

Caractérisation des gènes AtNCED impliqués dans la biosynthèse de l'acide abscissique dans la graine d'Arabidopsis thaliana

Valérie Lefebvre

▶ **To cite this version:**

Valérie Lefebvre. Caractérisation des gènes AtNCED impliqués dans la biosynthèse de l'acide abscissique dans la graine d'Arabidopsis thaliana. Life Sciences [q-bio]. INAPG (AgroParisTech), 2005. English. NNT : . pastel-00001585

HAL Id: pastel-00001585
https://pastel.hal.science/pastel-00001585

Submitted on 3 Feb 2006

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.

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

THESE

présentée pour l'obtention du grade de
Docteur en Sciences de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Valérie LEFEBVRE

Caractérisation des gènes *AtNCED* impliqués dans la biosynthèse de l'acide abscissique dans la graine d'*Arabidopsis thaliana*

Soutenue le 14 avril 2005 devant la commission d'examen

Marc JULLIEN	Président
Michel DELSENY	Rapporteur
Jeffrey LEUNG	Rapporteur
David MACHEREL	Examinateur
Annie MARION-POLL	Directrice de thèse

Tout d'abord, je remercie Annie Marion-Poll et Michel Caboche pour m'avoir accueillie pendant quatre ans (déjà !) dans l'unité de Biologie des Semences.

Mes plus vifs remerciements vont à Annie et Helen, qui m'ont confié ce sujet et m'ont encadrée, entourée, accompagnée, recadrée tout au long de cette thèse.
Merci Annie pour ton incroyable disponibilité, ta gentillesse, ton calme. Egalement, merci pour ton Aide, et j'y mets un grand "A" pour tout ce qui s'y cache, et pas seulement les dissections d'embryons, dans lesquelles, d'ailleurs, tu es promise à un grand avenir.
Helen, merci (je ne trouve pas d'autre mot) pour ton enthousiasme communicatif, pour ta patience et tout le temps que tu m'as consacré. Je repenserai souvent avec un brin de nostalgie à nos soirées en serre 3. Sans toi, je n'aurai sans doute jamais imaginé danser sur Cloclo dans le sas.

Ensuite, il y a évidemment le reste de l'équipe, toujours là ou trop tôt parti, Anne, Lucy, Audrey, Sidonie, Aurélie, Aurore et les petites nouvelles, Sabine, Anne et Ping-Hong. Un environnement de filles digne du bout du couloir ! Je vous remercie toutes pour la bonne ambiance du labo et toute l'aide que vous m'avez apportée. En particulier, merci Lucy pour les étiquetages, l'une de nos passion commune, et les délicieuses spécialités antillaises.
Merci Anne, évidemment, pour tout, et plus encore. Ton efficacité surprenante, ton aide tellement précieuse, voire indispensable, ton sourire à toute épreuve. Ton implication dans ce projet, ton sens aigu du clonage, ta pédagogie (et il en faut pour me faire résoudre un équation à deux inconnues), ta rigueur, ont largement contribué à faire avancer ce projet, et moi avec. Tu es véritablement en Or.
Bravo et merci à Sabine, toute nouvelle recrue qui s'est merveilleusement adaptée, pour tout le travail fourni et à venir.
Merci également à Jérôme, stagiaire d'un été caniculaire, pour son aide.

Isabelle, Bertrand, l'une reine de l'anatomie des graines, l'autre des outils informatiques, merci encore et encore pour votre gentillesse et pardonnez ma naïveté dans l'un et l'autre domaine.

Pour m'avoir donné l'occasion de m'évader quelques semaines du deuxième étage, je remercie le LCC : Halima, Katia et particulièrement Jocelyne, qui ma initiée aux joies de l'hybridation *in situ*. Merci aussi à Bruno Sotta pour tous les dosages ABA réalisés et pour m'avoir accueillie dans ses laboratoires d'ici et d'ailleurs, ce qui m'a permis de me rendre compte de l'ampleur de la tâche.

Il me faut remercier chaleureusement les serristes (et j'en ai épuisé plus d'un) d'avoir arrosé mes petites plantes avec tant de soins, même lorsqu'elles étaient sèches. Mickaël, Bruno,

Hervé, je vous suis très reconnaissante et j'espère que vous avez apprécié à leur juste valeur mes jolis petits sapins de Noël, même quand ce n'était pas l'époque.

Et comme ces quatre années se sont déroulées dans la joie et la bonne humeur, merci à tous d'avoir agrémenté ce lieu de travail d'une bonne ambiance quotidienne.
Toute la bande des semences d'abord, avec Nathalie, Erwana, Julie, Isabelle, Karine, Aude, Lucille, Monica, Neel et Damaris et j'y ajouterais Thomas, Loïc, Béatrice, Danièle, Bertrand, Sylvie, Marie et tous les autres ; ainsi que Antoine et Sébastien, à la fois coachs et mentors, merci d'avoir supporté, sans trop broncher, mes petites folies (passagères, quoique □).
Et le reste des deuxième et troisième étages, bien sûr, Steph (toujours là), Kian, Aymerick, Thierry, Greg, tous fans de café.
Tout le premier étage également, qui se vantait de rassembler les personnes les plus sympathiques du labo, si l'on y ajoutait quelques autres du sous-sol □ Mélissanne, Enric, Nico, Hien, Shey May, Maud, Fred, Sophie, Xavier, Stéphane, merci pour les bons moments après 19 heures, ou pendant midi, selon les disponibilités de chacun. Il ne faut évidemment pas oublier Jean-Pierre, Jean-Philippe, Mamadou et Dominique, le sourire aux lèvres dès le matin.

Et puis, il y a ceux, déjà ou pas encore cités, de l'INRA ou d'ailleurs. Steph, Soaz, Yann, Pierrick, Baldi, Cyril, la petite bande du DEA ou presque, merci à tous pour votre soutien plus ou moins quotidien, selon les disponibilités, les "Folies" et les "Tournesols". Mélissanne et Julie, nos folles soirées du jeudi, ou du mardi, non, du vendredi, au Merle ou ailleurs. Et tous ceux qui ne sont plus ou qui n'ont jamais mis les pieds à Versailles, Lolo, Kamel, Jay, Marion, Lolotte, Bruno, Tef et les autres, pour qui j'ai une pensée.

A ma petite famille, qui a tant fait pour que tout se passe bien, je réitère mes excuses, car je sais que je n'ai, étrangement, pas été facile à vivre tous les jours. Merci beaucoup, donc et pardon. Une pensée pour ma sœur-du-bout-du-monde et Aymeril, qui n'ont même pas pu assister à mon explosion.

Enfin, je remercie Michel Delseny, Jeff Leung, David Macherel et Marc Jullien, d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

1. Introduction 1

1.1. Avant propos 1

1.2. Les graines : de la fécondation à la germination 1

1.2.1. Généralités 1

1.2.2. *Arabidopsis thaliana*, plante modèle 2

1.2.3. Développement de la graine d'*Arabidopsis* 2

1.2.3.1. Double fécondation 2

1.2.3.2. Embryogenèse 3

1.2.3.2.1. Polarité apico-basale 3

1.2.3.2.2. Autres niveaux d'organisation 4

1.2.3.2.3. Rôles de l'auxine dans la mise en place de l'embryon 4

1.2.3.3. Développement de l'albumen 5

1.2.3.3.1. Albumen syncytial 6

1.2.3.3.2. Cellularisation de l'albumen 6

1.2.3.3.3. Patron d'organisation 6

*1.2.3.4. Maturation de la graine d'*Arabidopsis *: accumulation des réserves 7*

1.2.3.4.1. Sucres 7

1.2.3.4.2. Lipides 7

1.2.3.4.3. Protéines 8

*1.2.3.5. Dessiccation de la graine d'*Arabidopsis *8*

1.3. Régulation de la maturation de la graine d'*Arabidopsis* 9

1.3.1. Facteurs de transcription et promoteurs cibles 9

1.3.1.1. Mise en évidence d'éléments de signalisation 9

1.3.1.2. Les ABRE 9

1.3.1.3. Les RY 10

1.3.1.4. Les facteurs de transcription 10

1.3.2. Transition entre l'embryogenèse et la maturation 10

1.3.3. Contrôle de l'accumulation des réserves 11

1.3.4. Régulation de l'acquisition de la tolérance à la dessiccation 12

1.4. Dormance primaire et germination 14

1.4.1. Définitions et caractéristiques 14

1.4.2. Rôles des téguments de la graine chez *Arabidopsis* 14

1.4.3. Métabolisme de la graine en germination 15

1.4.3.1. Réhydratation de la graine 15

1.4.3.2. Mobilisation des réserves 16

1.5. Dormance *versus* germination : une balance hormonale 16

1.5.1. Théorie de la balance hormonale 16

1.5.2. L'ABA induit la dormance et inhibe la germination 17

1.5.3. Facteurs développementaux associés à la signalisation par l'ABA 18

1.5.4. GAs, régulateurs positifs de la germination 19

1.5.4.1. La germination nécessite la synthèse de GAs *19*
1.5.4.2. Modes d'actions des GAs *19*
1.5.4.3. Signalisation des GAs associée à la germination *20*
1.6. Dormance et germination : un cross-talk hormonal 21
1.7. Biosynthèse de l'ABA 22
1.7.1. La voie indirecte 22
1.7.2. La voie du glyceraldéhyde phosphate/pyruvate 23
1.7.3. De C5 à C40 23
1.7.4. ZEP 24
1.7.4.1. Caractérisation biochimique *24*
1.7.4.2. Caractérisation moléculaire *24*
1.7.4.3. Expression *25*
1.7.4.3.1. Rythme ciracadien 25
1.7.4.3.2. Stress hydrique 25
1.7.4.3.3. Graines en développement 26
1.7.4.3.4. Photoprotection et VDE : le cycle des xanthophylles 27
1.7.5. Origine des composés en C15 : les 9-*cis*-époxycaroténoïdes 27
1.7.5.1. La xanthoxine, premier composé en C_{15} *27*
1.7.5.2. Conformation cis *des précurseurs de la xanthoxine* *28*
1.7.5.3. Néoxanthine synthase et isomérases *28*
1.7.6. 9-*cis*-epoxycaroténoïde dioxygénase (NCED) 29
1.7.6.1. Caractérisation moléculaire et biochimique *29*
1.7.6.2. La Famille multigénique NCED *d'*Arabidopsis *30*
1.7.6.2.1. Activité 30
1.7.6.2.2. Expression 30
1.7.6.3. Le clivage des xanthophylles serait l'étape-clef régulatrice de la synthèse d'ABA *31*
1.7.6.4. Localisation sub-cellulaire *32*
1.7.7. Les étapes cytoplasmiques 32
1.7.7.1. De la xanthoxine à l'ABA *32*
1.7.7.2. Conversion de la xanthoxine en AB-aldéhyde *33*
1.7.7.2.1. Caractérisation moléculaire et biochimique 33
1.7.7.2.2. Expression chez *Arabidopsis* 33
1.7.7.3. L'AB-aldéhyde oxydase *34*
1.7.7.3.1. L'AB-aldéhyde oxydase possède un cofacteur à molybdène 34
1.7.7.3.2. AB-aldéhyde oxydase 34
1.7.7.3.3. Expression tissulaire et subcellulaire 35
1.7.8. Catabolisme de l'acide abscissique 36
1.7.8.1. L'hydroxylation *36*
1.7.8.2. La conjugaison *37*
1.8. Présentation du projet de thèse 37
2. Résultats 39

