data Set 1. Text File of the Alignment of Amino Acid Sequences Corresponding to the Double AP2 Domains of the Transcription Factors of the APETALA, AINTEGUMENTA, and WRINKLED Clades.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Michael Hodges for critical reading of the article. We also thank Adeline Berger and Halima Morin (Plateforme de Cytologie et Imagerie Végétale Institut National de la Recherche Agronomique–Institut Jean-Pierre Bourgin) for their technical assistance, Michael Anjuere and Philippe Maréchal for care of the plants, Chloé Marchive for sharing material, Vincent Colot for providing the REGIA library, and Nathalie Berger for amplifying it. We thank Yonghua Li-Beisson, Philippe Guerche, and Martine Miquel for helpful discussions. Analyses of cuticular lipids were carried out on the Bordeaux Metabolome Platform. This work was supported by the French National Research Agency (SOLAR, Grant ANR-10-GENM-009). S.B. is a Chargé de Recherche at Centre National de la Recherche Scientifique.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.J. performed the research and analyzed the data. G.B., A.L., and A.S. performed the research. S.J. and L.L. designed the research and analyzed the data. A.T. and S.B. designed and performed the research, analyzed the data, and wrote the article.

Received October 9, 2012; revised November 27, 2012; accepted December 3, 2012; published December 14, 2012.

REFERENCES

- Andre, C., Haslam, R.P., and Shanklin, J. (2012). Feedback regulation of plastidic acetyl-CoA carboxylase by 18:1-acyl carrier protein in *Brassica napus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**: 10107–10112.
- Barthole, G., Lepiniec, L., Rogowsky, P.M., and Baud, S. (2012). Controlling lipid accumulation in cereal grains. *Plant Sci.* **185–186**: 33–39.
- Baud, S., Fera Bourrellier, A.B., Azzopardi, M., Berger, A., Dechorgnat, J., Daniel-Vedele, F., Lepiniec, L., Miquel, M., Rochat, C., Hodges, M., and Ferrario-Méry, S. (2010). PII is induced by WRINKLED1 and fine-tunes fatty acid composition in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **64**: 291–303.
- Baud, S., and Lepiniec, L. (2009). Regulation of *de novo* fatty acid synthesis in maturing oilseeds of *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* **47**: 448–455.
- Baud, S., and Lepiniec, L. (2010). Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Prog. Lipid Res.* **49**: 235–249.
- Baud, S., Mendoza, M.S., To, A., Harscoët, E., Lepiniec, L., and Dubreucq, B. (2007b). WRINKLED1 specifies the regulatory action of LEAFY COTYLEDON2 towards fatty acid metabolism during seed maturation in *Arabidopsis*. *Plant J.* **50**: 825–838.
- Baud, S., Vaultier, M.-N., and Rochat, C. (2004). Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **55**: 397–409.
- Baud, S., Wuilleme, S., Dubreucq, B., de Almeida, A., Vuagnat, C., Lepiniec, L., Miquel, M., and Rochat, C. (2007a). Function of plastidial pyruvate kinases in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **52**: 405–419.
- Baud, S., Wuilleme, S., To, A., Rochat, C., and Lepiniec, L. (2009). Role of WRINKLED1 in the transcriptional regulation of glycolytic and fatty acid biosynthetic genes in *Arabidopsis*. *Plant J.* **60**: 933–947.
- Bechtold, N., Ellis, J., and Pelletier, G. (1993). *In planta Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci.* **316**: 1194–1199.
- Bourdenx, B., Bernard, A., Domergue, F., Pascal, S., Léger, A., Roby, D., Pervent, M., Vile, D., Haslam, R.P., Napier, J.A., Lessire, R., and Joubès, J. (2011). Overexpression of *Arabidopsis* ECERIFERUM1 promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol.* **156**: 29–45.
- Bourgis, F., Kilaru, A., Cao, X., Ngando-Ebongue, G.F., Drira, N., Ohlrogge, J.B., and Arondel, V. (2011). Comparative transcriptome and metabolite analysis of oil palm and date palm mesocarp that differ dramatically in carbon partitioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 12527–12532.
- Broun, P., Poindexter, P., Osborne, E., Jiang, C.-Z., and Riechmann, J.L. (2004). WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 4706–4711.
- Cernac, A., Andre, C., Hoffmann-Benning, S., and Benning, C. (2006). *WRI1* is required for seed germination and seedling establishment. *Plant Physiol.* **141**: 745–757.
- Cernac, A., and Benning, C. (2004). WRINKLED1 encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* **40**: 575–585.
- Curtis, M.D., and Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes *in planta*. *Plant Physiol.* **133**: 462–469.
- Domergue, F., Vishwanath, S.J., Joubès, J., Ono, J., Lee, J.A., Bourdon, M., Alhattab, R., Lowe, C., Pascal, S., Lessire, R., and Rowland, O. (2010). Three *Arabidopsis* fatty acyl-coenzyme A reductases, FAR1, FAR4, and FAR5, generate primary fatty alcohols associated with suberin deposition. *Plant Physiol.* **153**: 1539–1554.
- Estojak, J., Brent, R., and Golemis, E.A. (1995). Correlation of two-hybrid affinity data with *in vitro* measurements. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 5820–5829.
- Fera Bourrellier, A.B., Valot, B., Guillot, A., Ambard-Bretteville, F., Vidal, J., and Hodges, M. (2010). Chloroplast acetyl-CoA carboxylase activity is 2-oxoglutarate-regulated by interaction of PII with the biotin carboxyl carrier subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 502–507.
- Focks, N., and Benning, C. (1998). *wrinkled1*: A novel, low-seed-oil mutant of *Arabidopsis* with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant Physiol.* **118**: 91–101.
- Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* **350**: 87–96.
- Harwood, J.L. (1996). Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1301**: 7–56.
- Kannangara, R., Branigan, C., Liu, Y., Penfield, T., Rao, V., Mouille, G., Höfte, H., Pauly, M., Riechmann, J.L., and Broun, P. (2007). The transcription factor WIN1/SHN1 regulates Cutin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**: 1278–1294.

