



HAL
open science

Rôle du facteur de transcription ABI5 dans la vigueur et la longévité des graines de *Medicago truncatula*

Julia Zinsmeister

► To cite this version:

Julia Zinsmeister. Rôle du facteur de transcription ABI5 dans la vigueur et la longévité des graines de *Medicago truncatula*. Sciences agricoles. 2013. dumas-00973439

HAL Id: dumas-00973439

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00973439>

Submitted on 19 Jan 2016

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.



AGROCAMPUS OUEST
CFR Angers
2 rue André Lenotre
49045 Angers



**Institut de Recherche en
Horticulture et Semences**
42 rue Georges Morel
49071 Beaucoz 

Mémoire de Fin d'études

**Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques,
Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage**

Année universitaire : 2012-2013

Spécialité : Horticulture

Spécialisation ou option : Sciences des Productions Végétales, Semences

**Rôle du facteur de transcription *ABI5* dans la vigueur et la longévité des graines de
*Medicago truncatula***

Par : Julia ZINSMEISTER

Volet à renseigner par l'enseignant responsable de l'option/spécialisation*
ou son représentant

Date : .../.../... Signature

Bon pour dépôt (version définitive)

Autorisation de diffusion : Oui Non

Devant le jury :

Soutenu à le* :

Sous la présidence de* :

Mr. Olivier LEPRINCE

Maître de stage* :

Mme. Julia BUITINK

Enseignant r f rent :

Mr. Olivier LEPRINCE

Autres membres du jury :

Mme. Catherine AUBRY

Mme. Marie-Hélène MACHEREL

Mr. Soulayman SAKR

Mr. Emmanuel GEOFFRIAU

"Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent
que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST".

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement Mme. Buitink pour m'avoir accueillie durant ces 6 mois au sein de son équipe Conserto, à l'IRHS, au centre INRA Angers-Nantes. Merci pour votre passion de la Recherche, si communicative, pour votre encadrement et vos idées apportées tout au long de ce stage. Merci également pour votre aide à la rédaction de ce mémoire, sans laquelle ces travaux n'auraient pas abouti.

Merci également à Mr. Leprince, tout d'abord pour m'avoir permis de découvrir le monde de la physiologie moléculaire des graines au cours de mon cursus, puis pour m'avoir judicieusement conseillé mes stages, tant en M1 que en M2. Mais également pour votre avis apporté tout au long du stage, les conseils pour les concours de thèse et pour la rédaction du mémoire.

Je remercie également toute l'équipe Conserto, Mr. Lalanne pour son encadrement pratique et théorique, Mr. Benoit Li Vu pour son aide précieuse en physiologie, Mr. Joseph Li Vu pour son aide en microbiologie, et pour s'être tant de fois dérangé pour lancer mes autoclaves. Merci à Emmanuel Terrasson, pour ses conseils et son suivi à propos de nos chers mutants SDRX et RNAi, à Karima Righetti, pour sa bonne humeur. Je tiens à remercier également Julien, pour son aide dans le laboratoire mais aussi en tant que voisin, vanille te remercie. Je souhaite bonne chance aux deux étudiants en thèse, ainsi qu'à Karima, pour finir leurs travaux et trouver une équipe d'accueil aussi formidable que celle-ci. Je remercie aussi Romain, que l'équipe n'oubliera pas, à qui je souhaite de trouver un emploi qui lui convienne.

D'une manière plus générale, je remercie l'équipe Conserto, mais aussi les autres équipes de l'IRHS, qui m'ont intégré et permis de me sentir à l'aise dès le début : l'équipe BGL, dont je salue Mme Pascale Satour pour son aide avec le HPLC DIONEX, Mme. Françoise Montrichard, Mr. Thierry Montrichard, Mme. Theulah Merrah, et Mr. Chvan Youssef, et leurs stagiaires, Julien et Ombeline. Mais aussi merci à l'équipe Mitostress, notamment à Mme. Marie Hélène Macherel, pour sa constante bonne humeur et son entrain, Mr. Macherel et Mr. David Logan, à Mme Rolland Aurélia pour ses conseils judicieux, ainsi qu'à Mme. Neveu Martine.

Enfin, je remercie encore l'équipe, qui accepte de travailler avec moi encore trois ans.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ABA : Acide Abscissique	IRHS: Institut de Recherche en Horticulture et Semences
ABI3 : ABA-insensitive 3	LB : Lysogeny broth
ABI5 : ABA-insensitive 5	LEA : Late embryogenesis abundant
ABRE : ABA Response Element	LEC1: LEAFY COTYLEDON 1
ADN : Acide désoxyribonucléique	LEC2: LEAFY COTYLEDON 2
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire	MeOH : Méthanol
ARN : Acide ribonucléique	M : Molaire
B ₀ : 100 % binding	NAC : No amplification control
bZIP : Basic leucine zipper	NTC : No template control
CRB: Centre de Ressources Biologiques	<i>NCED</i> : 9- <i>cis</i> -epoxycaroténoïd dioxygenase
DAP: Days after polination	NSB : Non specific binding
DNase: Désoxyribonucléase	PEG: Polyéthylène glycol
DO : Densité optique	Pb : Paire de bases
EAR : Ethylen-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression	PCR, : polymerase chain reaction, RT-PCR reverse transcriptase-PCR
FNAMS : Fédération Nationale des Agriculteurs Multiplicateurs de Semences	PS : Post-maturation à sec
FUS3 : FUSCA3	RFO : Raffinose family oligosaccharides
JAP : Jours après pollinisation	RNase : Ribonucléase
GAs : Acides Gibbérelliques	SnrK Sucrose non fermenting related protein kinase
GEVES : Groupe d'étude et de contrôle des Variétés et des Semences	SSP : Seed storage protein
GFP : Green fluorescent protein	STR : Streptomycine
GNIS : Groupement National Interprofessionnel des Semences et Plants	SPC : Spectinomycine
GRAS : GAI, RGA, SCARECROW	TAE : Tris acétate EDTA
GUS : β -glucuronidase	TCTP : Translationally controlled tumour protein
HR : Humidité relative	TD : Tolérance à la dessiccation
Hsp : Heat shock protein	TS : Type sauvage
INRA: Institut National de Recherche Agronomique	UV : Ultra violet
	WT : Wild type
	ZEP : Zeaxanthine epoxydase

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Structure de la graine et de l'appareil reproducteur femelle de *Medicago truncatula*.

Figure 1.2 : Le développement d'une graine dicotylédone. (A) Photographie montrant le développement de la gousse et de la graine de *M. truncatula* (Chatelain, 2011).

Figure 1.3: Schéma prédictif des interactions entre les régulateurs maîtres du développement de la graine : *LEC1*, *ABI3*, *FUS3* et *LEC2* chez *Arabidopsis*

Figure 1.4 : Acquisition des processus physiologiques gouvernant la qualité physiologique de la graine : la TD, la longévité au cours de la maturation de la graine de *Medicago truncatula* (Chatelain, 2011).

Figure 1.5 : Événements cytologiques et biochimiques intervenant au cours des trois phases de la germination (Bewley and Black, 1997).

Figure 1.6: Modèle de régulation de la dormance et germination par les GAs et l'ABA en réponse à l'environnement basé sur les données obtenues chez *Arabidopsis*.

Figure 1.7: Voie de biosynthèse de l'ABA chez les végétaux supérieurs (Mitsunori *et al.*, 2002).

Figure 1.8: Modèle comparant les voies de signalisation de l'ABA dans les graines pendant la maturation et les tissus végétatifs soumis à un stress osmotique (Fujita *et al.*, 2011).

Figure 2.1 : Représentation schématique du gène *MtABI5* de 1803 paires de bases et de son transcrite de 1299 pnb, ainsi que des constructions génétiques des mutants *Tnt1 Mtabi5-1* et *Mtabi5-2* et des mutants *35S ::MtABI5_EAR* et *35S ::MtABI5 INTR 35S ::MtABI5*.

Figure 2.2: Réaction de ligation LR du système Gateway®.

Figure 2.3: Sélection des racines transformées sous UV au microscope optique après 6 semaines de croissance sur milieu Farhreaus Kanamycine 25µM

Figure 3.1: Vérification de l'expression du motif EAR chez les mutants *35S ::MtABI5_EAR* par RT-PCR.

Figure 3.2 : Vitesse de germination des graines des mutants RNAi *MtABI5* et des graines de type sauvage

Figure 3.3 : Tests de sensibilité à l'ABA de graines de type sauvage, *35S::MtABI5_EAR*, *Mtabi5-1* et *Mtabi5-2*.

Figure 3.4 : (A) Courbes de germination de type sauvage et de mutants *35S ::MtABI5_EAR* après 2 jours de post-maturation à sec (PS), et de germination de type sauvage après 1 an de

post-maturation à sec, données issues de Bolingue *et al.*, (2010). (B) Courbes de germination de type sauvage et de *Mtabi5-1* et *Mtabi5-2*, après 2j de post-maturation à sec. Données issues de Chatelain (2012).

Figure 3.5: Courbes de germination à différents temps de vieillissement (35°C, 75 HR) de type sauvage (A), *35S::MtABI5_EAR* (B) et *Mtabi5-1* (C).

Figure 3.6: (A) Courbes de survie des graines matures de type sauvage, *35S::MtABI5_EAR* et *Mtabi5-1*.

Figure 3.7: Dénombrement des radicules 2,9 mm de type sauvage et de mutant *Mtabi5-1* à TD ré-induite par un stress osmotique.

Figure 3.8: (A-E) Teneur en sucres solubles des graines matures de type sauvage et *35S::MtABI5_EAR*, et de type sauvage et de mutants *Mtabi5*, données issues de Chatelain, (2011).

Figure 3.9: (A) Diagrammes de Venn entre le nombre de gènes surexprimés par surexpression de *35S::MtABI5* (cercle rouge) dans des racines de *Medicago* et le nombre de gènes réprimés chez les mutants *Tnt1 Mtabi5* à au moins une des stades de maturation analysés (cercle vert).

Figure 3.10: Expression relative des gènes cibles potentiels *MtZEP330* et *MtZEP350* par RT-QPCR sur les ADNc de graines matures de *Mtabi5-1*, *Mtabi5-2* et *35S::MtABI5_EAR*.

Figure 3.11: Teneur en ABA (pm/mg MS) dans les graines de type sauvage (R108) à 16, 18 et 21 JAP.

Figure 3.12 : Teneur en ABA (pM/mg MS) chez les graines de type sauvage et de mutant *Mtabi5-1* à 16, 18 et 21 JAP, et de type sauvage et de mutants *Tnt1 Mtabi5-1*, *Mttabi5-2* et *35S::MtABI5_EAR* à 18 et 21 JAP.

Figure 3.13: Teneur en ABA des génotypes type sauvage (A) et *Mtabi5-1* (B) dans des radicules germées avant (T) et après (PEG) le traitement au PEG 48h à -1.7 MPa, 10°C.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1 : T_{50} (temps d'imbibition au bout duquel 50% de la germination est atteinte) des graines de type sauvage et de mutants après 0, 7, 14 et 21 jours après imbibition.

Tableau 3.2: Intensités des sondes correspondant aux gènes *MtABI5* et *MtEM6* pour le témoin (GUS R108) et la sur-expression de *MtABI5* dans des racines de *Medicago* (MtABI5 R108).

Tableau 3.3: Liste des groupes des principales fonctions biologiques liées aux gènes différentiellement sous-exprimés dans l'analyse du transcriptome de surexpression ectopique de *MtABI5*. La liste complète est présentée en Annexe XI.

Tableau 3.4: Liste des fonctions biologiques surreprésentés dans les données transcriptomiques de gènes sous-exprimés par expression ectopique de *MtABI5* dans des racines de *Medicago* et inversement surexprimés dans le transcriptome de graines de mutants *abi5-1* et *abi5-2* à l'abscission.

Tableau 3.5: Liste des 8 gènes surexprimés par surexpression ectopique de *35S::MtABI5* dans des racines de *Medicago* et surexprimés dans les radicules à TD ré-induite de type sauvage.

Tableau 3.6: (A) Données d'expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'ABA au cours de la maturation des graines de mutants *Tnt1 Mtabi5-1* et *Mtabi5-2*. (B) Données d'expression des gènes impliqués dans le catabolisme de l'ABA.

LISTE DES ANNEXES

Annexe I: Séquence de la construction *MtABI5* ::EAR.

Annexe II: Cartographie du plasmide pENTR™/D-TOPO®.

Annexe III: Composition du milieu de culture LB (Lysogeny Broth).

Annexe IV: Composition du mix PCR (A) et détails des programmes utilisés pour les PCR de criblage des mutants, de vérification des transformations et vérification de l'insert EAR chez le mutant *35S::MtABI5_EAR*.

Annexe V: Liste des amorces utilisées.

Annexe VI: Carte du vecteur de destination pK7WG2D.1 utilisé pour la surexpression de *MtABI5*.

Annexe VII: Composition du mix PCR (A) et détails du programme (B) pour la PCR haute fidélité, utilisée afin de produire l'amplicon à insérer dans le pENTR par système Gateway.

Annexe VIII: Composition du milieu de culture Farhaeus.

Annexe XIX: Programme pour les RT- QPCR.

Annexe X: Liste des annotations GO surreprésentés parmi les 948 gènes significativement surexprimés dans les racines *35S::MtABI5*.

Annexe XI: Liste des annotations 50 GO surreprésentés parmi les 1820 gènes significativement sous-exprimés dans les racines *35S::MtABI5*.

Annexe XII: Tableau des gènes surexprimés dans les racines *35S::MtABI5* et réprimés dans le transcriptome des mutants *Tnt1 Mtabi5* au stade abscission.

Annexe XIII: Liste des 77 gènes surexprimés par expression ectopique de *35S::MtABI5* et réprimés dans des mutants *Tnt1 Mabi5* ($p < 0,001$).

Annexe XIV: Courbe étalon du dosage de l'ABA des graines 18 et 21 JAP de type sauvage, *35S::MtABI5_EAR*, *Tnt1 abi5-1* et *abi5-2*. La valeur du y-intercept est de -0,778, la pente est de -1,0471.

SOMMAIRE

CONTEXTE ET INTRODUCTION	1
1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1.1. La plante <i>Medicago truncatula</i>	3
1.2. Formation et développement de la graine	3
<i>1.2.1 Accumulation des réserves</i>	<i>4</i>
<i>1.2.2 Tolérance à la dessiccation</i>	<i>4</i>
<i>1.2.3 Longévité</i>	<i>5</i>
<i>1.2.4 Dormance et germination</i>	<i>5</i>
1.3 Les voies du métabolisme et de la signalisation de l'ABA	6
<i>1.3.1 Voies de synthèse et de dégradation de l'ABA</i>	<i>6</i>
<i>1.3.2 Voie de signalisation de l'ABA dans les graines</i>	<i>7</i>
1.4 Le facteur de transcription ABI5	7
1.5 Rôle de ABI5 dans la maturation des graines	8
1.6 Objectifs du stage	9
2. MATERIEL ET METHODES	10
2.1 Matériel biologique : mutants étudiés	10
2.2 Obtention de racines transformées 35S ::MtABI5_GFP et 35S ::GUS_GFP	10
<i>2.2.1 Construction des plasmides pour la surexpression d'ABI5 dans des racines transgéniques de M. truncatula</i>	<i>10</i>
<i>2.2.2 Transformation de souches d'Agrobacterium rhizogenes</i>	<i>11</i>
<i>2.2.3 Transformation de racines de Medicago truncatula</i>	<i>11</i>
2.3 Condition de culture	11
2.4 Tests de physiologie	12
<i>2.4.1 Germination</i>	<i>12</i>
<i>2.4.2 Sensibilité à l'ABA</i>	<i>12</i>
<i>2.4.3 Vieillesse accélérée</i>	<i>12</i>
<i>2.4.4 Ré-induction à la tolérance à la dessiccation</i>	<i>12</i>
2.5 Dosage des sucres solubles	12
2.6 Analyse de la teneur en ABA	13
2.7 Extraction d'ADN génomique	13
2.8 Extraction d'ARN totaux	13
2.9 PCR	13
2.10 RT-QPCR	14

2.11 Analyse transcriptomique	14
2.11.1 Amplification des ARNm et marquage des ADNc avec cy3/cy5	14
2.11.2 Hybridation sur lame	14
2.11.3 Traitement des données	15
2.12 Tests statistiques	15
3. RESULTATS	16
3.1 Caractérisation des mutants Mtabi5	16
3.1.1 Criblage des lignées 35S ::MtABI5_EAR et RNAi homozygotes	16
3.1.2 Caractérisation physiologique des mutants Mtabi5	17
3.1.3 Caractérisation de la composition en sucres solubles des graines matures des mutants Mtabi5	19
3.2 Etude des cibles putatives de MTABI5	20
3.2.1 Etude de la surexpression ectopique de MtABI5 dans les racines transgéniques de Medicago	20
3.2.2 Identification des cibles putatives de MtABI5 impliquées dans la maturation des graines de Medicago	21
3.2.3 Identification des cibles putatives de MtABI5 impliquées dans la réinduction de la tolérance à la dessiccation	23
3.3 Implication potentielle de MtABI5 dans la régulation de la teneur en ABA	23
4. DISCUSSION	25
4.1 Modification d'action du gène MtABI5 via l'utilisation du motif EAR	25
4.2 Rôle potentiel de MtABI5 dans l'établissement de la dormance au cours du développement de la graine, en lien avec la modulation de la teneur en ABA.....	26
4.3 Rôle de MtABI5 dans la répression des gènes de la photosynthèse, et lien avec l'acquisition de la longévité	28
4.4 Rôle de MtABI5 dans la réinduction de la TD : réponse au froid et au stress hydrique ..	28
CONCLUSION	29
BIBLIOGRAPHIE	30
ANNEXES	36

CONTEXTE ET INTRODUCTION

En France, la filière semence est un secteur compétitif et dynamique, avec des liens étroits entre les secteurs privé et public, par l'intermédiaire d'organismes tels que le GNIS, la FNAMS et le GEVES. Ce secteur représente près de 2,4 Mrd € de chiffre d'affaire en 2009-2011 (données GNIS, 2012), soit une augmentation de +23% de chiffre d'affaire par rapport à 2004-2005. En 2013, la France est devenue le premier pays exportateur de graines semencières et potagères, devant les Etats-Unis et les Pays-Bas. De grands groupes Français tels que LIMAGRAIN sont des leaders mondiaux sur le marché de la semence (4^{ème} leader mondial, 2nd en semences potagères et maraîchères). Ce marché très compétitif exige des producteurs de semences et des semenciers une qualité irréprochable vis à vis de leur client, c'est-à-dire des lots ayant une levée rapide et homogène, garantissant un rendement maximal et une meilleure gestion des pratiques culturales par la suite.

Des instituts publics tels que l'INRA, organisme public créé en 1946, travaillent en collaboration avec le monde professionnel des semences. Au niveau du centre Angers-Nantes, cinq équipes de recherche au sein d'une UMR IRHS étudient les déterminants de la qualité physiologique et sanitaire de la graine. La qualité physiologique (ou vigueur) est l'ensemble des caractéristiques d'un lot de semences lui permettant de germer et de lever de façon rapide et homogène, indépendamment des conditions environnementales, et de tolérer une conservation prolongée (longévité). Les travaux portent sur les graines de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* ainsi que sur celles des légumineuses *Medicago truncatula* et *Pisum sativum*. En plus de produire des données génériques sur la qualité physiologique, l'étude des graines de Fabaceae présente des enjeux agronomiques importants en Europe en tant que graines protéagineuses, car elles constituent une ressource protéique d'intérêt majeur pour l'alimentation humaine ou animale. Ces plantes peuvent fixer l'azote atmosphérique, ce qui permet de diminuer l'utilisation d'engrais pour ces cultures, ou bien pour les cultures suivantes (par des rotations culturales ou des cultures d'association).

La qualité physiologique de la graine est acquise au cours de sa maturation. La tolérance à la dessiccation (TD) est acquise en même temps que l'accumulation des réserves, suivie par l'installation de la dormance et l'acquisition de l'aptitude à la conservation (longévité). L'acquisition de la qualité physiologique est dépendante des conditions de culture : par exemple, la qualité est affectée si un stress hydrique survient au cours de la maturation. Des graines de soja exposées à un stress hydrique au cours du remplissage de la graine ont un pourcentage de germination plus faible que les témoins (Dornbos *et al.*, 1989). En 1984, des criblages visant à sélectionner des mutants germant en présence d'ABA exogène ont permis d'identifier les gènes ABI (ABA Insensitive, Kornneef *et al.*, 1984). Parmi ceux-ci, le facteur de transcription *ABI5* a été découvert (Finkelstein et Lynch, 2000). *ABI5* est un gène qui code pour un facteur de transcription de type *basic leucine zipper* (bZIP). Chez les mutants *ABI5* d'*Arabidopsis*, nous pouvons observer une diminution de la sensibilité à l'ABA lors de la germination. C'est un gène impliqué dans la voie de signalisation de l'ABA qui agit en coopération avec *ABI3* comme un régulateur majeur dans la maturation et la dormance des

graines ainsi que la tolérance à la déshydratation des jeunes plantules d'*A. thaliana* (Finkelstein *et al.*, 2002). Au sein de l'équipe Conserto, des données préliminaires suggèrent que le gène *MtABI5* chez *Medicago truncatula* semble être impliqué dans la dormance, la vitesse de la germination et la longévité des graines, des phénotypes qui n'ont jusqu'alors pas été observés ou déterminés chez *Arabidopsis* (Buitink et Chatelain, données non publiées). Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que le gène *MtABI5* participerait à l'acquisition de la qualité physiologique de la graine. Une étude plus approfondie de celui-ci chez les légumineuses permettrait de caractériser les déterminants potentiels de la qualité de la graine, notamment ceux qui seraient liés à la longévité. Pour cela, la connaissance du réseau de gènes mis en jeu dans la signalisation de l'ABA est nécessaire.

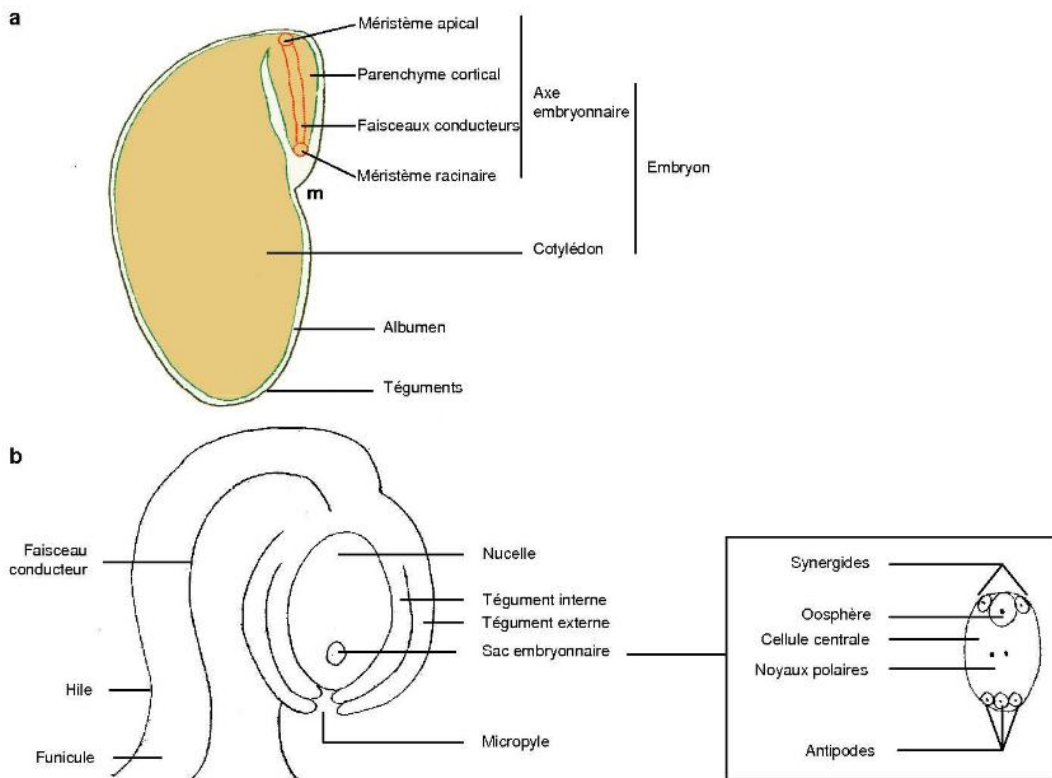


Figure 1.1: Structure de la graine et de l'appareil reproducteur femelle de *Medicago truncatula*. (a) Schéma de la coupe transversale d'une graine. (b) Ovule.

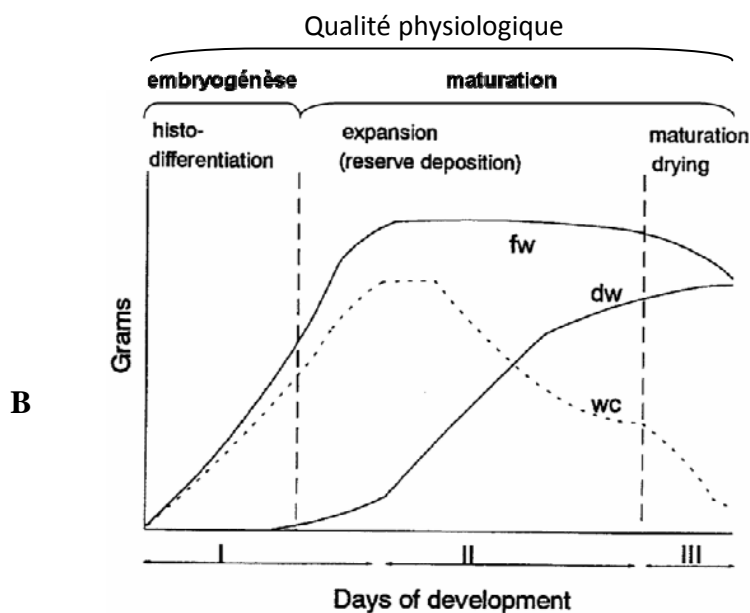
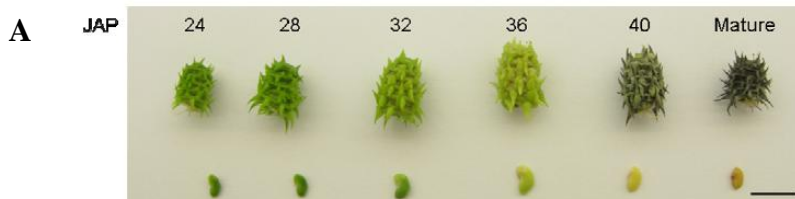


Figure 1.2 : Le développement d'une graine dicotylédone. (A) Photographie montrant le développement de la gousse et de la graine de *M. truncatula* (Chatelain, 2011). (B) Schéma résumant les phases du développement basées sur l'évolution de la masse de la graine (Dry Weight) et de sa teneur en eau (Water Content). D'après Bewley and black, 1997.