2.1. La famille A*tNCED* dans les graines 39
2.1.1. Caractérisation de la famille multigénique chez *Arabidopsis* 39
2.1.2. Expression des gènes *AtNCED* et *AtCCD* 39
2.1.2.1. Northern blot in planta *39*
2.1.2.2. Northern in silico *41*
2.2. Analyse fonctionnelle du gène *AtNCED6* 42
2.2.1. Résumé 42
2.2.1.1. Résumé *42*
2.2.1.2. Summary *43*
2.2.2. Introduction 44
2.2.3. Results 45
2.2.3.1. AtNCED6 *gene is involved in ABA biosynthesis* in vivo *45*
2.2.3.2. Temporal regulation of AtNCED6 *transcript in developing seeds* *47*
2.2.3.3. AtNCED6 *is specifically expressed in the endosperm* *47*
2.2.3.4. Molecular characterization of Atnced6 *mutants* *48*
2.2.4. Atnced6 *mutants exhibited ABA-deficient phenotypes in seeds, but not in vegetative tissues* 48
2.2.4.1. ABA synthesis in the endosperm regulates lipid accumulation in seeds *49*
2.2.5. Discussion 50
2.2.6. Material and methods 52
2.2.6.1. Plant material and growth conditions *52*
2.2.6.2. Germination experiments *53*
2.2.6.3. Water loss assays *53*
2.2.6.4. ABA content *53*
2.2.6.5. NCED6 probe specificity *53*
2.2.6.6. Northern blot analysis *54*
2.2.6.7. In situ *hybridization* *54*
2.2.6.8. Cloning and plant transformation *55*
2.2.6.9. Reporter gene analysis *55*
2.2.6.10. Lipid composition analysis *56*
2.3. *AtNCED9*, un gène de biosynthèse de l'ABA exprimé dans la graine 57
2.3.1. Analyse de l'expression de *AtNCED9* dans les graines en développement 57
2.3.1.1. Expression temporelle de AtNCED9 *par northern blot* *57*
2.3.1.2. Utilisation des gènes rapporteurs *57*
2.3.1.3. Hybridation in situ *57*
2.3.2. Implication de *AtNCED9* dans la biosynthèse de l'ABA 58
2.3.2.1. Recherche de mutants *58*
2.3.2.2. Caractérisation des insertions *58*
2.3.2.3. Caractérisation physiologique des mutants Atnced9 ..... *60*
2.3.2.3.1. Physiologie des parties végétatives 60
2.3.2.3.2. Physiologie des graines 61
2.3.2.3.3. Isolement des doubles mutants *Atnced6, Atnced9* 63

2.3.2.3.4. Analyse physiologique de *Atnced6, Atnced9* 63
2.3.3. Expression tissulaire des gènes *AtNCED2* et *AtNCED3* 64
2.3.3.1. Utilisation du gène rapporteur GUS *64*
2.3.3.2. Localisation de l'expression de AtNCED2 ..... *64*
2.3.3.3. Localisation de l'expression de AtNCED3 ..... *65*
2.3.4. Discussion 66
2.4. Matériels et méthodes complémentaires 68
2.4.1. Matériels 68
*2.4.1.1. Matériel végétal (*Arabidopsis thaliana*)* *68*
2.4.1.2. Souches bactériennes *68*
2.4.1.3. Vecteurs *69*
2.4.2. Méthodes 69
2.4.2.1. Culture des bactéries *69*
2.4.2.2. Manipulation du matériel végétal *70*
2.4.2.2.1. Stérilisation des graines 70
2.4.2.2.2. Conditions de culture 70
2.4.2.2.3. Transformation des plantes par *A. tumefaciens* 70
2.4.2.3. Tests physiologiques *71*
2.4.2.3.1. Cinétiques de germination 71
2.4.2.3.2. Test de résistance au paclobutrazol 71
2.4.2.3.3. Test de déshydratation 71
2.4.2.3.4. Mesure de la teneur en ABA 71
2.4.2.4. Analyses moléculaires *72*
2.4.2.4.1. Extraction, amplification et clonage de l'ADN 72
2.4.2.4.2. Clonage des promoteurs des gènes *AtNCED2*, *AtNCED3* et *AtNCED9* en amont des gènes rapporteurs *GUS* et *GFP*. 76
2.4.2.5. Analyse de l'expression des gènes *77*
2.4.2.5.1. Extraction d'ARN de feuilles 77
2.4.2.5.2. Extraction d'ARN de graines 77
2.4.2.5.3. Extraction des ARNs pour l'analyse en RT-PCR 78
2.4.2.5.4. Electrophorèse d'ARN 78
2.4.2.5.5. Transfert d'ARN sur membrane de nylon : northern blot 79
2.4.2.5.6. Hybridation des membranes de northern blot 79
2.4.2.5.7. Hybridation *in situ* 79
2.4.2.5.8. Test histochimique de l'activité β-glucuronidase (GUS) 82

3. Discussion générale et perspectives 83

3.1. Expression des gènes *AtNCED* 83
3.2. Redondance fonctionnelle des gènes *AtNCED* 85
3.3. L'expression d'*AtNCED9* est localisée dans l'embryon 86

3.4. Régulation de la synthèse des réserves lipidiques 86
3.5. L'ABA synthétisé dans l'albumen participe à la mise en place de la dormance 87
3.6. Dormance et résistance au paclobutrazol, deux phénotypes dissociables 88
3.7. Régulation hormonale de la germination 89
3.8. Conclusion et perspectives 90

4. Références bibliographiques 91

5. Annexes 101

Liste des figures

Figure 1.1	Anatomie d'une graine d'*Arabidopsis* au stade cœur	p.1
Figure 1.2	Cycles de développement des gamètes mâles et femelles chez les angiospermes	p.2
Figure 1.3	Organisation du sac embryonnaire	p.3
Figure 1.4	Stades de l'embryogenèse d'*Arabidopsis*	p.4
Figure 1.5	Etapes du développement de l'albumen d'*Arabidopsis*	p.6
Figure 1.6	Développement de l'albumen au stade syncytial	P.7
Figure 1.7	Cellularisation de l'albumen	p.7
Figure 1.8	Evénements physiologiques et métaboliques majeurs au cours du développement de la graine	p.8
Figure 1.9	Evolution du niveau des réserves nutritives et de la quantité d'eau au cours du développement de la graine	p.8
Figure 1.10	Représentation schématique des protéines ABI3 et FUS3	p.11
Figure 1.11	Modèle d'action de FUS3 au cours du développement embryonnaire	p.11
Figure 1.12	Modèle de régulation des gènes codant des protéines de réserve	p.12
Figure 1.13	Régulateurs principaux intervenant dans le développement de la graine	p.14
Figure 1.14	Evénements physiologiques et cellulaires associés à la germination et à la croissance postgerminative	p.15
Figure 1.15	Schéma séquentiel de l'arrêt du développement de l'embryon	p.18
Figure 1.16	Modèle d'action de FUS3 au cours du développement post-embryonnaire	p.19
Figure 1.17	Interactions hormonales et principaux régulateurs de la germination	p.22
Figure 1.18	Similarité entre la structure terminale des xanthophylles et de l'ABA	p.23
Figure 1.19	Voie de biosynthèse des caroténoïdes dans les plantes menant à la formation de la zéaxanthine, spécifique de l'ABA	p.24
Figure 1.20	Biosynthèse de l'ABA	p.25
Figure 1.21	Récapitulatif des activités catalytiques des AtNCED et des AtCCD	p.30
Figure 1.22	Voie de catabolisme de l'ABA	p.36

Figure 2.1	Alignement des 5 protéines les plus homologues de la famille AtNCED	p.39
Figure 2.2	Alignement de la partie 5' des 5 gènes les plus homologues de la famille *AtNCED*	p.39
Figure 2.3	Dot blot des 7 gènes les plus homologues de la famille *AtNCED*	p.40
Figure 2.4	Arbre phylogénétique de la famille AtNCED	p.40
Figure 2.5	Accumulation relative des transcrits des 5 gènes *AtNCED* au cours du développement de la graine	p.41
Figure 2.6	Accumulation relative des transcrits des 5 gènes *AtNCED* dans les tissus chlorophylliens	p.41
Figure 2.7	ABA content of detached rosettes of transgenic lines	p.45
Figure 2.8	Water loss of detached rosettes of transgenic lines	p.45
Figure 2.9	Effect of ABA content on the vegetative growth	p.46
Figure 2.10	Northern blot analysis of *AtNCED6* in developing WT siliques	p.47
Figure 2.11	*AtNCED6*promoter::GUS expression	p.47
Figure 2.12	*AtNCED6*promoter::GFP expression	p.47
Figure 2.13	Expression in sections of *AtNCED6*promoter::GUS seeds	p.49
Figure 2.14	*In situ* hybridization of WT developing seeds using a *AtNCED6* specific probe	p.49
Figure 2.15	Diagram of *AtNCED6* gene showing *Atnced6-1* and *Atnced6-2* insertion positions	p.49
Figure 2.16	Seed phenotypes associated wit AtNCED6 deficiency	p.50
Figure 2.17	Analyse par northern blot de *AtNCED9* dans les siliques WT en développement	p.57
Figure 2.18	Hybridation *in situ* de graines WT de 10 JAF avec une sonde spécifique de *AtNCED9*	p.58
Figure 2.19	Test de sélection par PCR des lignées homozygotes pour une insertion ADN-T	p.59
Figure 2.20	Schématisation des insertion d'ADN-T des mutants *Atnced9-1* et *Atnced9-2* dans le gène *AtNCED9*	p.59
Figure 2.21	Cinétique de déshydratation des parties aériennes des mutants *Atnced9*	p.60
Figure 2.22	Accumulation d'ABA dans les parties aériennes des mutants *Atnced9*	p.60

Figure 2.23 Accumulation d'ABA dans les graines sèches du mutant *Atnced9-1* p.61
Figure 2.24 Cinétique de germination du mutant *Atnced9-1* p.61
Figure 2.25 Test de résistance au paclobutrazol des mutants *Atnced9* p.62
Figure 2.26 Test de résistance au paclobutrazol des doubles mutants *Atnced6, Atnced9* p.63
Figure 2.27 Cinétique de germination du double mutant *Atnced6*, *Atnced9* p.63
Figure 2.28 Patron d'expression du gène *AtNCED2* dans les organes reproducteurs p.64
Figure 2.29 Patron d'expression du gène *AtNCED3* dans les organes reproducteurs p.65
Figure 2.30 Plasmides utilisés pour le clonage des produits de PCR p.69
Figure 2.31 Plasmides binaires utilisés pour les fusions promoteur::gène rapporteur p.70
Figure 2.32 Accumulation relative des transcrits de 5 gènes de biosynthèse de l'ABA au cours du développement de la graine p.85

Liste des tableaux

Tableau Ia Couples d'amorces utilisés pour la synthèse des sondes spécifiques des gènes *AtNCED* p.40
Tableau Ib Couples d'amorces utilisés pour l'amplification des séquences codantes des gènes *AtNCED* et *AtCCD* p.40
Table II Fatty acid composition of *Atnced6-1* and *Ataba3-1* dry seeds p.50
Tableau III Phénotypes observés chez les mutants *Atnced9* p.62
Tableau IV Phénotypes observés chez les doubles mutants *Atnced6, Atnced9* p.63
Tableau V Liste des lignées d'*Arabidopsis thaliana* utilisées p.68
Tableau VI Séquences des amorces utilisées pour la caractérisation des insertions ADN-T chez les mutants *Atnced9-1* et *Atnced9-2* p.73
Tableau VII Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des promoteurs des gènes *AtNCED2*, *AtNCED3* et *AtNCED9* p.74
Tableau VIII Séquences des amorces utilisées en RT-PCR p.74

Liste des annexes

Annexe 1
Figures non présentées de la partie **2.2 Analyse fonctionnelle du gène *AtNCED6***

Article en préparation : *AtNCED6* is specifically involved in ABA synthesis in *Arabidopsis* seed endosperm

Valérie Lefebvre, Helen North, Anne Frey, Martine Miquel, Bruno Sotta and Annie Marion-Poll

Figure A-1 Expression d'*AtNCED6* dans des plantules WT et transgéniques
Figure A-2 Expression d'*AtNCED6* dans des plantules et des siliques en développement
Figure A-3 Cinétiques de déshydratation des parties aériennes des mutants *Atnced6*
Figure A-4 Accumulation d'ABA dans les parties aériennes du mutant *Atnced6-1*
Figure A-5 Test de résistance au saccharose mutant *Atnced-1*

Annexe 2

Article paru dans *Plant Journal* (2002) **30**(4), 601-609

Use of infrared thermal imaging to isolate *Arabidopsis* mutants defective in stomatal regulation

Sylvain Merlot, Anna-Chiara Mustilli, Bernard Genty, Helen North, Valérie Lefebvre, Bruno Sotta, Alain Vavasseur and Jérôme Giraudat

The Plant Journal (2002) 30(4), 6O1-609

Abréviations

16 :0 : acide palmitique
18 :0 : acide stéarique
18 :1 : acide oléique
18 :2 : acide linoléique
18 :3 : acide alpha linolénique
20 :1 : acide eicosenoique