- Kim, Y.-S., Kim, S.G., Lee, M., Lee, I., Park, H.Y., Seo, P.J., Jung, J.H., Kwon, E.J., Suh, S.W., Paek, K.H., and Park, C.M.** (2008). HD-ZIP III activity is modulated by competitive inhibitors via a feedback loop in *Arabidopsis* shoot apical meristem development. *Plant Cell* **20**: 920–933.
- Kunst, L., and Samuels, L.** (2009). Plant cuticles shine: Advances in wax biosynthesis and export. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 721–727.
- Lee, S.J., Cho, D.I., Kang, J.Y., and Kim, S.Y.** (2009). An ARIA-interacting AP2 domain protein is a novel component of ABA signaling. *Mol. Cells* **27**: 409–416.
- 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.
- Li-Beisson, Y., Pollard, M., Sauveplane, V., Pinot, F., Ohlrogge, J., and Beisson, F.** (2009). Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers require the synthesis of cutin polyester. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 22008–22013.
- Liu, J., Wilson, T.E., Milbrandt, J., and Johnston, M.** (1993). Identifying DNA-binding sites and analyzing DNA-binding domains using a yeast selection system. *Methods* **5**: 125–137.
- Luo, Y., Vijaychander, S., Stile, J., and Zhu, L.** (1996). Cloning and analysis of DNA-binding proteins by yeast one-hybrid and one-two-hybrid systems. *Biotechniques* **20**: 564–568.
- Maeo, K., Tokuda, T., Ayame, A., Mitsui, N., Kawai, T., Tsukagoshi, H., Ishiguro, S., and Nakamura, K.** (2009). An AP2-type transcription factor, WRINKLED1, of *Arabidopsis thaliana* binds to the AW-box sequence conserved among proximal upstream regions of genes involved in fatty acid synthesis. *Plant J.* **60**: 476–487.
- Masaki, T., Mitsui, N., Tsukagoshi, H., Nishii, T., Morikami, A., and Nakamura, K.** (2005). ACTIVATOR of Spo^{min}:LUC1/WRINKLED1 of *Arabidopsis thaliana* transactivates sugar-inducible promoters. *Plant Cell Physiol.* **46**: 547–556.
- Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Pelletier, G., Caboche, M., and Lepiniec, L.** (2000). The *TT8* gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis* siliques. *Plant Cell* **12**: 1863–1878.
- Ohlrogge, J., and Browse, J.** (1995). Lipid biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 957–970.
- Ohlrogge, J.B., and Jaworski, J.G.** (1997). Regulation of fatty acid synthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 109–136.
- Panikashvili, D., Shi, J.X., Bocobza, S., Franke, R.B., Schreiber, L., and Aharoni, A.** (2010). The *Arabidopsis* DSO/ABCG11 transporter affects cutin metabolism in reproductive organs and suberin in roots. *Mol. Plant* **3**: 563–575.
- Paz-Ares, J. Regia Consortium** (2002). REGIA, an EU project on functional genomics of transcription factors from *Arabidopsis thaliana*. *Comp. Funct. Genomics* **3**: 102–108.
- Pouvreau, B., Baud, S., Vernoud, V., Morin, V., Py, C., Gendrot, G., Pichon, J.-P., Rouster, J., Paul, W., and Rogowsky, P.M.** (2011). Duplicate maize Wrinkled1 transcription factors activate target genes involved in seed oil biosynthesis. *Plant Physiol.* **156**: 674–686.
- Raffaele, S., Vaillau, F., Léger, A., Joubès, J., Miersch, O., Huard, C., Blée, E., Mongrand, S., Domergue, F., and Roby, D.** (2008). A MYB transcription factor regulates very-long-chain fatty acid biosynthesis for activation of the hypersensitive cell death response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 752–767.
- Shen, B., Allen, W.B., Zheng, P.Z., Li, C.J., Glassman, K., Ranch, J., Nubel, D., and Tarczynski, M.C.** (2010). Expression of *ZmLEC1* and *ZmWRI1* increases seed oil production in maize. *Plant Physiol.* **153**: 980–987.
- Shi, J.X., Malitsky, S., De Oliveira, S., Branigan, C., Franke, R.C., Schreiber, L., and Aharoni, A.** (2011). SHINE transcription factors act redundantly to pattern the archetypal surface of *Arabidopsis* flower organs. *PLoS Genet.* **5**: e1001388.
- Tanaka, T., Tanaka, H., Machida, C., Watanabe, M., and Machida, Y.** (2004). A new method for rapid visualization of defects in leaf cuticle reveals five intrinsic patterns of surface defects in *Arabidopsis*. *Plant J.* **37**: 139–146.
- Wang, H., Zhu, Y., Fujioka, S., Asami, T., Li, J., and Li, J.** (2009). Regulation of *Arabidopsis* brassinosteroid signaling by atypical basic helix-loop-helix proteins. *Plant Cell* **21**: 3781–3791.
- Wasternack, C.** (2007). Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot. (Lond.)* **100**: 681–697.
- Wellesen, K., Durst, F., Pinot, F., Benveniste, I., Nettesheim, K., Wisman, E., Steiner-Lange, S., Saedler, H., and Yephremov, A.** (2001). Functional analysis of the *LACERATA* gene of *Arabidopsis* provides evidence for different roles of fatty acid omega -hydroxylation in development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 9694–9699.
- Zhang, L.-Y., et al.** (2009). Antagonistic HLH/bHLH transcription factors mediate brassinosteroid regulation of cell elongation and plant development in rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 3767–3780.

Annexe 12

Annexe 12



Review

Controlling lipid accumulation in cereal grains

Guillaume Barthole^a, Loïc Lepiniec^a, Peter M. Rogowsky^b, Sébastien Baud^{a,*}^a Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318 INRA-AgroParisTech, INRA Centre de Versailles-Grignon, Route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles, France^b Reproduction et Développement des Plantes, UMR879 INRA-CNRS-Université Lyon 1-ENS de Lyon, 46 allée d'Italie, F-69364 Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 July 2011

Received in revised form 2 September 2011

Accepted 2 September 2011

Available online 7 September 2011

Keywords:

Cereal

Maize

Oat

Seed

Oil

Regulation

ABSTRACT

Plant oils have so far been mostly directed toward food and feed production. Nowadays however, these oils are more and more used as competitive alternatives to mineral hydrocarbon-based products. This increasing demand for vegetable oils has led to a renewed interest in elucidating the metabolism of storage lipids and its regulation in various plant systems. Cereal grains store carbon in the form of starch in a large endosperm and as oil in an embryo of limited size. Complementary studies on kernel development and metabolism have paved the way for breeding or engineering new varieties with higher grain oil content. This could be achieved either by increasing the relative proportion of the oil-rich embryo within the grain, or by enhancing oil synthesis and accumulation in embryonic structures. For instance, diacylglycerol acyltransferase (DGAT) that catalyses the ultimate reaction in the biosynthesis of triacylglycerol appears to be a promising target for increasing oil content in maize embryos. Similarly, over-expression of the maize transcriptional regulators *ZmLEAFY COTYLEDON1* and *ZmWRINKLED1* efficiently stimulates oil accumulation in the kernels of transgenic lines. Redirecting carbon from starch to oil in the endosperm, though not yet realized, is discussed.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	33
2. Triacylglycerols in cereal grains	34
2.1. Distribution within the grain	34
2.2. Cellular localization, remobilization	34
3. Oil metabolism in cereal grains	35
4. Transcriptional regulation of oil metabolism	35
5. Breeding, biotechnological approaches, prospects and conclusion	37
Acknowledgments	39
References	39

1. Introduction

Vegetable oils constitute a key component of both human and livestock diets. As a direct consequence of a marked modification of diets of 2–3 billion people in the developing world and of the sharp increase of the world population, plant oil consumption is steeply increasing worldwide. Vegetable oil production has thus been multiplied by six over the last 50 years (<http://faostat.fao.org>).

Abbreviations: ATP, adenosine-5'-triphosphate; CoA, coenzyme A; EST, expressed sequence tag; LEC1, LEAFY COTYLEDON1; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; QTL, quantitative trait locus; TAG, triacylglycerol; WRI1, WRINKLED1.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 30 83 30 66; fax: +33 1 30 83 30 96.

E-mail addresses: Guillaume.barthole@versailles.inra.fr (G. Barthole), Loic.lepiniec@versailles.inra.fr (L. Lepiniec), Peter.rogowsky@ens-lyon.fr (P.M. Rogowsky), sebastien.baud@versailles.inra.fr (S. Baud).

Since fatty acids stored in seeds have a structure similar to aliphatic hydrocarbons found in petroleum, they also represent an alternative to hydrocarbon-based products for biofuel production [1] and synthons for green chemistry (e.g. detergents, paints, inks, plastics and lubricants) [2]. Fossil carbon is a limited resource, and in the light of rising environmental concerns, plant oils derived from oilseed crops are increasingly demanded for the provision of renewable industrial raw materials. Over the last decade, the relative proportion of rapeseed oil used for non-food purposes has thus increased from 5 to 30% [3].

To ensure that these new industrial uses of plant oil will not affect food supply at a time when the world population is estimated to be 9 billion people by 2050, the production of vegetable oil has to be dramatically increased [4]. This could be achieved by improving oil yields in oil crop species already widely cultivated – today, more than 80% of vegetable oil production relies upon palm oil (*Elaeis guineensis*), soybean (*Glycine max*), rapeseed (*Brassica napus*) and

sunflower (*Helianthus annuus*). Alternatively, new oil production systems are being considered. For instance, use of oilseed species capable of growing on non-arable land (e.g. *Jatropha curcas*) as well as production of oil by algae (either in tanks or in open ponds) have been proposed [5–7]. Furthermore, research is currently being carried out to trigger oil accumulation in vegetative organs of oilseed species [8]. Another way to generate new oil crop systems may consist in selecting or engineering cereals with increased grain oil content. Since cultivation of cereals is already widespread and agronomically optimized, this solution could become economically viable.