1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 La plante *Medicago truncatula*

La luzerne tronquée (*Medicago truncatula*) est une herbacée annuelle de la famille des Fabaceae, proche de la luzerne cultivée (*Medicago sativa*). Cette famille rassemble environ 650 genres et 20 000 espèces (Doyle et Luckow, 2003). *Medicago truncatula* est originaire du pourtour Méditerranéen. Son cycle de développement dure environ 12 semaines. La plante est constituée d'un colet, les feuilles sont trifoliées. Son inflorescence porte 4 à 5 fleurs jaunes, de 5 à 8 mm de long. Chaque fleur contient environ 10 ovules, et la fleur s'ouvre après auto-fécondation, c'est une espèce autogame diploïde ($2n=16$) dont le génome (www.medicago.org) de petite taille (450 millions de paires de bases) séquencé contient environ 30 000 gènes identifiés. Une banque de mutants d'insertion *Tnt1* est disponible (<http://bioinfo4.noble.org/mutant>). Le CRB de *M. truncatula*, situé à Montpellier, regroupe 2500 accessions gérées par le CIRAD, l'INRA et SupAgro (<http://www1.montpellier.inra.fr/BRC-MTR>). Les travaux décrits ci-dessous portent sur le génotype R108 (*Medicago truncatula ssp tricycla*), issu de l'écotype R108-1. Chez cette espèce, au cours du développement de la graine, l'embryon se développe au détriment de l'albumen. Une assise cellulaire d'albumen subsiste entre l'embryon et les téguments dans la graine sèche.

1.2 Formation et développement de la graine

La graine est issue de la double fécondation allogame ou autogame (selon les espèces). Chez les angiospermes, elle est constituée de téguments provenant des parois de l'ovaire (tissus maternels), de l'albumen triploïde, issu de la fécondation des deux noyaux polaires du sac embryonnaire (maternel) par le second noyau mâle (paternel), et de l'embryon, issu de la fécondation de l'oosphère maternel par le noyau mâle du pollen (**Figure 1.1**).

Le développement de la graine est divisé en 2 phases : l'embryogénèse et la maturation (**Figure 1.2**). L'embryogénèse est une phase d'histo-différenciation au cours de laquelle l'embryon acquiert ses plans apex-base et radial, ainsi que ses méristèmes fondamentaux par une série de divisions cellulaires successives. La maturation comprend 2 phases successives : le remplissage de la graine, caractérisé par le dépôt des substances de réserve et un allongement cellulaire des organes de réserve concernés (embryon, albumen, périsperme) ; puis la maturation dite « tardive », au cours de laquelle intervient la dessiccation de la graine (**Figure 1.2**). Au cours des 2 phases de maturation, la graine acquiert également sa qualité physiologique, caractérisée par sa TD, sa capacité germinative, sa dormance et sa longévité. Chez *M. truncatula*, le développement de la graine dure entre 42 et 44 jours (**Figure 1.2**).

Le développement de la graine est sous le contrôle de quatre gènes régulateurs majeurs : *FUS3*, *ABI3*, *LEC1* et *LEC2* (Holdsworth *et al.*, 2008). *FUS3*, *ABI3* et *LEC2* codent pour des facteurs de transcription à domaine B3. *LEC1* code pour un facteur de transcription de fixation au domaine NF-Y. Les mutants *abi3* ont un phénotype de perte de sensibilité à l'ABA (germination en présence d'ABA exogène), une diminution importante

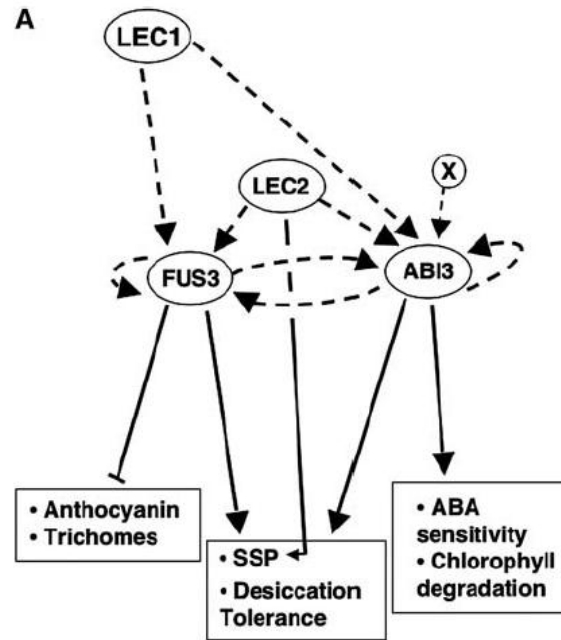


Figure 1.3: Schéma prédictif des interactions entre les régulateurs maîtres du développement de la graine : *LEC1*, *ABI3*, *FUS3* et *LEC2* chez *Arabidopsis*. Les flèches en traits plein représentent les voies de signalisation validées expérimentalement et celles en pointillés sont à confirmer (To, 2006).

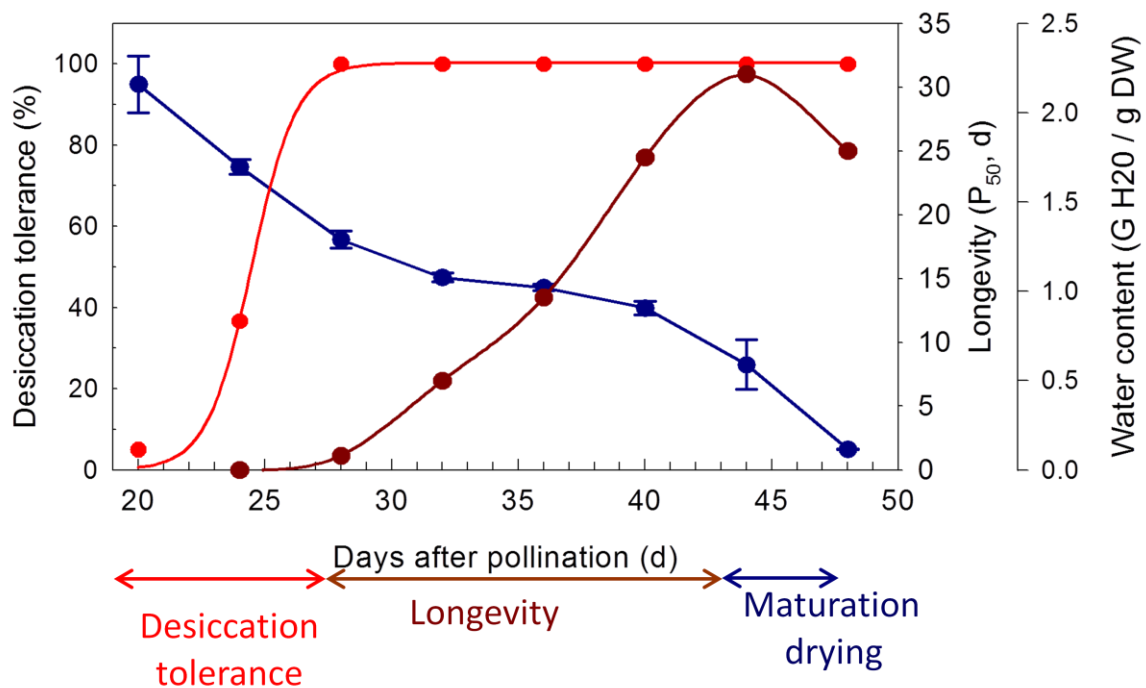


Figure 1.4 : Acquisition des processus physiologiques gouvernant la qualité physiologique de la graine : la TD, la longévité au cours de la maturation de la graine de *Medicago truncatula* (Chatelain, 2011). L'évolution de la teneur en eau au cours de la maturation est également indiquée.

des réserves protéiques, une absence de la dégradation de la chlorophylle en fin de maturation et une forte sensibilité à la dessiccation (Raz *et al.*, 2001). Ces mutants dont la sensibilité à l'ABA est altérée sont donc des outils précieux pour comprendre les mécanismes régulateurs de l'acquisition de la qualité germinative. Les graines des mutants *lec1*, *fus3* et *lec2* sont également sensibles à la dessiccation et présentent un phénotype d'accumulation d'anthocyanes et de défaut dans l'acquisition de l'identité des cotylédons. Nous savons également que ces facteurs de transcription interagissent entre eux: la **Figure 1.3** (To, 2006), montre que *LEC1* régulerait la transcription de *ABI3* et *FUS3*.

1.2.1 Accumulation des réserves

Chez *M. truncatula*, les réserves accumulées sont principalement d'origine protéique, sous forme de vicilines, de convicilines et de légumine. Une graine mature contient entre 35 et 45% du poids sec de protéines, 10% de lipides, 10% d'oligosaccharides (Djemel *et al.*, 2005). Ces derniers appartiennent à la famille des RFO: raffinose, stachyose (majoritaire chez cette espèce) et verbascose. Les RFO sont synthétisés par l'ajout d'une molécule de galactose à une molécule de saccharose pour donner successivement : le raffinose (triholoside), le stachyose (tétraholoside) et le verbascose. La synthèse du raffinose peut se faire de deux manières : par condensation du galactose et du saccharose, ou du fructose avec du melibiose, toutes deux par la raffinose synthase (Obendorf, 1997). Lors de la phase tardive de la maturation, le stachyose s'accumule de manière concomitante à une diminution du saccharose. Les RFO seraient une importante source de carbone au cours de la germination, et également impliqués dans la TD (Rosnoblet *et al.*, 2007). Chatelain *et al.*, (2012) a également montré que la teneur en RFO est corrélée à la longévité, mais le rôle précis des RFO n'est pas clair.

1.2.2 Tolérance à la dessiccation

La TD est la capacité d'un organisme à survivre à un retrait total de l'eau intracellulaire (Crowe *et al.*, 1992). Celle-ci est mesurée par la capacité de la graine à germer lors de la réhydratation après un séchage rapide à une teneur en eau équivalente à celle des graines matures (8-10%). Chez *M. truncatula*, elle est acquise au cours de la maturation vers 16-20 JAP (Rosnoblet *et al.*, 2007, illustrée dans la **Figure 1.4**). Les mécanismes conférant la TD sont l'accumulation de sucres non réducteurs, de composés amphiphiles (Buitink *et al.*, 2000) et des protéines de stress de type HSP et LEA. Les sucres solubles non réducteurs joueraient un rôle protecteur en remplaçant les groupements OH de l'eau au moyen de leurs fonctions hydroxyles et en participant à la formation de l'état vitreux à l'état sec (Hoekstra *et al.*, 2001). Les HSP et les protéines LEA se lient de façon non covalente aux protéines (molécules chaperonnes) et empêchent leur agrégation pendant la dessiccation (Tunnacliffe et Wise, 2007). Ces protéines LEA interagiraient également avec les membranes pour maintenir leur intégrité fonctionnelle. Ainsi, des LEA, comme EM6 et EM1 interagissent avec les phospholipides membranaires des mitochondries et empêchent la déformation des membranes au cours de la perte en eau. Les graines possèdent une large panoplie de protéines LEA et HSP

mais seulement quelques unes d'entre-elles sont spécifiquement accumulées en lien avec la TD (Boudet *et al.*, 2006). Des systèmes antioxydants permettant de lutter contre les réactions d'oxydation engendrées par les espèces réactives de l'O₂ lors de la dessiccation seraient également importants (Hoekstra *et al.*, 2001).

1.2.3 Longévité

La longévité (ou aptitude à la conservation) est la durée pendant laquelle une graine peut être stockée sans perte de viabilité. La longévité d'un lot de semences est souvent exprimée en P₅₀, correspondant au temps nécessaire pour obtenir 50% de survie du lot après stockage. Chez *Medicago*, elle est acquise au cours de la maturation tardive de la graine, entre 25 et 44 JAP (**Figure 1.4**). Les conditions de stockage des graines, c'est-à-dire la température, l'humidité relative et l'oxygène contrôlent la longévité. Cependant, des propriétés intrinsèques telles que l'espèce, le génotype, les conditions de culture lors du développement et le stade de récolte de la graine peuvent également influencer la longévité. Des graines de palmier peuvent ainsi germer après une conservation de 2000 ans alors que dans les mêmes conditions, celles d'*A. thaliana* survivent pendant une décennie selon leur génotype (Sallon *et al.*, 2008 ; Clercx, 2004).

La longévité des graines est essentiellement due à la présence d'un état vitreux cytoplasmique à l'état sec, c'est à dire un liquide amorphe dont la viscosité ressemble à celle d'un solide. Les macromolécules sont ainsi stabilisées, le métabolisme (notamment la respiration et la production d'ATP) est arrêté et les réactions délétères sont très fortement ralenties (Buitink et Leprince, 2004). La nature de l'état vitreux est inconnue mais il est suspecté d'être formé par des sucres et des protéines LEA (Buitink et Leprince, 2004). D'autres mécanismes impliqués dans la longévité ont été évoqués tels que la présence de protéines HSP, la présence d'antioxydants liposolubles, mais aussi à des mécanismes de réparation de l'ADN comme les DNA ligases (Rajjou et Debaujon, 2008).

1.2.4 Dormance et germination

La dormance est définie comme un état physiologique de la graine intacte correspondant à une inaptitude temporaire à germer alors que les conditions environnementales lui sont favorables (Bewley and Black, 1997). Chez *Medicago*, une dormance physiologique peu profonde et une dormance physique co-existent. Elles s'établissent au cours du développement, à partir de 36 JAP (Bolingue *et al.*, 2010). La dormance physique est imposée par les téguments de la graine et empêche l'imbibition de l'embryon. Elle est levée par scarification des téguments. La dormance physiologique primaire est imposée chez la graine fraîchement récoltée par l'ABA endogène produit au cours de la maturation (Bolingue *et al.*, 2010). Elle est progressivement levée pendant le stockage des graines correspondant à la post-maturation à sec (de 1 à 3 mois chez *M. truncatula*) et/ou par la perception de signaux environnementaux reçus par la graine au cours de l'imbibition.

La germination est l'ensemble des processus depuis l'imbibition de la graine conduisant à la percée de la radicule hors des téguments. La germination est permise lorsque les dormances ont été levées et que les conditions environnementales sont favorables. Chez *M. truncatula*, la

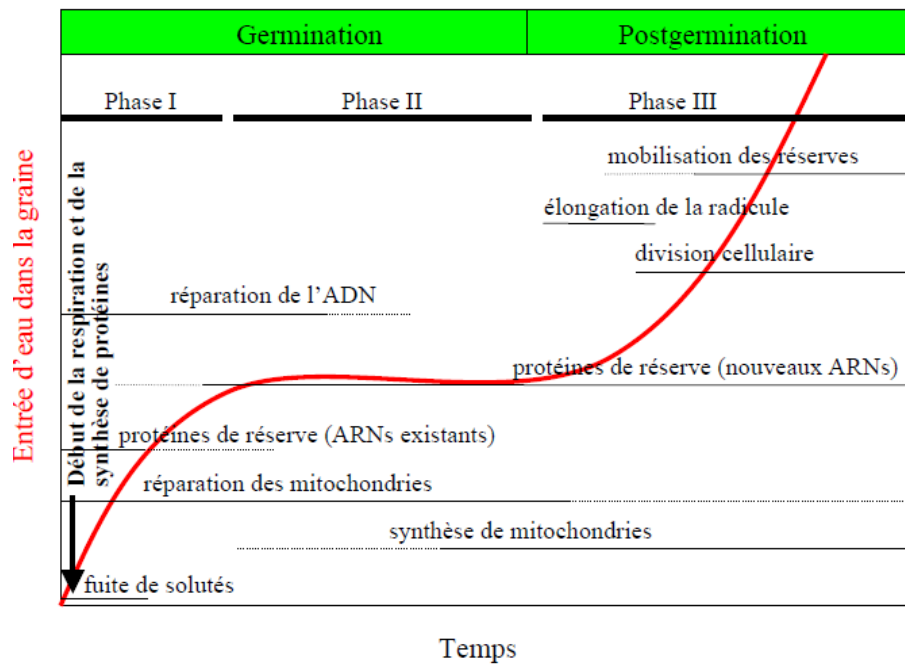


Figure 1.5 : Evénements cytologiques et biochimiques intervenant au cours des trois phases de la germination (Bewley and Black, 1997).

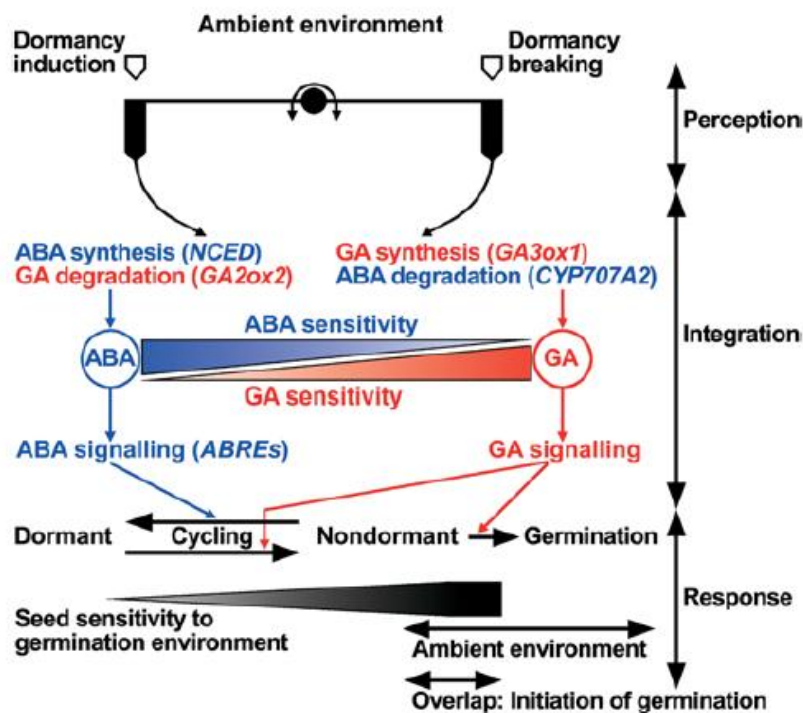


Figure 1.6: Modèle de régulation de la dormance et germination par les GAs et l'ABA en réponse à l'environnement basé sur les données obtenues chez *Arabidopsis*. D'après ce modèle, les facteurs de l'environnement contrôlent le ratio GA/ABA et la sensibilité de la graine à ces hormones. La synthèse et l'activation des voies de signalisation de l'ABA, ainsi que le catabolisme des GAs, maintiennent la graine dans un état dormant. La synthèse de GAs, l'activation des voies de signalisation de celles-ci par dégradation des DELLA et le catabolisme de l'ABA favorisent la levée de dormance puis la germination. La sensibilité de la graine à son environnement est ainsi modulée, lui permettant d'interrompre la germination et d'entrer à nouveau en dormance, (Finch-Savage et Leubner 2006).

température optimale de germination est de 18°C. La germination peut être divisée en 3 phases (**Figure 1.5**, Bewley and Black, 1997). La phase I est caractérisée par une augmentation passive de la teneur en eau de la graine sèche mature. Au cours de la phase II, le métabolisme reprend rapidement, la teneur en eau dans les graines reste constante : il y a synthèse d'ARNm, qui sont stockés jusqu'à l'imbibition, et de protéines. Enfin, la phase III est caractérisée par l'élongation de l'axe embryonnaire et la percée de la radicule hors des téguments.

La levée de dormance et la germination sont contrôlées par le ratio en ABA/GA. Ce ratio est fortement contrôlé par les conditions environnementales pendant la formation de la graine et pendant l'imbibition (**Figure 1.6**). Durant la levée de dormance puis la germination, ce ratio évolue en faveur des GAs et est déterminé par une capacité accrue à dégrader l'ABA accumulé lors de la maturation ou pendant l'imbibition et un accroissement de la synthèse des GAs. Les GAs ont ensuite une action stimulatrice sur la germination en augmentant le potentiel de croissance de l'embryon et en éliminant les contraintes mécaniques imposées par les structures tégumentaires autour de la pointe radiculaire, en stimulant notamment la synthèse des hydrolases des parois. En revanche, le rôle inhibiteur de l'ABA dans la germination serait d'inhiber le potentiel de croissance de l'embryon et d'interférer avec la synthèse des GAs (Holdsworth *et al.*, 2008). Ce rôle inhibiteur intervient tardivement par rapport à celui des GAs visant à affaiblir les contraintes mécaniques des parois de l'albumen et des téguments. Il faut noter que d'autres hormones telles que les brassinostéroïdes et l'éthylène semblent également jouer un rôle dans la germination de la graine (2et Leubner, 2012).

1.3 Les voies du métabolisme et de la signalisation de l'ABA

L'acide abscissique (ABA) est une molécule à 15 carbones appartenant à la famille des isoprénoïdes (Nambara et Poll, 2003). Cette phytohormone a été isolée et identifiée pour la première fois en 1960. C'est une molécule signal produite par la plante et perçue à très faibles quantités (10^{-7} à 10^{-5} M). Elle est impliquée dans la régulation de la croissance et du développement, mais aussi au cours de la réponse à un stress hydrique, osmotique ou biotique chez la plante entière. L'ABA régule la fermeture des stomates dans les cellules de garde, semble jouer un rôle dans la résistance aux pathogènes (Mauch-Mani et Mauch, 2005), régule la réponse aux stress abiotiques tels qu'un stress hydrique, thermique ou salin (Fujita *et al.*, 2011). Chez les graines, l'ABA régule l'accumulation des réserves, l'acquisition de la TD, la dormance, la viviparité et la capacité germinative (Leung *et al.*, 1998).

1.3.1 Voies de synthèse et de dégradation de l'ABA

Chez *A. thaliana*, les gènes de synthèse de l'ABA dans les graines ont été identifiés (Nambara et Poll, 2003, **Figure 1.7**). Celui-ci est synthétisé à partir des caroténoïdes par clivage oxydatif. La zeaxanthine époxydase (*ABAI/ZEP*) est la première enzyme régulant la synthèse de l'ABA à partir de son précurseur, les caroténoïdes. Elle convertit le zéaxanthine en all-*trans*-violaxanthine. Le deuxième nœud de régulation de la synthèse de l'ABA implique les gènes *NCED*. Ils codent pour l'enzyme Nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase

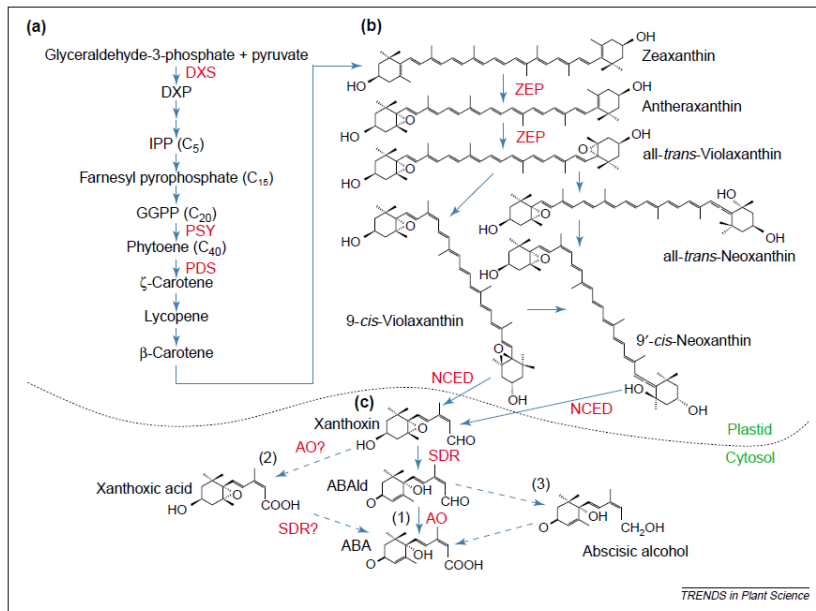


Figure 1.7: Voie de biosynthèse de l'ABA chez les végétaux supérieurs (Mitsunori *et al.*, 2002). (a) Voie de synthèse des caroténoïdes. (b) Formation de l'époxycaroténoïde et son clivage dans les plastides pour former l'ABA. La première étape clé est réalisée par les enzymes codées par les gènes *ZEP*. La deuxième étape clé correspond au clivage oxydatif réalisée par une enzyme codée par les gènes *NCED*.

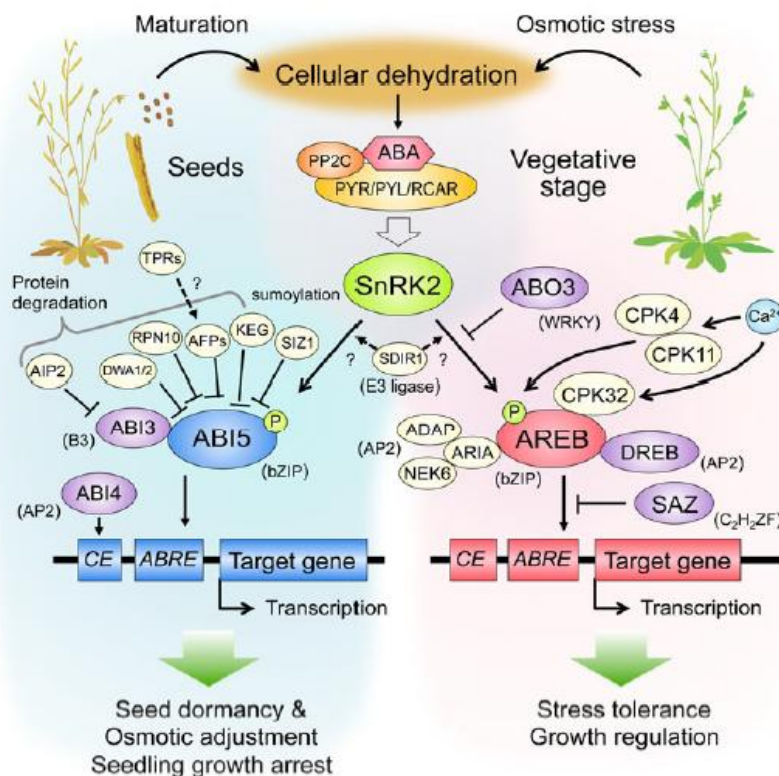


Figure 1.8: Modèle de la régulation transcriptionnelle du signal de l'ABA par la famille des facteurs de transcription AREB/ABFs et ABI5 (Fujita *et al.*, 2011).

violax-anthine en xanthoxine, le précurseur de l'ABA. Chez *A. thaliana*, les *NCED* sont une famille multigénique. La biosynthèse de la xanthoxine est effectuée dans les plastes qui clive la all-*trans*- (Mitsunori *et al.*, 2002) puis l'ABA est synthétisé dans le cytosol. Au cours de la maturation de la graine d'*A. thaliana*, l'ABA s'accumule dans les graines en deux temps (Finkelstein *et al.*, 2002). Un premier pic d'ABA apparaît en début de maturation. D'origine maternelle, il est transporté par le phloème et est absorbé par la graine par deux transporteurs spécifiques. Son rôle est de stimuler l'accumulation des réserves et d'inhiber la viviparité. Ensuite, un second pic de synthèse est observé au cours du remplissage. Il correspond à une néo synthèse par l'embryon, et serait responsable de la mise en place de la dormance.