A : antérieur
A, C, G, T : adénine, cytosine, guanidine, thymidine
DCN : domaine cytoplasmique nucléaire
AAO : abscissique aldéhyde oxydase
ABA : acide abscissique
ABA-GE : ABA glucose ester
AB-aldéhyde : abscissique aldéhyde oxydase
ABRC : "ABA response complex"
ABRE : "ABA response element"
Ac : "Activator"
ADN : acide désoxyriblnucléique
ADNc : acide désoxyriblnucléique complémentaire
ADN-T : acide désoxyriblnucléique transféré
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messager
ATP : adénosine tri-phophate
BCIP : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BET : bromure d'éthidium
BRs : brassinostéroïdes
BSA : "bovine serum albumine"
bZIP : basic leucine-zipper
CaMV : "cauliflower mosaic virus"
CCD : "carotenoid cleavage dioxygenase"
CCS : capsanthine capsorubine synthase
CTAB : cétyltriméthylammonium
CTRL-b : β-carotène hydroxylase
CoA : coenzyme A
Col-0 : columbia-0
Cyt P450 : cytochrome P450
Da, kDa : dalton, kilodalton

DEPC : diéthyl-pyrocarbonate
DIG : digoxygénine
DO : Densité Optique
DNAse : désoxyribonucléase
dNTP : déoxynucléotides triphosphates
dSpm : "defective Supressor mutator"
E, µE : einstein, microeninstein
EDTA : éthylène diamine triacétique
Em : "early methionated labelled"
Est : "expressed sequence tag"
FAD : flavine adénine dinucléotide
FPP : farnésyl pyro-phosphate
FST : "flanking sequence tag"
g : gravité
g, mg, µg : gramme, milligramme, microgramme
GAs : gibbérellines
GFP :" green fluorescent protein"
GGPP : géranylgéranylpyrophosphate
GGPS : GGPP synthase
GRAS : GAI, RGA, SCARECROW
GUS : β-glucuronidase
h, min, s : heure, minute, seconde
HPLC : "high pressure liquid chromatography"
Hsp : "heat shock protein"
IDI : IPP isomérase
IPP : isopentényl pyrophosphate
JAF : jour après floraison
L, mL, µL : litre, millilitre, microlitre
LB : Luria Bertani
LB : "left border"
LCY-b : lycopène β-cyclase
LEA : "late embryogenesis abundant"
LHCII : "light harvesting complex II"
LSD : lignostilbène dioxygénase
M, mM, µM : molaire, millimolaire, micromolaire
MoCo : cofacteur à molybdène
MOPS : acide 3-(N-morpholino)propane sulfonique
(n), (2n), (3n) : haploïde, diploïde, triploïde
NAD : β-nicotinamide adénine dinucléotide

NADP : β-nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBT : "nitroblue tetrazolium chloride"
NCED : "9-*cis*-epoxycaroténoid dioxygenase"
NO : nitric oxide
NPQ : " non-photochemical quenching"
NSY : néoxanthine synthase
O-Glc NAc : "O_linked N-Acétylglucosamine"
OGT : "O-Glc Nac trasferase"
P : postérieur
PA, DPA, néoPA : "phaseic acid, dihydrophaseic acid, neophaseic acid"
pb, kb, Mb : paire de base, kilo base, mégabase
PBS : "phosphate-buffered saline
PCR, RT-PCR : "polymerase chain reaction, reverse transcriptase-PCR"
PDS : phytoène désaturase
PP2A/PP2C : protéine phosphatase de type 2A/2C
PSII : photosystème II
PSY : phytoène synthase
pH : potentiel hydrogène
R : base purique
RB : "Right border"
RNase : riblonucléase
RWC : "relative water content"
SDR : "short chain dehydrogenase reductase"
SSP : "seed storage protein"
TAE : tris acétate EDTA
TAG : triacylglycérol
TPR : tetratricopeptide
UDPG : uridine di-phosphate glucose
UV : ultra violet
V : Volt
VDE : violaxanthine de-époxydase
Ws : Wassilewskija
WT : "wild type"
Y : base pyrimidique
ZEP : zéaxanthine époxydase
8'-OH ABA : 8'-hydroxy ABA

1. Introduction

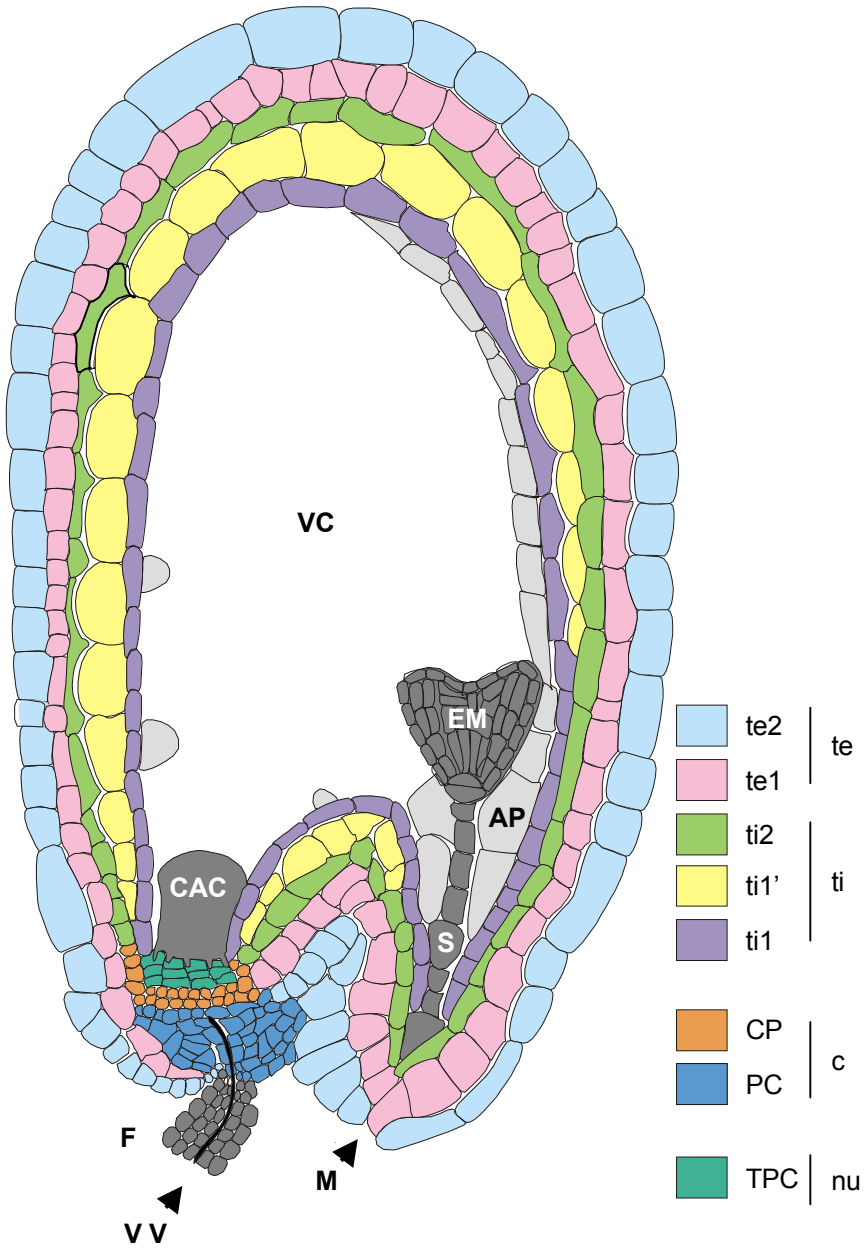


Figure 1.1 : Anatomie d'une graine d'*Arabidopsis* au stade coeur. c, chalaze; CAC, cyste d'albumen chalazal ; TPC, tissus prolifératifs de la chalaze ; VC, vacuole centrale ; EM, embryon ; F, funicule ; ti, tégument interne ; M, micropyle ; Nu, nucelle ; te, tégument externe ; PC, placenta chalazal ; AP, albumen périphérique ; CP, couche pigmentaire ; S, suspenseur ; VV, vaisseaux vasculaires. L'endothélium correspond à la couche ti1.

D'après Debeaujon et al., 2003

1. Introduction

1.1. Avant propos

L'acide abscissique (ABA) est l'une des cinq grandes hormones du monde végétal, avec les gibbérellines (GAs), les cytokinines, l'éthylène et l'auxine. Il participe à un certain nombre de processus physiologiques au cours de la vie de la plante. Notamment, l'ABA est impliqué dans l'adaptation des plantes à divers stress, comme la déshydratation, la salinité, le froid ou la blessure. En particulier, il serait responsable de la fermeture des stomates lors d'un stress hydrique, qui évite une trop grande perte d'eau par évapotranspiration.
Il contribue également à la régulation du développement de la graine, après l'embryogenèse. Il joue ainsi un rôle de premier ordre dans le contrôle de la maturation de la graine, la mise en place de la dormance et son maintien, ainsi que dans les processus menant à la germination.
En agriculture, l'utilisation de la graine en tant que semence est cruciale. Par ailleurs, les graines elles-mêmes, notamment chez les céréales, constituent une source majeure de nourriture, dont l'importance tient à leur contenu en protéines, amidon et lipides accumulés au cours du développement et de la maturation. L'importance biologique et économique des graines est donc évidente, d'où la nécessité de connaître et de pouvoir contrôler leur développement ainsi que leur germination.
La régulation de la biosynthèse de l'ABA, ainsi que son mode d'action dans les graines restent encore mal connus.

1.2. Les graines : de la fécondation à la germination

1.2.1. Généralités

Les graines assurent la pérennité de l'espèce chez les plantes supérieures dans la mesure où elles en représentent l'unité de dispersion. Elles procurent à l'embryon un environnement favorable à son développement et participent à sa protection en attendant la germination. La vigueur de la jeune plantule est en grande partie déterminée par les caractéristiques physiologiques et biochimiques de la graine. Les réserves contenues dans la graine et sa capacité de répondre à l'environnement extérieur sont des facteurs clef pour les processus post-germinatifs.
Après la fécondation, les zygotes subissent des divisions cellulaires organisées menant à la croissance et à la différenciation de l'albumen et de l'embryon. Sur la plante mère, les graines accumulent des réserves nutritives après l'arrêt de leur croissance et de leur développement, et enfin subissent une forte dessiccation. Afin de survivre une longue période en terre, avant que les conditions environnementales ne permettent la germination, certaines graines développent en plus un état de quiescence appelé dormance. La

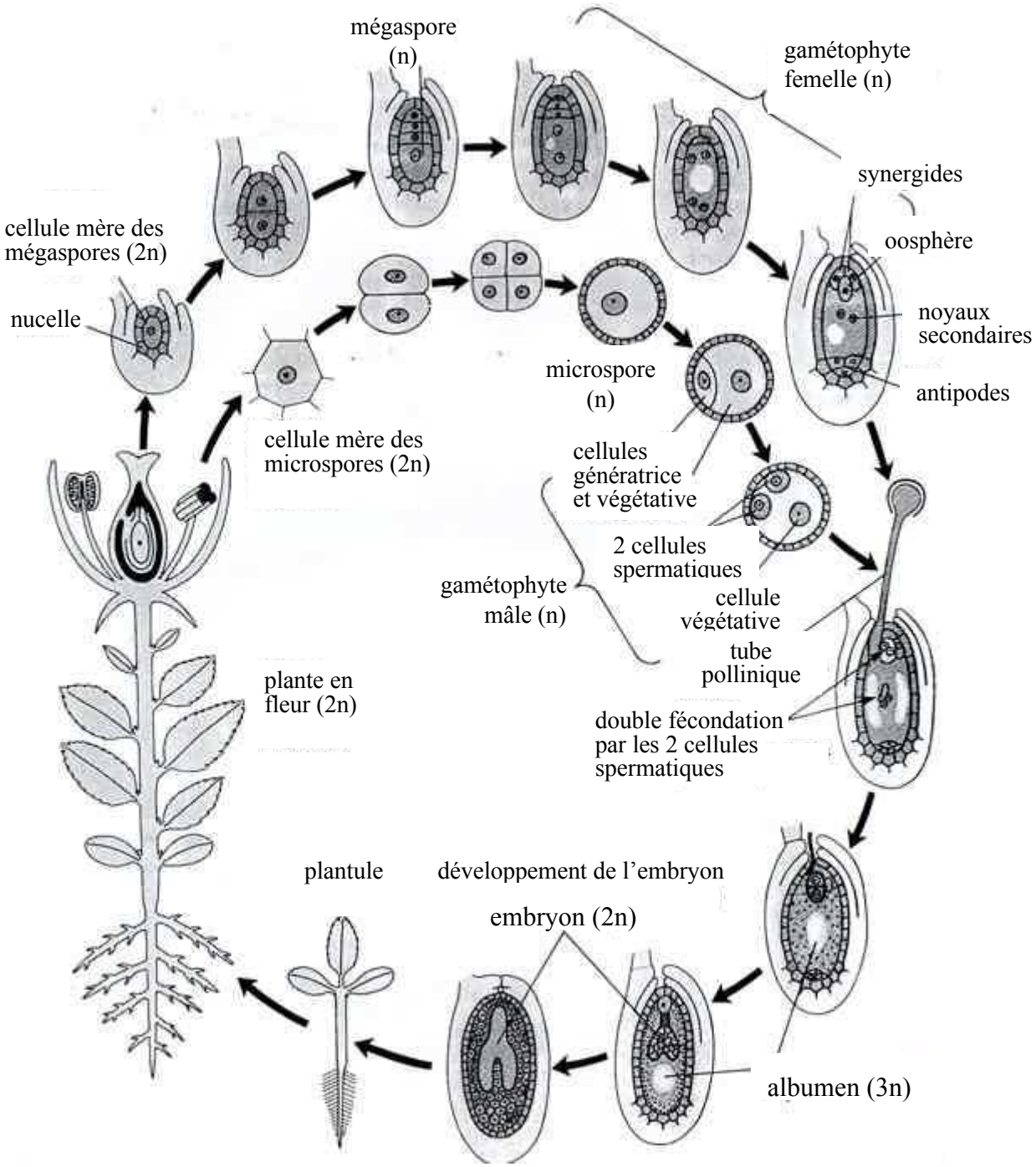


Figure 1.2 : Cycles de développement des gamètes mâles et femelles chez les angiospermes. La double fécondation produira l'albumen et l'embryon, à l'origine de la future plante.