2. Triacylglycerols in cereal grains

2.1. Distribution within the grain

Cereal grains are composed of two zygotic tissues, namely the embryo (germ) and the endosperm, that are embedded in the maternal testa (or seed coat) and pericarp (or fruit wall), which fuse into a thin protective envelope (Fig. 1A). The aleurone layer that represents the outer cell layer(s) of the endosperm plays a key role during germination in the mobilization of reserve compounds stored in the endosperm [9]. The outer layer of the scutellum, a modified cotyledon (or seed leaf) of the embryo, also participates in this mobilization and absorbs nutrients coming from the endosperm during the germination process [10]. In most cereal grains, the large endosperm constitutes the major site of starch and seed storage protein deposition. Oil is mostly stored in the form of triacylglycerols (TAGs, esters of fatty acids and glycerol) within the embryo, which constitutes a rather limited part of the grain structure. Oil thus accounts for 2–3% of seed dry weight in wheat (*Triticum aestivum*) and barley (*Hordeum vulgare*) grains. The main fatty acid species accumulated are linoleate (C18:2), palmitate (C16:0), and oleate (C18:1) [11]. Oil content and lipid distribution within seeds have been precisely analyzed either by microdissection of the grain followed by GC analyses [12] or by non-destructive quantitative imaging of living seeds using nuclear magnetic resonance (NMR) [13]. In developing grains of barley for instance, the scutellum and nodular region of the embryo appear to be important sites of oil deposition, whereas the coleorhizae and coleoptile do not accumulate lipids [13]. Within the endosperm, steep gradients can be detected, with high lipid levels within the aleurone layer and very low lipid levels in the basal endosperm.

The kernel of maize is slightly richer in oil than the above mentioned cereal species. In traditional varieties, the kernel contains 4% oil by weight, this oil being accumulated in the embryo (preferentially in the scutellum) and in the aleurone layer [14,15]. The main fatty acid species found in maize oil are linoleate (60 mol%), oleate (25 mol%), and palmitate (12 mol%). Even though the oil content of traditional maize varieties is low, maize production is so widespread (one of the world's top three grains) that the total amount of oil available in maize kernels is sizeable (<http://faostat.fao.org>). The major portion of the maize kernel production and consequently of maize oil is used as feedstock for animal production (ruminant, pig and poultry). Oil contributes to feed efficiency due to its high caloric value. Maize oil is also a valuable by-product of the wet and dry milling to make maize meal, and is mainly used as edible vegetable oil. Over 2.2 Mt are produced every year, rivaling with olive oil (2.9 Mt) but lagging far behind palm oil (41.3 Mt). The desirable flavor and good oxidative stability (linolenate, C18:3, is present at less than 1 mol%) of maize oil contribute to its positive image and to its market acceptance [16]. Some maize varieties have been selected for high oil content (up to 20%) [17]. In the kernel of these high-oil maize lines, both the embryo oil

concentration and the relative proportion of this embryo, specifically the oil-rich scutellum, are increased [18]. Nevertheless, the yield and other agronomic characteristics of these lines are rather poor. For instance, a significant reduction of kernel size was measured. Although this genetic material has very little economic value, high-oil maize is used for certain poultry and livestock feed. Lower yield is balanced by higher calories.

Oat (*Avena sativa*) accumulates important amounts of oil in its grains as compared to other cereals apart from maize [19] and has been selected to feed horses because of this higher energy density. Oil concentration in oat groat can vary from 3 to 11% in different cultivars, and selection has led to the isolation of lines with oil contents as high as 18% [20]. The highest oil concentrations are in the embryo, scutellum, and aleurone layer (just as in other cereal grains). The inner endosperm also contains substantial amounts of oil. Given the relative proportion of these tissues within the groat, oat appears unique among cereals with a major proportion (almost 90%) of oil stored in the endosperm [21]. The agronomic characteristics and genetic diversity available have led to the current exploration of oat as a potential new oil crop for Europe (<http://epobio.net/>).

2.2. Cellular localization, remobilization

In most oil storing tissues, TAGs accumulate in subcellular oil bodies, comprising a matrix of TAGs surrounded by a phospholipid monolayer. A specific set of proteins is usually embedded in this monolayer. This proteome, first depicted in Brassicaceae (*Arabidopsis thaliana*, *B. napus*), has recently been described in germinating embryos of maize [22]. Among those proteins, oleosins are important actors that would prevent coalescence of the oil bodies and might play a key role in both storage and remobilization of TAGs [23,24]. The elimination of some isoforms of these oleosins by RNA interference (RNAi) in transgenic rice (*Oryza sativa*) strongly impacts on the structure of oil bodies. They appear as large, irregular oil clusters as a consequence of a lack of embedding oleosins. This has a clear negative impact on the amount of oil stored [25]. Nevertheless, the apparent lack of specificity of the RNAi constructs used prevents from attributing a precise function to each of the rice oleosin isoform investigated. Interestingly, in oat, while oil bodies occur as intact individual entities in the aleurone layer, scutellum, and embryo, they have diffuse boundaries and tend to fuse with each other in the starchy endosperm; they form a continuous smear between starch granules and protein bodies [26]. This fusion of oil bodies correlates with a reduction of the amount of available oleosins in this tissue and raises the question of the stability/quality of this oil and of the remobilization of these TAGs after germination. Time-course analyses of lipid and carbohydrate contents in dissected tissues of germinating oat groats suggest that TAGs stored in the endosperm are not a dead-end product and might be remobilized [27]. Similar observations were carried out in germinating seeds of oil palm (a non-cereal monocot) [28]. However, the exact mechanism responsible for the remobilization of TAGs in this tissue is still poorly understood and the nature of the metabolites transferred from the endosperm to the germinating embryo remains to be firmly established. These physiological aspects ought to be considered with care when selecting or engineering varieties with endosperm metabolism diverted from starch to oil. For instance, sufficient amounts of oleosins may be crucial for the elevated accumulation of TAGs within this tissue during seed filling. In the same line, a strong activation of the actors involved in the remobilization of TAGs (e.g. lipases or transporters) during germination may play a key role in maintaining both the germinative capacity of modified seeds and the successful establishment of corresponding siblings.

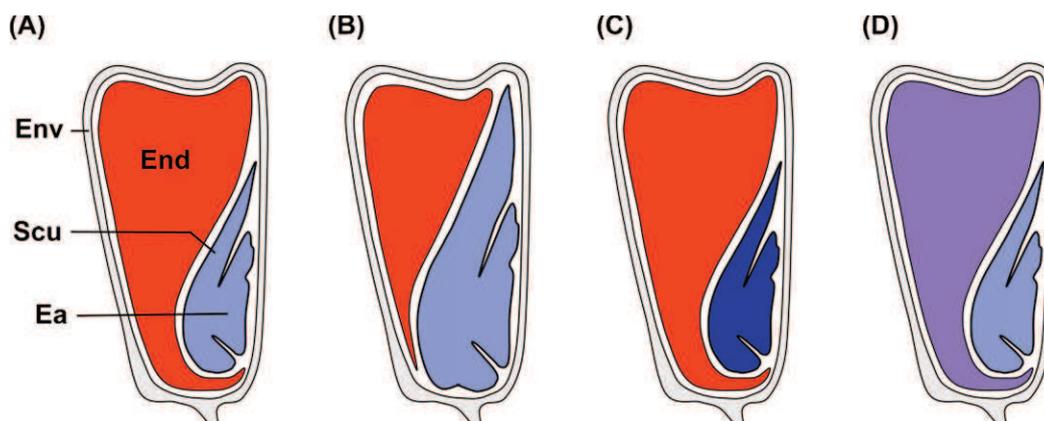


Fig. 1. Strategies for increased oil content in the kernel of maize (*Zea mays*). (A) Scheme representing a longitudinal section of the kernel. Within the endosperm (End), carbon is stored in the form of starch (red color), whereas the embryo, comprising the embryo axis (Ea) and the scutellum (Scu), preferentially accumulates oil (blue color). End, endosperm; Env, envelope composed of seed coat and pericarp; Scu, scutellum. (B) Maize kernel with high oil content due to an enlargement of the scutellum. This was achieved by over-expression of the wheat *Purindoline a* and *b* genes. (C) Kernel exhibiting high oil content as a consequence of an increased oil concentration within the embryo (dark blue). This was achieved by over-expression of either maize or fungal *DGAT* genes, or by over-expression of transcription factors like *ZmLEC1* and *ZmWRI1a*. (D) Increased oil content in maize kernel due to a partial rerouting of carbon from starch to oil metabolism in the starchy endosperm (purple color). This has not yet been achieved and may necessitate modifying the structure of the grain for better oxygenation of the endosperm tissue (not presented on the scheme).