La dégradation de l'ABA se fait par hydroxylation. L'ABA est hydroxylé en 8'hydroxy-ABA puis en acide phaséique, qui est dégradé. L'hydroxylation de l'ABA se fait par l'enzyme ABA-8-hydroxylase, qui est codée par des gènes de la famille du cytochrome P540 *CYP707A* (Okamoto *et al.*, 2006). L'enzyme ABA-8-hydroxylase est codée par 4 membres de la famille des *CYP707A*. Leur transcription peut être induite en cas de stress osmotique ou par un traitement exogène à l'ABA. Il y a une accumulation de ses transcrits dans la graine sèche (Okamoto *et al.*, 2006).

1.3.2 Voie de signalisation de l'ABA dans les graines

Chez *Arabidopsis*, plus de 50 gènes impliqués dans le signal de l'ABA ont été caractérisés (Finkelstein *et al.*, 2002). Ces gènes codent pour des facteurs de transcription et des régulateurs positifs et négatifs, correspondant à des phosphatases et kinases, et participent à un réseau visant à activer les promoteurs des gènes en réponse à l'ABA. La transduction du signal de l'ABA se fait par l'activation du complexe PYR/PYL/RCAR PP2c-Récepteur par l'ABA. Il permet l'inactivation de la protéine phosphatase 2C (PP2C), ce qui entraîne la phosphorylation des protéines de la famille des SnRK2, qui vont par la suite phosphoryler sous leur forme active les facteurs de transcription. Ceux-ci vont ensuite activer les promoteurs de gènes en réponse à l'ABA. Parmi ceux-ci *ABI3*, *ABI4* et *ABI5* jouent un rôle dans la maturation des graines (Lynch *et al.*, 2012, Fujita *et al.*, 2011, **Figure 1.8**). *ABI4*, *ABI3* et *ABI5* semblent contrôler l'accumulation des réserves, l'acquisition de la TD et la dormance au cours de la maturation en réponse à l'ABA (Brocard, 2002).

1.4 Le facteur de transcription ABI5

ABI5 est un facteur de transcription appartenant à la famille des facteurs de type bZIP (Finkelstein *et al.*, 2000). Ce facteur de transcription reconnaît les éléments *cis* dits ABRE correspondant au motif ACGT (G Box). Les facteurs de transcription bZIP s'associent en dimères pour se fixer sur l'ADN et réguler l'expression des gènes cibles. *ABI5* a été découvert en isolant des mutants d'*A. thaliana* dont les graines germaient en présence d'ABA. Chez *Arabidopsis*, Il appartient à une famille *ABI5/ABF/ABRE* composée de 13 gènes au rôle homologue: *ABI5*, *ABF1*, *ABF2/AREB1*, *ABF3*, *ABF4/AREB2*, *AREB3* et *GBF4* (Brocard

et al., 2002), *AtBZIP12/EEL*, 13, 14, 15, 27, 67 (Carles *et al.*, 2002). L'expression d'*ABI5* est élevée dans des graines matures d'*Arabidopsis* et dans des racines soumises à un stress hydrique, alors qu'il est bas au sein des organes floraux et végétatifs (Brocard *et al.*, 2002). Chez *Medicago*, l'ADNg de *ABI5* est constitué de 1803 pb, avec 4 exons et 3 introns. *MtABI5* code pour un ARN messager de 1299 bases. L'ABA régule l'activité de *ABI5* par phosphorylation de la protéine (Dai *et al.*, 2013) via les kinases de type SnrK2 et SnrK3. Ce gène est également induit en amont par *ABI3* (Lopez-Molina *et al.*, 2002 ; Santos-Mendoza *et al.*, 2008) mais aussi par *ABI4* (Carles *et al.*, 2002).

1.5 Rôle de *ABI5* dans la maturation des graines

En dépit de la multitude des travaux caractérisant le rôle d'*ABI5* dans les voies de signalisation par l'ABA, son rôle dans la biologie de la graine reste encore mal compris. Chez *Arabidopsis*, les graines des mutants *abi5* n'ont pas de défauts morphologiques ou physiologiques apparents, si ce n'est une germination insensible à l'ABA. L'implication d'*ABI5* dans la biologie de la graine a été déduite dans un premier temps en mettant en évidence ses cibles putatives dont l'expression est contrôlée par les éléments *cis* ABRE. Ainsi, il régule notamment des gènes codant pour des LEA, comme *AtEM6* et *AtEM1* (Carles *et al.*, 2002), *LEA1* (AT1G32560.1), *LEA D-29* (AT4G36600.1), la protéine *Dc-8* (AT2G36640.1, Reeves *et al.*, 2011), ce qui suggère qu'il jouerait un rôle dans la maturation de la graine. Mais celui-ci reste mal compris jusqu'à présent. Chez *M. truncatula*, *MtABI5* régulerait également des gènes liés à la phase tardive de la maturation, comme l'établissement de la dormance et l'acquisition de la longévité. En effet, les graines des mutants *abi5* ne sont pas dormantes, et ont une aptitude à la conservation moins importante (Chatelain, 2011). Ces données doivent encore être confirmées.

Chez *Arabidopsis*, d'autres cibles identifiées de *ABI5* seraient les gènes *PGIP* (Kanai *et al.*, 2010). Les PGIPs favorisent la dégradation des polygalacturonanes et permettent la germination, mais un tel phénotype n'est pas observé chez *Arabidopsis*. Ces données confirmeraient donc le rôle d'*ABI5* dans la germination des graines. Cependant, la totalité des gènes cibles de ce facteur de transcription n'est pas encore connue. Ceci est dû en partie à des observations montrant que *ABI5* induit l'expression de ses cibles en interagissant de manière très complexe et encore mal comprise avec différents partenaires, tels que *ABI3*, d'autres protéines de la même famille qu'*ABI5* (*EEL*, *DPBF2*, *DPBF4*, *AREB3*) ainsi que des protéines *ABI5*-binding protein.

Un des autres rôles identifiés d'*ABI5* serait son implication dans l'induction de la tolérance à la sécheresse dans les graines germées et dans l'arrêt de croissance post-germinatif en conditions de stress osmotiques. En effet, chez *Arabidopsis*, en cas de stress osmotique ou en présence d'ABA exogène, la croissance de la racine s'arrête. Il a été montré que *ABI5* est un déterminant nécessaire pour permettre l'arrêt de cette croissance, régulé par l'ABA (Lopez-Molina, 2001). Cet arrêt post-germinatif serait un mécanisme de défense de la jeune plantule, non autotrophe, afin de la protéger de la sécheresse et de lui permettre de reprendre la

croissance lorsque les conditions environnementales sont meilleures. *ABI5* agirait en aval de *ABI3* pour permettre l'arrêt post-germinatif de la croissance (Lopez-Molina *et al.*, 2002). Bien que le stress osmotique subi par les graines germées d'*abi5* n'est pas contrôlé et que le niveau de sensibilité à la sécheresse n'a pas été mesuré par ces auteurs, leur travaux sont à rapprocher de ceux obtenus au sein du laboratoire sur la ré-induction de la TD. En effet, un traitement osmotique de -1.7 MPa par du PEG sur des graines germées à un stade très précis (radicules germées de 2,9 mm) rétablit la TD dans les radicules sensibles chez *Medicago* (Buitink *et al.*, 2003).

1.6 Objectifs du stage

Les objectifs du stage sont doubles. Tout d'abord, il s'agit de déterminer les cibles potentielles d'*ABI5* chez *M. truncatula ssp tricycla*. Pour ce faire, le transcriptome de racines sur-exprimant *35S::MtABI5-GFP* est obtenu et comparé aux données transcriptomiques déjà disponibles sur des graines de mutants *Tnt1 Mtabi5* au cours de la maturation et de la réinduction de la TD chez cette espèce. Les données sont obtenues en sur-exprimant *MtABI5* dans des racines de *Medicago* génotype R108, en présence de 5 μ M d'ABA. Afin de valider les cibles potentielles de *MtABI5* déterminées par l'analyse transcriptomique, des RT-QPCR sont menées sur les ARNm des graines de mutants. Le second objectif est de mieux comprendre le rôle de *MtABI5* dans la biologie de la graine de *Medicago*. Des études physiologiques sur la dormance, la sensibilité à l'ABA et au vieillissement accéléré ont été menées sur des graines de mutants d'insertion *Tnt1* déjà partiellement caractérisées au laboratoire ainsi que sur des mutants *35S::MtABI5-EAR et RNAi*.

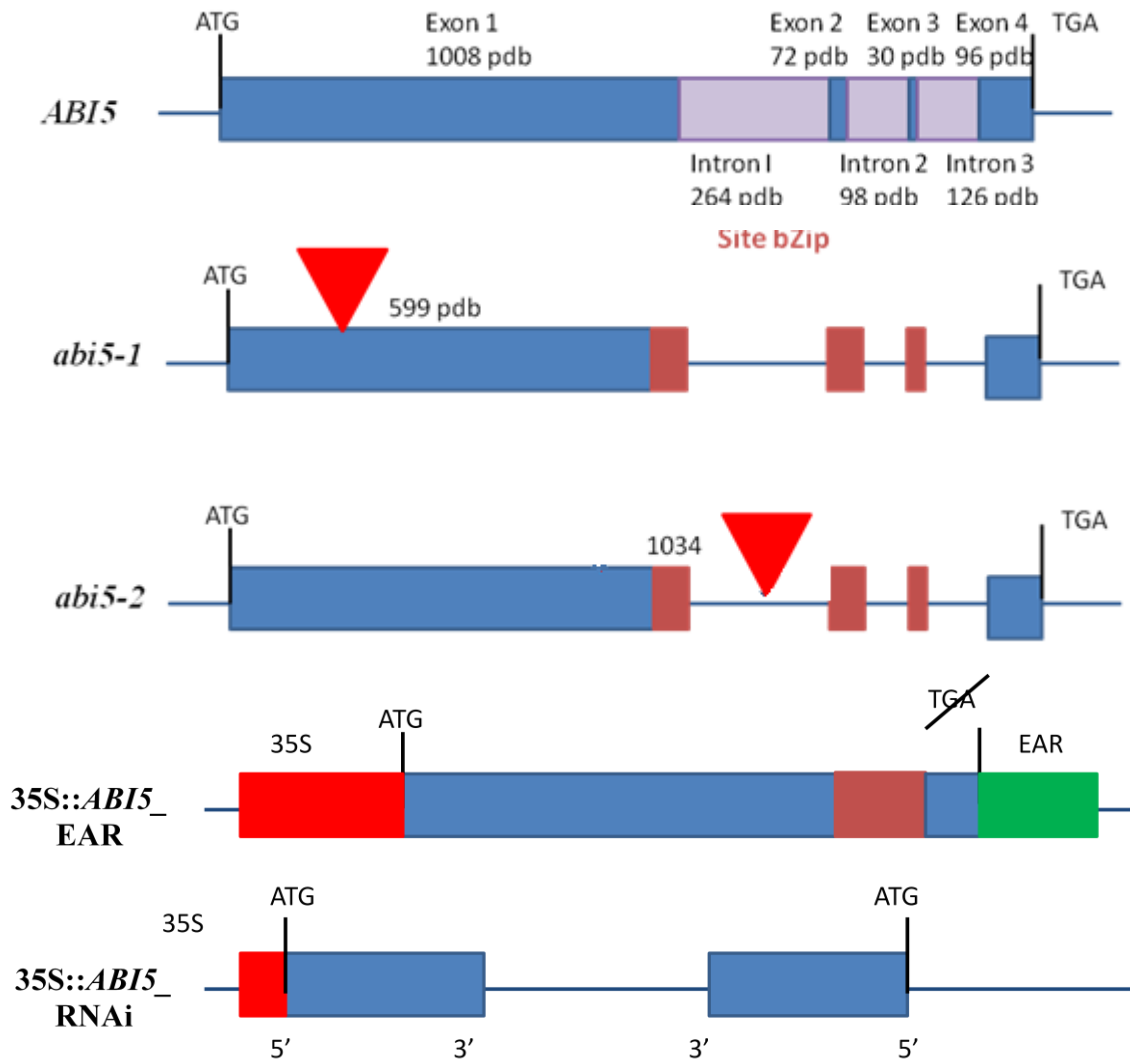


Figure 2.1 : Représentation schématique du gène *MtABI5* de 1803 paires de bases, ainsi que des constructions génétiques des mutants *Tnt1 Mtabi5-1* et *Mtabi5-2* et des mutants *35S::MtABI5_EAR* et *35S::MtABI5 INTR 35S::MtABI5*. Le motif EAR est un répresseur dominant se fixant sur les éléments *cis* des gènes cibles de *MtABI5*. En bleu sont représentés les exons et en violet les introns. Le site bZIP est représenté en rose. L'insertion du *Tnt1* des mutants *abi5-1* et *abi5-2* est représenté en triangle rouge.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Matériel biologique : mutants étudiés

Les études réalisées au cours du stage portent sur *Medicago truncatula ssp tricycla*, génotype R108-1. Les graines issues de ce génotype sont utilisées en tant que graines témoin, les transformations de racines sont réalisées sur ce fond génétique. Trois types différents de mutants, sur le fond génétique de R108, sont étudiés: les mutants d'insertions *Tnt1 Mtabi5-1* et *Mtabi5-2*, les mutants RNAi *Mtabi5* et *35S ::MtABI5_EAR*. Ces mutants sont présentés dans la **Figure 2.1**.

MtABI5-1 possède l'insertion du *Tnt1* à 599 bases du codon ATG, pour *MtABI5-2*, le *Tnt1* est inséré à 1034 bases du codon start (**Figure 2.1**). Le mutant RNAi *MtABI5* est basé sur le silencing, induisant la destruction des ARNm du gène *MtABI5* par le complexe RISC (Bentounas *et al.*, 2004). Les mutants RNAi *MtABI5* sont obtenus en surexprimant une cassette contenant un fragment d'ADNc d'environ 250 bases en direction sens et antisens (*35S ::ABI5-S ::INTRON CHS::ABI5R*). Les mutants *MtABI5_EAR* sont construits en surexprimant le gène *MtABI5* fusionné à la séquence codant le motif EAR (Annexe I). La protéine ainsi construite est un répresseur dominant qui se fixe sur les éléments *cis* des gènes cibles du gène *MtABI5* et empêche la fixation du facteur de transcription sur ses cibles (Kagale *et al.*, 2011).

La sélection des transformants et le criblage en vue d'obtenir des homozygotes sont effectués dans le cadre de ce stage.

2.2 Obtention de racines transformées *35S ::MtABI5_GFP* et *35S ::GUS_GFP*

2.2.1 Construction des plasmides pour la surexpression d'*ABI5* dans des racines transgéniques de *M. truncatula*

La construction du plasmide *35S::MtABI5-35S::GFP* est faite selon la technique Gateway (Invitrogen). L'amplicon de 1,8 kb du gène *MtABI5*, à bouts francs et avec le motif CACC avant le codon TGA est inséré dans le vecteur d'entrée pENTR®/D-TOPO® (Annexe II) avec le kit pENTR™ Directional TOPO® Cloning kits (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. La transformation de souches chimio compétentes One shot® TOP 10 de *E. coli* est réalisée en mélangeant 3µL de mix de vecteur d'entrée avec 50µL de bactéries suivi par un choc thermique de 30s à 42°C. Soixante quinze et 120 µL de milieu bactérien sont étalés sur milieu de culture solide LB (composition en Annexe III), kanamycine 25 µM. Après 24 h à 37°C, les colonies positives sont sélectionnées par PCR (Annexes IV et V) puis multipliées 24 h en milieu LB liquide additionné d'antibiotique (kanamycine 25 µM). L'ADN des plasmides des colonies de *E. coli* ayant intégré le vecteur d'entrée avec la séquence de *MtABI5* est purifié avec le kit Plasmid DNA purification, NucleoSpin®Plasmid/Plasmid (Macherey-Nagel), en éluant dans 100µL de Buffer AE à 70°C les ADNp finaux. La séquence insérée est vérifiée par séquençage (Genoscreen). Le plasmide pENTR® ayant intégré le gène *MtABI5* est ensuite recombiné avec le vecteur de destination pK7WG2D,1 (Karimi *et al.*,

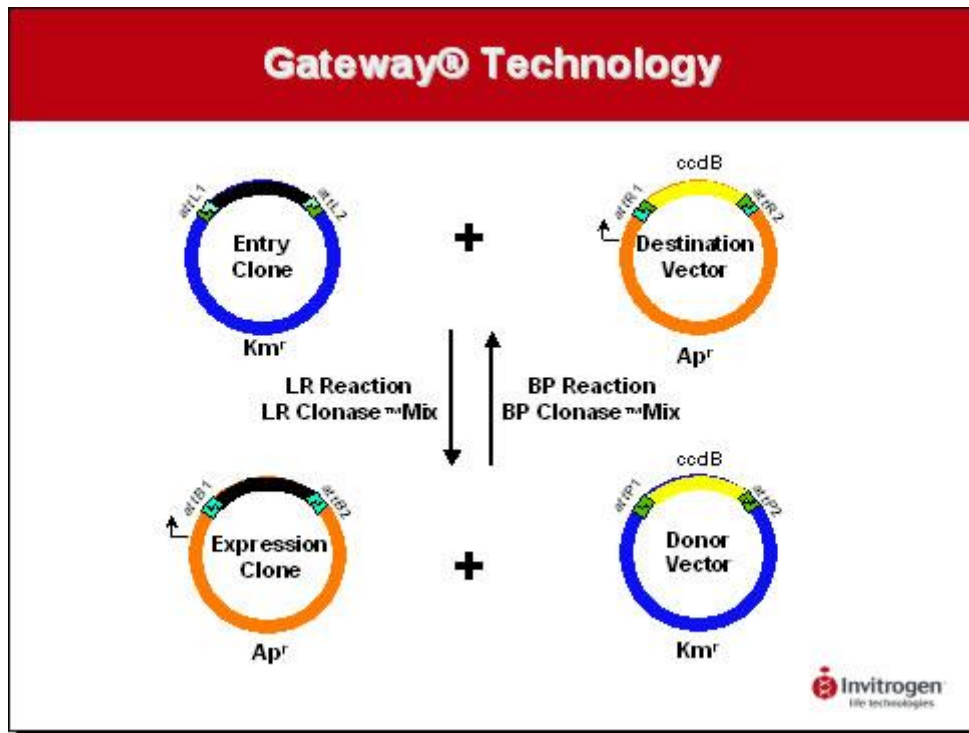


Figure 2.2: Réaction de ligation LR du système Gateway ®. Le clone d'entrée (pENTR®/D-TOPO®) est incubé avec le vecteur de destination. Celui-ci contient les sites attR1 et attR2 recombinant spécifiquement avec les sites attL1 et attL2, permettant d'obtenir le clone d'expression.

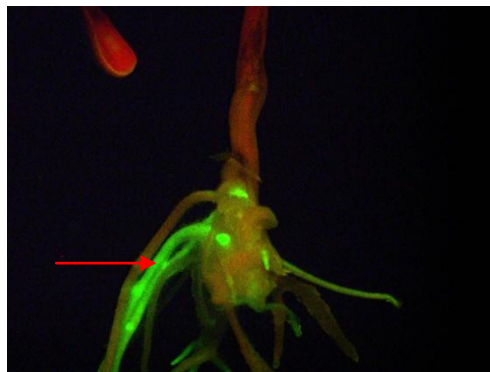


Figure 2.3: Sélection des racines transformées sous UV au microscope optique après 6 semaines de croissance sur milieu Farhraeus Kanamycine 25µM. La flèche indique une racine transformée, qui est excisée et placée dans un réplicat. Les autres racines, non fluorescentes à la GFP, ne sont pas récoltées.

2002) par recombinaison avec le kit Gateway® LR Clonase™II Enzyme Mix (**Figure 2.2**). La carte génétique du plasmide pK7WG2D,1 est représentée en Annexe VI. Puis une seconde transformation de bactéries *E. coli* compétentes One shot® TOP 10 est réalisée et étalée sur milieu LB solide additionné de streptomycine et de spectinomycine 50 µM, suivi par PCR pour sélectionner les colonies positives. Le vecteur d'expression 35S::*MtABI5*-35S::*GFP* est purifié à partir de 1mL de culture liquide comme décrit ci-dessus.

2.2.2 Transformation de souches d'*Agrobacterium rhizogenes*

Deux cent µL de bactéries *Agrobacterium rhizogenes* compétentes *Arq1* sont transformées avec 1 µg de vecteur d'expression 35S::*MtABI5*-35S::*GFP* en réalisant deux chocs thermiques, l'un à -196°C pendant 5 min puis un second, 5 min au bain marie à 37°C. Les transformants sont mis en culture 4 h à 28°C, sous agitation légère (200 rpm) en milieu liquide STR+SPC 25 µM. La culture est ensuite étalée sur milieu LB solide en présence de STR et SPC, et cultivée 48 h à 28°C. Les colonies positives sont sélectionnées par PCR (Annexes V et VII) et mises en culture liquide 48 h à 28°C. Une colonie est ensuite étalée sur milieu LB solide, STR+SPC 25 µM, afin de former le tapis bactérien pour la transformation des racines de *M. truncatula*. Le témoin 35S::*GUS/GFP* a déjà été obtenu dans le laboratoire.

2.2.3 Transformation de racines de *Medicago truncatula*

Le protocole de transformation est celui de Chabaud *et al.*, (2006). Quatre cent graines de R108 sont scarifiées, puis stérilisées pendant 5 min sous agitation dans un bain de javel à 3% (25 mL de solution de javel à 6%, 10 µL de Triton x 100, 25 mL d'eau stérile), puis rincées à l'eau stérile. Les graines sont mises à imbiber 30 h dans de l'eau stérile pour obtenir des radicules de 1 cm environ. La pointe (environ 3 mm) des radicules est excisée sous hotte à flux laminaire, en conditions stériles puis trempée dans le tapis bactérien d'*A. rhizogenes*. Elles sont ensuite cultivées sur boîte de pétri carrée avec 50 mL de milieu Fahraeus (Annexe VIII), Kanamycine 25 µM, en présence d'ABA 5 µM, afin de voir si la présence d'ABA induit la phosphorylation de ABI5 dans les racines, en conditions stériles à 20°C, avec une photopériode de 16 h. Après environ 6 semaines, les racines transformées montrant une fluorescence verte sont sélectionnées sous microscope UV (stereomicroscope, Olympus U-RFL-T), filtre GFP, comme présenté dans la **Figure 2.3**, puis congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN.

2.3 Conditions de culture

Pour la production de graines, celles-ci sont semées en mottes gifi (Grosseron) individuelles, puis transférées en jardinière ou en pot individuel de 3 L dans un terreau mélangé à de l'engrais NPK à 21 et 24°C, avec une photopériode de 16 h et d'environ 200 µmol photons/m² s². Après l'abscission, les gousses sont récupérées et les graines matures sont disséquées.

2.4 Tests de physiologie

2.4.1 Germination

Les graines matures sont dégoussées et séchées à 44%, 20°C pendant 48 heures. Avant imbibition, les graines sont scarifiées sur du papier de verre pour lever la dormance tégumentaire puis imbibées à l'obscurité, 20°C sur du papier Whatman No 1 dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre avec 4 mL d'eau. Une graine est considérée germée lorsque la pointe de la radicule a percé les téguments. Les tests sont réalisés en 3 réplicats de 30 ou 50 graines.

2.4.2 Sensibilité à l'ABA

Pour déterminer la sensibilité à l'ABA, 3 réplicats de 30 ou 50 graines sont mises à imbiber avec 4 mL de solution d'ABA à 10 ou 50 μ M. La solution mère de 500 μ M d'ABA est réalisée en ajoutant 50 μ L de MeOH à 2,64 mg de *cis* ABA (Sigma-Aldrich,), puis en ajustant à 10 mL avec de l'eau milliQ, pH=6,6. Le témoin consiste à l'incubation dans une solution de MeOH à concentration équivalente (0,01% ou 0,05%).

2.4.3 Vieillesse accélérée

La longévité des graines est déterminée sur 3 réplicats de 50 graines par un vieillissement accéléré (VA). Après scarification, les graines sont incubées à 75 % HR dans une enceinte contenant une solution saturée de NaCl à 35°C pendant 0, 7, 14 ou 21 jours. Les graines incubées sont ensuite mises à germer afin de compter les graines viables. La P_{50} est déterminée par le temps de vieillissement qui conduit à 50% de perte de viabilité.

2.4.4 Ré-induction à la tolérance à la dessiccation

Des graines germées dont la longueur de la radicule se situe entre 2,7 et 2,9 mm sont placées dans 8 mL de solution de PEG correspondant à un potentiel hydrique de -1,7 MPa et incubées à 10°C. Après 3 jours, les radicules sont rincées et séchées au dessiccateur à 20°C, 44% HR, durant 2 jours. Le témoin est réalisé en omettant le passage dans le PEG et en plaçant 30 graines germées directement au dessiccateur. Les radicules sont ensuite imbibées avec 4 mL d'eau. La TD est évaluée par une reprise de la croissance primaire.