dormance pourra par exemple permettre la germination à la saison ou dans un environnement adéquats à la survie de la plantule. Finalement, la reprise de l'activité métabolique conduit à la germination de la graine, pour donner une plantule. Tous ces mécanismes nécessitent des régulations fines à la fois spatiales et temporelles pour assurer le bon déroulement des étapes menant l'ovule fécondé à la graine mature. Les cinq hormones majeures jouent des rôles très importants dans ces différentes séquences, puisque leurs teneurs varient considérablement pendant le développement des graines (Rock and Quatrano, 1995).

Comme mon projet de thèse a porté sur la régulation de la biosynthèse de l'ABA dans la graine d'*Arabidopsis thaliana*, cette introduction apportera principalement des informations sur les processus physiologiques et moléculaires mis en place au cours du développement, de la dormance et de la germination de la graine d'*Arabidopsis*.

1.2.2. *Arabidopsis thaliana*, plante modèle

Arabidopsis thaliana appartient à la famille des Brassicacées, tout comme le colza. Elle s'est imposée comme plante modèle en génétique végétale pour plusieurs raisons. Son temps de génération est relativement court (2 à 3 mois de la graine à la graine) ; chaque plante produit un grand nombre de descendants (environ 10 000 graines par plante) ; sa transformation via *Agrobacterium tumefaciens* est aisée (Clough and Bent, 1998). Son génome est petit, 120 Mb répartis sur 5 chromosomes ; il présente une faible proportion de séquences non-codantes ; il est entièrement séquencé depuis 2000, et ordonné dans des banques de données (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) ; de nombreuses cartes physiques et génétiques des 5 chromosomes ont été établies. De plus, un certain nombre d'outils ont été mis en place, comme la construction de plusieurs collections de mutants d'insertion couvrant la quasi totalité du génome d'*Arabidopsis*, ainsi que la mise à disposition d'informations telles que le séquençage d'ESTs, les banques d'ADNc, les microarrays, ainsi que divers outils d'analyse de séquences nucléotidiques et protéiques.

1.2.3. Développement de la graine d'*Arabidopsis*

La graine est formée de tissus d'origines différentes : les structures entourant l'embryon, les téguments, sont d'origine maternelle et dérivent de l'ovule. L'embryon ainsi que l'albumen, son tissu nourricier, sont les produits de la fécondation. Une représentation schématique de la graine en développement est donnée en **figure 1.1**.

1.2.3.1. Double fécondation

Chez les plantes, c'est un processus particulier appelé double fécondation, qui donne naissance à deux zygotes à l'origine de la graine (**figure 1.2**).

Les gamétophytes sont les organes contenant les cellules reproductrices haploïdes. Le gamétophyte femelle, ou sac embryonnaire, est contenu dans l'ovule et est issu de la division de la cellule mère des gamètes (n). Cette mégaspore subit trois divisions mitotiques

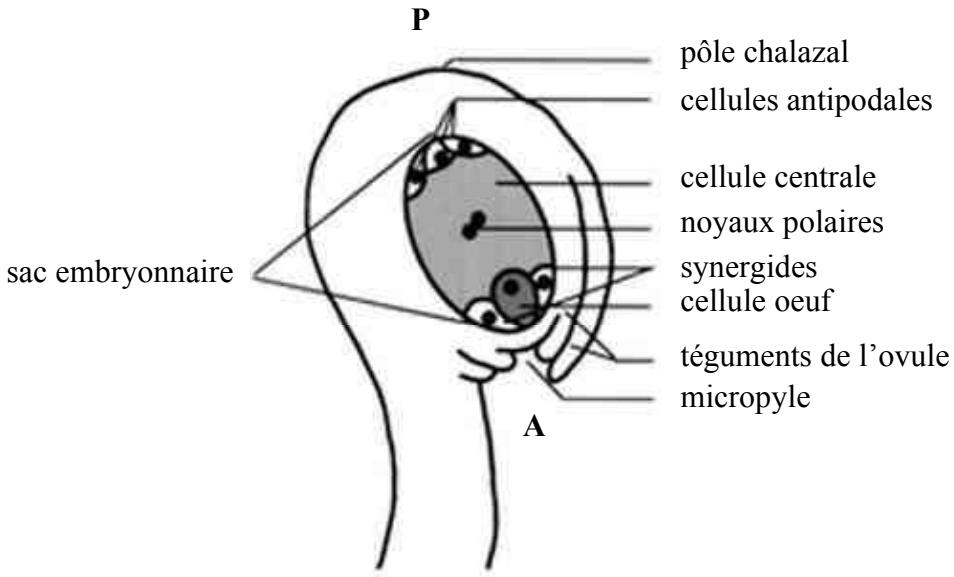


Figure 1.3 : Organisation du sac embryonnaire. Le sac embryonnaire est situé à l'intérieur de l'ovule et est protégé par ses téguments. Le zygote est issu de la fécondation de la cellule œuf par l'un des gamètes mâles et se développe à l'extrémité micropylaire. La fécondation des deux noyaux polaires par le deuxième gamète mâle donnera l'albumen.

A, pôle antérieur ; **P**, pôle postérieur.

D'après Berleth et Chatfield, 2002

successives sans formation de parois cellulaires. Il en résulte une cellule unique, appelée sac embryonnaire, contenant huit noyaux haploïdes, parmi lesquels les trois noyaux qui participeront à la formation des zygotes. L'un, appelé zygote principal, sera diploïde (1m, 1p) et deviendra l'embryon. Le deuxième, accessoire, sera triploïde (2m, 1p) et donnera l'albumen. Le tout constitue une structure polarisée avec un pôle postérieur (P) et un pôle antérieur (A) (**figure 1.3**). A l'extrémité chalazale (P), se situent 3 noyaux qui s'entourent chacun d'une membrane plasmique et prennent le nom de cellules antipodales. A l'extrémité micropylaire (A), trois autres cellules sont créées : les synergides entourant la cellule œuf, qui donnera le zygote principal. Enfin, la cellule centrale est formée, qui comprend les deux noyaux situés au centre du sac embryonnaire. Ils fusionneront lors de la fécondation pour donner le zygote accessoire triploïde. Après la fécondation, l'embryon et l'albumen se développeront à l'intérieur du sac embryonnaire, lui-même entouré des téguments maternels protecteurs de l'ovule.

Le grain de pollen ou gamétophyte mâle, est constitué de deux cellules haploïdes, la cellule génératrice et la cellule végétative, entourées d'une paroi. Par division, la cellule génératrice donnera deux gamètes (n) (**figure 1.2**). Au contact du pistil, le grain de pollen germe et le tube pollinique, issu de la cellule génératrice, s'allonge, emportant les deux gamètes mâles vers l'ovule. Le micropyle correspond à l'ouverture laissée lorsque les deux téguments de l'ovule se rencontrent et permet au tube pollinique, guidé par les synergides, d'entrer dans le sac embryonnaire. Ainsi, il pénétrera dans le gamétophyte femelle et la double fécondation pourra avoir lieu, donnant naissance à la cellule mère de l'embryon (2n) et à la cellule mère de l'albumen (3n), qui se développeront à l'intérieur du sac embryonnaire, protégés par les téguments de l'ovule.

1.2.3.2. Embryogenèse

L'embryogenèse produit un organisme multicellulaire organisé à partir d'une cellule unique. Pour cela, un développement coordonné permet la mise en place d'un certain nombre de structures architecturales incontournables, comme un axe apico-basal nécessaire à l'initiation des organes et une organisation radiale des tissus. La **figure 1.4** représente le développement de l'embryon (Berleth and Chatfield, 2002).

1.2.3.2.1. Polarité apico-basale

L'embryogenèse d'*Arabidopsis* commence par l'allongement du zygote, suivie d'une division cellulaire asymétrique, qui produit une cellule basale assez longue et une petite cellule apicale au cytoplasme dense, métaboliquement active (Berleth and Chatfield, 2002). La cellule apicale, après 3 mitoses, donnera naissance à une structure sphérique, l'embryon octant (**figure 1.4 A**). Celui-ci est organisé puisque sa moitié supérieure donnera la partie aérienne de la plantule, alors que la moitié inférieure produira l'essentiel de la tige et de la racine. Au contraire, la cellule basale du zygote se divise horizontalement et conduit à une