3. Oil metabolism in cereal grains

A majority of the experimental data dealing with oil metabolism in cereal grains has been obtained with maize kernels [14]. Sucrose is transferred from the maize kernel phloem across the phloem parenchyma and placentochalaza cells to zygotic tissues during development. After passive efflux from the pedicel symplast, sucrose is cleaved by extracellular invertases, releasing glucose and fructose that are imported by the transfer cells of the basal endosperm layer, phosphorylated, and metabolized by the endosperm and subsequently by the embryo to synthesize storage and structural compounds. The flow of carbon through primary metabolism of developing maize embryos has been quantified by steady state metabolic flux analysis [29]. Seventy percent of the carbon used for fatty acid production in the plastids is derived from phosphoenolpyruvate produced by the plastidial glycolytic and oxidative pentose phosphate pathways from hexose-phosphates imported from the cytosol (Fig. 2A). Phosphoenolpyruvate is further metabolized by plastidic pyruvate kinase and acetyl-CoA carboxylase, providing acetyl-CoA for *de novo* fatty acid synthesis. The remaining 30% of the carbon used for fatty acid production is derived from malate imported from the cytosol and transformed into pyruvate by plastidic NADP-dependent malic enzyme. The ATP necessary for fatty acid synthesis is provided by plastidic pyruvate kinase and phosphoglycerate kinase reactions. The NADPH required for fatty acid production is produced both by the oxidative pentose phosphate pathway and NADP-dependent malic enzyme. Another part of the reductive power is provided in the form of NADH by plastidic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. Acyl chains produced in the plastids are exported to the cytosol. They are acylated to a glycerol-3-phosphate backbone in the endoplasmic reticulum [30]. Various interconnected pathways contribute to TAG assembly in oilseeds, and acyl exchange between lipids plays a key role [31,32].

Within the endosperm, ADP-glucose and hexose-phosphates transferred from the cytosol to the plastid mostly serve as a source of carbon for starch biosynthesis [14] (Fig. 2B). The source of carbon used for fatty acid synthesis differs from that described in embryo cells (see above). More than 90% of this carbon comes from triose-phosphates derived from hexose-phosphates imported into the plastid. The role of NADP-dependent malic enzyme in providing carbon for fatty acid synthesis is very limited [33]. The oxidative pentose phosphate pathway and the plastidic pyruvate

dehydrogenase generate sufficient amounts of NADPH and NADH, respectively, to support fatty acid production.

4. Transcriptional regulation of oil metabolism

In the oilseed dicot *A. thaliana*, transcriptomic and genetic studies have unraveled the importance of transcriptional regulations for the control of oil accumulation in seeds [34]. Genes associated with plastidial fatty acid metabolism display a bell-shaped pattern of expression at the onset of seed maturation, whereas the activation of genes involved in TAG assembly and storage is slightly delayed [35]. In barley, 37 genes involved in fatty acid and TAG biosynthesis were identified by aligning ESTs generated from developing grains with genomes of Arabidopsis and rice [13]. The expression pattern of these genes in the different tissues composing the grain was further characterized by macroarray analyses. Several enzymes involved in fatty acid biosynthesis are encoded by two isogenes, one of which is preferentially expressed in the endosperm whereas the other is embryo specific. As for the enzymes putatively encoded by a single gene, corresponding genes are more highly expressed in the embryo. These data are consistent with the spatial pattern of oil deposition within the grain, with oil accumulation being several fold higher in the embryo than in the endosperm. Apart from genes encoding oleosins, it is not clear whether a tight correlation exists between temporal patterns of oil deposition and induction of genes related to oil metabolism. In contrast, the results of microarray experiments carried out with developing maize embryos clearly demonstrate the existence of transcriptional regulations of the genes involved in carbon and oil metabolism [36,37]. What is more, induction of these genes is well correlated with the pattern of oil deposition within the embryo (Fig. 3). Interestingly, the accumulation of mRNAs coding for enzymes of late glycolysis (e.g. pyruvate kinase) and for actors of the fatty acid biosynthetic pathway (e.g. 3-ketoacyl ACP synthase III or acyl carrier protein) peaks at the onset of embryo maturation, when oil accumulation is triggered, whereas induction of genes involved in TAG metabolism and storage (e.g. *OLEOSIN16* or *18*) is slightly delayed. This pattern is reminiscent of the 'contrapuntal' network of expression described in Arabidopsis [35]. This suggests that the transcriptional regulatory system orchestrating the oil metabolic network might be conserved between the two species.

The participation of transcription factors in the regulation of oil metabolism in maize kernels tends to confirm this hypothesis