Pour la teneur en ABA des radicules à TD ré-induite, 30 graines de type sauvage et de mutant *MtABI5-1* sont utilisées. Les radicules sont disséquées et plongées dans l'azote liquide. En témoin, 30 radicules des graines germées de chaque génotype sans traitement préalable sont également congelées.

2.5 Dosage des sucres solubles

Quatre réplicats de 10 graines matures sont lyophilisés puis broyés au mortier avec l'azote liquide. La poudre (5 à 10 mg) est pesée et rajouté dans 1 mL de MeOH 80% contenant du melizitose (4 g/L) comme standard interne. Après 15 min au bain marie à 76°C, le surnageant

est évaporé sous vide à l'aide du Speedvac AES1010 (Savant Instruments,) pendant 3 h. Le culot est ensuite dissout dans 1 mL d'eau distillée, et après dilution ½, analysé par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPCL) sur colonne CarboPac Pa-1 (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA), comme décrit par Rosnoblet *et al.* (2007).

2.6 Analyse de la teneur en ABA

Quinze fleurs sont étiquetées sur le type sauvage et les mutants *MtABI5-1*, *MtABI5-2*, *35S::MtABI5-EAR*. Après 18 et 21 jours, 10-20 graines de ces plantes sont récoltées, dégoussées et congelées à -196°C dans l'azote liquide.

Après lyophilisation, les graines (10-12 mg) et 30 radicules (environ 13 mg) sont broyées au broyeur à billes Tissuelyser (Qiagen), avec 2 billes de 5 mm pendant 90 s à 30 Hz, (1800 oscillations/min). Le tampon d'extraction (1,5 mL de MeOH 80%, 100 mg/L d'hydroxytoluène butylaté, 500 mg/L d'acide citrique) est ajouté à chaque échantillon, l'ensemble est placé à 4°C sous agitation horizontale (100 rpm). Après 16h d'agitation, les échantillons sont centrifugés 20 min à 4°C à 1000 g. Cinq cent µL de surnageant sont prélevés et séchés 3 heures à 41°C au Speedvac . Le culot est resuspendu dans 100 µL de tampon TRIS (50 mM TRIS 1M, 1 mM MgCl, 150 mM NaCl, pH 7,8).

Le dosage de l'ABA est réalisé avec le kit Phytodetek (Agdia), en plaque ELISA 96 puits, selon les instructions du fournisseur. Les densités optiques (DO) sont lues au spectrophotomètre Spectromax Plus (Molecular Devices) à 405 nm.

2.7 Extraction d'ADN génomique

Une foliole est broyée au micro-pilon dans 400 µL de tampon d'extraction (200 mM tris pH 8, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8, SDS 0,5% p/v). Après centrifugation à 22 000g pendant 5 min à 4°C, 300 µL de surnageant sont mélangés à 300 µL d'isopropanone. Après centrifugation identique et élimination du surnageant, le culot est séché et repris dans 50 µL de tampon TE (10 mM Tris pH 8, 1 M EDTA 0,5). Les quantités et la qualité des ADNg extraits sont évalués par spectrophotométrie au Nanodrop ND 1000.

2.8 Extraction d'ARN totaux

Les ARN totaux de 10 graines matures de type sauvage et de mutant *TNt1 Mtabi5-1* et *35S::MtABI5_EAR*, ainsi que deux répétitions biologiques de racines transformées sont extraits à l'aide du kit NucleoSpin RNA Plant (Machery Nagel) selon les instructions du fournisseur. La quantité des ARN totaux extraits est vérifiée par spectrophotométrie au Nanodrop ND 1000. La qualité des ARN totaux est vérifiée par migration sur gel d'agarose 1% TBE 0,5X, 25 minutes, 100 V avec un agent intercalant (SYBR Safe), et révélé aux UV.

2.9 PCR

Le gène *MtABI5* est amplifié par PCR haute fidélité, avec l'ADN polymérase Phusion (FINNZYMES, F-530S, 100 u). Vingt ng d'ADNg sont utilisés dans un mix PCR de 18 µL (décrit en Annexe VII). Pour le criblage des mutants, les PCR sont réalisées dans un

volume de 13 μL avec 20 ng d'ADN, avec l'ADN polymérase DreamTaq (Thermoscientific, 5 U/ μL), avec les paramètres et les amorces décrit en Annexes IV et V. Les produits PCR sont vérifiés par migration sur gel d'agarose 1% ou 1,5%, TAE 0,5X, 25 min, 100 Volts, avec l'agent intercalant SYBR Safe (Invitrogen) et révélés aux UV. Les amorces sont désignées à l'aide du logiciel Primer 3 output (Untergasser *et al.*, 2007).

2.10 RT-QPCR

Après extraction des ARN totaux, l'ADNg résiduel est éliminé en incubant 600 ng d'ARN totaux avec 1 μL de tampon DNase 10X, 200 U de DNase I RNase Free (Fermentas) et 3 μL eau DEPC. Après 30 min à 37°C, 1 μL EGTA 25mM est rajouté et incubé 10 min à 65°C. Puis 1 μL d'oligo dT15 (30 μg , Fermentas) et 3 μL d'eau DEPC sont ajoutés aux 11 μL du mélange, et incubés 5 min à 70°C. La rétrotranscription est effectuée en mélangeant 6 μL de tampon M-MLV 5X (Promega), 6 μL de dNTP mix 100mM (Promega), 1 μL d'eau DEPC, 250 U d'enzyme Riboblock (Promega, N2111) et de M-MLV RTase (Promega) au mix d'ARN. Le mélange est placé 60 min à 42°C. La QPCR est réalisée avec les amorces diluées à 1,6 μM et listées en Annexe V. L'efficacité de la PCR est mesurée avec une gamme de dilution de 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, NAC, NTC, eau pour les gènes étudiés, avec l'ADNc du type sauvage, avec le programme décrit en Annexe IX.

2.11 Analyse transcriptomique

2.11.1 Amplification des ARNm et marquage des ADNc avec cy3/cy5

Les ARN totaux (500 ng) des racines qui surexpriment *MtABI5* (35S::*MtABI5*-35S::*GFP/GUS*) ou 35S::*GFP/GUS* (témoin) sont amplifiés avec le kit MessageAmp™ II aRNA (Ambion). Les ARN sont rétrotranscrits en ADNc pleine longueur avec une amorce d'oligo (dT) et une ArrayScript™ reverse transcriptase. Le brin complémentaire est synthétisé puis les ARNa (antisens) sont transcrits avec une T7 ARN polymérase. Après quantification, les ARNa sont dilués à 1 ng/ μL avec de l'eau RNase Free. Le marquage des ARNa rétrotranscrits est effectué avec le kit NucleoSpin PCR clean-up (Macherey-Nagel). Cinq ng d'ARNa sont rétrotranscrits en ADNc marqué au fluorophore cyanine3 (Cy3 sous forme de Cy3-dUTP) ou au fluorophore Cy5. La concentration des ADNc marqués est ensuite évaluée au nanodrop ND 1000. Ensuite, les échantillons marqués (30 pmoles) sont mélangés selon *MtABI5*Cy3-témoinCy5 et *MtABI5*Cy5-témoinCy3.

2.11.2 Hybridation sur lame

Chacun des duplicats est marqué avec un STC (Sample Tracking Control) et incubé 16 h à 42°C après dépôt sur la lame NimbleGen custom IRHS_Medtr_102K_v1 en présence du tampon d'hybridation. Après l'hybridation, la lame est lavée dans trois bains successifs, puis les cibles sont scannées dans un scanner NimbleGen MS200.

2.11.3 Traitement des données

Les intensités de fluorescence Cy3 et Cy5 sont traduites en valeurs numériques et normalisés avec les logiciels DEVA 1.2.1, R2.14 et Rstudio. Les gènes sont considérées différentiellement exprimés quand la p-valeur est <0.001 et ratio d'expression en \log_2 est > 1 ou < -1).

Une analyse AgriGo (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php>) est réalisée afin de voir les fonctions biologiques surreprésentées dans la liste de gènes différentiellement exprimés par la sur-expression du gène *MtABI5* dans les racines. Les AGI les plus homologues des séquences de *Medicago truncatula* sont utilisés pour cette analyse.

2.12 Tests statistiques

Une ANOVA à deux facteurs est réalisée sous le logiciel R afin de comparer les données de dosage des sucres solubles entre le type sauvage et *35S::MtABI5_EAR*. La normalité des résidus et l'homoscédasticité sont vérifiés sous R. Les résultats sont significativement différents lorsque la p valeur est inférieure à 5%.

Les écarts-types entre les trois réplicats de 30 ou 50 graines sont calculés pour les tests de physiologie. Pour les pourcentages finaux de germination après un VA de 14 jours, les données sont soumises à une ANOVA afin de comparer les données de germination finale entre le type sauvage, *35S::MtABI5-EAR* et *MtABI5-1*.

Les résultats de la PCR en temps réel sont obtenus sous forme de données chiffrées, les Ct (cycles treshold, seuil de la PCR à partir duquel la fluorescence émise est significativement supérieure au bruit de fond, et où l'amplification se situe dans la phase exponentielle permettant un doublement théorique de la quantité d'ADNc à chaque cycle). Les Ct ont été extraits pour les ADNc de chacun des mutants et du type sauvage. La moyenne des Ct du gène contrôle est calculée pour chaque ADNc. Les Ct obtenus pour les gène étudiés sont corrigés à partir de la moyenne géométrique des Ct des gènes contrôles par le ΔCt afin de normaliser les données par rapport aux biais introduits par les différences entre les RT, les erreurs dues aux effets plaques PCR:

$$\Delta Ct = Ct (\text{gène cible}) - Ct (\text{moyenne géométrique du gène contrôle})$$

La spécificité des amorces est vérifiée par la courbe de fusion : obtention d'un seul pic de dissociation pour chacune des amorces utilisées.

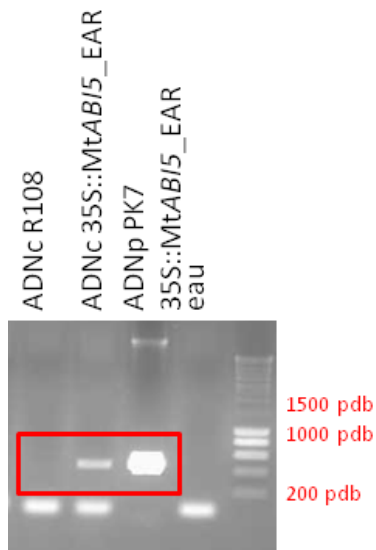


Figure 3.1: Vérification de l'expression du motif EAR chez les mutants *35S::MtABI5_EAR* par RT-PCR. Une amplification est attendue à 441 pb si la construction est exprimée. L'ADNc du type sauvage et l'eau ne présentent pas de bande d'amplification. Une bande représentant des dimères d'amorce est présente dans les puits du type sauvage, du mutant *35S::MtABI5_EAR* et l'eau

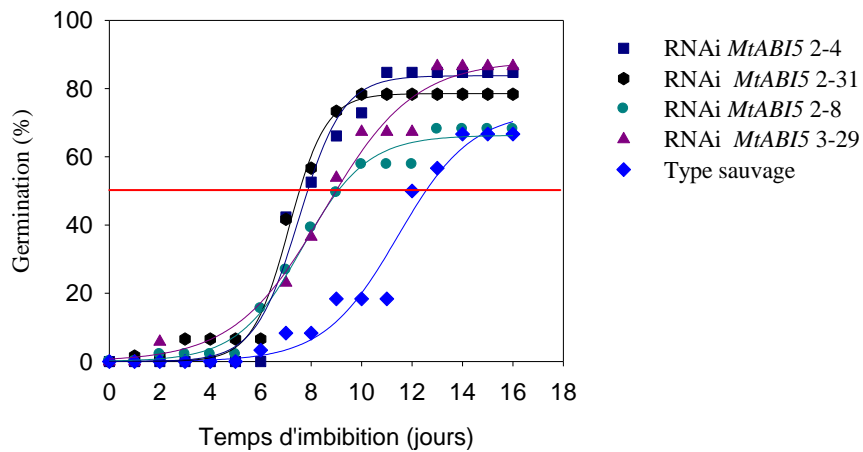


Figure 3.2 : Vitesse de germination des graines des mutants RNAi *MtABI5* et des graines de type sauvage. Les graines ont été récoltées au stade immature (entre 30 et 40 DAP).

3. RESULTATS

3.1 CARACTERISATION DES MUTANTS *Mtabi5*

3.1.1 Criblage des lignées *35S::MtABI5_EAR* et RNAi homozygotes

Avant de commencer la caractérisation des graines de mutants *Mtabi5*, le criblage des différentes lignées mutants est nécessaire pour identifier les mutants homozygotes. Deux types de transformants sont criblés: les mutants *35S::MtABI5_EAR* et les mutants RNAi *MtAbi5*. Pour les graines des deux lignées d'insertion *Tnt1 Mtabi5*, les lignées homozygotes sont déjà identifiées et disponibles au laboratoire.

Mutants 35S::MtABI5_EAR

Les graines issues de la génération T1 des lignées *35S::MtABI5_EAR* sont disponibles au laboratoire. De cette génération, les plantes sauvages ont été éliminées par PCR, et les graines qui ont été récoltées préalablement proviennent donc soit de plantes homozygotes mutants, soit hétérozygotes pour l'insertion *35S::MtABI5_EAR*. Nous avons d'abord procédé à l'identification des homozygotes. Comme il n'est pas possible de différencier les hétérozygotes des homozygotes mutants, quarante individus issus de trois lots, *35S::MtABI5_EAR* 16-4, 11-1 et 11-3, sont semés. Après 6 semaines, les plantules sont criblées par PCR. Pour deux lignées, 16-4 et 11-1, les quarante individus sont positifs après PCR, suggérant que la plante mère d'où sont issues les graines est homozygote mutant. Ensuite, les plantes de ces deux lignées sont conduites jusqu'à la production de graines pour la caractérisation de ces mutants. Pour des raisons de temps de culture, les analyses sont réalisées sur la lignée 11-11, car des plantes déjà caractérisées ont été plantées avant le début du stage. Les graines issues de la ligne 16-4 ont permis de valider les expériences d'absence de dormance observées chez la lignée 11-11. Enfin, les plantes 11-1 sont conduites à la production de graines durant la fin du stage et seront utiles pour la validation des phénotypes.

Afin de vérifier l'expression de la construction *35S::MtABI5* du motif répresseur EAR, des RT-PCR sont réalisées avec des ARN totaux de graines matures du type sauvage et du mutant *35S::MtABI5_EAR* 11-11. Les amorces sont désignées afin d'amplifier une séquence comprise entre la fin du gène *MtABI5* et le début de la séquence du motif EAR, de taille attendue de 441 pb. La **Figure 3.1** montre qu'une bande à la taille attendue est effectivement amplifiée dans la lignée *35S::MtABI5_EAR* 11-11 et confirme la surexpression de la construction dans les graines.

Mutants RNAi Mtabi5

Les graines disponibles sont de la génération T0, et sont donc en ségrégation. Un premier criblage par PCR dans le promoteur constitutif *35S* a été nécessaire afin d'éliminer les types sauvages. Trois lignées T0, RNAi *Mtabi5-1*, RNAi *Mtabi5-2* et RNAi *Mtabi5-3*, ont été retenues qui sont soit hétérozygotes ou homozygotes mutants, et ont été conduites à la production de graines (T1). Quarante graines de chaque lignée ont été semées, et après sélection des transformants positifs par PCR, douze plantules de chacune des 3 lignées sont retenues pour la production des graines (T2). Ces graines (T2) n'ont pas pu être récoltées à

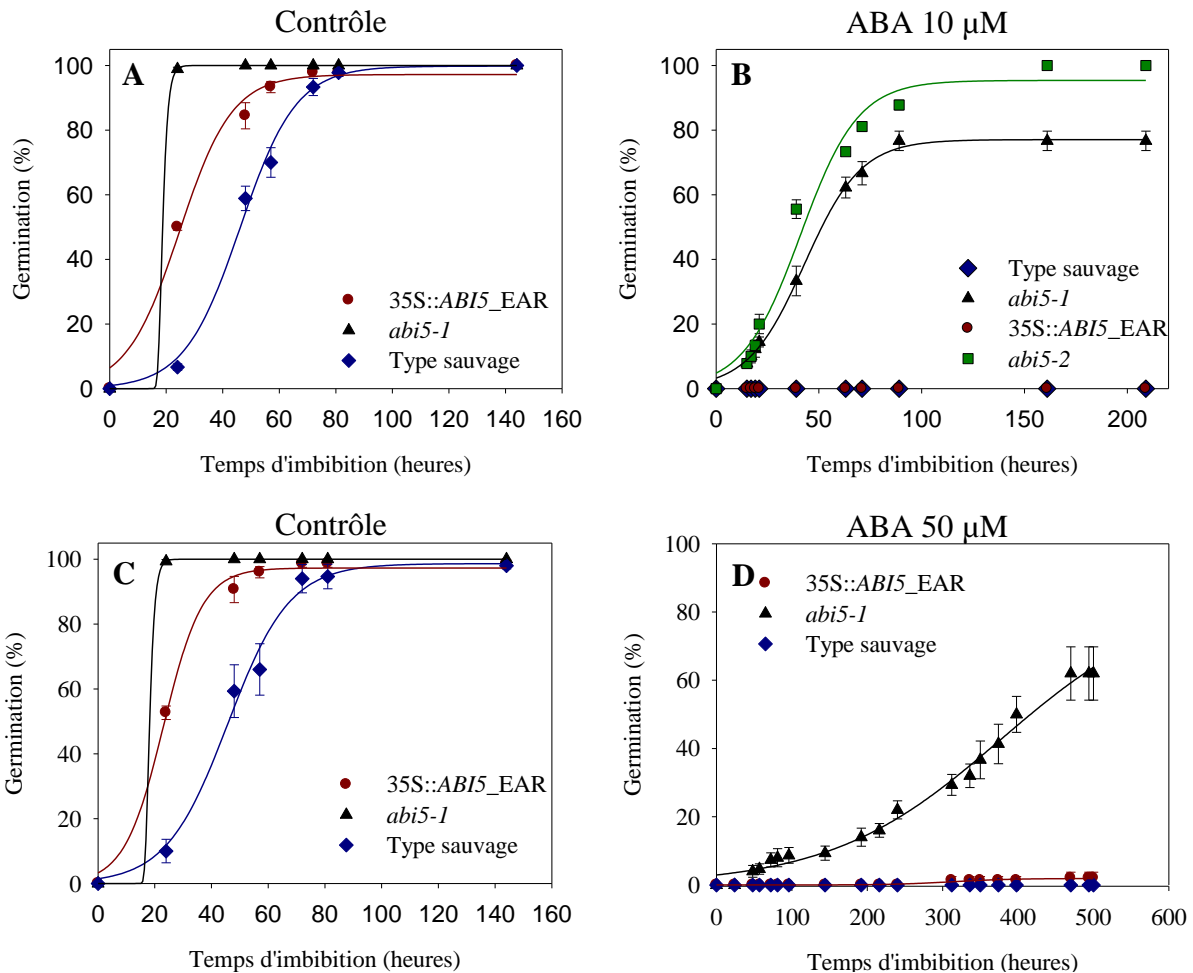


Figure 3.3 : Tests de sensibilité à l'ABA de graines de type sauvage, *35S::MtABI5_EAR*, *Mtabi5-1* et *Mtabi5-2*. Les graines sont post-maturées à sec pendant 1 mois (A) Imbibition dans MeOH 0,01%. (B) Imbibition dans 10 μ M d'ABA. (C) Imbibition dans MeOH 0,05%. (D) Imbibition dans 50 μ M d'ABA. Les écarts types représentent la variation mesurée entre trois réplicats de 50 graines.

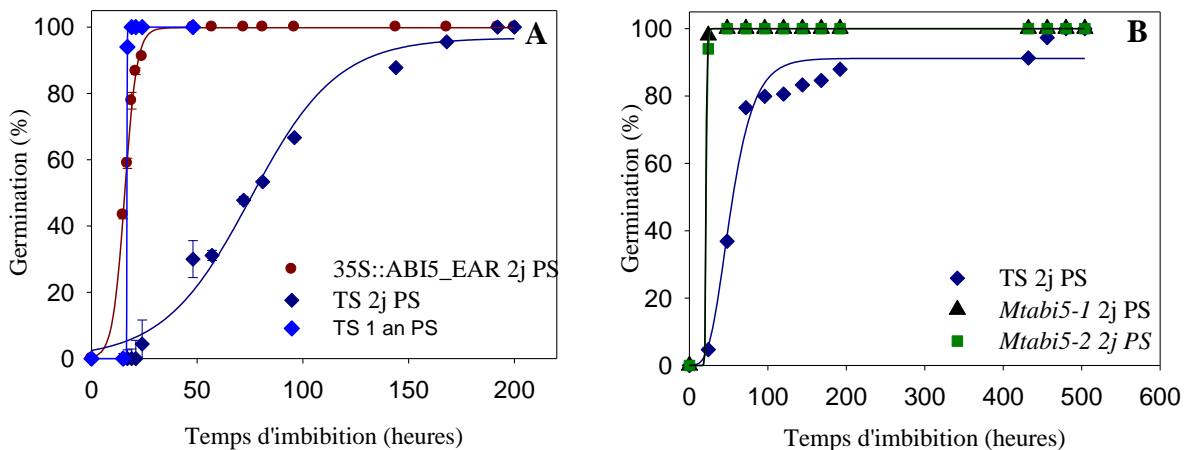


Figure 3.4 : (A) Courbes de germination de type sauvage et de mutants *35S::MtABI5_EAR* après 2 j de post-maturation à sec (PS), et de germination de type sauvage après 1 an de post-maturation à sec, données issues de Bolingue *et al.*, (2010). (B) Courbes de germination de type sauvage et de *Mtabi5-1* et *Mtabi5-2*, après 2 j de post-maturation à sec. Données issues de Chatelain (2011).

l'abscission pour cause de maladie dans la salle de culture et ont été mises à germer quand elles avaient atteint entre 30 JAP et 40 JAP. Le criblage en PCR a identifié que toutes les 33, 42, 31 et 37 plantules issue des lignées RNAi *Mtabi5-2-4*, RNAi *Mtabi5-2-31*, RNAi *Mtabi5-2-8* et RNAi *Mtabi5-3-29* sont positives pour l'amplification du fragment de 35S, ce qui suggère que ces lignées sont issues de parents homozygotes mutants. Une vérification sur les descendants sera nécessaire pour confirmer qu'il s'agit effectivement des homozygotes. Des tests de vitesse de germination menés sur ces graines récoltées avant abscission montrent que la vitesse de germination de ces lignées sélectionnées est plus importante que pour les graines de type sauvage (**Figure 3.2**). En effet, 50% de germination est atteint au bout de 12 jours pour le type sauvage contre entre 7 et 8 jours pour les mutants. Cependant, les temps de récolte des graines varient en fonction des individus et les différences de vitesse de germination observées pourraient donc être dues aux différences de temps de maturation à la récolte. Une étude plus poussée sera nécessaire pour confirmer les différences de vitesse de germination entre les graines de type sauvage et de RNAi.

3.1.2 Caractérisation physiologique des mutants *Mtabi5*

*L'insensibilité à l'ABA des mutants *Tnt1 Mtabi5* n'est pas visible chez les mutants *35S::MtABI5_EAR**

Les mutants ABI ont été caractérisés par un phénotype de germination en présence d'ABA exogène (Finkelstein, 1994). Pour confirmer ce phénotype chez les mutants d'insertion *Mtabi5-1*, *Mtabi5-2* et chez les mutants *35S::MtABI5_EAR*, des graines matures post-maturées à sec 1 mois sont imbibées en présence de 10 et 50 μM d'ABA (**Figure 3.3**). Le témoin (sans ABA) est incubé dans une solution de MeOH à une concentration équivalente aux solutions d'ABA utilisées. Pour tous les génotypes, le pourcentage final de germination est de 100% (**Figures 3.3A,C**). Nous pouvons remarquer que la vitesse de germination du type sauvage est plus faible que chez les mutants *Mtabi5-1* et *Mtabi5-2*, avec un T_{50} de 50 heures contre 20 heures. A 10 μM d'ABA (**Figure 3.3B**), aucune graine de type sauvage ni de mutant *35S::MtABI5_EAR* ne germe. Par contre, pour les mutants *Tnt1 Mtabi5*, le taux de germination finale pour *Mtabi5-2* et *Mtabi5-1* est de 100 et 76% respectivement, et corroborent les résultats de Chatelain (2011). Cette diminution de sensibilité pour les mutants d'insertion est confirmée à 50 μM d'ABA (**Figure 3.3D**). Néanmoins, la vitesse de germination pour les mutants d'insertion *Mtabi5* est affectée pour l'ABA, qui montre qu'il subsiste une sensibilité résiduelle. Il semble donc que les graines du mutant *35S::MtABI5_EAR* ne sont pas insensibles à l'ABA, tout du moins pas aux concentrations testées.