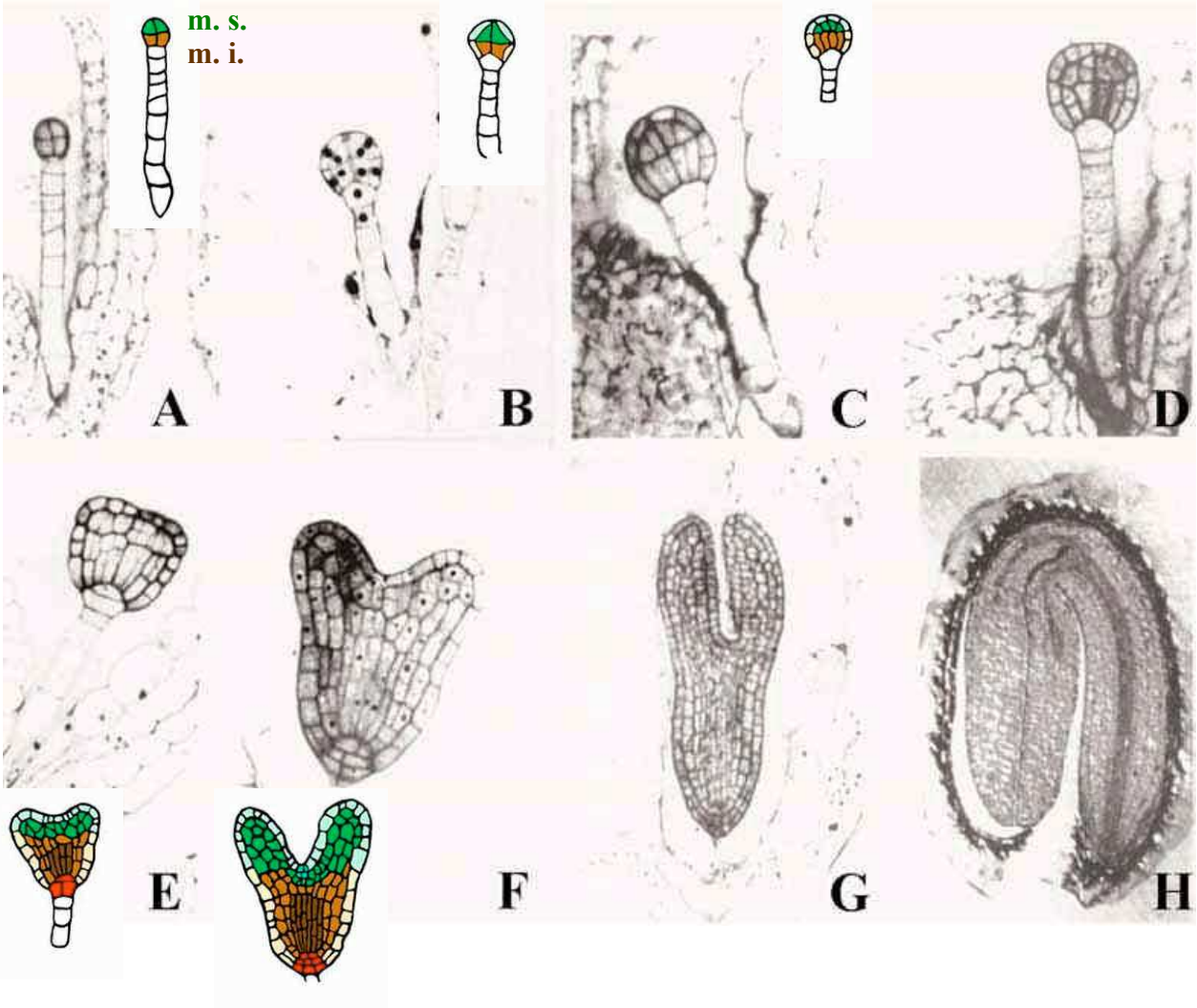


Figure 1.4 : Stades de l'embryogenèse d'*Arabidopsis*. (**A**) L'embryon prend la forme d'une sphère au stade octant, d'où se dégage un épiderme primitif ou protoderme dès le stade dermatogène (**B**). Au stade globulaire, les divisions cellulaires s'orientent le long d'un axe apico-basal (**C**, **D**) et chez l'embryon globulaire tardif, les cellules de la moitié inférieure se différencient en cellules procambiales : la symétrie radiale est mise en place (**D**). La symétrie bilatérale est visible au stade triangulaire (**E**) : deux cotylédons sont ébauchés dans la moitié supérieure, où les cellules sont restées isodiamétriques ; les cellules de la moitié inférieure présentent une organisation radiale, prémices de vaisseaux vasculaires. (**F**) stade cœur. (**G**) L'embryon torpille est constitué de deux cotylédons et d'un hypocotyle, la différenciation vasculaire a lieu dans les cotylédons ; (**H**) au stade cotylédons retournés, le patron d'organisation radial est présent dans tous les organes. (**G**) La plantule présente deux cotylédons, un hypocotyle et une radicule.

m. s., moitié supérieure ; m. i., moitié inférieure (**A**).
couleurs : parties aériennes, vert ; hypocotyle + racine, marron ; tissus vasculaires, brun (**E**, **F**) ; protoderme, bleu clair (**B**, **C**, **E**, **F**); méristème racinaire, rouge (**E**, **F**) ; méristème apical, bleu (**F**)

D'après Berleth et Chatfield, 2002

structure filamenteuse, le suspenseur, qui attache l'embryon aux structures maternelles qui l'entourent. Une partie de l'apex racinaire provient de sa cellule la plus apicale, l'hypophyse.
Au stade dermatogène, une couche cellulaire externe, le protoderme, se différencie déjà des cellules plus internes et exprime des marqueurs que l'on trouvera par la suite dans l'épiderme, comme AtML1 (*Arabidopsis thaliana MERISTEM LAYER1*) (**figure 1.4 B**). Dès ce moment, les cellules internes adoptent un plan de division commun, parallèle à l'axe apico-basal. Ainsi, à ce stade, l'embryon est axé, mais aucune ébauche d'organe ne vient le polariser. Par la suite, les cellules internes de la moitié inférieure se divisent pour donner des files cellulaires orientées, alors que celles de la partie supérieure restent isodiamétriques. Au stade globulaire, la polarité apico-basale de l'embryon est donc complètement acquise (**figure 1.4 C, D**).
Par la suite, l'embryon se développe et commence à former ses organes (**figure 1.4 E-H**). L'initiation des cotylédons au stade triangulaire provient d'une croissance localisée située à deux pôles opposés de la région apicale (**figure 1.4 E**). Lorsque l'embryon est au stade cœur, les organes majeurs de la plantule ainsi que les différents tissus sont ébauchés : hypocotyle, cotylédons, radicule, mais également les tissus provasculaires, le protoderme et le cortex (**figure 1.4 F**). Passé le stade cœur, le méristème apical caulinaire est mis en place. Après la forme cœur, il deviendra torpille (**figure 1.4 G**), puis cotylédons retournés (**figure 1.4 H**).

1.2.3.2.2. Autres niveaux d'organisation

Le long de l'axe embryonnaire, se trouvent le méristème apical caulinaire, les cotylédons, l'hypocotyle, la radicule et le méristème apical racinaire. En plus, l'embryon présente une organisation cylindrique particulièrement visible dans l'hypocotyle et la radicule. La structure cylindrique formée au stade dermatogène par les cellules de la motié inférieure (**figure 1.4 B**), va prendre une organisation radiale au stade cœur (**figure 1.4 E, F**) : protoderme, tissus parenchymateux et tissus provasculaires, de l'extérieur vers l'intérieur.
L'embryon acquiert une symétrie bilatérale lors de la formation des cotylédons. Ceux-ci ont une localisation opposée, qui peut s'expliquer par l'inhibition latérale, par laquelle un primordium générerait une force inhibitrice empêchant la formation d'un autre organe, ce qui orientera son apparition vers les positions de plus faible inhibition. Une composante génétique entre également en compte, qui met en jeu les gènes *STM* (*SHOOT MERISTEMLESS*) et *CUC* (*CUP-SHAPED COTYLEDON*) dans la définition des zones où les cotylédons ne pourront pas se former (Aida et al., 1999). Au contraire, le gène *ANT* (*AINTEGUMENTA*) est exprimé dans la zone en périphérie du méristème apical, au site d'initiation des primordia (Long and Barton, 1998).

1.2.3.2.3. Rôles de l'auxine dans la mise en place de l'embryon

La croissance de l'embryon est régulée par l'activité de deux méristèmes : les méristèmes apicaux caulinaire et racinaire. Plusieurs protéines impliquées dans le transport ou la

réponse à l'auxine sont exprimées dans l'embryon au cours de l'embryogenèse précoce, comme PIN1 (PIN-FORMED1), BDL (BODENLOS), MP (MONOPTEROS) (Weijers and Jurgens, 2005). De plus, l'expression de la construction DR5::GFP, qui rapporte les lieux de réponse à l'auxine, suggère que l'auxine au cours de l'embryogenèse est requise pour l'organisation des régions apicale et basale (Weijers and Jurgens, 2005).

Dans l'embryon, l'auxine est majoritairement synthétisée dans le méristème apical. Le transport polarisé de l'auxine semble être la clef de son mécanisme d'action, ce qui implique l'existence de transporteurs, comme la protéine PIN1, impliquée dans la formation des tissus vasculaires (Galweiler et al., 1998). Le gradient radial d'auxine à l'intérieur du procambium permettrait d'initier un programme de divisions précis et de spécifier les différents types cellulaires qui composent ce tissu (Souter and Lindsey, 2000).

En accord avec cette hypothèse, chez certains mutants comme *bdl* (*bodenlos*) (Hamann et al., 1999), *mp* (*monopteros*) (Berleth and Jürgens, 1993) et *axr6* (*auxin resistant 6*) (Hobbie et al., 2000), l'axe de l'embryon ne se forme pas correctement. L'étude de ces trois mutants affectés dans la réponse à l'auxine a montré que l'alignement des cellules dépend d'une polarité dans le transport de l'auxine (Hardtke and Berleth, 1998) (Hobbie et al., 2000) (Hamann et al., 2002).

Enfin, la perception de l'auxine et son transport est important dans le positionnement et la séparation des primordia des cotylédons : *mp*, *bdl*, *axr6* et *pin1* ont les cotylédons fusionnés ou mal positionnés (Hardtke and Berleth, 1998) (Galweiler et al., 1998) (Hamann et al., 1999) (Hobbie et al., 2000). De plus, l'auxine joue un rôle dans leur initiation puisqu'une application exogène induit la formation des cotylédons et que le gène *PIN1*, impliqué dans le transport de l'auxine, régule l'expression de gènes impliqués dans la mise en place des organes (Kuhlemeier and Reinhardt, 2001).

Le développement de l'embryon suit une série très précise d'événements cellulaires et moléculaires permettant la formation du précurseur de la future plante. Le zygote accessoire ou albumen est également soumis à un mécanisme séquentiel qui conduit à sa mise en place.

1.2.3.3. Développement de l'albumen

L'albumen fonctionne comme une annexe qui permet à l'embryon de se développer et de germer puisqu'il est un lieu de stockage des réserves. Cependant, contrairement à l'embryon, son développement s'arrête au cours de la germination. La remobilisation des réserves qui y sont accumulées, au moment de la germination est la fonction ultime de l'albumen avant sa disparition.

On distingue deux phases dans sa formation : l'albumen syncytial puis l'albumen cellularisé. Les étapes du développement de l'albumen chez *Arabidopsis*, de la fécondation jusqu'à sa cellularisation, sont illustrées en **figure 1.5**.

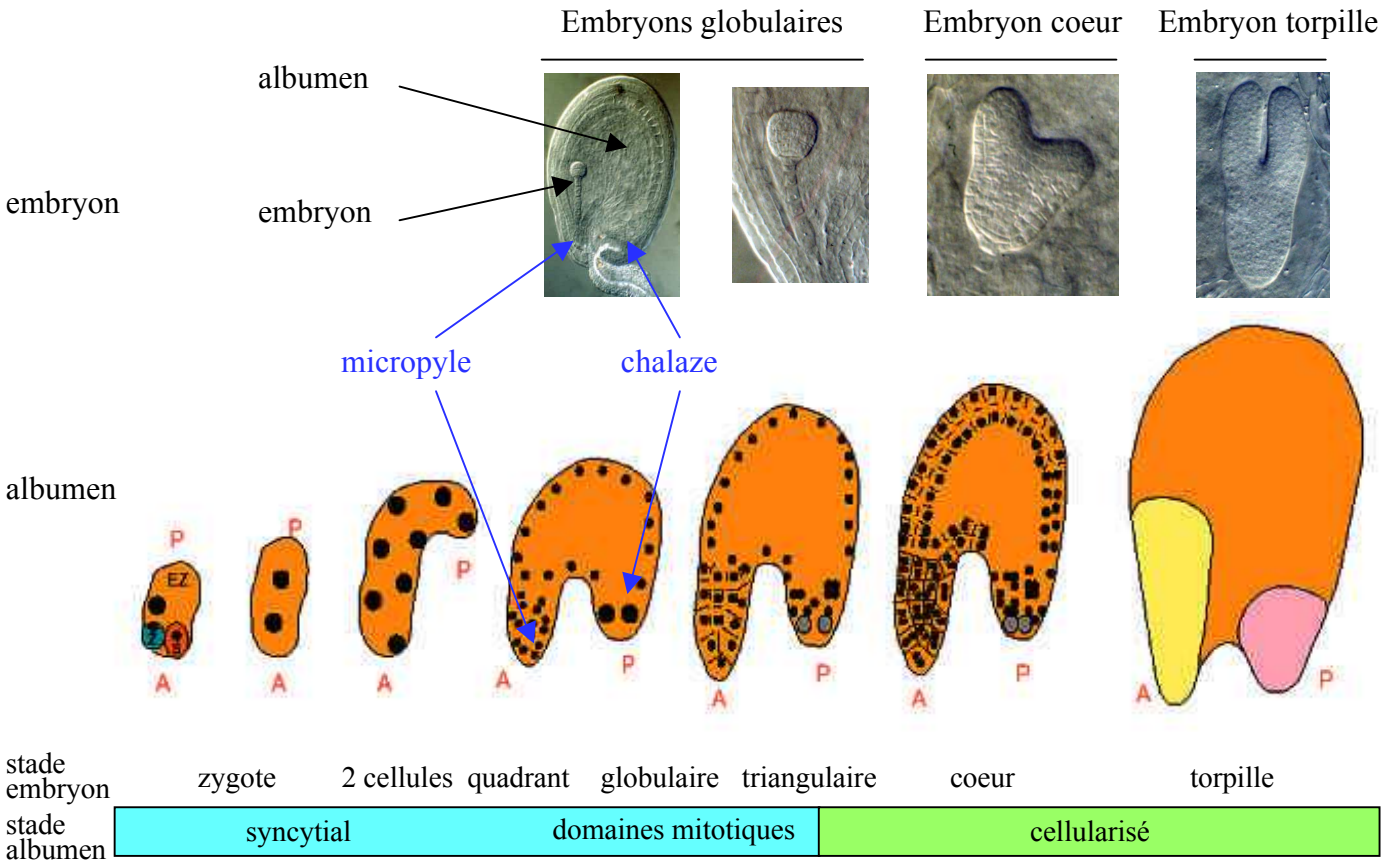


Figure 1.5 : Etapes du développement de l'albumen chez *Arabidopsis*. La double fécondation produit le zygote (Z) et l'albumen (EZ). Le développement de l'albumen se divise en deux phases : il est tout d'abord syncytial puis se cellularise. Les stades de développement sont définis par des successions de mitoses pseudo-synchrones. On distingue trois domaines mitotiques dans l'albumen mature, du pôle antérieur (A) au pôle postérieur (P) : l'albumen micropylaire (jaune), l'albumen périphérique (orange) et l'albumen chalazal (rose). La cellularisation a tout d'abord lieu dans le micropyle, elle gagne l'albumen périphérique pour finir par l'albumen chalazal au stade embryon torpille.