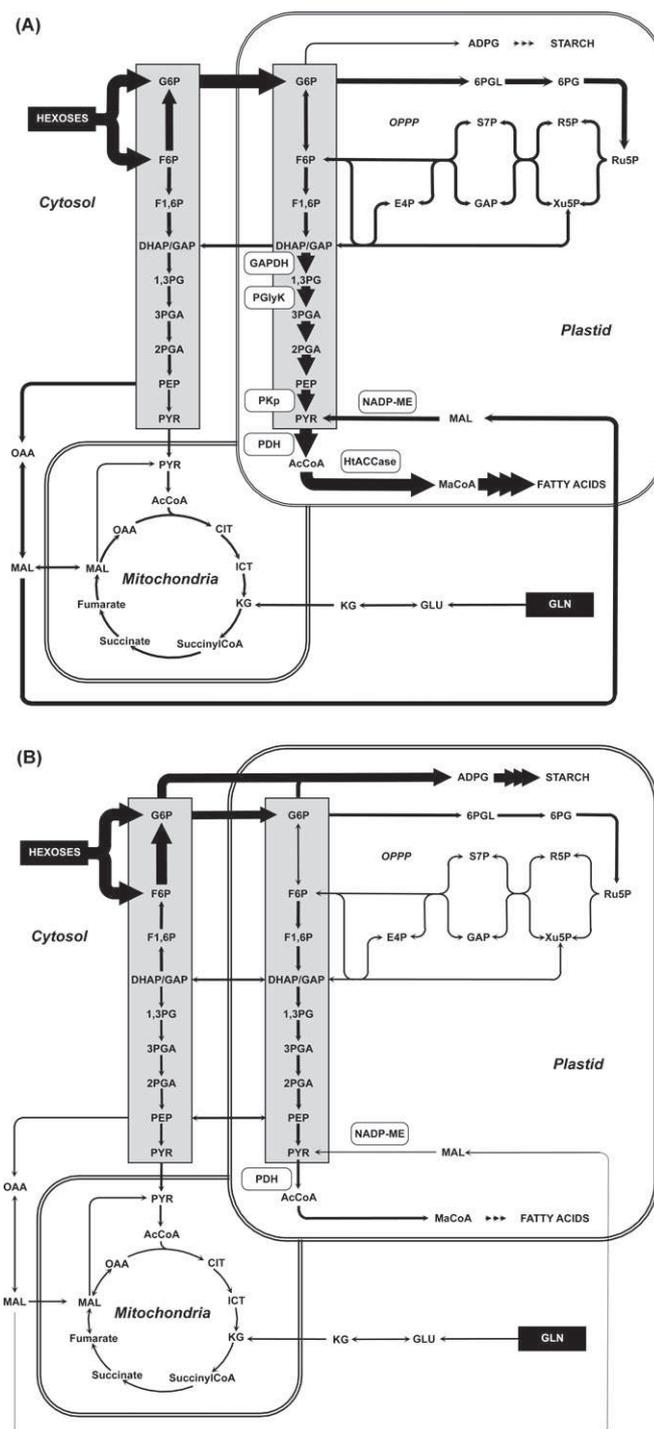


Fig. 2. Simplified scheme of central metabolism in embryo (A) or endosperm tissues (B) of maturing kernels of maize (*Zea mays*). Arrows represent net fluxes of carbon; the arrow thicknesses are proportional to net fluxes of carbon, based on metabolic flux analysis [29,33]. Note that the starch biosynthetic pathway represented is simplified. Glycolytic sequences are shaded in grey. ADPG, ADP-glucose; HtACCase, heteromeric acetyl-CoA carboxylase; AcCoA, acetyl-coenzyme A; CIT, citrate; DHAP, dihydroxyacetone-3-phosphate; E4P, erythrose-4-phosphate; F1,6P, fructose-1,6-bisphosphate; F6P, fructose-6-phosphate; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; G6P, glucose-6-phosphate; GLN, glutamine; GLU, glutamate; ICT, isocitrate; KG, alpha-ketoglutarate; MaCoA, malonyl-coenzyme A; MAL, malate; NADP-ME, NADP-dependent malic enzyme; OAA, oxaloacetate; OPPP, oxidative pentose phosphate pathway; PDH, pyruvate dehydrogenase; PEP, phosphoenolpyruvate; 6PG, 6-phosphogluconate; 6PGL, 6-phosphogluconolactone; 1,3PG, 1,3-bisphosphoglycerate; 2PGA, 2-phosphoglycerate; 3PGA, 3-phosphoglycerate; PGlyK, phosphoglycerate kinase; PKp, plastidial pyruvate kinase; PYR, pyruvate; R5P, ribose-5-phosphate; Ru5P, ribulose-5-phosphate; S7P, sedoheptulose-7-phosphate; Xu5P, xylulose-5-phosphate.

[38,39]. In the model species *Arabidopsis*, master regulators of the maturation program like *LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*) and 2 (*LEC2*) directly activate genes involved in TAG metabolism and storage. Another transcription factor, *WRINKLED1* (*WR1*), is necessary to mediate the regulatory action of the master regulators

towards late glycolytic and fatty acid biosynthetic genes [30]. The maize homolog of *LEC1*, *ZmLEC1*, shares 41% identity in amino acid sequence with its *Arabidopsis* relative and is expressed only during early embryo development, like *AtLEC1* [40]. Furthermore, *ZmLEC1* complements the *lec1* mutation when expressed in *Arabidopsis*.

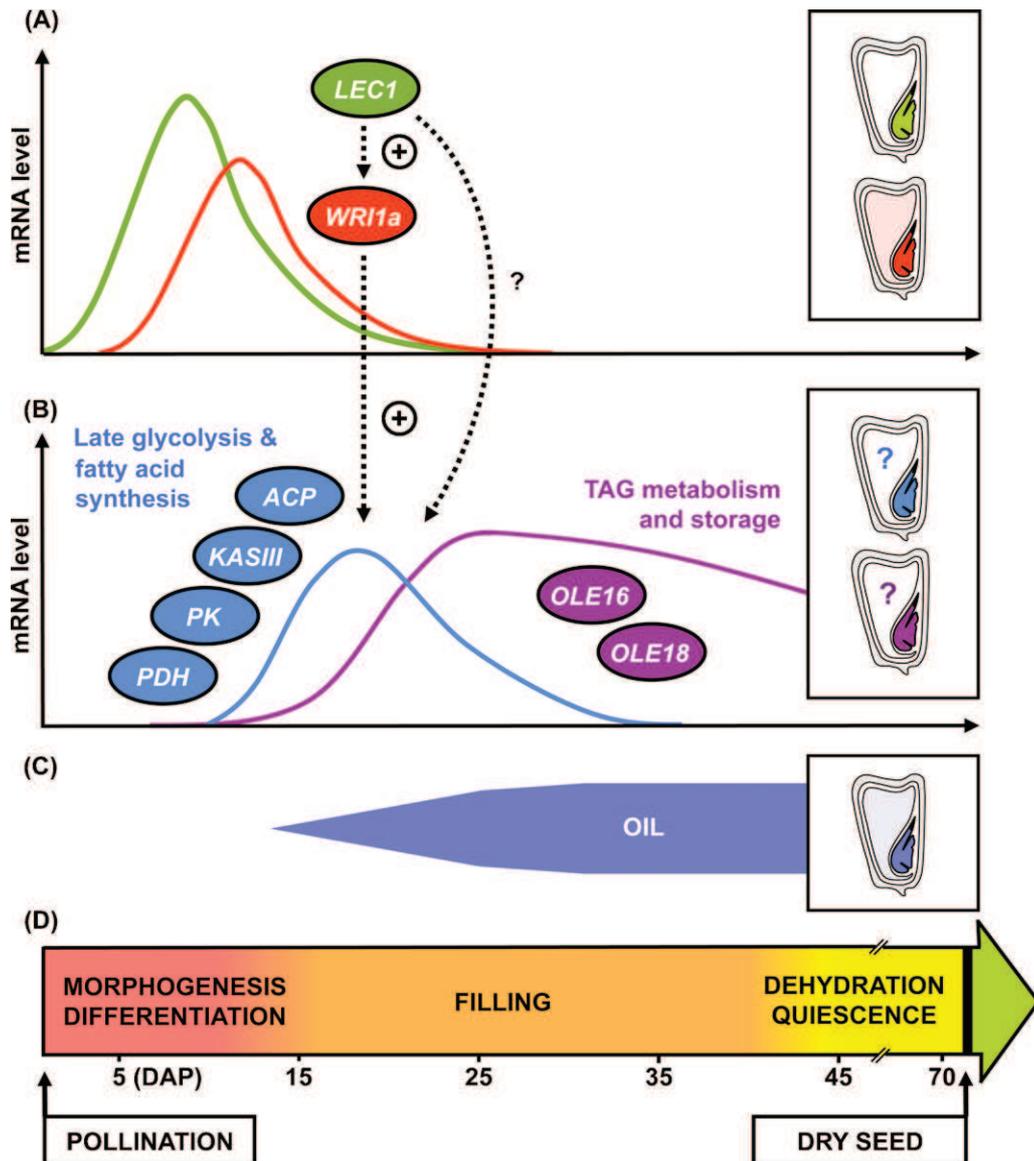


Fig. 3. Model for the transcriptional regulation of oil biosynthesis in embryos of maize (*Zea mays*). (A) Expression patterns of the transcriptional regulators involved in the control of oil metabolism during kernel development. LEAFY COTYLEDON1 (*ZmLEC1*) activates the transcription of *WRINKLED1a* (*ZmWRI1a*). Since the involvement of *ZmWRI1b* in the control of oil synthesis in maize has not been firmly established to date, this transcription factor has been omitted. For each of the genes considered, spatial regulation of the transcription within the kernel is presented in a box on the right side of the graph. (B) Expression patterns of selected genes involved in late glycolysis, the fatty acid biosynthetic pathway, and triacylglycerol metabolism and storage. For each set of genes, spatial regulation of the transcription within the kernel is presented in a box on the right side of the graph. (C) Pattern of oil accumulation during kernel development and within the tissues composing the kernel (box). (D) Developmental stages. ACP, acyl carrier protein; DAP, days after pollination; KASIII, 3-ketoacyl-ACP synthase III; OLE16, oleosin 16; OLE18, oleosin 18; PDH, pyruvate dehydrogenase; PK, pyruvate kinase; TAG, triacylglycerol. Dashed arrows represent transcriptional activation.

Two maize orthologs of *AtWRI1*, *ZmWRI1a* and *ZmWRI1b*, complement the *wri1* mutation when expressed in *Arabidopsis* [39]. Both genes are preferentially expressed in maize embryo with a peak of expression at the onset of kernel maturation. *ZmWRI1a* is induced by *ZmLEC1* [38] (Fig. 3A). Transcriptomic analyses of *ZmWRI1a* over-expressing lines have identified putative target genes of *ZmWRI1a* involved in late glycolysis, fatty acid and oil metabolism. Though not fully overlapping, the sets of *AtWRI1* and *ZmWRI1a* target genes are very similar. Complementary analyses relying on chromatin immunoprecipitation techniques would now be necessary to identify direct targets of these transcription factors in an exhaustive manner and to determine whether these sets of targets are identical. Interestingly, the *cis*-regulatory element proposed to be bound by *AtWRI1* (AW-box) [41] was also identified in promoter sequences of putative target genes of *ZmWRI1a*,

suggesting that even the *cis*-regulatory element recognized by *WRI1* might have been conserved between dicots and monocots.