*Absence de dormance chez les graines des mutants *Mtabi5**

Chez *M. truncatula*, la dormance primaire est caractérisée par une vitesse de germination beaucoup moins élevée quand les graines sont fraîchement récoltées et séchées. Un temps de post-maturation à sec de 3 à 6 mois permet de lever cette dormance (Bolingue *et al.*, 2010). La **Figure 3.4A** montre la vitesse de germination des graines de type sauvage après post-maturation à sec de 2 j et 1 an. Après 2 j de post maturation, la moitié de la population germe après 72 h, et cette vitesse est réduite à 20 h quand les graines sont imbibées 1 an après

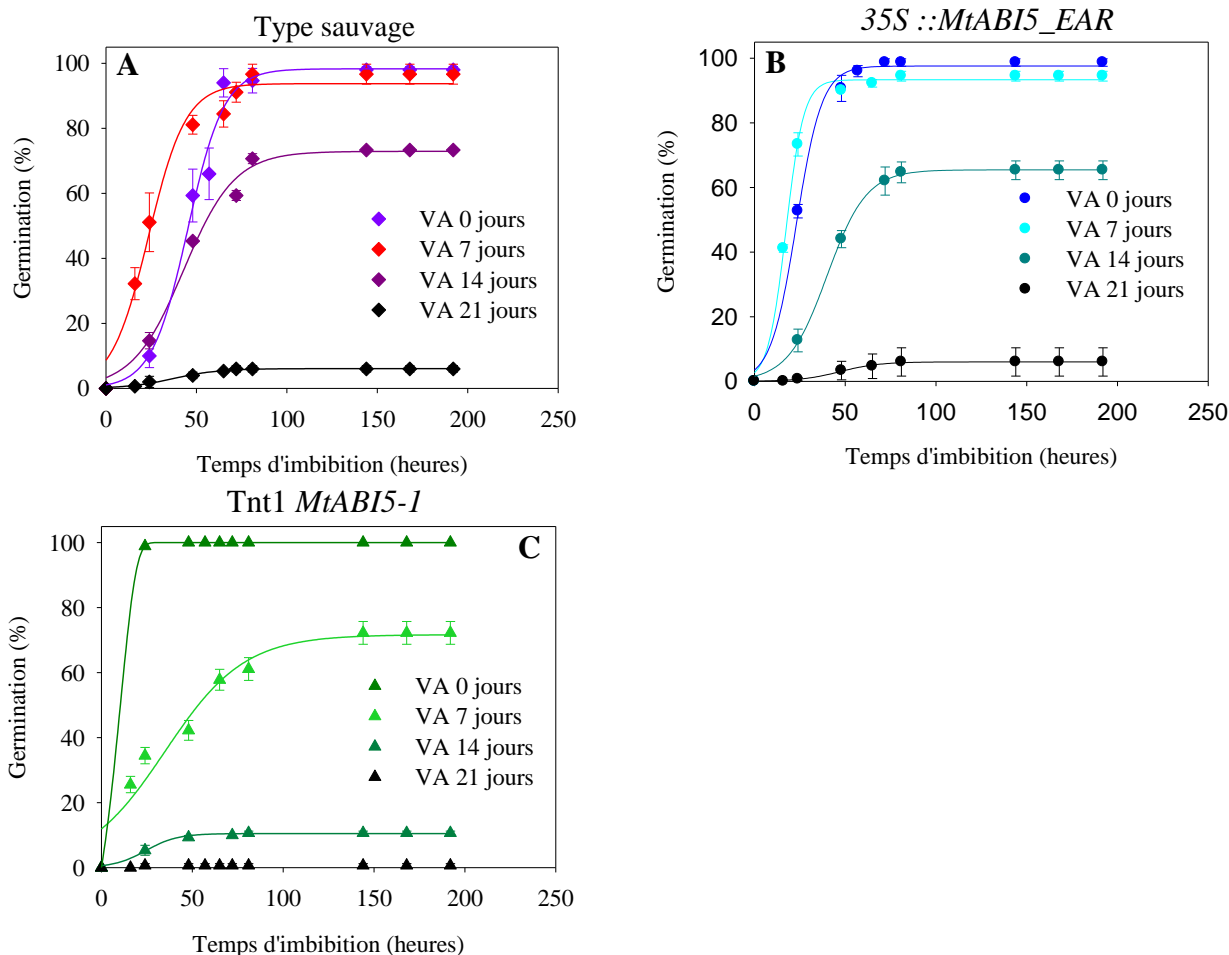


Figure 3.5: Courbes de germination à différents temps de vieillissement (35°C, 75 HR) de type sauvage (A), *35S::MtABI5_EAR* (B) et *MtABI5-1* (C). Les graines sont post-maturées à sec 1 mois avant les tests de conservation.

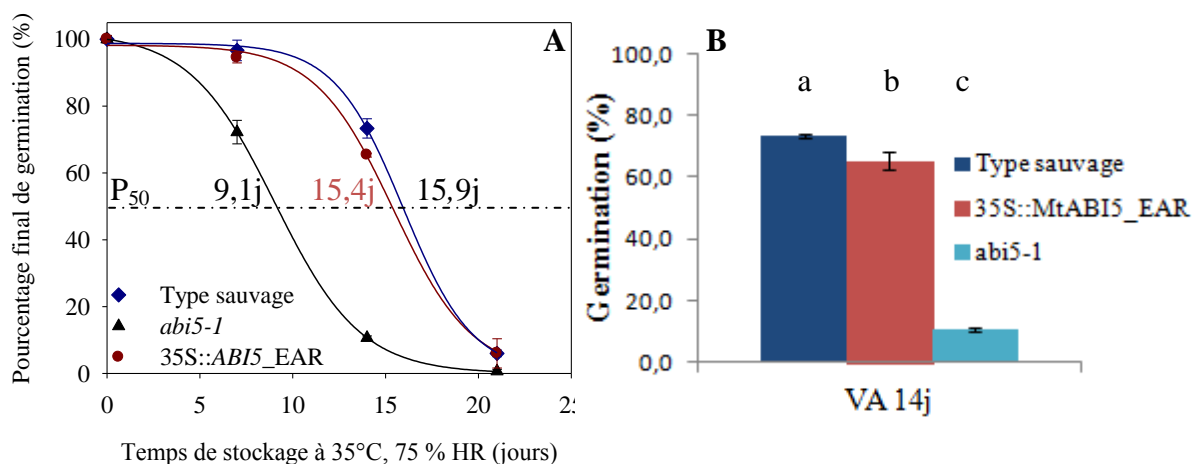


Figure 3.6: (A) Courbes de survie des graines matures de type sauvage, *35S::MtABI5_EAR* et *MtABI5-1*. Le pourcentage de germination final est déterminé à partir des courbes de germination (voir Figure 3.5). (B) Pourcentage de germination finale après 14 j de vieillissement accéléré. Les écarts types représentent la différence obtenue entre les 3 réplicats de 50 graines. Les lettres a, b, c représentent les trois groupes significativement différents au seuil de 5%, selon le test de Duncan, p-valeur < 0,05.

stockage. Pour étudier ce phénotype chez les mutants *35S::MtABI5_EAR*, la germination des graines fraîchement récoltées a été également évaluée (**Figure 3.4A**). Après 24 h d'imbibition, 90% des graines du mutant ont germé contre environ 4% des graines du type sauvage. De plus, le T_{50} est à 22 h, et comparable à une graine de type sauvage pour laquelle la dormance est complètement levée (après 4 mois de post-maturation à sec). Ceci indique que les graines de *35S::MtABI5_EAR* ne sont pas dormantes. A l'inverse de ce qui a été observé pour la sensibilité à l'ABA, ce phénotype ressemble à celui des graines *Tnt1 Mtabi5* (**Figure 3.4B**).

Les effets d'un vieillissement accéléré sur les graines de mutants Mtabi5

Les expériences préliminaires sur les mutants *Tnt1 Mtabi5* suggèrent que le gène *MtABI5* joue un rôle dans la longévité (Chatelain, 2011). Pour valider cette observation sur une autre récolte de mutants d'insertion, et pour déterminer si les mutants *35S::MtABI5_EAR* présentent également ce phénotype, trois réplicats de 50 graines de type sauvage, de mutant *35SMtABI5_EAR* et de *Mtabi5-1* sont mises en conditions contrôlées de conservation à température et HR élevées pour accélérer le vieillissement. Après 0, 7, 14 et 21 j de conservation, les courbes de germination sont déterminées (**Figure 3.5**). Lorsque le vieillissement est modéré, après 7 j, seule la vitesse de la germination est affectée (**Figure 3.5A**). Toute la population de graines germe encore à 100%. Ensuite, un vieillissement prolongé conduit à une diminution progressive de la germination finale (**Figure 3.5 A,B, C**).

Chez le mutant *35S::MtABI5_EAR*, le VA conduit à une perte de la capacité germinative qui est comparable à celui du type sauvage (**Figure 3.5B**). Cependant, une diminution plus rapide de la vitesse de germination est observée par rapport au type sauvage: le T_{50} augmente 2,5 fois entre 0 et 14 j de traitement (**Tableau 3.1**), contre une augmentation de 1,5 fois pour le type sauvage.

Chez le mutant *Tnt1 Mtabi5-1*, le vieillissement est beaucoup plus rapide que pour les deux autres génotypes (**Figure 3.5C**). Le pourcentage final de germination est déjà diminué à 76% après 7 j de vieillissement. Entre 0 et 7 j de VA, le T_{50} augmente d'un facteur 5 environ (**Tableau 3.1**), alors que les effets sur la vitesse de germination du type sauvage ne sont observés qu'à partir de 14 j de traitement.

Tableau 3.1 : T_{50} (temps d'imbibition au bout duquel 50% de la germination est atteinte) des graines de type sauvage et de mutants après 0, 7, 14 et 21 j de VA après imbibition. ND : non défini.

Vieillessement accéléré (j)	T_{50} (h)		
	Type sauvage	<i>35S::MtABI5_EAR</i>	<i>Tnt1 Mtabi5-1</i>
0	46,8	24,2	10,4
7	24,8	18,7	52,8
14	55,1	52,9	ND
21	ND	ND	ND

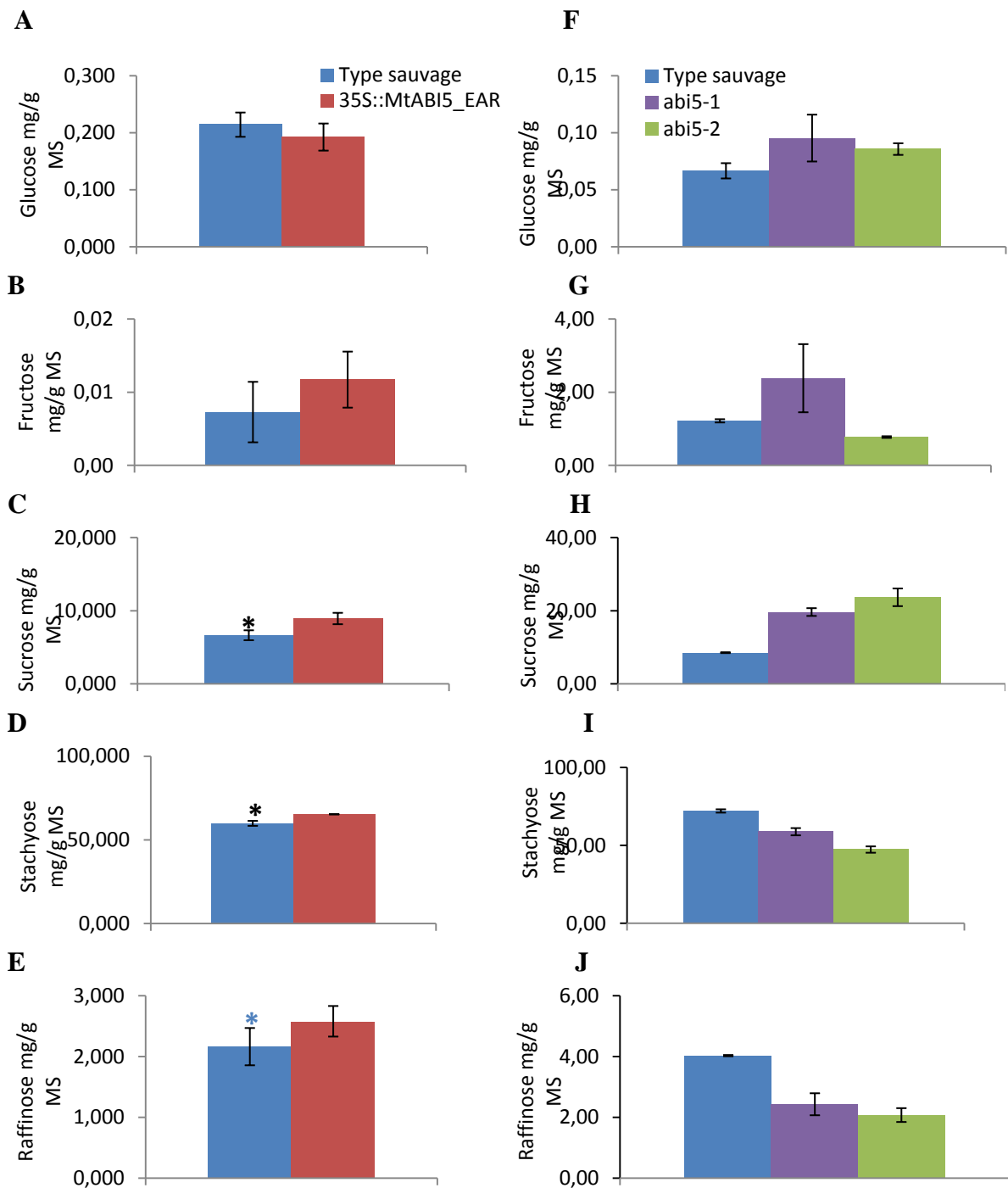


Figure 3.8: (A-E) Teneur en sucres solubles des graines matures de type sauvage et *35S::MtABI5_EAR*, Les données représentent la moyenne des 3 réplicats biologiques (+/- écarts-types). Une ANOVA à deux facteurs a été réalisée afin de comparer le type sauvage et *35S::MtABI5_EAR*. Les figures marquées * représentent une différences significative au seuil de 10%, les données marquées en noir au seuil de 5%. (F-J) Teneur en sucres solubles des graines matures de type sauvage, *Mtabi5-1* et *Mtabi5-2* données de Chatelain (2011). Les écarts-types représentent la moyenne des 5 répétitions. Les données n'ont pas été analysées statistiquement.

Les courbes de germination pendant le vieillissement ont permis de construire la courbe de survie pour les trois génotypes avec les pourcentages de germination finaux (**Figure 3.6A**). Les P₅₀, calculés comme le temps de VA nécessaire au bout duquel 50% de la germination finale est perdue, sont de 9,1 j pour les graines *Mtabi5-1*, 15,4 j pour les graines *35S::ABI5_EAR* et 15,9 j pour les graines du type sauvage. Il semble que la longévité est légèrement diminuée pour les graines *35S::MtABI5_EAR* par rapport au type sauvage. Ceci est également visible à 14 j de VA (**Figure 3.6B**). Les pourcentages de germination finaux sont significativement différents au seuil de 5% entre les trois génotypes, le mutant d'insertion étant le plus affecté, avec un pourcentage de germination final de 10,7%, contre 65,3% pour le mutant *35S::MtABI5_EAR* et 73,3%. Cependant, au seuil plus astringent de 1%, seule la différence significative est observée entre les graines du mutant *Tnt1 abi5-1* et celles du type sauvage et du mutant *35S::MtABI5_EAR*.

Ré-induction de la TD chez les radicules de type sauvage et du mutant 35S::MtABI5_EAR

Les expériences de ré-induction de la TD montrent que les radicules de type sauvage peuvent avoir une TD ré-induite, contrairement aux radicules de mutant *Tnt1 Mtabi5-1* (**Figure 3.7**). Des résultats préliminaires sur *35S::MtABI5_EAR* semblent montrer que comme le type sauvage, la TD peut être ré-induite chez ce mutant, résultats à confirmer par d'autres répétitions biologiques.

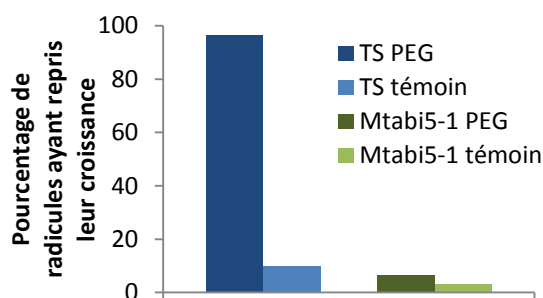


Figure 3.7: Dénombrement des radicules 2,9 mm de type sauvage et de mutant *Mtabi5-1* à TD ré-induite par un stress osmotique. TS, *Mtabi5-1* PEG : après 3 j dans une solution de PEG, -1,7 MPa, 10°C, puis séchage à 44% HR, 20°C pendant 2 j avant imbibition dans 4 mL d'eau à 20°C. Témoin : Radicules de type sauvage et *Mtabi5-1* ayant subi directement un séchage à 44% HR, 20°C avant imbibition à 20°C.

3.1.3 Caractérisation de la composition en sucres solubles des graines matures des mutants Mtabi5

Des données préliminaires ont montré que chez les graines matures des mutants *Tnt1 Mtabi5*, la teneur en saccharose est plus importante que chez le type sauvage, alors que la teneur en oligosaccharides (stachyose et raffinose) est plus faible chez ces mutants (Chatelain, 2011). Afin de caractériser la composition des sucres solubles dans les graines des mutants *35S::MtABI5_EAR*, les sucres sont extraits des graines matures de type sauvage et de mutants, et analysés par HPLC DIONEX (**Figure 3.8**) En accord avec les données connues de *Medicago*, la stachyose est l'oligosaccharide majoritaire (86%) (Rosnoblet *et al.*, 2007). La

Tableau 3.2: Intensités des sondes correspondant aux gènes *MtABI5* et *MtEM1* pour le témoin (GUS R108) et la surexpression de *MtABI5* dans des racines de Medicago (*MtABI5* R108). Le ratio correspond à la différence d'intensité GUSR108/*MtABI5*R108. La p-valeur p représente la significativité de cet écart, au seuil de 5%.

Seq_id New	Gène	GUSR108	MtABI5R108	Ratio	pvalue
Medtr7g104480.1	<i>ABI5</i>	1,6	1,93	0,32	0,2135742
Medtr4G016960.1	LEA EM1	1,21	2,08	0,85	0,007635994

comparaison entre les graines matures de type sauvage et de *35S::MtABI5_EAR* montre que pour les deux génotypes, la teneur en glucose et fructose est très basse (**Figure 3.8A,B**). La teneur en sucrose est 1,3 fois plus élevée chez le mutant *35S::MtABI5_EAR* que chez le type sauvage (**Figure 3.8C**), et la teneur en stachyose est 1,1 fois plus élevée chez le mutant (**Figure 3.8D**). Ces différences sont significatives, au seuil de 5%, par une ANOVA réalisée sur les données. Néanmoins, la composition de ces deux sucres chez les mutants *Mtabi5-1* et *Mtabi5-2* est beaucoup plus affectée: la teneur en saccharose est 1,3 à 2,8 fois plus élevée. Pour faciliter la comparaison, ces données, issues de Chatelain (2011), sont indiquées dans la **Figure 3.8H**. Tandis que le stachyose est 1,24 fois plus présent chez le type sauvage que *Mtabi5-1* et 1,5 fois plus que chez *Mtabi5-2* (**Figure 3.8I**). Comme pour le vieillissement, le phénotype des graines *35S::MtABI5_EAR* suit la même tendance que celui des mutants d'insertion, mais est beaucoup moins marqué.

3. 2. ETUDE DES CIBLES PUTATIVES DE *MTABI5*

3.2.1 Etude de la surexpression ectopique de *MtABI5* dans les racines transgéniques de *Medicago*

ABI5 est un facteur de transcription, il est donc capable d'activer ou de réprimer l'expression de ses gènes cibles. Pour augmenter nos chances d'identifier les cibles directes de *MtABI5*, nous avons choisi de sur-exprimer ce gène d'une manière ectopique, en dehors du contexte biologique normal (la graine). Ensuite, cette analyse peut être comparée avec les analyses transcriptomiques obtenues sur les mutants *Mtabi5* pour intégrer le contexte biologique. Dans cette étude, *MtABI5* est surexprimé en présence d'ABA, nécessaire pour l'activation d'*ABI5* (Dai *et al.*, 2013). Le transcriptome est comparé au témoin, qui correspond à des racines transformées avec le plasmide sans *MtABI5* mais avec *GUS/GFP*, aussi en présence d'ABA.

Validation de l'analyse de la surexpression ectopique de *MtABI5* dans les racines de *Medicago*

L'analyse transcriptomique de la surexpression de *MtABI5* dans les racines, pour 2 réplicats, en présence de 5 μ M d'ABA montre une différence d'expression de 1003 sondes (p-valeur 1%, $-1 > \text{ratio} > 1$). Un total de 948 sondes est surexprimé et 1819 sondes sont sous-exprimées par rapport aux racines témoin. Le gène *MtABI5* (Medtr7g104480.1) est annoté par la sonde Medtr_v1_046360. Il n'y a pas de différence d'expression génique significative au seuil de 5% pour le gène *MtABI5* chez les racines transformées (**Tableau 3.2**). Après vérification, la séquence de la sonde utilisée a été comparée à la séquence du gène *MtABI5*, et montre que la sonde a été désignée dans la séquence 5'UTR du gène *MtABI5*. Or la surexpression du gène a été faite selon sa séquence génomique, du codon start au codon stop, ce qui explique que nous n'observons pas de surexpression du gène *MtABI5*. Pour vérifier la surexpression effective de *MtABI5*, des RT-QPCR devraient être réalisées sur les ADNc des racines de *Medicago* transformées.

Afin de valider notre modèle expérimental, nous avons identifié *MtEM1* comme cibles putatives chez *Medicago*. En effet, Chatelain, (2011) a montré que chez les mutants *Tnt1*, la quantité de cette protéine dans les graines est 20 fois inférieure par rapport au type sauvage.

Tableau 3.3: Liste des groupes des principales fonctions biologiques liées aux gènes différentiellement sous-exprimés dans l'analyse du transcriptome de surexpression ectopique de *MtABI5*. La liste complète est présentée en Annexe XI.

Go Term	Ontology	Description	Number in input list	Number in BG/Ref	p-value	FDR
GO:0050896	P	response to stimulus	88	4057	2.1e-14	3.2e-11
GO:0009628	P	response to abiotic stimulus	48	1471	7.2e-14	5.4e-11
GO:0006950	P	response to stress	54	2320	5.3e-10	2.6e-07
GO:0015979	P	photosynthesis	14	162	1,00E-09	3.8e-07
GO:0009409	P	response to cold	16	328	1.4e-07	4.1e-05
GO:0009416	P	response to light stimulus	21	596	3.1e-07	7.7e-05
GO:0009266	P	response to temperature stimulus	18	485	1.1e-06	0.0002
GO:0009832	P	plant-type cell wall biogenesis	7	58	2.2e-06	0.00034
GO:0009834	P	secondary cell wall biogenesis	5	19	2.2e-06	0.00034
GO:0042546	P	cell wall biogenesis	7	70	6.8e-06	0.00085
GO:0010218	P	response to far red light	6	57	2.4e-05	0.0026
GO:0009791	P	post-embryonic development	19	705	4.4e-05	0.0039
GO:0050789	P	regulation of biological process	57	3697	8.7e-05	0.0062
GO:0009664	P	plant-type cell wall organization	6	79	0.00013	0.0085
GO:0042221	P	response to chemical stimulus	37	2085	0.00013	0.0085

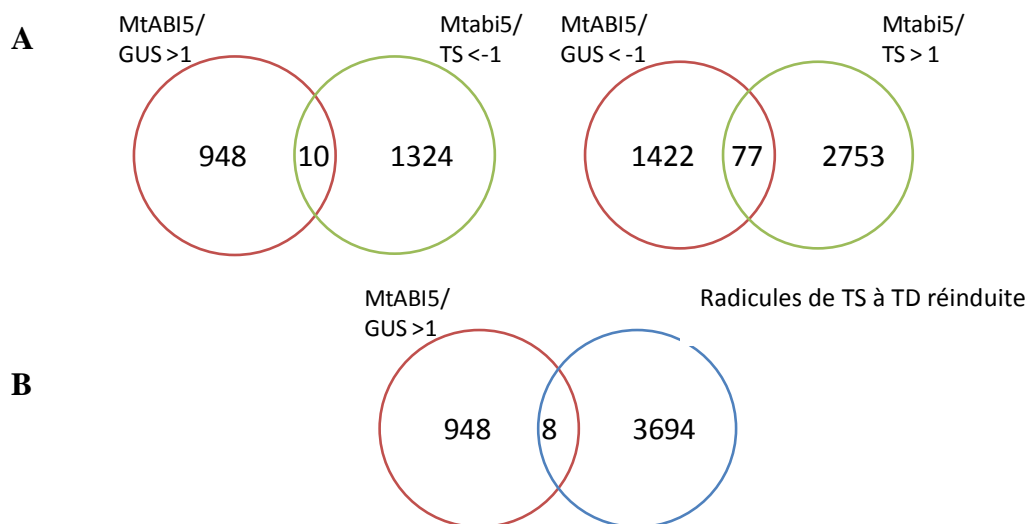


Figure 3.9: (A) Diagrammes de Venn entre le nombre de gènes surexprimés par surexpression de *35S::MtABI5* (cercle rouge) dans des racines de *Medicago* et le nombre de gènes réprimés chez les mutants *Tnt1 Mtabi5* à au moins une des stades de maturation analysés (cercle vert). (B) Diagramme représentant le nombre de gènes surexprimés par surexpression de *35S::MtABI5* (cercle rouge) dans des racines de *Medicago* et le nombre de gènes surexprimés dans les radicules à TD ré-induite de type sauvage (cercle bleu).

L'expression du gène *MtEMI* est augmentée un facteur 1,8, mais son expression n'est pas significative (**Tableau 3.2**). Des RT-QPCR devraient être réalisées sur les ADNc des racines *Medicago* transformées pour confirmer si cette différence est validée.

Analyse des gènes différentiellement exprimés par l'expression ectopique de MtABI5: analyse d'enrichissement Gene Ontology

Les données issues de l'analyse transcriptomique sont classées selon les sondes surexprimées, au ratio >1, et les sondes sous-exprimées, au ratio <-1. Afin de déterminer les fonctions biologiques significativement surreprésentés parmi ces gènes, ces listes sont analysées grâce au logiciel AgriGo, basé sur l'annotation Gene Ontology (GO) (Zhou *et al.*, 2010). Pour ce faire, les identifiants d'*Arabidopsis* (AGI) les plus homologues de gènes de *Medicago* sont utilisés.

Parmi les 948 gènes surexprimés par *MtABI5*, 457 gènes AGI sont trouvés en correspondance. L'analyse montre que 47 GO sont représentés (Annexe X). Les GO liés aux fonctions biologiques de réponse à des stress, de réponse à des stimulations par les hormones, à une blessure sont déterminés.

Parmi les 1820 gènes sous-exprimés au ratio <-1 déterminés par l'analyse, 50 GO sont trouvés. Les principales fonctions biologiques sont listées dans le **Tableau 3.3**, présenté en entier en Annexe XI. Dans ces gènes réprimés, il y a une surreprésentation de ceux liés à la photosynthèse, à la réponse au froid et aux modifications des parois cellulaires.