D'après Berger et al., 2003
clichés : Sébastien Baud

1.2.3.3.1. Albumen syncytial

L'albumen provient de la division de la cellule mère triploïde. Juste après la fécondation, des mitoses sans cytokinèse interviennent par vagues, qui remplissent le sac embryonnaire de noyaux espacés régulièrement (**figures 1.5 et 1.6 A**). A mesure que l'ovule grandit, il se recourbe jusqu'à ce que la chalaze (P) se situe en face de la région micropylaire (A). Pendant ce temps, la vacuole centrale du sac embryonnaire s'élargit et l'albumen multinucléé est repoussé à la périphérie (**figures 1.5 et 1.6 B, C**).

Au stade globulaire, l'albumen syncytial entoure complètement l'embryon dans la chambre micropylaire (**figures 1.5 et 1.6 D**). Dans la chambre centrale, il est présent sous la forme d'une fine couche périphérique, où chaque noyau est entouré d'une sphère de cytoplasme avec une organisation microtubulaire radiale : ce sont les DCN (Domaines Cytoplasmiques Nucléaires) (Brown et al., 1999). Ces microtubules participent au processus particulier qui conduit à la cellularisation de l'albumen. Dans la chalaze, quelques noyaux seulement sont présents puisque les successions de mitoses pseudo synchrones commencent dans le micropyle pour se terminer à l'extrémité chalazale (Brown et al., 1999).

1.2.3.3.2. Cellularisation de l'albumen

La cellularisation de l'albumen commence dans la chambre micropylaire, et coïncide avec la formation des cotylédons dans l'embryon (**figure 1.5**) (Brown et al., 1999). Au moment de la transition syncytium/cellularisation, les DCN deviennent polarisés et s'allongent perpendiculairement à la paroi du sac embryonnaire grâce à une orientation précise des microtubules. Le processus de cellularisation est basé sur la formation d'alvéoles qui compartimentent le syncytium. La première étape de la cellularisation est une division mitotique particulière qui a lieu dans la plus ancienne alvéole, proche de l'embryon. Elle produira une cellule basale, surmontée d'une alvéole. La première série de divisions laisse place à une couche cellulaire périphérique et une couche interne d'alvéoles, qui continueront de se diviser jusqu'à ce que l'albumen soit entièrement cellularisé (**figure 1.7**) (Brown et al., 1999). La vague de cellularisation part du micropyle, gagne l'albumen périphérique et termine sa course dans la chambre chalazale. L'albumen chalazal reste cependant sous forme synticiale jusqu'à un stade tardif de la maturation de la graine (**figure 1.5**).

1.2.3.3.3. Patron d'organisation

L'albumen est caractérisé par deux patrons d'organisation. Le long d'un axe antéro-postérieur, on distingue trois régions : l'albumen micropylaire, qui entoure l'embryon ; l'albumen périphérique, autour de la vacuole centrale ; l'albumen chalazal. De plus, comme l'embryon, il présente une organisation radiale, surtout étudiée chez les céréales, qui distingue les 2 couches à aleurones externes de la masse de l'albumen (Berger, 2003).

L'organisation de l'albumen chalazal est notamment contrôlée par les gènes *FIS*, qui codent des protéines présentant des homologies avec les protéines du groupe Polycomb. Chez la drosophile, elles seraient impliquées dans le maintien des patrons établis par des contrôles

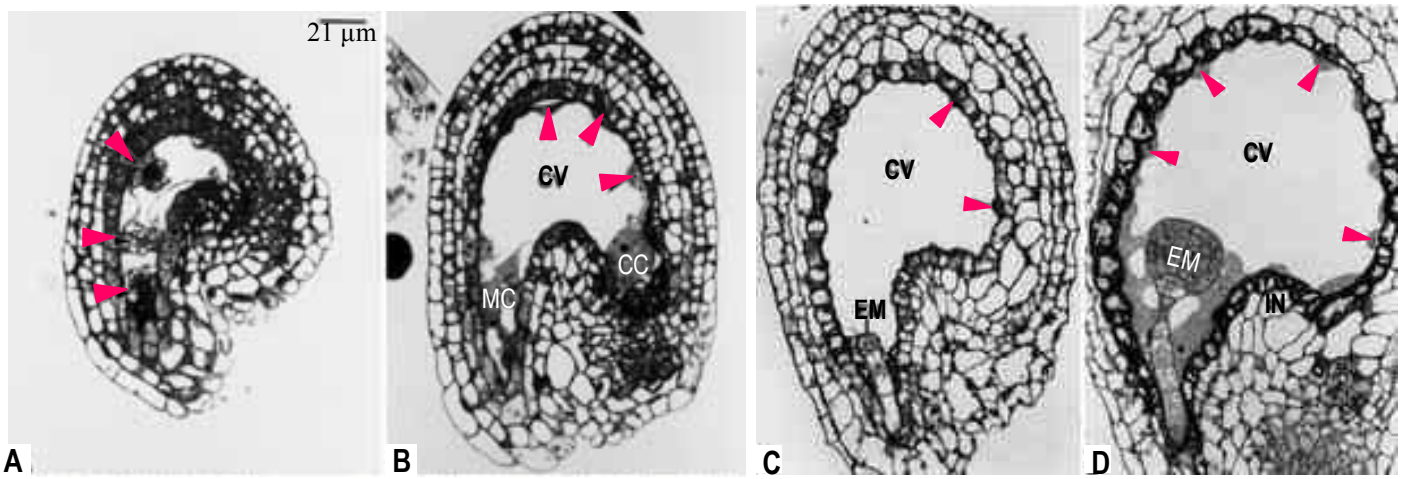


Figure 1.6 : Développement de l'albumen au stade syncytial sur des coupes longitudinales de graine d'*Arabidopsis*. (**A**) l'albumen contient 4 noyaux également espacés le long du sac embryonnaire (flèches). (**B**) Un syncytium remplit les chambres micropylaire (MC) et chalazale (CC) et est réduit à une unique couche de noyaux en périphérie de la chambre centrale (flèches), entourant la vacuole centrale (CV). (**C**) Au stade embryon globulaire très précoce, une fine couche d'albumen syncytial (flèches) entoure la vacuole centrale (CV). (**D**) Au stade globulaire tardif, l'albumen syncytial entoure l'embryon (EM). Dans la chambre centrale, l'albumen périphérique est constitué de noyaux largement espacés (flèches), avec un petit amas dans la zone chalazale. (IN, tégument interne).

D'après Brown et al., 1999

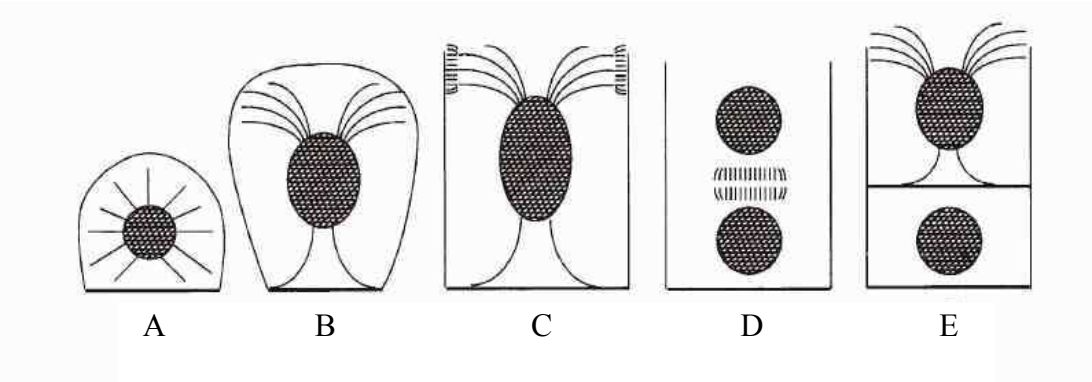


Figure 1.7 : Cellularisation de l'albumen. (A) Un système microtubulaire radial est associé aux DCN (domaines cytoplasmiques nucléaires). (B) La polarisation des DCN est induite par un réarrangement des microtubules. (C) L'alvéolation de l'albumen est initiée grâce à des dépôts de phragmoplastes adventifs entre les DCN. (D) Le noyau se divise et un phragmoplaste est déposé, qui divise l'alvéole en une cellule périphérique (couche cellulaire d'albumen), surmonté d'une alvéole en position interne (E).

D'après Brown et al, 1999

maternels (Berger, 2003). De plus, de nombreux auteurs ont montré qu'une empreinte génétique est exercée sur les gènes *FIS* du génome paternel. Ce mécanisme semble très important dans la régulation du développement de l'embryon et implique la méthylation de l'ADN (Berger, 2003). L'albumen se développerait donc sous le contrôle du gamétophyte femelle.

*1.2.3.4. Maturation de la graine d'*Arabidopsis *: accumulation des réserves*

Les réserves synthétisées par l'embryon et l'albumen au cours de son développement sont de trois types : des sucres, des lipides et des protéines. Chez *Arabidopsis*, une graine ex-albuminée, elles sont majoritairement stockées dans les cotylédons, alors que les céréales en emmagasinent la plus grande partie dans l'albumen. Leur accumulation séquentielle est résumée sur la **figure 1.8**.

1.2.3.4.1. Sucres

Les carbohydrates présents dans la graine sont de deux types : les sucres solubles (hexoses, saccharose, oligosaccharides) et l'amidon insoluble.

Au cours de l'embryogenèse d'*Arabidopsis*, il existe une accumulation transitoire d'amidon située en grande partie dans les deux couches cellulaires les plus externes du tégument, mais également dans l'embryon (Focks and Benning, 1998) (Baud et al., 2002). Sa dégradation pourrait procurer des précurseurs lors de la différenciation des téguments ou encore pour la production du mucilage (Western et al., 2000) (Windsor et al., 2000). De la même façon, la teneur en hexoses augmente pendant l'embryogenèse, puis diminue.

D'autres sucres solubles présentent un patron d'accumulation tout autre. En effet, le saccharose et les oligosaccharides sont synthétisés pendant les phases de maturation et de maturation tardive (Baud et al., 2002). Le saccharose pourrait servir de source d'énergie rapidement utilisable au cours des premiers stades de germination. Une autre hypothèse suggère que son apparition serait, conjointement avec celle du stachyose et la disparition de l'amidon, un des facteurs clefs dans l'acquisition de la tolérance à la dessiccation (Leprince et al., 1990).

1.2.3.4.2. Lipides

La quantité de lipides dans la graine augmente jusqu'à 18 jours après fécondation, où elle atteint 40% du poids sec de la graine sèche dans l'écotype Ws (Baud et al., 2002). En fin de maturation tardive, on assiste au début de la dégradation des lipides.

Au cours de l'embryogenèse, les acides gras majoritaires sont l'acide palmitique (16:0), l'acide stéarique (18:0) et l'acide linoléique (18:2). Puis, la graine entre dans une phase de synthèse plus active d'acides gras et la composition change rapidement. La quantité d'acides palmitique et stéarique diminue alors que les acides oléique (18:1), linoléique et alpha linolénique (18:3) voient leur teneur augmenter, de même que l'acide eicosenoique (20:1) (Focks and Benning, 1998) (Baud et al., 2002).