5. Breeding, biotechnological approaches, prospects and conclusion

Due to a significant degree of genetic variability for grain oil content, improvement of this trait through breeding has been successfully achieved in oat and maize (see above). After more than 100 cycles of selection in the Illinois long-term selection experiment, maize kernel oil content was increased from initially 4.7% to over 20% for the high oil population. The upper limit may even be higher since the population continues to respond to selection [17]. The observed quantitative phenotypic response for oil content suggests that numerous genes control this trait. Indeed, complementary

genetic analyses have shown that oil content is determined by additive effects of an estimated 14–69 genetic factors and that heterosis plays only a minor role [17]. Numerous quantitative trait loci (QTLs) for oil content and/or the concentration of particular fatty acids have been identified [17,42] and many of these QTLs are co-localized with at least one lipid-related gene [43]. One of the high-oil QTLs identified (*qH06*) affecting both oil and oleic-acid contents encodes a diacylglycerol acyltransferase (DGAT1-2) [44]. This enzyme catalyses the transfer of an acyl chain from the acyl-CoA pool to the *sn*-3 position of a diacylglycerol molecule, resulting in the synthesis of TAG. A phenylalanine insertion in DGAT1-2 at position 469 increases oil and oleic-acid contents. If long-term selection is powerful to alter the expression of complex traits such as grain oil content, positional cloning of QTLs of interest then provides insights into the molecular basis of selection as well as opportunities for uncoupling oil content from other agronomic traits. This is particularly useful when selection programs for grain yield and kernel oil concentration have been conducted independently. The commercial use of maize high oil lines has been limited, mainly because of a frequent negative correlation with grain yield. In addition, the pollen source has a significant influence ('Xenia effect') on kernel oil content in maize and the top cross technique had to be used to fully exploit the genetic material [45]. This somewhat cumbersome culture scheme consists in the open pollination of a male sterile line with normal oil content by pollen of a high oil line. Recent studies have shown that pollen of a high oil concentration pollinator improved kernel oil concentration by increasing both the embryo-to-kernel ratio and the embryo oil concentration [46].

Various and complementary biotechnological approaches are considered to try and enhance oil content in cereal species. This objective could be reached by increasing the relative proportion of the oil-rich embryonic tissue within the grain (Fig. 1B). Grain embryo size and oil content could be increased in transgenic maize by ectopic expression of the wheat puroindoline-a and b (*Pina* and *Pinb*) genes [47]. While total oil content of the kernel was increased by 25% in these transgenic lines, the molecular mechanism responsible for the increase remains to be elucidated. PINA and PINB proteins share a similar structure to that of plant non-specific lipid-transfer proteins. In wheat, PINA and PINB together are the functional components of the grain hardness locus [48]. They control whether wheat grains are soft or hard textured. The agronomic characteristics of the transgenic maize lines over-expressing *PIN* genes [47] remain to be exhaustively studied in field trials to evaluate the economic potential of such material.

Another biotechnological approach to enhance oil accumulation in cereal grain may consist of improving the oil content of embryonic tissues (Fig. 1C). A close examination of carbon metabolism in maize embryos suggested that the flux of carbon through NADP-malic enzyme may constitute a metabolic bottleneck [29]. Accordingly, the oil content of the kernel was positively correlated with malic enzyme activities in maturing embryos [49], which makes NADP-malic enzyme an attractive target for engineering high oil concentrations in embryos of maize. In oilseed species, numerous biotechnological approaches have been carried out that were aimed at maximizing the flow of carbon into oil by over-expression of enzymes of the TAG assembling network [50]. Several attempts have been made to over-express diacylglycerol acyltransferases in maize. The embryo-specific over-expression of both maize *DGAT1-2* [44] and of fungal *DGAT2* [51] resulted in a limited (25%) but statistically significant increase in kernel oil content. Grain yield was not affected by expression of fungal *DGAT2* [51], but there are no data about the consequences of the over-expression of maize *DGAT1-2* on yield and other agronomic characteristics of the transgenic lines. The recent identification of transcriptional regulators of the oil biosynthesis network in maize [38,39] has paved

the way for designing and testing new biotechnological strategies. The expression of *ZmLEC1* under the control of embryo-preferred promoters in transgenic lines increased kernel oil content by as much as 48%. However, there were undesirable side effects such as reduced seed germination and seedling leaf growth in these lines, suggesting that *ZmLEC1*, like *AtLEC1*, concomitantly regulates various metabolic pathways and developmental programs. In contrast to *LEC1*, *WRI1* specifically regulates fatty acid biosynthesis. Expression of *ZmWRI1a* under the control of either an embryo-preferred promoter or a strong and constitutive promoter in transgenic maize lines increased kernel oil content to levels similar to that of *ZmLEC1* over-expressing lines [38,39]. Interestingly, neither seed germination nor seedling growth was altered in these lines.

A third biotechnological approach to increase oil content in cereal grains may consist in diverting carbon flux from starch to oil in the endosperm (Fig. 1D). It was speculated that increasing biomass synthesis and redirecting part of the carbon flux toward fatty acid production in the endosperm of maize could theoretically be obtained by metabolic engineering, provided that the elevated amounts of ATP consumed in futile cycling processes can be reduced [33]. This would require inhibiting futile cycling whilst over-expressing the whole set of enzymes involved in TAG production. To date, no successful attempt along those lines has been reported. If the use of *ZmWRI1* as a biotechnological tool for improving oil content in embryos of maize seems promising (see above), over-expression of *ZmWRI1a* in the starchy endosperm was not sufficient to trigger oil accumulation in this compartment [38]. Since there is no evidence that *WRI1* regulates TAG assembly, it is not surprising that over-expression of *ZmWRI1a* is only efficient in tissues already accumulating oil, and thus already expressing the TAG biosynthetic machinery. What is more, the structure and size of maize kernels may impair accumulation of much more oil in the endosperm. The combined topographical analysis, metabolite profiling, and isotope flux analysis carried out has indeed established that endogenous oxygen deprivation is particularly pronounced in the inner endosperm tissues and that starch storage may be specifically adapted to such hypoxic conditions [14]. The energy demand for starch synthesis is considerably less than that of oil. Consequently, engineering cereal varieties with high endosperm oil content appears to be particularly challenging and may require complex strategies aimed at modifying both endosperm metabolism and structure. Studies currently carried out on oat cultivars exhibiting contrasted endosperm oil content [52] or on non-cereal seeds that accumulate oil to very high levels in endosperm (e.g. *Ricinus communis*) may provide us with useful pieces of information.

In conclusion, several promising strategies have already demonstrated the possibility for increasing oil accumulation in cereal grains without any yield penalty. The gain in oil content obtained so far by metabolic engineering is rather limited: in maize, no more than 25–50% increase in this storage compound representing 3–4% of the kernel dry weight. However, the surfaces grown worldwide are such that limited increases are sufficient to significantly impact oil production. For this purpose, comprehensive field trials are critical to evaluate the overall impact of new biotechnological tools by testing agronomic performance associated directly or not with the modified trait, namely oil enrichment. In the future, engineering of new 'high-oil' cereal varieties of agronomic and economic interest may arise from the combination of efficient biotechnological solutions dedicated to the modification of the grain structure on one side, and to the stimulation of the oil biosynthetic network on the other side. Together with the design of transgenic maize varieties optimized for starch production [53,54], this research may contribute to the emergence and use of distinct varieties dedicated to specific productions.