L'analyse de ces données seules ne permet pas d'émettre des hypothèses quant à des cibles potentielles du gène *MtABI5*. En revanche, une comparaison de ces données avec l'expression chez les mutants *Mtabi5* peut conduire à l'identification des cibles potentielles de *MtABI5*. Deux jeux de données ont été produits au laboratoire sur les mutants *Tnt1 Mtabi5*. Pour un jeu, le transcriptome des mutants a été comparé avec celui de graines de type sauvage à trois temps de développement: à 16 JAP, quand les graines sont encore sensibles à la dessiccation, à 24 JAP, quand les graines ont acquis la tolérance à la dessiccation et au stade d'abscission, quand les graines ont acquis leur longévité. Cette longévité est différemment affectée dans les mutants *Mtabi5* (**Figure 3.6**). Un deuxième jeu de données est basé sur le transcriptome avant et après un traitement osmotique qui ré-induit dans les graines germées sensibles la tolérance à la dessiccation. Dans les graines germées de *Mtabi5*, cette tolérance à la dessiccation n'est pas ré-induite (**Figure 3.7**).

3.2.2 Identification des cibles putatives de MtABI5 impliquées dans la maturation des graines de Medicago

Pour identifier des cibles putatives, les gènes statistiquement surexprimés dans les racines *35S::MtABI5* et réprimés dans les mutants *Tnt1 Mtabi5* ont été comparés (**Figure 3.9A**). Le diagramme de Venn montre que seulement 10 gènes sont surexprimés (in)directement par *MtABI5* (Annexe XII). Il s'agit de deux transposons, trois nucléases, un récepteur protéin kinase et plusieurs gènes inconnus.

Tableau 3.4: Liste des fonctions biologiques surreprésentées dans les données transcriptomiques de gènes sous-exprimés par expression ectopique de *MtABI5* dans des racines de Medicago et inversement surexprimés dans le transcriptome de graines de mutants *abi5-1* et *abi5-2* à l'abscission.

GO term	Ontology	Description	Number in input list	Number in BG/Ref	p-value	FDR
GO:0015979	P	photosynthesis	13	162	2.4e-110	3.8e-108
GO:0009639	P	response to red or far red light	8	210	1.5e-31	4.6e-30
GO:0009416	P	response to light stimulus	12	596	5.6e-25	1.5e-23
GO:0009314	P	response to radiation	12	613	3.2e-24	7,00E-23
GO:0009409	P	response to cold	7	328	4.1e-15	8,00E-14
GO:0009628	P	response to abiotic stimulus	15	1471	2.3e-14	3.9e-13
GO:0009266	P	response to temperature stimulus	7	485	5.8e-10	9,00E-09
GO:0006091	P	generation of precursor metabolites and energy	5	285	1.2e-08	1.7e-07
GO:0050896	P	response to stimulus	20	4057	5.7e-07	7.3e-06
GO:0006950	P	response to stress	12	2320	0.00011	0.0013
GO:0008152	P	metabolic process	31	10614	0.00075	0.0083

Tableau 3.5: Liste des 8 gènes surexprimés par surexpression ectopique de *35S::MtABI5* dans des racines de Medicago et surexprimés dans les radicules à TD ré-induite de type sauvage.

seq_id	Description.BH.SP	MtABI 5/R108	pvalue	BH	R108	abi5-1	abi5-2			
					PEG/ Temoin	pvalue	PEG/ Temoin	pvalue	PEG/ Temoin	pvalue
MT3_5_1CHR8D115		1,85	0,0062		1,2	0,0005	-0,98	0,0109	-1,22	0,0296
MEDTR4G118350_1	PPDK; pyruvate orthophosphate dikinase	1,37	0,0001	0,0267	1,35	0,0005				
MIRMED2PCHR8R37	microRNA	1,15	0,0007	0,0626	1,74	0,0005				
MEDTR7TE017640_1	Ribonuclease H protein	1,11	0,001	0,0729	1,81	0,0002		0,0439		
MT3_5_1S040361	Serine/threonine-protein kinase AtPK2	1,05	0,0014	0,0849	1,65	0,0001				
MT3_5_1S011054	LOS1; Ribosomal protein S5	1,05	0,0098		1,49	4E-05				0,015
MT3_5_1S021954	Beta-carotene hydroxylase BCH1	1,03	0,0014	0,0881	2,12	9E-05	0,69	0,0158	1,05	0,044
MIRMED2PCHR0R15	microRNA	1,03	0,0068		1,66	0,0006	0,63			

Tableau 3.6: (A) Données d'expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'ABA au cours de la maturation des graines de mutants *Tnt1 Mtabi5-1* et *Mtabi5-2*. BCH1 : Beta-hydroxylase 1, impliquée dans la biosynthèse des caroténoïdes. *ZEP330*, *ZEP350*, gènes impliqués dans la synthèse de l'ABA (Nambara *et al.*, 2003). (B) Ratios des données transcriptomiques de graines de mutants *abi5-1* et *abi5-2* au cours du développement et dans le transcriptome *35S::MtABIS* pour les gènes *CYP707A1*, 2 et 4, gènes impliqués dans la dégradation de l'ABA (Okamoto *et al.*, 2006).

A

probe_id	Mutants Tnt1												35S::MtABIS		Radicules 2,9 mm					
	16 DAP				24 DAP				abs				Ratio	pvalue	R108 T/P	pvalue x	abi5-1 T/P	pvalue y	abi5-2 T/P	pvalue z
	Ratio abi5-1 16dap	pvalue 16 dap	Ratio abi5-216dap	pvalue 16 dap	Ratio abi5-1 24dap	pvalue 24 dap	Ratio abi5-2 24dap	pvalue 24 dap	Ratio abi5-1 abs	pvalue abs	Ratio abi5-2 abs	pvalue abs								
BCH1 Medtr_v1_073087	1.03	0,0014										0,037	1.03	0,001438559	2,12	9E-05	0,69	0,0158	1,05	0,044
<p style="text-align: center;">↓ caroténoïdes</p>																				
ZEP330 Medtr_v1_030456	-0,56	0,0077			-1,34	0,0009	-1,08	0,001	-1,27	0,0006	-0,92	0,0008			1,48	4E-05	-1,75	0,0041	-1,13	0,0202
ZEP350 Medtr_v1_030457		0,0422		0,0338	1,46	7E-05	-1,5	0,0007	-2,87	5E-07	-2,6	3E-07			2,53	0,0005	-1,32	6E-05	-1,29	0,0002
<p style="text-align: center;">↓ ABA</p>																				

B

	Mutants Tnt1												35S::MtABIS		Radicules 2,9 mm					
	Tnt1				24 DAP				abs				Ratio	pvalue	R108 T/P	abi5-1 pvalue T/P	abi5-2 pvalue T/P	abi5-1 pvalue T/P	abi5-2 pvalue T/P	
	Ratio abi5-1 16dap	pvalue 16dap	Ratio abi5-2 16dap	pvalue 16dap	Ratio abi5-1 24dap	pvalue 24dap	Ratio abi5-2 24dap	pvalue 24dap	Ratio abs	pvalue abs	Ratio abs	pvalue abs								
CYP707A1 Medtr_v1_031175			1,1	0,00119	1,89	1,1E-05	1,82	0,00011	3,72	1,4E-06	2,61	3,1E-07	0,75	0,01020522	-2,43	2E-05				
CYP707A1 Medtr_v1_050546		0,0144			1,03	0,00446	0,95	0,00049	3,3	3,7E-08	2,11	4,5E-06	-1,37	0,00013647	-1,16	0,009	-1,65	0,0073	-1,07	
CYP707A2 Medtr_v1_084111					0,95	0,00657			1,38	3,5E-05	0,98	0,00129			2,16	0,0074	0,0074	1E-05	1E-05	0,0027
CYP707A4 Medtr_v1_025709					0,93	0,00745			1,8	6,3E-05	1,74	0,00038	1,74	0,00247679		0,0316				

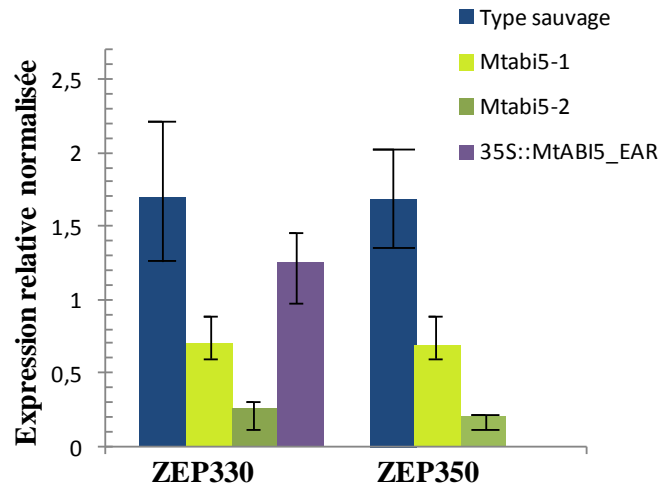


Figure 3.10: Expression relative des gènes cibles potentiels *MtZEP330* et *MtZEP350* par RT-QPCR sur les ADNc de graines matures de *Mtabi5-1*, *Mtabi5-2* et *35S::MtABI5_EAR*. Les données sont normalisées par rapport au gène référence *TCTPS*, gène codant pour une fonction du métabolisme basal.

En revanche, 77 sondes représentent des gènes qui sont sous-exprimés dans le transcriptome *35S::MtABI5* et inversement surexprimés dans le transcriptome de mutants *Tnt1 Mtabi5* à l'abscission (Annexe XIII). Une analyse AgriGo montre 42 GO dont les fonctions biologiques sont surreprésentées (**Tableau 3.4**). Les processus surreprésentés sont liés à la photosynthèse, à la réponse à la lumière, à la réponse au froid, et montre une grande similarité avec les processus biologiques surreprésentés parmi les gènes réprimés par *MtABI5* dans les racines (Annexe XI). Un gène (MEDTR8G072260) code un *CYP707A1*, aussi connu comme un ABA 8'-hydroxylase, une enzyme impliquée dans la dégradation de l'ABA (Okamoto *et al.*, 2006). Un grand nombre de gènes qui sont réprimés par *MtABI5* sont impliqués dans le fonctionnement du photosystème I: deux gènes qui codent pour la sous-unité LHCA4 et le LHCA6 (light-harvesting chlorophyll-protein complex I subunit A4 et A6), PSAG, PSAK, PSAD-2, PSAH2 et PSAF (photosystem I subunit G, K, D-2, H2 et F). Il y a également plusieurs gènes qui codent pour les composants du photosystème II: LHCB2.1 et LHCB4.3 (photosystem II light harvesting complex gene 2.1 et 4.3), PSBP-1 (photosystem II subunit P-1) et PSBW (photosystem II reaction center W). Il y a également une sous-unité de Rubisco (Ribulose bisphosphate carboxylase small chain 3A), et l'homologue de la Rubisco activase.

3.2.3 Identification des cibles putatives de *MtABI5* impliquées dans la réinduction de la tolérance à la dessiccation

Quand les données d'expression ectopique de *MtABI5* sont croisées avec celles de la réinduction de la TD, le diagramme de Venn montre que seulement 8 gènes sont des cibles putatives de *MtABI5* (**Figure 3.9B, Tableau 3.5**). Une sonde est liée à un gène de fonction inconnue, une autre à un gène codant pour la PPDK (Pyruvate orthophosphate dikinase). Cette protéine est impliquée dans la remobilisation de l'azote lors de la sénescence foliaire chez *Arabidopsis* et dans la photosynthèse des plantes en C4 (des monocotylédones). Deux autres sondes représentent des gènes codant pour des miARN. Un des gènes code également pour une β -carotène hydroxylase, qui est impliquée dans la synthèse de la zeaxanthine (précurseur de l'ABA), par hydroxylation des xanthophylles (Inoue, 2004). Deux autres gènes, codant pour LOS1 (Low expression of osmotically responsive genes 1) et une sérine-thréonine protéine kinase 2 ressortent également de l'analyse.

3.3 Implication potentielle de *MtABI5* dans la régulation de la teneur en ABA

Dans les analyses précédentes, deux gènes codant les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'ABA ont été identifiés: *CYP707A1*/ABA 8'-hydroxylase et la β -carotène hydroxylase, un précurseur d'ABA. Ensuite, nous avons identifié tous les gènes significativement différentiellement exprimés chez les mutants *Mtabi5*, sans prendre en compte l'expression ectopique de *MtABI5*. Cette analyse montre qu'au cours du développement, deux autres gènes impliqués dans la synthèse de l'ABA, codant pour des zeaxanthine epoxidase (*ZEP*, *ABA*), sont sous-exprimés chez les mutants *Mtabi5-1* et *Mtabi5-2* à partir de 24 JAP (**Tableau 3.6A**). Les transcrits de ces gènes (MEDTR5G017330/*ZEP330* et MEDTR5G017350/*ZEP 350*) sont également surexprimés

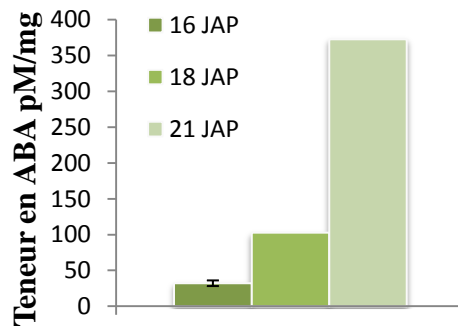


Figure 3.11: Teneur en ABA (pM/mg MS) dans les graines de type sauvage (R108) à 16, 18 et 21 JAP, données préliminaires, à refaire sur trois réplicats.

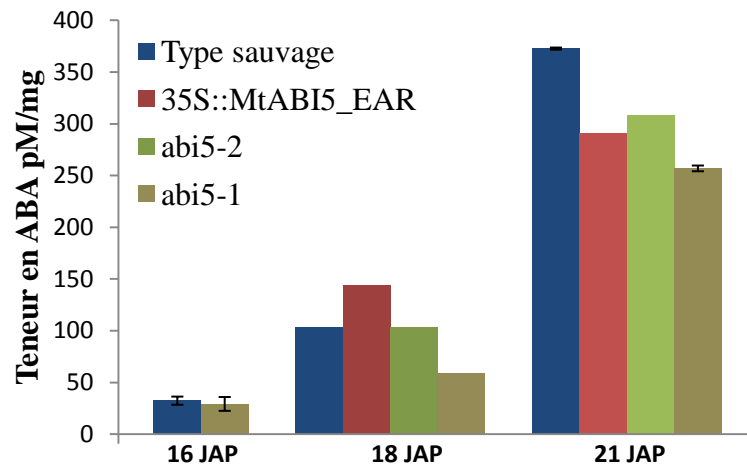


Figure 3.12 : Teneur en ABA (pM/mg MS) chez les graines de type sauvage et de mutant *Mtabi5-1* à 16, 18 et 21 JAP, et de type sauvage et de mutants *Tnt1 Mtabi5-1*, *Mttabi5-2* et *35S ::MtABI5_EAR* à 18 et 21 JAP.

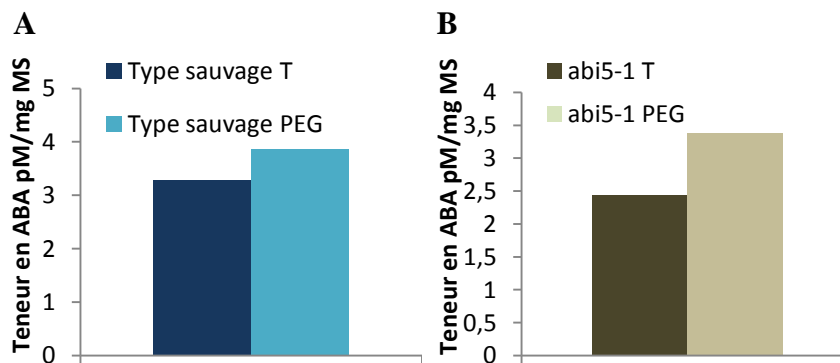


Figure 3.13: Teneur en ABA des géotypes type sauvage (A) et *Mtabi5-1* (B) dans des radicules germées avant (T) et après (PEG) le traitement au PEG 48h à -1.7 MPa, 10°C.

dans les racines de type sauvage quand la TD est ré-induite, mais n'augmentent pas dans les racines des mutants *Mtabi5* (**Tableau 3.6A**). Il y a également des différences d'expression des gènes liés au catabolisme de l'ABA. En plus de *CYP707A1* déjà identifié (voir 3.1), un deuxième gène codant pour une enzyme à activité ABA-8-hydroxylase est identifié qui est surexprimé dans le transcriptome de graines des mutants. Un *CYP707A2* et un *CYP707A4* sont également identifiés avec un profil d'expression à l'opposé des *CYP707A1* (**Tableau 3.6B**).

Afin de valider ces résultats obtenus par analyse transcriptomique, nous avons réalisé une RT-QPCR sur les ADNc des graines matures de type sauvage, *Mtabi5-1*, *Mtabi5-2* et *35S::MtABI5_EAR*. La **Figure 3.10** montre une différence d'expression effective entre le type sauvage et les mutants *Tnt1*. Il n'y a pas de différence significative entre la quantité de transcrits de ces 2 gènes entre le type sauvage et le mutant *35S::MtABI5_EAR*.

Afin d'évaluer l'influence de *MtABI5* dans la teneur en ABA, nous avons effectué un test ELISA sur les graines matures de type sauvage et de mutants *Tnt1 abi5-1*, *abi5-2*, *35S::MtABI5_EAR* pendant la maturation et la réinduction de la TD (Annexe XIV). Ces tests sont préliminaires: comme il n'y avait plus assez de matériel, et qu'il n'était pas possible d'attendre 4 mois pour une nouvelle récolte, ces tests ont du être faits sans répétition, sauf pour 16 et 21 JAP, type sauvage et *Mtabi5-1*. Les écarts-types pour ces mesures sont montrés dans la **Figure 3.12** pour donner une idée de la reproductibilité biologique et technique. Chez le type sauvage, la teneur en ABA double entre 16 et 18 JAP, puis triple de 18 à 21 JAP (**Figure 3.11**).

Lorsque la teneur en ABA est comparée entre les graines de type sauvage et *Mtabi5* pendant la maturation, nous pouvons observer qu'il n'y a pas de différence significative entre les teneurs en ABA à 16 JAP et 18 JAP entre les graines de type sauvage et de mutants (**Figure 3.12**). A 21 JAP, les teneurs en ABA de tous les génotypes ont triplé par rapport à 18 JAP. Cependant, une différence de la teneur en ABA est visible entre mutants et type sauvage, avec une teneur de 350 pM/mg MS pour le type sauvage contre 300 pour *Mtabi5-1* et *35S::MtABI5_EAR*, et 320 pour *Mtabi5-2*. Cependant, les résultats doivent être validés par des répétitions biologiques.

La teneur en ABA est également déterminée dans des racines des graines germées, avant et après le traitement osmotique par le PEG (**Figure 3.13**). Dans les deux génotypes, le traitement osmotique conduit à une augmentation de la teneur en ABA. La teneur en ABA pour les racines de type sauvage augmente de 3,2 à 3,8 pM/mg MS après traitement PEG, alors que le mutant présente une augmentation de la teneur en ABA de 2,2 à 3,5 pM/mg MS. Il est à noter que la teneur en ABA est plus élevée dans des racines de type sauvage que le mutant *Mtabi5-1*, avant et également après le traitement au PEG.

En conclusion, un certain nombre de gènes impliqués dans la synthèse ou catabolisme d'ABA ont été identifiés comme cibles putatives. Leur régulation par *MtABI5* devra être validée par d'autres techniques. Aux vues des résultats transcriptomiques et des mesures de teneur en ABA obtenus, nous pouvons émettre l'hypothèse que *MtABI5* est impliqué dans la régulation du métabolisme de l'ABA.

4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

4.1 Modification d'action du gène *MtABI5* via l'utilisation du motif EAR

Chez *Arabidopsis*, les mutants *abi5* présentent une germination insensible à l'ABA exogène (Koornneef *et al.*, 1984) et une diminution de l'expression de gènes codant pour des LEA : *AtEM1* et *AtEM6* (Carles *et al.*, 2002). Chez *Medicago*, les graines des mutants *Tnt1 Mtabi5* sont également moins sensibles à l'ABA et germent encore à 10 et à 50 μM . Cependant, chez les mutants *Tnt1 Mtabi5-1* et *Mtabi5-2*, la traduction d'une protéine tronquée subsiste. Afin d'obtenir d'autres mutants, l'équipe a cherché à obtenir des mutants *35S::MtABI5_EAR* et RNAi *Mtabi5*, mutants criblés et caractérisés au cours du stage.

Nos résultats montrent que les graines du mutant *35S::MtABI5_EAR* ne germent pas en présence de 10 et 50 μM d'ABA (**Figure 3.3**). Afin de confirmer si ces mutants ne sont effectivement pas affectés dans leur sensibilité à l'ABA, il faudrait réaliser des tests de germination à concentrations plus faibles en ABA (2 et 5 μM d'ABA, par exemple). Cependant, les graines de ces mutants ne sont pas dormantes, la teneur en ABA à 21 JAP est plus faible que chez les graines de type sauvage et l'aptitude à la conservation est également plus faible. Nous pouvons supposer que l'explication de ce phénotype « partiel », observé pour les mutants *35S::MtABI5_EAR*, réside dans le fonctionnement du motif EAR.

Le motif EAR est un régulateur négatif de la transcription (Kagale *et al.*, 2011). Ce motif a été caractérisé comme étant un répresseur dominant pour les FT, c'est-à-dire qu'il permet un phénotype perte de fonction total, en bloquant la fixation de tous les homologues de son FT cible par la modification de l'état de condensation de la chromatine (Kagale *et al.*, 2011). Depuis sa découverte, le motif EAR est utilisé pour générer des répresseurs chimériques de l'expression des gènes cibles (Hiratsu *et al.*, 2003). Hiratsu *et al.* (2003) ont utilisé le motif EAR fusionné à des FT chez *Arabidopsis* et a révélé la suppression de l'expression d'un gène cible connu, utilisé comme gène cible rapporteur. Chez le mutant *35S::MtABI5_EAR*, l'activation de la transcription des gènes cibles de *MtABI5* est donc supposée bloquée par la fixation sur le promoteur des gènes cibles de *MtABI5* du motif EAR. Toutefois, pour nos mutants, nous observons un phénotype « partiel ». Cependant, Kagale *et al.*, (2010) montre par des analyses bioinformatiques que chez *Arabidopsis*, seulement 40% des protéines fusionnées, présentant le motif EAR, ont un rôle répresseur : en effet, il y aurait des modifications post-translotionnelles qui influenceraient la fonctionnalité du motif EAR : nous pouvons émettre l'hypothèse que dans le cas de nos mutants *35S::MtABI5_EAR*, le motif EAR, bien qu'exprimé, n'agisse pas comme répresseur dominant suite à des modifications post-translotionnelles.

Un autre type de mutant a été formé par l'équipe afin d'obtenir des mutants perte de fonction de *MtABI5* : les mutants RNAi *MtABI5*. Au cours des 6 mois de stage, la production de graines n'a pas pu être menée à abscission, mais permettrait d'obtenir des mutants avec une forte réduction des transcrits de *MtABI5* (Bantounas *et al.*, 2004). Il sera important d'utiliser ces mutants pour valider les phénotypes physiologiques, biochimiques et moléculaires identifiés chez les mutants *Tnt1 Mtabi5*.

4.2 Rôle potentiel de *MtABI5* dans l'établissement de la dormance au cours du développement de la graine, en lien avec la modulation de la teneur en ABA

Chez *Arabidopsis*, à la récolte, la dormance des graines *abi5* ressemble à celle des graines de type sauvage, même si la levée de la dormance est plus rapide (Holdsworth, communications personnelles). Par contre, chez *Medicago*, les graines *Tnt1 Mtabi5* ne sont pas dormantes (Chatelain, 2011). Cette absence est également observée pour les mutants *35S::MtABI5_EAR*. De plus, les données préliminaires de graines de mutants RNAi *MtABI5* suggèrent également une absence de dormance, même si ces résultats sont à confirmer sur les graines matures à l'abscission, avec plus de réplicats biologiques.

L'établissement de la dormance, son maintien, et sa levée à l'imbibition sont sous le contrôle de la balance ABA/GA. Cette balance est modulée par l'activation ou la répression des gènes liés au métabolisme et au catabolisme de l'ABA (Finkelstein *et al.*, 2008). Ainsi, l'induction de la dormance pendant la maturation est contrôlée par l'activation de la transcription de gènes codant pour les *NCEDs*, et l'inactivation des gènes liés au catabolisme, les *CYP707As* (Okamoto *et al.*, 2006). Son maintien pendant l'imbibition est sous le contrôle des gènes *NCEDs* et *ZEP*, et de la répression des *CYP707As* (Grappin *et al.*, 2000). Chez le sorgho, des études de lignées dormantes et non dormantes montrent une corrélation entre la quantité de transcrits de *ABI5* et la dormance : des mesures de la quantité des transcrits et du protéome de *ABI5* dans des graines imbibées de lignées dormante et non dormante révèlent une corrélation entre une diminution des transcrits de *ABI5* et de *ABI5* et une plus faible dormance (Rodriguez *et al.*, 2009). Millar *et al.*, (2006) révèle que chez *Arabidopsis* et l'orge, les niveaux d'expression de *CYP707A2* sont différents entre les graines dormantes et non dormantes: le gène est plus exprimé chez les graines non dormantes, en corrélation avec une teneur en ABA moins importante: or pour nos données, *MtCYP707A2* est sous-exprimé chez les mutants, dont la graine est non dormante. Peut être que les mécanismes de régulation de l'ABA sont différents entre *Medicago*, *Arabidopsis* et l'orge.

Ces résultats sur le rôle du contrôle de la synthèse d'ABA dans la dormance, en lien avec la quantité de *ABI5*, nous permettent d'avancer des hypothèses quant à l'explication possible d'absence de dormance chez les graines *Tnt1 Mtabi5* et *35S::MtABI5_EAR*. Chez ces mutants, la teneur en ABA dans les graines pendant la maturation, à 21 JAP, est plus faible que le type sauvage (**Figure 3.12**). Il faudrait cependant mesurer la teneur en ABA des graines matures afin de confirmer ces résultats. Néanmoins, dans les racines de 2,9mm, la teneur en ABA est également plus faible dans les mutants que dans le type sauvage (**Figure 3.13A**). De plus, les résultats transcriptomiques montrent que chez les mutants *Mtabi5-1* et *Mtabi5-2*, *MtZEP330* et *MtZEP350* sont sous-exprimés chez la graine à 24 JAP et à l'abscission. Ces gènes codent pour la zeaxanthine époxydase (*ABA1*), enzymes qui interviennent dans les premières étapes de la voie de synthèse de l'ABA: ils clivent la zeaxanthine en all-*trans*-violax-anthine (Nambara *et al.*, 2003). Chez *Arabidopsis* et le tabac, les mutants *aba1* sont déficients en ABA (Duckham *et al.*, 1991 ; Marin *et al.*, 1996). Les résultats transcriptomiques de l'expression différentielle des gènes *MtZEP330* et *MtZEP350* ont été confirmés par RT-QPCR dans les graines matures de type sauvage et de mutants *Tnt1 Mtabi5* et *35S::MtABI5_EAR*. Ces résultats nous indiquent que *MtABI5* jouerait un rôle dans la

régulation de la teneur en ABA en agissant sur la synthèse des précurseurs de l'ABA et dans la voie du métabolisme de l'ABA. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'au cours de la maturation de la graine, la synthèse d'ABA (réalisée en 2 pics, d'origine maternelle puis néosynthétisée par l'embryon) est sous le contrôle des gènes *MtZEP* et *MtNCED*, qui seraient potentiellement régulés par *MtABI5*.