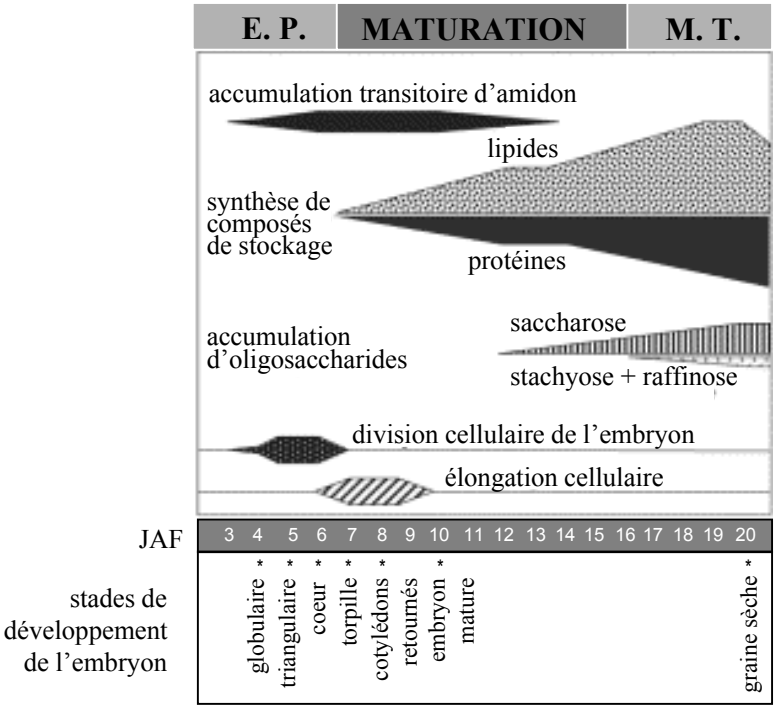


Figure1. 8 : Evénements physiologiques et métaboliques majeures au cours du développement de la graine.

E. P. : embryogenèse précoce
M. T. : maturation tardive
JAF : jour après floraison

D'après Baud et al., 2002

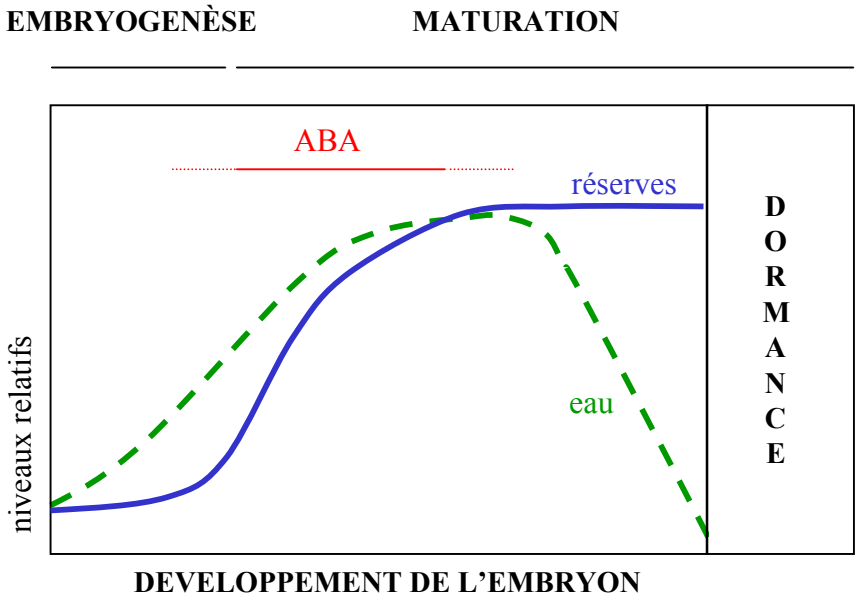


Figure 1.9 : Evolution du niveau des réserves nutritives et de la quantité d'eau au cours du développement de la graine.

D'après Rock et Quatrano1995

Les formes acétylées des lipides, ou triacylglycérols (TAG) font leur apparition en début de maturation. En milieu de maturation, ils représentent 60% des acides gras totaux et cette proportion augmente pour atteindre 90% au maximum. Cependant, juste avant la germination, la teneur en acides gras diminue brutalement ce qui pourrait s'expliquer par une remobilisation des réserves, nécessaire à l'accomplissement de la germination (Baud et al., 2002).

Les compositions en lipides de l'embryon et de l'albumen sont différentes, certains acides gras étant majoritaires dans l'un ou l'autre des compartiments. De plus, d'après Penfield et collaborateurs (2004), l'embryon accumulerait dix fois plus de lipides que l'albumen (Penfield et al., 2004).

1.2.3.4.3. Protéines

Les protéines accumulées dans la graine sont à 70% des protéines de réserve. Leur quantité augmente régulièrement au cours du temps, selon une courbe qui suit à peu près celle des lipides. Cependant, en toute fin de maturation tardive, la synthèse de protéines continue, contrairement à celle des lipides. Cette observation suggère que cette synthèse puisse être potentialisée par la dégradation des acides gras (Baud et al., 2002). Au cours de la maturation, les ARNm les plus abondants présents dans l'embryon codent pour des protéines de réserve. Chez *Arabidopsis*, les protéines de réserve majoritairement accumulées sont les albumines 2S et 12S. Elles peuvent représenter jusqu'à un tiers du poids sec de la graine (Baud et al., 2002). Elles pourraient être la source d'azote nécessaire à la croissance de la jeune plantule.

*1.2.3.5. Dessiccation de la graine d'*Arabidopsis

La fin de la maturation de la graine s'accompagne d'une diminution importante de la teneur en eau, d'environ 90%, pour permettre la survie de la graine dans des conditions défavorables (**figure 1.9**). Cette déshydratation s'accompagne de l'accumulation de divers composés comme certains sucres ainsi que des protéines telles que les Hsp (Heat shock proteins) et certaines classes de protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant), participant à l'acquisition à la tolérance à la dessiccation (Ingram and Bartels, 1996) (Bentsink and Koornneef, 2002). Les protéines LEA on été identifiées chez de nombreuses espèces et sont divisées en au moins six groupes (Wise and Tunnacliffe, 2004). Chez *Arabidopsis*, les protéines AtEm1 et AtEm6 (Early methionine labelled) appartiennent au groupe I. Le rôle des protéines LEA reste encore largement inconnu. Elles pourraient protéger les structures cellulaires des effets de la déshydratation grâce à leurs caractéristiques hydrophiles, par la séquestration d'ions, par la renaturation de protéines ou encore en formant des filaments associés au cytosquelette qui limiteraient la plasmolyse (Wise and Tunnacliffe, 2004). L'ABA endogène joue un rôle majeur dans l'expression des LEA, puisque chez les mutants déficients en ABA, la quantité d'ARNm est réduite (Parcy et al., 1994). Toutefois, la tolérance à la dessiccation n'est pas abolie chez les mutants *aba* (Giraudat et al., 1994). D'autres

facteurs développementaux et d'autres mécanismes entrent donc en jeu dans la régulation des LEA et plus généralement dans l'acquisition de la tolérance à la dessiccation (Giraudat et al., 1994) (Ingram and Bartels, 1996).

1.3. Régulation de la maturation de la graine d'*Arabidopsis*

1.3.1. Facteurs de transcription et promoteurs cibles

1.3.1.1. Mise en évidence d'éléments de signalisation

L'étude de la régulation de la maturation de la graine a été rendue possible par l'isolement de mutants dont la sensibilité à l'ABA est altérée. Ils peuvent présenter une diminution d'accumulation des protéines et lipides de réserve, une réduction de la dormance et une intolérance à la déshydratation (Hilhorst, 1995). Ces mutants sont impliqués dans la signalisation par l'ABA et les gènes affectés sont des éléments participant à ces voies de signalisation.

Ainsi, l'accumulation des réserves nutritives et l'acquisition de la tolérance à la dessiccation, sont associés à l'expression de groupes de gènes spécifiques, codant des protéines de stockage ou des protéines LEA par exemple. Ces expressions sont très finement contrôlées puisque l'action de l'ABA induit des modifications d'expression géniques. L'analyse des promoteurs de gènes répondant à l'ABA semble une approche intéressante pour permettre la caractérisation des voies de régulation par l'ABA, c'est-à-dire les éléments *cis* et les facteurs *trans* impliqués dans ces cascades. L'une des premières études a permis de montrer que le promoteur du gène *Em* de blé est induit par l'ABA en expression transitoire dans un système hétérologue (Marcotte et al., 1988).

1.3.1.2. Les ABRE

Une première catégorie d'éléments *cis* présents dans les promoteurs a été découverte par analogie avec le motif I du promoteur du gène *Rab16B* de riz et *Em1a* de blé (Marcotte et al., 1989) (Ono et al., 1996). Ces séquences ont en commun un noyau de 4 paires de bases : "ACGT" , également appelée boîte G et ont été appelées ABA Response Elements, ou ABRE. Ces motifs ABRE sont retrouvés dans les promoteurs de nombreux gènes, notamment dans ceux codant des protéines de réserve (Leung and Giraudat, 1998).

La plus petite unité promotrice, appelée ABRC (ABA response complex) présentée comme nécessaire et suffisante à l'induction par l'ABA de l'expression de gènes est constituée d'au moins deux éléments *cis*. Il peut s'agir d'un dimère de boîtes ABRE, ou de l'association d'une ABRE avec une autre séquence régulatrice ne contenant pas de boîte G (Giraudat et al., 1994) (Leung and Giraudat, 1998).

1.3.1.3. Les RY

La séquence consensus CATGCATG constitue un autre type d'élément *cis*-régulateur retrouvé dans les séquences promotrices des gènes exprimés dans la graine. Ils ont été identifiés grâce à l'étude des promoteurs de nombreux gènes codant des protéines de réserves notamment chez les légumineuses (Baumlein et al., 1992). Cette séquence, caractérisée par l'alternance de bases puriques (R) et pyrimidiques (Y) a été nommée motif RY. Tout comme les éléments ABRE, un motif RY ne peut fonctionner seul. Il ne pourra conférer la spécificité tissulaire qu'associé à d'autres séquences régulatrices (Ezcurra et al., 1999). C'est ainsi que chez le gène codant l'albumine 2S *napA* du colza, on trouve deux motifs RY entourant une boîte G, constituant la séquence minimale nécessaire à la régulation de ce gène (Ezcurra et al., 1999).

1.3.1.4. Les facteurs de transcription

Les facteurs agissant en *trans*, c'est-à-dire participant à la transduction de signal via leur liaison aux séquences *cis*-régulatrices, sont des facteurs de transcription. Afin d'associer à chacune des séquences *cis*-régulatrices, un ou plusieurs facteurs *trans* capables de la reconnaître et de la lier, des expériences de simple hybride ont notamment été menées dans la levure, en utilisant une séquence *cis* d'intérêt fusionnée en amont d'un gène rapporteur. Les résultats ont montré que les boîtes ABRE et les éléments RY sont liés par des protéines appartenant à la classe des bZIP (basic leucine-zipper) et des protéines possédant un domaine B3 respectivement (Finkelstein et al., 2002).
Des études récemment effectuées chez *Arabidopsis* ont mis en évidence les mécanismes d'action de facteurs bZIP, ainsi que de bZIP en association avec des protéines à domaine B3 au cours de la synthèse de protéines de réserve et dans l'acquisition de la tolérance à la dessiccation (Lara et al., 2003) (Kroj et al., 2003) (Cf § 1.3.3).

1.3.2. Transition entre l'embryogenèse et la maturation

L'embryogenèse d'*Arabidopsis* comprend la phase de morphogenèse (abordée dans le §1.1.3), suivie de la phase de croissance, au cours de laquelle l'embryon remplit la graine. A la fin du remplissage, les divisions cellulaires sont stoppées. Plus tard, une importante augmentation de la teneur en ABA contrôle la maturation de la graine. Les embryons en développement entrent dans cette phase de maturation lorsque la croissance cesse de se faire par divisions cellulaires, mais a lieu par augmentation du volume des cellules. Il a notamment été déterminé chez la tomate que l'ABA participait à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Finkelstein and Rock, 2002). Les facteurs de régulation FUS3 (FUSCA3), LEC1 et LEC2 (LEAFY COTYLEDON1 et 2), impliqués dans le signalisation par l'ABA, semblent impliqués dans l'arrêt des divisions cellulaires lors de l'arrêt de croissance de l'embryon (Raz et al., 2001). Comme ABI3, LEC2 et FUS3 appartiennent à la famille des facteurs de transcription à domaine B3 (Finkelstein et al., 2002) et possèdent des domaines

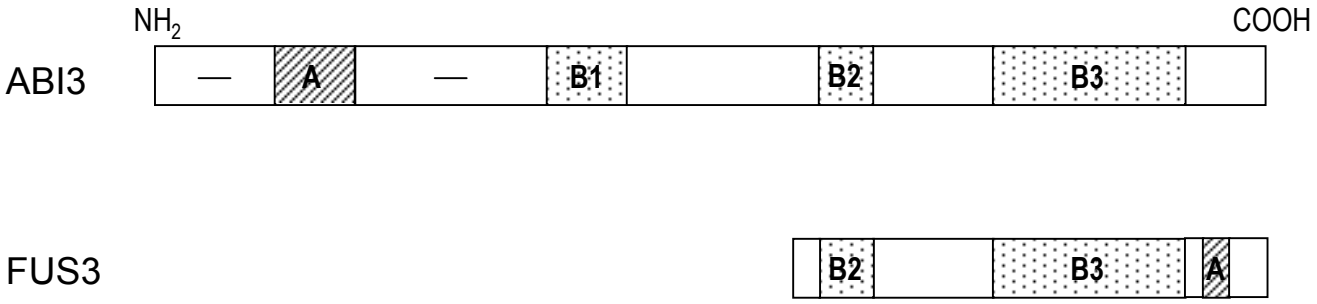


Figure 1.10 : Représentation schématique des protéines ABI3 et FUS3, à domaine bZIP. Quatre domaines sont reconnaissables : le domaine A, localisé dans la région N-terminale acide et trois domaines basiques, B1, B2 et B3.