Acknowledgments

Our work on the regulation of oil synthesis in seeds is supported by the grants from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR) entitled 'HyperMaize' (ANR-07-GPLA-019), 'Plant-TFcode' (ANR-07-BLAN-0211-02), and 'SOLAR' (ANR-10-GNM-009). S.B. is a Chargé de Recherche at CNRS.

References

- [1] T.P. Durrett, C. Benning, J. Ohlrogge, Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels, *Plant J.* 54 (2008) 593–607.
- [2] J.M. Dyer, S. Stymne, A.G. Green, A.S. Carlsson, High-value oils from plants, *Plant J.* 54 (2008) 640–655.
- [3] F.D. Gunstone, Non-food uses of vegetable oils, *Lipid Technol.* 23 (2011) 24.
- [4] H. Charles, Food security: the challenge of feeding 9 billion people, *Science* 327 (2010) 812–818.
- [5] Q. Hu, M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert, A. Darzins, Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspective and advances, *Plant J.* 54 (2008) 621–639.
- [6] A. Beopoulos, J. Cescut, R. Haddouche, J.L. Uribelarrea, C. Molina-Jouve, J.M. Nicaud, *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production, *Prog. Lip. Res.* 48 (2009) 375–387.
- [7] J. Gressel, Transgenics are imperative for biofuel crops, *Plant Sci.* 174 (2008) 246–263.
- [8] Sanjaya, T.P. Durrett, S.E. Weise, C. Benning, Increasing the energy density of vegetative tissues by diverting carbon from starch to oil biosynthesis in transgenic *Arabidopsis*, *Plant Biotechnol. J.* (2011) 1–10.
- [9] L.S. Dure, Site of origin and extent of activity of amylases in maize germination, *Plant Physiol.* 35 (1960) 925–934.
- [10] L.S. Dure, Gross nutritional contributions of maize endosperm and scutellum to germination growth of maize axis, *Plant Physiol.* 35 (1960) 919–925.
- [11] P.B. Price, J.G. Parson, Lipids of seven cereal grains, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52 (1975) 490–493.
- [12] K. Liu, Comparison of lipid content and fatty acid composition and their distribution within seeds of 5 small grain species, *J. Food Sci.* 76 (2011) 334–342.
- [13] T. Neuberger, N. Sreenivasulu, M. Rokitta, H. Rolletschek, C. Göbel, T. Rutten, V. Radchuk, I. Feussner, U. Wobus, P. Jakob, A. Webb, L. Borisjuk, Quantitative imaging of oil storage in developing crop seeds, *Plant Biotechnol. J.* 6 (2008) 31–45.
- [14] H. Rolletschek, K. Koch, U. Wobus, L. Borisjuk, Positional cues for the starch/lipid balance in maize kernels and resource partitioning to the embryo, *Plant J.* 42 (2005) 69–83.
- [15] H. Saousssem, B. Sadok, K. Habib, P.M. Mayer, Fatty acid accumulation in the different fractions of the developing corn kernel, *Food Chem.* 117 (2009) 432–437.
- [16] R. Bressani, V. Benavides, E. Acevedo, M.A. Ortiz, Changes in selected nutrient contents and in protein quality of common and quality-protein maize during rural tortilla preparation, *Cereal Chem.* 67 (1990) 515–518.
- [17] S.P. Moose, J.W. Dudley, T.R. Rocheford, Maize selection passes the century mark: a unique resource for 21st century genomics, *Trends Plant Sci.* 9 (2004) 358–364.
- [18] J.W. Dudley, R. J. Lambert, 100 generations of selection for oil and protein in corn, *Plant Breed. Rev.* 24 (2004) 79–110.
- [19] S. Leonova, T. Shelenga, M. Hamberg, A.V. Konarev, I. Loskutov, A.S. Carlsson, Analysis of oil composition in cultivars and wild species of oat (*Avena* sp.), *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 7983–7991.
- [20] K.J. Frey, J.B. Holland, Nine cycles of recurrent selection for increased grain-oil content in oat, *Crop Sci.* 39 (1999) 1636–1641.
- [21] A. Banas, H. Debski, W. Banas, W.K. Heneen, A. Dahlqvist, M. Bafor, P.O. Gummesson, S. Marttila, A. Ekman, A.S. Carlsson, S. Stymne, Lipids in grain tissues of oat (*Avena sativa*): differences in content, time of deposition, and fatty acid composition, *J. Exp. Bot.* 58 (2007) 2463–2470.
- [22] H. Tnani, I. López, T. Jouenne, C.M. Vicent, Protein composition analysis of oil bodies from maize embryos during germination, *J. Plant Physiol.* 168 (2011) 510–513.
- [23] J.T. Ting, K. Lee, C. Ratnayake, K.A. Platt, R.A. Balsamo, A.H. Huang, Oleosin genes in maize kernels having diverse oil contents are constitutively expressed independent of oil contents. Size and shape of intracellular oil bodies are determined by the oleosins/oils ratio, *Planta* 199 (1996) 158–165.
- [24] R.B. Aalen, The transcripts encoding two oleosin isoforms are both present in the aleurone and in the embryo of barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds, *Plant Mol. Biol.* 28 (1995) 583–588.
- [25] Y.-Y. Wu, Y.-R. Chou, C.-S. Wang, T.-H. Tseng, L.-J. Chen, J.T.C. Tzen, Different effects on triacylglycerol packaging to oil bodies in transgenic rice seeds by specifically eliminating one of their two oleosin isoforms, *Plant Phys. Biochem.* 48 (2010) 81–89.
- [26] W.K. Heneen, G. Karlsson, K. Brismar, P.-O. Gummesson, S. Marttila, S. Leonova, A.S. Carlsson, M. Bafor, A. Banas, B. Mattson, H. Debski, S. Stymne, Fusion of oil bodies in endosperm of oat grains, *Planta* 228 (2008) 589–599.
- [27] S. Leonova, Å. Grimberg, S. Marttila, S. Stymne, A.S. Carlsson, Mobilization of lipid reserves during germination of oat (*Avena sativa* L.), a cereal rich in endosperm, *J. Exp. Bot.* 61 (2010) 3089–3099.
- [28] Z.C. Alang, G.F.J. Moir, L.H. Jones, Composition, degradation and utilization of endosperm during germination in the oil palm (*Eleais Guineensis* Jacq.), *Ann. Bot.* 61 (1988) 261–268.
- [29] A.P. Alonso, V.L. Dale, Y. Shachar-Hill, Understanding fatty acid synthesis in developing maize embryos using metabolic flux analysis, *Metab. Eng.* 12 (2010) 488–497.
- [30] S. Baud, L. Lepiniec, Physiological and developmental regulation of seed oil production, *Prog. Lipid Res.* 49 (2010) 235–249.
- [31] J.A. Napier, The production of unusual fatty acids in transgenic plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 58 (2007) 295–319.
- [32] P.D. Bates, T.P. Durrett, J.B. Ohlrogge, M. Pollard, Analysis of acyl fluxes through multiple pathways of triacylglycerol synthesis in developing soybean embryos, *Plant Physiol.* 150 (2009) 55–72.
- [33] A.P. Alonso, D.L. Val, Y. Shachar-Hill, Central metabolic fluxes in the endosperm of developing maize seeds and their implications for metabolic engineering, *Metab. Eng.* 13 (2011) 86–107.
- [34] S. Baud, L. Lepiniec, Regulation of de novo fatty acid synthesis in maturing oilseeds of *Arabidopsis*, *Plant Physiol. Biochem.* 47 (2009) 448–455.
- [35] S.A. Ruuska, T. Girke, C. Benning, J.B. Ohlrogge, Contrapuntal networks of gene expression during *Arabidopsis* seed filling, *Plant Cell* 14 (2002) 1191–1206.
- [36] J.M. Lee, M.E. Williams, S.V. Tingey, J.A. Rafalski, DNA array profiling of gene expression changes during maize embryo development, *Funct. Integr. Genomics* 2 (2002) 13–27.
- [37] X. Liu, J. Fu, D. Gu, W. Liu, T. Liu, Y. Peng, J. Wang, G. Wang, Genome-wide analysis of gene expression profiles during the kernel development of maize (*Zea mays* L.), *Genomics* 91 (2008) 378–387.
- [38] B. Shen, W.B. Allen, P.Z. Zheng, C.J. Li, K. Glassman, J. Ranch, D. Nubel, M.C. Tarczynski, Expression of *ZmLEC1* and *ZmWRI1* increases seed oil production in maize, *Plant Physiol.* 153 (2010) 980–987.
- [39] B. Pouvreau, S. Baud, V. Vernoud, V. Morin, C. Py, G. Gendrot, J.-P. Pichon, J. Rouster, W. Paul, P.M. Rogowsky, Duplicate maize Wrinkled1 transcription factors activate target genes involved in seed oil biosynthesis, *Plant Physiol.* 156 (2011) 674–686.
- [40] S.B. Zhang, L. Wong, L. Meng, P.G. Lemaux, Similarity of expression patterns of *knotted1* and *ZmLEC1* during somatic and zygotic embryogenesis in maize (*Zea mays* L.), *Planta* 215 (2002) 191–194.
- [41] K. Maeo, T. Tokuda, A. Ayame, N. Mitsui, T. Kawai, H. Tsukagoshi, S. Ishiguro, K. Nakamura, An AP2-type transcription factor, WRINKLED1, of *Arabidopsis thaliana* binds to the AW-box sequence conserved among proximal upstream regions of genes involved in fatty acid synthesis, *Plant J.* 60 (2009) 476–487.
- [42] J.J. Wassom, V. Mikkelineni, M.O. Bohn, T.R. Rocheford, QTL for fatty acid composition of maize kernel oil in Illinois high oil x B73 backcross-derived lines, *Crop Sci.* 48 (2008) 69–78.
- [43] L. Li, H. Li, J. Li, S. Xu, X. Yang, J. Li, J. Yan, A genome-wide survey of maize lipid-related genes: candidate genes mining, digital gene expression profiling and co-location with QTL for maize kernel oil, *Sci. China Life Sci.* 53 (2010) 690–700.
- [44] P. Zheng, W.B. Allen, K. Roesler, M.E. Williams, S. Zhang, J. Li, K. Glassman, J. Ranch, D. Nubel, W. Solawetz, D. Bhatramakki, V. Llaca, S. Deschamps, G.-Y. Zhong, M.C. Tarczynski, B. Shen, A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize, *Nat. Genet.* 40 (2008) 367–372.
- [45] P.R. Thominson, A.B. Geyer, L.D. Lotz, H.J. Siegrist, T.L. Dobbels, Topcross high oil corn production: select grain quality attributes, *Agron. J.* 95 (2003) 147–154.
- [46] W. Tanaka, A.I. Mantese, G.A. Maddonni, Pollen source effects on growth of kernel structures and embryo chemical compounds in maize, *Ann. Bot.* 104 (2009) 325–334.
- [47] J. Zhang, J.M. Martin, B. Beecher, C. Lu, L.C. Hannah, M.L. Wall, I. Altosaar, M.J. Giroux, The ectopic expression of the wheat Purindoline genes increase germ size and seed oil content in transgenic corn, *Plant Mol. Biol.* 74 (2010) 353–365.
- [48] H.W. Wanjugi, A.C. Hogg, J.M. Martin, M.J. Giroux, The role of puroindoline A and B individually and in combination on grain hardness and starch association, *Crop Sci.* 47 (2007) 67–76.
- [49] D.C. Doehlert, R.J. Lambert, Metabolic characteristics associated with starch, protein, and oil deposition in developing maize kernels, *Crop Sci.* 31 (1991) 151–157.
- [50] R.J. Weselake, D.C. Taylor, M.H. Rahman, S. Shah, A. Laroche, P.B.E. McVetty, J.L. Harwood, Increasing the flow of carbon into seed oil, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 866–878.
- [51] J. Oakes, D. Brackenridge, R. Colletti, M. Daley, D.J. Kawkins, H. Xiong, J. Mai, S.E. Screen, D. Val, K. Lardizabal, K. Gruys, J. Deikman, Expression of fungal diacylglycerol acyltransferase2 genes to increase kernel oil in maize, *Plant Physiol.* 155 (2011) 1146–1157.
- [52] Å. Ekman, D.M. Hayden, K. Dehes, L. Bülow, S. Stymne, Carbon partitioning between oil and carbohydrates in developing oat (*Avena sativa* L.) seeds, *J. Exp. Bot.* 59 (2008) 4247–4257.
- [53] N. Li, S. Zhang, Y. Zhao, B. Li, J. Zhang, Over-expression of AGPase genes enhances seed weight and starch content in transgenic maize, *Planta* 233 (2011) 241–250.
- [54] F. Torney, L. Moeller, A. Scarpa, K. Wang, Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize, *Curr. Opin. Biotechnol.* 18 (2007) 193–199.