L'analyse transcriptomique révèle également que les gènes de la famille des *MtCYP707As* sont différentiellement exprimés à l'abscission et lors de la réinduction de la TD. Les gènes *MtCYP707A1* codent pour une enzyme liée au catabolisme de l'ABA. Cette enzyme, ABA-8 hydroxylase, hydroxyle l'ABA en acide phaséique qui est ensuite dégradé (Okamoto *et al.*, 2006). L'expression de ABA-8_hydroxylase est normalement inhibée en fin de maturation, ce qui correspond avec nos données transcriptomiques (Okamoto *et al.*, 2006, Inoue *et al.*, 2004). Chez *Medicago*, la dormance est plus profonde pendant la maturation tardive (à 36 DAP) que dans les graines sèches (Bolingue *et al.*, 2010). Il est donc possible que *MtABI5* joue également un rôle dans la régulation de la teneur en ABA via sa dégradation, qui est activée à la fin de la maturation pour préparer la graine pour la germination.

Il reste à confirmer si *MtZEP330*, *MtZEP350*, *MtCYP707A1* et *MtCYP707A2* sont des cibles directes ou indirectes de *MtABI5*. Il faudrait réaliser des expériences de simple hybride ou de ChIP PCR afin d'étudier l'interaction physique de *MtABI5* sur les promoteurs de ces cibles. Nous pouvons noter que l'expression ectopique de *MtABI5* n'induit pas l'expression de *MtZEP330* et *MtZEP350*. Ceci laisse à penser que ces gènes sont des cibles indirectes. Une autre possibilité serait que ces gènes sont sous la régulation de *MtABI5* mais en interaction avec d'autres co-régulateurs qui sont exprimés dans les graines mais pas dans les racines. La régulation de l'expression des enzymes est cependant complexe. Deux autres gènes, *CYP707A2* et *CYP707A4*, ont un profil d'expression opposé aux deux *CYP707A1*. Okamoto *et al.*, 2006, émet l'hypothèse que *CYP707A4*, que nous retrouvons surexprimé par surexpression de *MtABI5*, n'aura pas un rôle dans la régulation de l'ABA chez les graines d'*Arabidopsis*. L'expression de ce gène est retrouvée seulement dans les siliques, et il n'y a pas de phénotype en lien avec la teneur en ABA chez ces mutants.

Shu *et al.*, (2013) montrent par ChIP-PCR que *ABI4* inhibe l'expression de *CYP707A1* et *CYP707A2*. De plus, comme chez les mutants *abi5*, la teneur en ABA des mutants *abi4* est plus faible que chez le type sauvage (1,3 fois plus d'ABA dans les graines de type sauvage que celles de *abi4*) : Shu *et al.*, (2013) suggèrent donc que *ABI4* établit la dormance primaire en modulant la teneur en ABA et en GA. Reeves *et al.*, (2011) montrent que *ABI4* et *ABI5* agissent en synergie : des expériences de surexpression ectopiques de *ABI4*, *ABI5* séparément, et de *ABI4 ABI5* conjointement montrent que certaines cibles sont différentiellement exprimées par surexpression conjointe des deux FT. Il sera intéressant d'étudier si les FT *ABI4* et *ABI5* activent en dimères les gènes liés à la synthèse de l'ABA au cours du développement de la graine.

4.3 Rôle de *MtABI5* dans la répression des gènes de la photosynthèse, et lien avec l'acquisition de la longévité

Lorsque nous recoupons le transcriptome des racines *35S::MtABI5* avec le transcriptome des mutants *Tnt1 abi5* pendant la maturation, 77 gènes ont été identifiés en commun. Ces gènes sont fortement surexprimés dans les graines de mutants dans le dernier stade de la maturation, à l'abscission (Annexe XIII). Le profil d'expression de ces gènes pendant le développement de la graine montre une expression élevée jusqu'à la fin du remplissage, puis une diminution, en parallèle avec la perte de la chlorophylle (Chatelain, 2011). Il semble donc que *MtABI5* joue un rôle de répresseur de ces gènes. Parmi ces 77 gènes, une majorité est liée à la photosynthèse : des gènes codant pour des acteurs de la chaîne photosynthétique dans les membranes tilakoïdales, notamment les sous-unités qui forme le photosystème I et II (annexe 3.4).

Les caroténoïdes, participent à la protection de molécules de chlorophylle contre la photo-oxydation lors de la photosynthèse. Ils sont également les précurseurs de l'ABA. Nous savons que la teneur en chlorophylle dans les graines diminue à la fin de maturation et serait liée à la longévité de la graine (Jalink *et al.*, 1998) : nous pouvons émettre l'hypothèse que *MtABI5* induirait la synthèse de l'ABA, ce qui conduirait à inhiber la photosynthèse et le taux de chlorophylle dans les graines, conduisant à l'acquisition de la qualité de la graine, notamment de la longévité. En effet, cette hypothèse serait corroborée par Nakajima *et al.*, (2012), qui stipule que la dégradation de la chlorophylle en fin de maturation est sous le contrôle de l'ABA, et permet l'acquisition de l'aptitude au stockage. L'ABA régulerait ainsi une enzyme de dégradation de la chlorophylle b, la chlorophyllase b.

4.4 Rôle de *MtABI5* dans la réinduction de la TD : réponse au froid et au stress hydrique

L'étude des cibles potentielles de *MtABI5* par croisement avec les données issues des racines à TD ré-induite serait plus proche que l'étude croisée avec les données issues des graines, car les organes étudiés sont similaires: La surexpression se fait dans la racine secondaire, et la réinduction de la TD est étudiée dans l'axe embryonnaire, organe proche de la racine. Parmi les 8 ressortant de l'analyse (**Tableau 3.5**), un code pour la protéine sérine-thréonine protéine kinase 2, qui est impliquée dans la voie de réponse au froid, à la chaleur et à un stress osmotique ; un autre code pour LOS1, impliquée dans la réponse au froid, et de l'acclimatation au froid. Au cours de la réinduction de la TD, les racines 2,9 mm sont placées 3 j dans une solution de PEG -1,7 MPa à 10°C, c'est-à-dire au froid. Cette condition aurait activé la voie d'acclimatation au froid, qui serait induite par *Mtabi5*. Cependant, parmi les gènes qui seraient réprimés par *MtABI5*, des gènes liés à la réponse au froid sont inhibés (résultats de l'analyse Agrigo des gènes « down » et « up » dans les racines et les mutants *Tnt1 abi5*). Chez *Arabidopsis*, il a été montré que des gènes de réponse au froid sont activés par la voie de signalisation de l'ABA (Catala et Salinas, 2008). En effet, les gènes de réponse au froid seraient activés par ABF1, via la fixation au motif ABRE, sous l'effet de l'ABA et du froid. Chez le soja, il a été montré qu'une protéine à motif en doigt de zing contrôlerait l'activation de gènes de réponse au froid. Ces données laissent supposer que *MtABI5* contrôlerait la voie de réponse au froid, signalisée par l'ABA.

CONCLUSION

La caractérisation des mutants *35SS::MtABI5_EAR* réalisée au cours de ce stage montre que les graines de ce mutant ne sont pas dormantes et ont une aptitude à la conservation plus faible que le type sauvage. Cependant, ces graines sont sensibles à l'ABA exogène à la germination, et la teneur en sucres solubles n'est pas différente de celle des graines de type sauvage. Ces mutants *35S::MtABI5_EAR* présentent un phénotype « partiel » par rapport aux graines de type sauvage et de mutants *Tnt1 Mtabi5*. En revanche, les mesures de la teneur en ABA montrent que, comme les mutants *Tnt1 Mtabi5*, celle-ci est moins importante dans ces graines au cours du développement que pour celle des graines de type sauvage. Ces données nous permettraient d'émettre une première hypothèse selon laquelle la mutation *MtABI5* serait liée à un phénotype d'absence de dormance, lié à une teneur en ABA plus faible.

De plus, les analyses transcriptomiques de surexpression ectopique de *35S::MtABI5*, couplées avec les données de réinduction de la TD dans les radicules, montrent une sous-expression de gènes liés à la photosynthèse et à la synthèse de xanthophylle. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la diminution de la teneur en chlorophylle à la fin de maturation, en lien avec la qualité de la graine, serait contrôlée par *MtABI5*. Cependant, des données de validation phénotypique de mutants manquent : il serait intéressant de réaliser un dosage de la chlorophylle dans les téguments des graines de type sauvage et de mutants *Tnt1 Mtabi5* et *35S::MtABI5_EAR*.

Les données de surexpression ectopique de *35S::MtABI5* croisées avec les transcriptomes des graines de mutants *Tnt1 Mtabi5* à l'abscission montrent que deux gènes, codant pour des enzymes ABA1, sont surexprimés par surexpression *35S::MtABI5* et inversement réprimés dans le transcriptome des graines matures de *Tnt1 Mtabi5*. Ces enzymes sont liées au métabolisme de l'ABA. De plus, deux gènes liés au catabolisme de l'ABA, les *CYP707A1*, sont réprimés à la fin de la maturation. Ces données permettent de supposer que le second pic de synthèse d'ABA, observé vers la fin du développement de la graine, serait dû à une expression des gènes du métabolisme de l'ABA, et à une répression des gènes liés à son catabolisme, sous le contrôle supposé de *MtABI5*. Les données de caractérisation des mutants, croisées avec ces analyses transcriptomiques, nous permettent donc de supposer un rôle de *MtABI5* dans l'établissement de la dormance, via le contrôle des gènes liés à la synthèse et à la dégradation de l'ABA.

Ces résultats préliminaires sont à confirmer. Tout d'abord, les caractérisations des mutants doivent être réalisées sur les autres lignées *35S::MtABI5_EAR*, puis sur d'autres récoltes. Elles doivent également être confirmées sur les graines des mutants RNAi *MtABI5*. De plus, des répétitions biologiques doivent être faites pour les données *35S::MtABI5*, puis validées par des RT-QPCR sur les gènes cibles putatifs. Ces données préliminaires semblent indiquer que *MtABI5* serait impliqué dans l'acquisition de la qualité de la graine. La connaissance plus précise de son rôle permettrait, à terme, d'améliorer la compréhension de l'acquisition de la qualité de la graine, qui est un caractère complexe. Ces informations aideraient le secteur public à comprendre les mécanismes de la formation de la graine, mais également le secteur privé, pour qui la qualité de la graine est un déterminant-clef.

BIBLIOGRAPHIE

ARTICLES

- Bantounas I., Phylactou LA., Uney JB. (2004). RNA interference and the use of a small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 33, 5475-557
- Bolingue, W., Ly Vu, B., Leprince, O., & Buitink, J. (2010). Characterization of dormancy behaviour in seeds of the model legume *Medicago truncatula*. *Seed Science Research*, 20(02), 97-107
- Boude,t J., Buitnik, J., Hoeksra, FA., Rogniaux, H., Larré, C., Satour, P., Leprince, O. (2006) Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins a ssociated with desiccation tolerance. *Plant physiology*, 140, 1418-1436
- Brocard, I. M., Lynch, T. J., & Finkelstein, R. R. (2002). Regulation and role of the Arabidopsis abscisic acid-insensitive 5 gene in abscisic acid, sugar, and stress response. *Plant physiology*, 129(4), 1533-1543
- Buitink, J., Leprince, O., & Hoekstra, F. A. (2000). Dehydration-induced redistribution of amphiphilic molecules between cytoplasm and lipids is associated with desiccation tolerance in seeds. *Plant physiology*, 124(3), 1413-1426
- Buitink, J., Vu, B. L., Satour, P., & Leprince, O. (2003). The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. *Seed Science Research*, 13(4), 273-286
- Buitink, J., et Leprince, O. (2004). Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state . *Cryobiology*, 48(3), 215-228
- Carles, C., Bies-Etheve, N., Aspart, L., Léon-Kloosterziel, K. M., Koornneef, M., Echeverria, M., & Delseny, M. (2002). Regulation of Arabidopsis thaliana Em genes: role of ABI5. *The Plant Journal*, 30(3), 373-383
- Catala, R., & Salinas, J. (2008). Review. Regulatory mechanisms involved in cold acclimation response. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6, 211-220
- Chatelain, E., Hundertmark, M., le Gall, S., Leprince, O., Satour, P., Rogniaux, H., Buitink, J. (2012). Profiling the heat stable proteome identifies different LEA (late embryogenesis abundant) proteins linked to desiccation tolerance, longevity and maturation drying in developing *M. truncatula* seeds. *Plant Cell Environment*, 35(8), 1440-1455

- Clerkx, E. J.M, El-Lithy ME, Vierling E, Ruys GJ, Blankestijn-De Vries H, Groot SP, Vreugdenhil D, Koornneef M. (2004). Analysis of Natural Allelic Variation of Arabidopsis Seed Germination and Seed Longevity Traits between the Accessions Landsberg erecta and Shakdara, Using a New Recombinant Inbred Line Population . *Plant physiology* 135(1), 432-443
- Crowe, J. H., Hoekstra, F. A., & Crowe, L. M. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 54(1), 579-599
- Dai, M., Xue, Q., Mccray, T., Margavage, K., Chen, F., Lee, J. H., ... & Wang, H. (2013). The PP6 Phosphatase Regulates ABI5 Phosphorylation and Abscisic Acid Signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 25(2), 517-534
- Djemel, N., Guedon, D., Lechevalier, A., Salon, C., Miquel, M., Prosperi, J. M., ... & Boutin, J. P. (2005). Development and composition of the seeds of nine genotypes of the *Medicago truncatula* species complex. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(6), 557-566
- Dornbos, D. L., Mullen, R. E., & Shibles, R. E. (1989). Drought stress effects during seed fill on soybean seed germination and vigor. *Crop science*, 29(2), 476-480
- Doyle, J. J., & Luckow, M. A. (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology*, 131(3), 900-910.
- Duckham, S. C., Linforth, R. S. T., & Taylor, I. B. (1991). Abscisic-acid-deficient mutants at the aba gene locus of Arabidopsis thaliana are impaired in the epoxidation of zeaxanthin. *Plant, Cell & Environment*, 14(6), 601-606
- Finch-Savage, W. E., & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171(3), 501-523
- Finkelstein, R. R., & Lynch, T. J. (2000). The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *The Plant Cell Online*, 12(4), 599-609
- Finkelstein, R. R., Gampala, S. S., & Rock, C. D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell Online*, 14(suppl 1), S15-S45
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., & Steber, C. (2008). Molecular Aspects of Seed Dormancy*. *Plant Biology*, 59(1), 387
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of plant research*, 124(4), 509-525
- Grappin P, Bouinot D, Sotta B, Miginiac E, Jullien M. (2010). Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta*, 210(2), 279-28

- Hiratsu, K., Matsui, K., Koyama, T., & Ohme-Takagi, M. (2003). Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 34(5), 733-739
- Hoekstra, F. A., Golovina, E. A., & Buitink, J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in plant science*, 6(9), 431-438
- Holdsworth, M. J., Bentsink, L., & Soppe, W. J. (2008). Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist*, 179(1), 33-54
- Inoue, K. (2004). Carotenoid hydroxylation–P450 finally!. *Trends in plant science*, 9(11), 515-517
- Jalink, H., Van der Schoor, R., Frandas, A., Van Pijlen, J. G., & Bino, R. J. (1998). Chlorophyll fluorescence of Brassica oleracea seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance. *Seed Science Research*, 8(4), 437-443
- Kagale, S., Links, M. G., & Rozwadowski, K. (2010). Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in Arabidopsis. *Plant physiology*, 152(3), 1109-1134
- Kagale, S., & Rozwadowski, K. (2011). EAR motif-mediated transcriptional repression in plants: an underlying mechanism for epigenetic regulation of gene expression. *Epigenetics*, 6(2), 141-146
- Kanai, M., Nishimura, M., & Hayashi, M. (2010). A peroxisomal ABC transporter promotes seed germination by inducing pectin degradation under the control of ABI5. *The Plant Journal*, 62(6), 936-947
- Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in plant science*, 7(5), 193-195
- Koornneef, M., Reuling, G., & Karssen, C. M. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of Arabidopsis thaliana. *Physiologia Plantarum*, 61(3), 377-383
- Leung, J., & Giraudat, J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annual review of plant biology*, 49(1), 199-222
- Linkies, A., & Leubner-Metzger, G. (2012). Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant cell reports*, 31(2), 253-270
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., & Chua, N. H. (2001). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8), 4782-4787

- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., McLachlin, D. T., Chait, B. T., & Chua, N. H. (2002). ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *The Plant Journal*, 32(3), 317-328
- Lynch, T., Erickson, B. J., & Finkelstein, R. R. (2012). Direct interactions of ABA-insensitive (ABI)-clade protein phosphatase (PP) 2Cs with calcium-dependent protein kinases and ABA response element-binding bZIPs may contribute to turning off ABA response. *Plant molecular biology*, 80(6), 647-658
- Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B., Huguency, P., ... & Marion-Poll, A. (1996). Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO journal*, 15(10), 2331
- Mauch-Mani, B., & Mauch, F. (2005). The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current opinion in plant biology*, 8(4), 409-414
- Millar, A. A., Jacobsen, J. V., Ross, J. J., Helliwell, C. A., Poole, A. T., Scofield, G., ... & Gubler, F. (2006). Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *The Plant Journal*, 45(6), 942-954
- Mitsunori S., Tomokazu K. (2002). Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 7(1), 41-48
- Nakajima, S., Ito, H., Tanaka, R., Tanaka, A. (2012). Chlorophyll b reductase plays an essential role in maturation and storability of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant physiology*, 160(1), 261-273
- Nambara, E., et Marion-Poll, A. (2003). ABA action and interactions in seeds. *Trends in Plant Science* 8(5), 213-217
- Obendorf, R. L. (1997). Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research*, 7(2), 63-74
- Okamoto, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kushiro, T., Asami, T., Hirai, N., ... & Nambara, E. (2006). CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 141(1), 97-107
- Rajjou, L., & Debeaujon, I. (2008). Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes rendus biologiques*, 331(10), 796-805
- Raz, V., Bergervoet, J. H., & Koornneef, M. (2001). Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development*, 128(2), 243-252
- Reeves, W. M., Lynch, T. J., Mobin, R., & Finkelstein, R. R. (2011). Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive (ABI) 4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors. *Plant molecular biology*, 75(4-5), 347-363

- Rodríguez, M. V., Mendiondo, G. M., Maskin, L., Gudesblat, G. E., Iusem, N. D., & Benech-Arnold, R. L. (2009). Expression of ABA signalling genes and ABI5 protein levels in imbibed *Sorghum bicolor* caryopses with contrasting dormancy and at different developmental stages. *Annals of botany*, *104*(5), 975-985
- Rosnoblet, C., Aubry, C., Leprince, O., Vu, B. L., Rogniaux, H., & Buitink, J. (2007). The regulatory gamma subunit SNF4b of the sucrose non-fermenting-related kinase complex is involved in longevity and stachyose accumulation during maturation of *Medicago truncatula* seeds. *The Plant Journal*, *51*(1), 47-59
- Sallon, S., Solowey, E., Cohen, Y., Korchinsky, R., Egli, M., Woodhatch, I., ... & Kislev, M. (2008). Germination, genetics, and growth of an ancient date seed. *Science*, *320*(5882), 1464-1464
- 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*(4), 608-620
- Shu, K., Zhang, H., Wang, S., Chen, M., Wu, Y., Tang, S., Liu, C., Feng, Y., Cao, X., Xie, Q. (2013). ABI4 regulates primary seed dormancy by regulating the biogenesis of ABA and Gas in *Arabidopsis*. *Plos Genetics* *9*(6), e1003577
- 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 Online*, *18*(7), 1642-1651
- Tunnacliffe, A., Wise, M. (2007). The continuing conundrum of the lea proteins. *Naturwissenschaften*, *94*(10), 791-812

OUVRAGES

Bewley, J.D. et Black, M. 1994. Seeds : Physiology of development and germination. Second edition. Plenum Press. New York. 445 pages

Chabaud, Mireille, Boisson-Dernier, Aurélien, Zhang, Juan, Taylor, Christopher, Yu, Olivier, Barker, David. 2006. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation . *Medicago truncatula* hand book, 2006. 26 pages

Thèses

Chatelain, Emilie. « Contribution à la caractérisation des phases tardives de la maturation des graines de *Medicago truncatula* : une étude physiologique et biochimique pour comprendre la longévité ». Université d'Angers, 2011

LOGICIELS

Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, and Jack A.M. Leunissen: Primer3Plus, an enhaNCED web interface to Primer3 Nucleic Acids Research 2007 35: W71-W74

Zhou, D., Xin, Z., Yi, L., Zhenhai, Z., Zhen, S. “agrigO: a GO analysis toolkit for the agricultural community”. Nucleic acids research advance, 2010

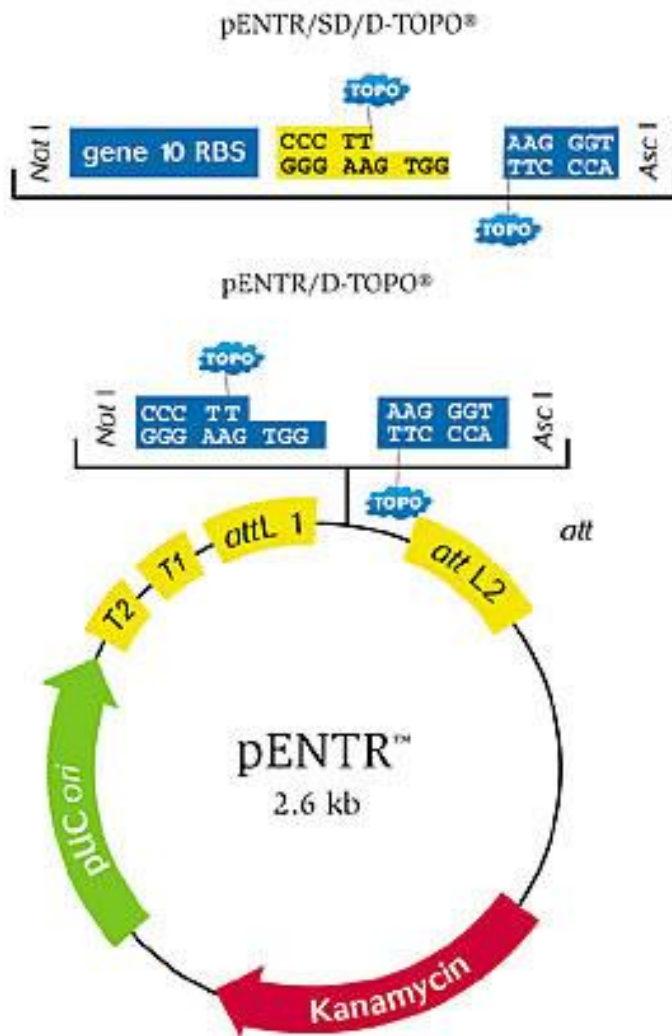
Annexe I: Séquence de la construction *MtABI5* ::EAR utilisée pour la surexpression dans les racines transgéniques. Pour fusionner *MtABI5* avec le motif EAR (en bleu), le codon TGA a été enlevé

cacc...

atggtggaagagaaggtgagatgaattggcaacaaggggaggtagaatcattgcagagg
M V V R E G E M N W Q Q G E V E S L Q R
gaaggagaagaagcgaccaggaatgacgtcaacaatgtcatttcttcacgcctcggaagg
E G E E A T R N D V N N V I S S S L G R
caatcgatccatataactcactcacccttgacgagttccaacacagcctctgtgatagc
Q S S S I Y S L T L D E F Q H S L C D S
ggcaagaatttcggatccatgaacatggatgagtttctaagtagtatttggaatgcagaa
G K N F G S M N M D E F L S S I W N A E
gaaaaccaacaacaagctgcatccaacaataataacagcaacaacaataactgtctgca
E N Q Q Q A A S N N N N S N N N N L S A
gctcagaaagggattagcaaacaggcaagtcttcctcgccaaaattcgttatcgattcct
A Q K G I S K Q A S L P R Q N S L S I P
gctcctctctgcaggaaaactgtggaacaagtttgggtctgagatacacaagaacaacag
A P L C R K T V E Q V W S E I H K E Q Q
aacatcacaacatcaacaatgttgctcagaataccgagctctaccctcgacagccgact
N H H N I N N V A Q N T E S T P R Q P T
tttggcgagatgacattggaggatttcttggttaaagcaggggtagttagggaaacaacag
F G E M T L E D F L V K A G V V R E Q Q
cttggtatgccggttgccatagcaccaccctaccgcagcagcagtgatctcctcagcgg
S G M P V A I A P P P P T A A A V S S H R
ccgcagcagcattacgctgcagtgatccgaacaacaactctacaatggttcagggtgct
P Q Q H Y A A V Y P N N N S T M V Q A A
tcatttgcatttggcggcggggaatctaaacgttgttgcgccaccgtaccaaacggtg
S F A I G G G G N L N V V A P P Y Q T V
gcacagggaggtggagcagttggagaaccttcgagttcaggggtatgttgggaatggtgaa
A Q G G G A V G E P S S S G Y V G N G K
acgagagatagtataggtacggggatcctccaccgcccagctgtttgttacggaggg
T R D S I G T G Y P P P P P A V C Y G G
agagtggatggaatggagcagcggggttatggcatggcagtggcacaaactatgggaatg
R V V N G A A G G Y G M A V A Q T M G M
ggtggacctgttagtccggtttcatcggatgggattggaaatgaaaactcgggtgggtcaa
G G P V S P V S S D G I G N E N S G G Q
tttgggattgatatgaatggtttacgaggaagaaagaggatggttgatggtcctggtgaa
F G I D M N G L R G R K R M V D G P V E
aggggtggtagagaaggcagaggaggatgatcaagaatagagagtcagcagcaaatct
R V V E R R Q R R M I K N R E S A A R S
agagccagaaaacaggcctatacagttgaattagaagcagaactgaatcaattaagagaa
R A R K Q A Y T V E L E A E L N Q L R E
gagaattctcaactgaaacaggcactggctgaactcgagaggagaagaagacaacagtggt
E N S Q L K Q A L A E L E R R R R Q Q C
ttagaggaaacaaacgtgagagttcaaacgaaagctcagaaagcaaaagagaaaactgaga
L E E T N V R V Q T K A Q K A K E K L R
ggcttaagaaggaatacaagttgtcatctgcttgatctggatctagaactcggtttgggt
G L R R N T S C H L L D L D L E L R L G
ttcgcttaactgcagt
F A -

Annexe II: Cartographie du plasmide pENTR™/D-TOPO®.