Abstract

In the model plant *Arabidopsis thaliana*, seed maturation and more especially the accumulation of storage compounds such as oil and seed storage proteins (SSP) have been widely studied. Although the biosynthetic networks underlying the accumulation of such compounds are now well described, regulation of these pathways remains poorly understood. My Ph.D. project is a part of a research program aimed at identifying new transcriptional regulators of seed maturation in *Arabidopsis*. After a comparative analysis of maturation processes in the two zygotic tissues of the seed, namely the embryo and the endosperm, we have characterized *MYB118*, an endosperm-specific transcription factor, putatively involved in the regulation of this maturation process.

A fine and comprehensive characterization of its expression pattern showed a peak of expression at the onset of the maturation phase in the endosperm. Expression studies carried out in *LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)* mutant and over-expressing lines demonstrated that *MYB118* expression is positively regulated by this master regulator. Biochemical analysis of *myb118* seeds showed that oil and SSP contents were doubled in the endosperm fraction and decreased in the embryo of this mutant compared to the wild type. A transcriptomic analysis of *myb118* mutant seeds point out some putative targets, the misregulation of which could explain this phenotype: *MYB118* seems to be a repressor of storage compounds accumulation in the endosperm.

Since *MYB118* belongs to the broad family of MYB transcription factors, we investigated the expression pattern and the role of its closest paralogs. One of them, called *MYB115* is expressed specifically in the chalazal endosperm and seems to have partially redundant functions with *MYB118*.

Résumé

Chez la plante modèle *Arabidopsis*, le processus de maturation de la graine et, en particulier, l'accumulation de composés de réserves (huile et protéines de réserve) sont étudiés depuis de nombreuses années. Si les voies de biosynthèse conduisant à l'accumulation de tels composés sont bien décrites, leur régulation est encore largement méconnue. Mon travail de thèse s'inscrit dans un projet de recherche dont le but est d'identifier de nouveaux régulateurs transcriptionnels de la maturation de la graine d'*Arabidopsis*. Après avoir réalisé une étude comparative du processus de maturation chez les deux zygotes de la graine, embryon et albumen, nous avons caractérisé un facteur de transcription appelé *MYB118*, exprimé spécifiquement dans l'albumen et potentiellement impliqué dans la régulation du processus de maturation.

Son patron d'expression, finement caractérisé, montre un pic d'accumulation d'ARNm en début de maturation de la graine, plus spécifiquement dans l'albumen. Des études menées sur des lignées mutantes ou surexprimant *LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)* révèlent que l'expression de *MYB118* est activée par ce régulateur maître de la maturation de la graine. Une analyse biochimique de graines *myb118* montre que le contenu en huile et en protéines de réserve est doublé dans l'albumen et réduit dans l'embryon de ce mutant par comparaison aux graines sauvages. Finalement, une analyse transcriptomique effectuée sur des graines *myb118* a permis d'identifier des cibles putatives dont la dérégulation pourrait expliquer le phénotype : *MYB118* semble être un répresseur de l'accumulation de composés de réserve dans l'albumen.

Comme la famille de facteurs de transcription à laquelle appartient *MYB118* comprend de nombreux membres, nous nous sommes intéressés au patron d'expression et au rôle de ses paralogues les plus proches. L'un d'entre eux, appelé *MYB115*, est exprimé spécifiquement dans l'albumen chalazal et semble avoir une fonction partiellement redondante à celle de *MYB118*.