[http:// products.invitrogen.com/ivgn/product/K240020.](http://products.invitrogen.com/ivgn/product/K240020)



pENTR/SD/D-TOPO® contains a gene 10 sequence and Shine-Dalgarno (SD) sequence for efficient initiation of native expression in *E. coli*.

Figure 1 - Gateway® Directional TOPO® entry vector

Annexe III : Composition du milieu de culture LB (Lysogeny Broth).

LB (solide)	10g/L Bacto-tryptone, 5g/L Bacto-yeast extract, 10 g/L NaCl, pH ajusté à 7 avec du NaOH (et 15g/L de Bacto-Agar)
------------------------	--

Annexe IV: Composition du mix PCR (A) et détails des programmes utilisés pour les PCR de criblage des mutants, de vérification des transformations et vérification de l'insert EAR chez le mutant 35S::MtABI5 EAR.

(A)

Produit	Concentration initiale	Concentration finale	Quantité pour 1 échantillon (µL)
H2O stérile			7,5
Tampon Taq Pol	5X	1X	2,6
dNTPs	2,5 mM	200 µM	0,75
Amorce Sens	10 µM	0,5 µM	0,75
Amorce Anti-sens	10 µM	0,5 µM	0,75
Taq polymérase	5 u/µL	0,05 u/µL	0,65
ADN		<250 ng	2

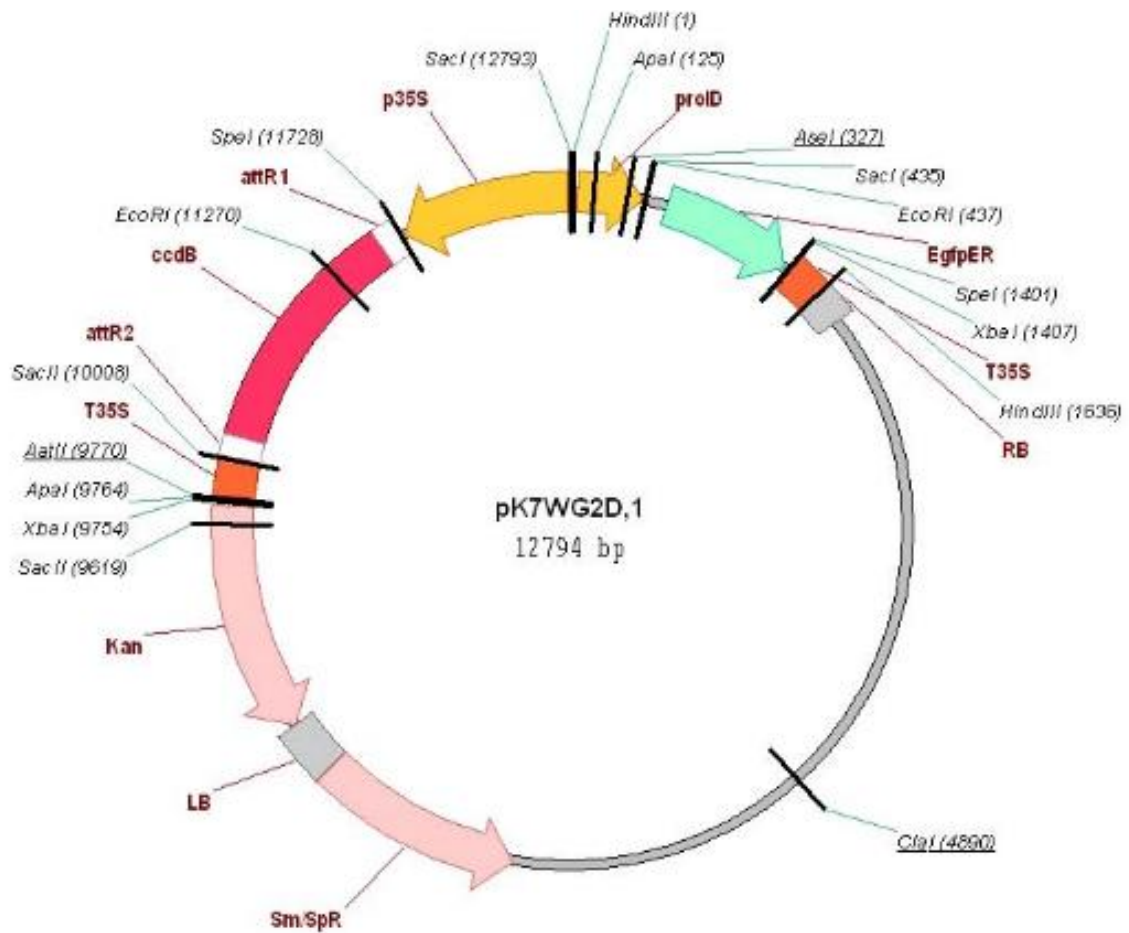
(B)

Température de l'échantillon (°C)	Temps (secondes)	Nombre de répétitions (cycles)
95	120	1
95	30	35
Tm amorces	30	
72	60	
72	300	1
12	infini	

Annexe V: Liste des amorces utilisées.

Nom de l'amorce	Annotation	Séquence associée	Utilisation	Séquence (5' -> 3')	Tm (°C)
JZ-P35S-F1		Promoteur 35S	Criblage lignées homozygotes RNAi	TGCTGACCCACAGATGGTTA	57,3
JZ-P35S-R1		Promoteur 35S	Criblage lignées homozygotes RNAi	CGCCAATGATGGCATTGTAG	55,3
T35S-R			-Criblage lignées homozygotes 35S ::ABI5_EAR -Criblage de colonies de <i>E. coli</i> et de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> transformées avec le vecteur de destination		60
Abi5-F	MEDTR7G104480.1	ABI5	-Criblage lignées homozygotes 35S ::ABI5_EAR -PCR haute fidélité du gène <i>ABI5</i> pour le clonage -Criblage de colonies de <i>E. coli</i> et de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> transformées avec le vecteur de destination	CACCATGGTGGTAAGAGAAGGTGAGAT	59
Abi5-R	MEDTR7G104480.1	ABI5	- PCR haute fidélité du gène <i>ABI5</i> pour le clonage	TCTGGCTCTAGATCTTGCTGCT	60
M13 F		Site de clonage du pENTR	-Criblage de colonies de <i>E. coli</i> transformées avec le pENTR/D-TOPO -Réaction de séquençage	GTAAAACGACGGCCAG	60
M13 R		Site de clonage du pENTR	-Criblage de colonies de <i>E. coli</i> transformées avec le pENTR /D-TOPO -Réaction de séquençage	CAGGAAACAGCTATGAC	60
ZEP 330 F2 EL	MEDTR5G017330.1	ABA 1	RT-QPCR	AGACTTTGTGCCACCTGACA	59
ZEP 330 R2 EL	MEDTR5G017330.1	ABA1	RT-QPCR	TTGCATCTTTCCAGCACCGA	60
ZEP 350 F1 JZ2	MEDTR5G017350.1	ABA 1	RT-QPCR	CGCATCCGTCCTTCTCATGT	60
ZEP 350 R1 JZ2	MEDTR5G017350.1	ABA1	RT-QPCR	TGCCCTTCCTTTTGAGCAA	59

Annexe VI: Carte du vecteur de destination pK7WG2D.1 utilisé pour la surexpression de *MtABI5*. La séquence d'intérêt est sous le contrôle du promoteur 35S. Les gènes codant pour la GFP (EgfpER, gène rapporteur) et la résistance à la Kanamycine sont présents entre les bornes RB et LB.



Annexe VII: Composition du mix PCR (A) et détails du programme (B) pour la PCR haute fidélité, utilisée afin de produire l'amplicon à insérer dans le pENTR par système Gateway.

(A)

Produit	Concentration initiale	Concentration finale	Quantité pour 1 échantillon (µL)
H2O stérile			10,2
Tampon Phus	5X	1X	4
dNTPs	2,5 mM	200 µM	1,6
Amorce Sens	10 µM	0,5 µM	1
Amorce Anti-sens	10 µM	0,5 µM	1
Taq Phusion	2 u/µL	0,02 u/µL	0,2

(B)

Température de l'échantillon (°C)	Temps (secondes)	Nombre de répétitions (cycles)
98	30	1
98	10	34
63	30	
72	60	
72	300	1
12	infini	

Annexe VIII: Composition du milieu de culture Farhaeus.

	Concentration stock	Quantité pour 1 L	Concentration finale (µM)
Macroéléments			
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 M	1	500
KH ₂ PO ₄	0,7 M	1	700
Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	0,4 M	2	800
Fe-EDTA	20 mM	2,5	500
Microéléments			
MnSO ₄ , CuSO ₄ , ZnSO ₄ , H ₃ BO ₃ , Na ₂ MoO ₄	1 mg/mL de chaque	100 µL	0,1 µg/ chaque
Plant Preservative Mixture		1 mL	
Agar HSP 696		15 g	
CaCl₂		335 µL	
Kanamycine		500 µL	25
ABA		0 ou 10µL d'ABA 500 µM	0 ou 5µM

Annexe IX: Programme pour les RT- QPCR.

Température	Temps	Nombre de cycles
95°C	30 s	
95°C	5 s	x39
60°C	5 s	
Courbe de fusion		
70°C -> 95°C	5 s	

Annexe X: Liste des annotations GO surreprésentés parmi les 948 gènes significativement surexprimés dans les racines 35S::MtABI5.

GO term	Ontology	Description	Number in input list	Number in BG/Ref	p-value	FDR
GO:0050896	P	response to stimulus	93	4057	8.8e-11	7.5e-08
GO:0019318	P	hexose metabolic process	9	126	4.7e-08	2,00E-05
GO:0006950	P	response to stress	56	2320	1.3e-07	3.7e-05
GO:0009063	P	cellular amino acid catabolic process	5	47	7.4e-07	0.00016
GO:0010033	P	response to organic substance	36	1342	1.6e-06	0.00022
GO:0009310	P	amine catabolic process	5	49	1.4e-06	0.00022
GO:0016054	P	organic acid catabolic process	7	98	2.4e-06	0.00023
GO:0046395	P	carboxylic acid catabolic process	7	98	2.4e-06	0.00023
GO:0042221	P	response to chemical stimulus	49	2085	2.5e-06	0.00023
GO:0005996	P	monosaccharide metabolic process	9	168	9.6e-06	0.00083
GO:0009719	P	response to endogenous stimulus	29	1068	1.4e-05	0.0011
GO:0009725	P	response to hormone stimulus	27	982	2.3e-05	0.0016
GO:0009605	P	response to external stimulus	15	429	5.4e-05	0.0036
GO:0009611	P	response to wounding	9	197	0.0001	0.0064
GO:0009743	P	response to carbohydrate stimulus	10	240	0.00014	0.0082
GO:0016265	P	death	11	286	0.0002	0.0093
GO:0012501	P	programmed cell death	10	244	0.00018	0.0093
GO:0008219	P	cell death	11	286	0.0002	0.0093
GO:0016891	F	endoribonuclease activity, producing 5'-phosphomonoesters	5	44	2.6e-07	5.5e-05
GO:0003824	F	catalytic activity	166	9638	2,00E-07	5.5e-05
GO:0016893	F	endonuclease activity, active with either ribo- or deoxyribonucleic acids and producing 5'-phosphomonoesters	5	49	1.4e-06	0.00019
GO:0016491	F	oxidoreductase activity	38	1463	2.2e-06	0.00023
GO:0004521	F	endoribonuclease activity	5	66	6.6e-05	0.0048
GO:0016798	F	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	17	526	6.9e-05	0.0048
GO:0004497	F	monooxygenase activity	7	127	9.6e-05	0.0052
GO:0020037	F	heme binding	6	97	0.00011	0.0052
GO:0046914	F	transition metal ion binding	37	1618	0.00011	0.0052

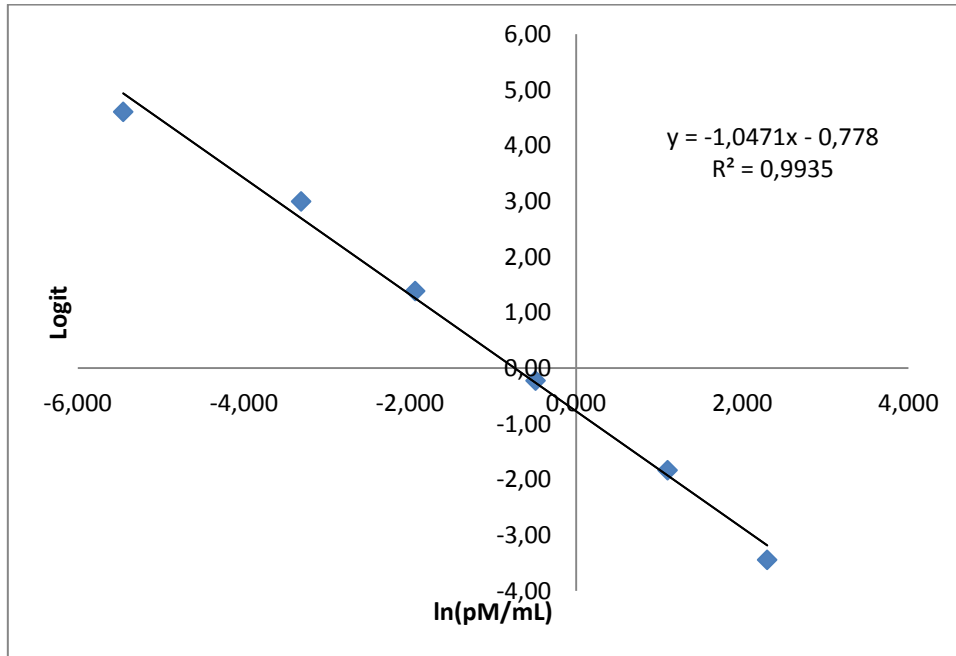
Annexe XI : Liste des annotations 50 GO surreprésentés parmi les 1820 gènes significativement sous-exprimés dans les racines 35S::MtABI5.

GO Term	Ontology	Description	Number in input list	Number in BG/Ref	p-value	FDR
GO:0050896	P	response to stimulus	88	4057	2.1e-14	3.2e-11
GO:0009628	P	response to abiotic stimulus	48	1471	7.2e-14	5.4e-11
GO:0006950	P	response to stress	54	2320	5.3e-10	2.6e-07
GO:0015979	P	photosynthesis	14	162	1,00E-09	3.8e-07
GO:0009409	P	response to cold	16	328	1.4e-07	4.1e-05
GO:0009416	P	response to light stimulus	21	596	3.1e-07	7.7e-05
GO:0009314	P	response to radiation	21	613	4.8e-07	0.0001
GO:0009266	P	response to temperature stimulus	18	485	1.1e-06	0.0002
GO:0009832	P	plant-type cell wall biogenesis	7	58	2.2e-06	0.00034
GO:0009834	P	secondary cell wall biogenesis	5	19	2.2e-06	0.00034
GO:0065007	P	biological regulation	67	4188	5.6e-06	0.00076
GO:0042546	P	cell wall biogenesis	7	70	6.8e-06	0.00085
GO:0010114	P	response to red light	7	77	1.2e-05	0.0014
GO:0010218	P	response to far red light	6	57	2.4e-05	0.0026
GO:0050794	P	regulation of cellular process	55	3375	2.7e-05	0.0028
GO:0009639	P	response to red or far red light	10	210	3.8e-05	0.0036
GO:0009791	P	post-embryonic development	19	705	4.4e-05	0.0039
GO:0010196	P	nonphotochemical quenching	3	6	6,00E-05	0.005
GO:0010033	P	response to organic substance	28	1342	6.7e-05	0.0053
GO:0005975	P	carbohydrate metabolic process	21	866	7.6e-05	0.0057
GO:0050789	P	regulation of biological process	57	3697	8.7e-05	0.0062
GO:0009664	P	plant-type cell wall organization	6	79	0.00013	0.0085
GO:0042221	P	response to chemical stimulus	37	2085	0.00013	0.0085
GO:0016168	F	chlorophyll binding	8	38	8.4e-09	3.8e-06
GO:0046906	F	tetrapyrrole binding	12	136	1.3e-08	3.8e-06
GO:0016491	F	oxidoreductase activity	32	1463	8.1e-06	0.0012
GO:0003824	F	catalytic activity	126	9638	6.3e-06	0.0012
GO:0044435	C	plastid part	33	867	1.7e-11	5.5e-09
GO:0044434	C	chloroplast part	28	746	8.3e-10	1.4e-07
GO:0009579	C	thylakoid	19	376	5.3e-09	5.8e-07
GO:0010287	C	plastoglobule	10	81	1.1e-08	9.4e-07
GO:0010319	C	stromule	8	49	4.9e-08	3.2e-06
GO:0034357	C	photosynthetic membrane	15	273	7.9e-08	4.3e-06
GO:0009526	C	plastid envelope	16	331	1.5e-07	7.2e-06
GO:0009521	C	photosystem	8	66	3.9e-07	1.6e-05
GO:0030076	C	light-harvesting complex	6	31	1,00E-06	3.6e-05
GO:0042651	C	thylakoid membrane	11	244	2.5e-05	0.00083
GO:0030312	C	external encapsulating structure	14	407	3.8e-05	0.0011
GO:0009535	C	chloroplast thylakoid membrane	10	231	8.1e-05	0.002
GO:0055035	C	plastid thylakoid membrane	10	231	8.1e-05	0.002
GO:0009523	C	photosystem II	5	45	9.2e-05	0.0021
GO:0031976	C	plastid thylakoid	11	293	0.00012	0.0024
GO:0005618	C	cell wall	13	403	0.00013	0.0024
GO:0009534	C	chloroplast thylakoid	11	290	0.00011	0.0024
GO:0031984	C	organelle subcompartment	11	295	0.00013	0.0024
GO:0044436	C	thylakoid part	11	307	0.00018	0.0028
GO:0009706	C	chloroplast inner membrane	5	53	0.00019	0.0028
GO:0031975	C	envelope	16	595	0.00018	0.0028
GO:0031967	C	organelle envelope	16	595	0.00018	0.0028
GO:0009528	C	plastid inner membrane	5	57	0.00026	0.0037

Annexe XII : Tableau des gènes surexprimés dans les racines 35S ::MtABI5 et réprimés dans le transcriptome des mutants *Tnt1 Mtabi5* au stade abscission.

seq_id	Description.BH.SP	MtABI5/ R108	pvalue	abi5-1 abs	pvalue abs	abi5-2 abs	pvalue abs
MEDTR3TE100530_1	MuDR family transposase	1.42	1E-04	-2.77	2E-05	-3.96	1E-05
MEDTR3G013420_1	NA	1.22	4E-04	-2.81	2E-04	-3.7	2E-07
MEDTR7G012180_1	NA	1.58	2E-04	-2.27	7E-05	-3.08	1E-04
MEDTR4TE022740_1	IPR004252: Transposase, PttA/En/Spm, plant;	1.98	#####	-1.83	6E-05	-2.25	6E-07
MEDTR2TE021290_1	Putative nuclease HARBI1 EC=3.1.-.-; Cytoplasm Hydrolase Met	1.35	2E-04	-1.85	3E-05	-1.76	8E-06
MT3_5_1S064038		1.11	8E-04	-2.4	1E-05	-2.07	9E-06
MEDTR7TE017640_1	Putative ribonuclease H protein	1.11	1E-03	-1.84	6E-06	-1.56	1E-05
MEDTR4TE043610_1	Putative nuclease HARBI1	1.23	4E-04	-1.45	3E-05	-1.25	4E-05
MEDTR1G110220_1	Receptor-like protein kinase	1.3	2E-04	-1.28	3E-05	-1.09	3E-04

Annexe XIV: Courbe étalon du dosage de l'ABA des graines 18 et 21 JAP de type sauvage, 35S ::MtABI5 EAR, Tnt1 abi5-1 et abi5-2. La valeur du y-intercept est de -0,778, la pente est de -1,0471.



	<p>Diplôme: Diplôme d'Ingénieur de l'Institut des Sciences Agronomiques, Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage</p> <p>Spécialité: Horticulture</p> <p>Spécialisation / option: Amélioration des plantes, semences</p> <p>Responsable d'option: Mr Olivier LEPRINCE</p>
Auteurs(s): Julia ZINSMEISTER	Organisme d'accueil: INRA Angers
Date de naissance: 30/12/1989	Adresse: 42 rue Georges Morel, 49071
Nb pages: 36	Beaucouzé Cedex
Annexe(s): 12	
Année de soutenance: 2013	Maître de stage: Mme Julia BUITINK
Titre français: Implication du facteur de transcription ABI5 dans la vigueur et la longévité des graines de <i>Medicago truncatula</i>	
Titre anglais: The role of ABI5 in <i>Medicago truncatula</i> seed longevity and vigor	
<p>Résumé: ABI5 est un facteur de transcription (FT) de la famille des bZIP qui activerait ou inhiberait la transcription de ses cibles par reconnaissance au motif ABRE des promoteurs des gènes cibles. Le rôle de ce FT est encore méconnu, mais chez <i>Arabidopsis</i>, il serait impliqué dans la transcription de LEA <i>AtEM1</i> et <i>AtEM6</i> et joue un rôle dans l'arrêt de la croissance post-germinatif en réponse à l'ABA. Les travaux de l'équipe sur <i>ABI5</i> chez <i>Medicago truncatula ssp tricycla</i> suggèrent un rôle de ce FT dans la dormance et la longévité des graines. Le but de ce stage est de cribler et phénotyper les mutants <i>Tnt1 Mtabi5</i>, RNAi <i>Mtabi5</i> et les mutants surexprimant <i>MtABI5</i> avec le motif répresseur EAR. Chez les mutants <i>35S::MtABI5_EAR</i>, les graines ne sont pas dormantes mais ne montrent pas un phénotype d'insensibilité à l'ABA exogène lors de l'imbibition. Pour les graines de mutants <i>Tnt1 Mtabi5</i>, nous avons confirmé la réduction de la longévité et une plus faible teneur en sucres RFO. Ces graines ne sont pas dormantes, et il n'est pas possible de ré-induire la TD. Afin de déterminer les cibles putatives de ce FT, <i>MtABI5</i> a été surexprimé dans des racines de <i>Medicago</i>. Une analyse transcriptomique par microarray a été ensuite réalisée pour identifier les gènes différentiellement exprimés. La comparaison avec les données transcriptomiques sur les graines des mutants <i>Tnt1Mtabi5</i> suggère que <i>MtABI5</i> induit l'expression de deux gènes <i>ZEP</i>, impliqués dans la synthèse de l'ABA pendant la maturation et réprime deux ABA 8' hydroxylases, impliquées dans la dégradation de l'ABA, à l'abscission. Les mesures de teneur en ABA montrent une diminution dans les graines de <i>Mtabi5</i> et <i>35S::MtABI5_EAR</i> par rapport au type sauvage. Aux vues de ces données, il est possible que <i>MtABI5</i> serait impliqué dans l'établissement et le maintien de la dormance en modulant la teneur en ABA. <i>MtABI5</i> semble également impliqué dans la répression des gènes impliqués dans la photosynthèse, en parallèle de la perte de chlorophylle dans les graines à la fin de la maturation.</p>	
<p>Abstract: ABI5 is a TF family of bZIP that activates or inhibits the transcription of its targets through the ABRE motifs in their promoters. The role of this TF is still unknown, but in <i>Arabidopsis</i>, it is involved in transcription of the LEA genes <i>AtEM6 AtEM1</i> and plays a role in postgerminative growth arrest in response to ABA. Previous results from the research team demonstrated a role for ABI5 in seed dormancy and longevity of <i>Medicago truncatula ssp tricycla</i>. Here, we screened and phenotyped several <i>abi5</i> mutants: <i>Tnt1 Mtabi5</i>, RNAi <i>Mtabi5</i> and overexpressors of <i>MtABI5</i> containing the repressor motif EAR. Seeds of the <i>35S::MtABI5_EAR</i> did not show any ABA insensitivity, but they lacked dormancy and had a slightly reduced longevity. For seeds of the <i>Tnt1</i> insertion mutants, longevity was strongly decreased and RFO sugar content was reduced. Seeds were not dormant and desiccation tolerance could be re-induced in germinated radicles, in contrast to wild type seeds. To determine putative targets, <i>MtABI5</i> was ectopically expressed in hairy roots, followed by a microarray analysis to identify differentially expressed genes. The comparison of these data with the transcriptome of <i>Tnt1 Mtabi5</i> mutants suggests that <i>MtABI5</i> induces the expression of two <i>ZEP</i> genes, implicated in ABA synthesis, during maturation and represses two ABA 8' hydroxylases, involved in ABA degradation, around seed abscission. ABA contents are lower in the <i>Mtabi5</i> and <i>35S::MtABI5_EAR</i> seeds. We hypothesize <i>MtABI5</i> is implicated in the acquisition and maintenance of seed dormancy via ABA modulation. <i>MtABI5</i> also appears to be involved in the repression of genes involved in photosynthesis, concomitant with the loss of chlorophyll in the seeds during maturation.</p>	
<p>Mots-clés: <i>Medicago</i>, graine, ABA, dormance, longévité, qualité de la graine, germination, facteur de transcription, ABI, ABI5, clonage Gateway, expression ectopique, microarray</p>	
<p>Key Words: <i>Medicago</i>, seeds, ABA, dormancy, longevity, seed quality, germination, transcription factor, ABI, ABI5, Gateway Technique, hairy root system, microarray</p>	