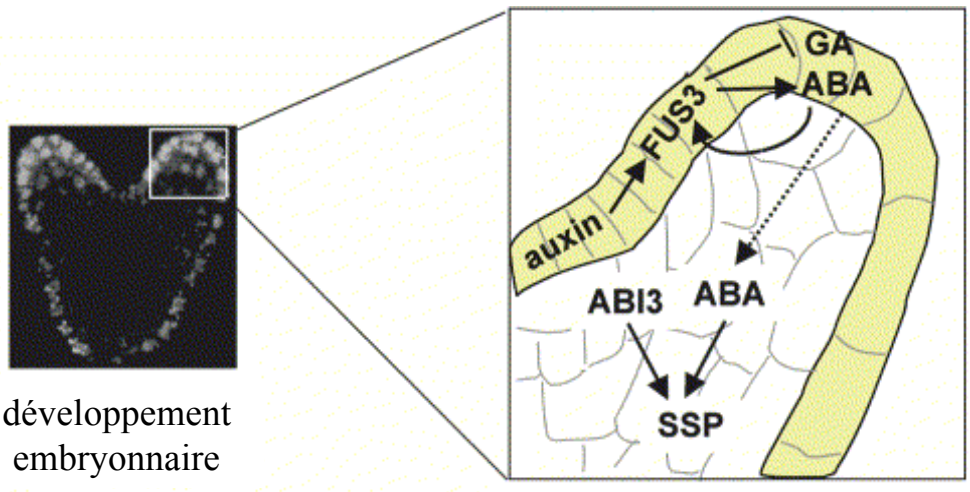


Figure 1.11 : Modèle d'action de FUS3 au cours du développement embryonnaire. *FUS3* s'exprime dans l'épiderme (jaune) de l'embryon, sous le contrôle de l'auxine. Dans ce tissu, FUS3 a deux rôles : il inhibe la synthèse et les fonctions médiées par les GAs (initiation de la germination) et induit la synthèse d'ABA. L'ABA stabilise la protéine FUS3 dans l'épiderme et diffuse dans l'embryon pour y induire l'accumulation des protéines de réserve (SSP), sous le contrôle d'ABI3.

D'après Gazzarrini et al., 2004

consensus basiques et un domaine acide (**figure 1.10**), tandis que LEC1 code pour la sous-unité HAP3 des facteurs de transcription se liant au motif CCAAT (Kwong et al., 2003)
Plus récemment, Gazzarrini et collaborateurs (2004) ont montré que FUS3 jouait un rôle-clef dans la transition entre la phase de croissance de l'embryon et l'activation du programme de maturation de la graine d'*Arabidopsis* (Gazzarrini et al., 2004). En effet, durant l'embryogenèse, le facteur de transcription FUS3, exprimé dans l'épiderme, contribuerait à l'arrêt de croissance de l'embryon par deux mécanismes : l'inhibition de la production des GAs et l'induction de la synthèse d'ABA (**figure 1.11**). De plus, l'ABA produit dans l'épiderme stabiliserait la protéine FUS3, formant ainsi une boucle de régulation, et diffuserait dans les autres tissus afin d'activer les processus de maturation auxquels il est généralement associé, comme l'accumulation des protéines de réserve, en combinaison avec ABI3 (Gazzarrini et al., 2004). De façon concomitante, l'inhibition de production de GAs empêche l'activation du programme de germination.

1.3.3. Contrôle de l'accumulation des réserves

L'expression spatio-temporelle des protéines de réserve est finement régulée au cours de la maturation des graines. Hugues et Galau (1991) ont montré que la variation de la teneur en ABA ne semble pas être la composante développementale majeure qui contrôlerait l'expression des gènes de protéines de stockage (Hughes and Galau, 1991) puisque la diminution de synthèse d'ABA n'induit pas de phénotype sérieux (Giraudat et al., 1994). L'étude de mutants affectés dans la biosynthsèse ou la sensibilité à l'ABA a démontré l'implication de cette hormone dans la composition ainsi que dans la quantité des réserves stockées. Bien que chez les mutants affectés dans la biosynthèse de l'ABA, l'expression des gènes codant les protéines de réserve n'est que très peu diminuée (Giraudat et al., 1994), une déficience quasi-totale en ABA libre, telle que celle obtenue par immunomodulation, permet de réduire la quantité de protéines de réserve et de corps lipidiques (Phillips et al., 1997). De même, chez les mutants sévères d'*Arabidopsis abi3* (*aba insensitive3*) ou chez des allèles faibles en association avec la mutation *aba1*, les protéines stockées sont moins abondantes (Koornneef et al., 1989).
L'expression des gènes codant ces protéines de réserve pourrait être induite par l'augmentation de la sensibilité des graines à l'ABA (Parcy et al., 1994). En fait, l'accumulation des protéines de réserve pourrait être contrôlée par l'ABA maternel puisqu'elle est concomitante avec ce pic d'ABA (Parcy et al., 1994). De plus, l'ABA d'origine maternelle semble requis pour l'entrée de l'embryon dans la phase de maturation (Raz et al., 2001). De nombreuses études ont montré que cette régulation fine est opérée par des facteurs de transcription, ceci au moyen de différentes combinaisons d'interactions avec des séquences cibles situées dans les régions promotrices des protéines de réserve (Cf § 1.3.1).
Des éléments nouveaux concernant la régulation de l'expression d'une protéine de réserve majeure, l'albumine 2S At2S3 ont récemment été apportés (Kroj et al., 2003). Il apparaît que

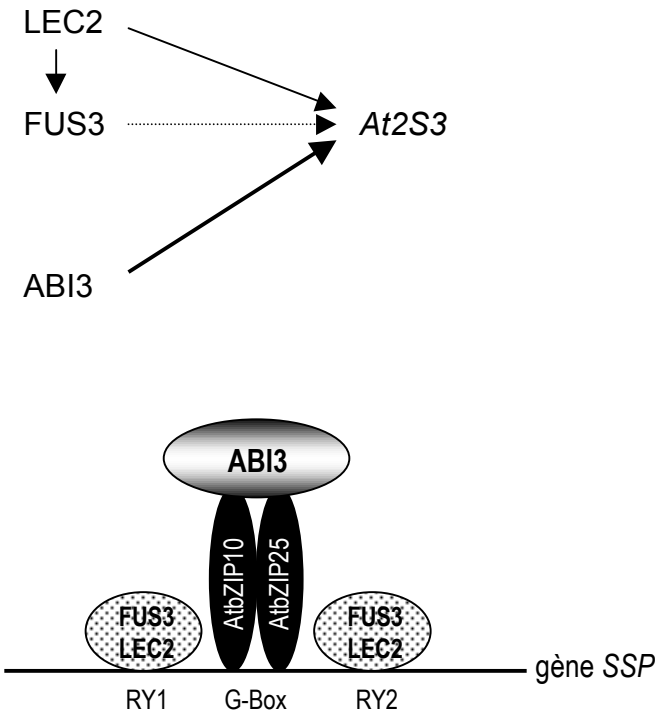


Figure 1.12 : Modèle de régulation des gènes codant des protéines de réserve (SSP). Les protéines ABI3, FUS3 et LEC2 régulent positivement l'expression d'*At2S3*. LEC2 et FUS3 agissent directement et sont partiellement redondants. ABI3 régule l'expression des gènes SSP de façon différente : il ne se lierait pas directement à l'ADN mais par l'intermédiaire d'un dimère de bZIP, AtbZIP10-AtbZIP25.

D'après Kroj et al., 2003 et Lara et al., 2003

trois facteurs de transcription sont impliqués dans ce processus chez *Arabidopsis* : FUS3, LEC2 et ABI3. Ces trois facteurs de transcription ont déjà été étudiés et décrits comme des régulateurs potentiels de l'expression d'autres gènes de réserve. Le promoteur d'*At2S3* est constitué de trois séquences régulatrices : deux éléments RY entourant une boîte G (Kroj et al., 2003). Les résultats des expérimentations de simple hybride ont montré que FUS3 et LEC2 sont capables de lier le promoteur du gène *At2S3* dans la levure au niveau des séquences RY et ceci indépendamment de la boîte G. Au contraire, ABI3 n'active pas le promoteur *At2S3* par interaction directe avec le complexe "RY - boîte G - RY" dans la levure (Kroj et al., 2003). Ces auteurs concluent que FUS3 et LEC2 agiraient par liaison directe au promoteur d'*At2S3* et sembleraient partiellement redondants ; tandis que ABI3 agirait comme cofacteur au sein d'un complexe d'activation (Kroj et al., 2003). D'autres données ont permis de compléter ce schéma. En se basant sur la similarité des mécanismes moléculaires contrôlés par les facteurs de transcription Opaque 2 chez le maïs, il a été établi que les facteurs AtbZIP10 et AtbZIP25 interagiraient avec la boîte G des promoteurs des gènes codant les protéines de réserve. Il a également été montré que la protéine ABI3 est capable de se lier physiquement en double hybride aux protéines AtbZIP10 et AtbZIP25. Ces deux protéines bZIP constitueraient donc l'interface qui lierait ABI3 aux séquences promotrices régulatrices des protéines 2S (Lara et al., 2003). Le modèle proposé à partir de ces résultats expérimentaux est présenté en **figure 1.12**.

Cependant, Mönke et collaborateurs (2004) ont démontré ultérieurement par la technique de BIAcore que, comme la protéine FUS3, la protéine ABI3 pleine longueur est capable de se lier à l'ADN. De plus, cette interaction protéine-ADN se fait par le domaine B3 du facteur de transcription, sur la séquence RY (Monke et al., 2004). Cependant, aucune interaction entre les protéines FUS3 et ABI3 n'a pu être observée par cette technique.

L'accumulation des protéines de réserve se fait vraisemblablement au moyen d'une régulation fine, où interviennent de nombreux facteurs de transcription, dont les combinaisons pourraient contrôler le stockage de différentes protéines spécifiques de la graine. Toutefois la plupart de ces facteurs reste sûrement encore à découvrir ainsi que le rôle respectif de chacun d'entre eux, les mécanismes de leur régulation et les éléments de signalisation en amont. Notons que certains facteurs ont été identifiés dans différentes espèces, comme par exemple la protéine VP1 du maïs, homologue d'ABI3, (Finkelstein et al., 2002). Il existe donc une conservation des mécanismes de développement de la graine au cours de l'évolution, bien que la localisation des réserves puisse différer selon les espèces.

1.3.4. Régulation de l'acquisition de la tolérance à la dessiccation

L'étude de mutants affectés dans leur sensibilité à l'ABA et dans la maturation des graines a permis l'identification de plusieurs facteurs de transcription et de protéines régulatrices contrôlant l'expression des gènes *AtEm*, en plus des facteurs hormonaux tels que l'ABA.

Le gène *ABI3* est requis dans l'activation de la plupart des gènes de réponse à l'ABA dans les graines. En effet, les transcrits ainsi que les protéines AtEm1 et AtEm6 sont indécelables chez les allèles sévères des mutants *abi3* (Parcy et al., 1994) (Bies-Etheve et al., 1999) (Carles et al., 2002). Ces auteurs ont montré, grâce à l'expression ectopique de ABI3, que cette protéine interagit avec certaines cascades de signalisation de l'ABA puisque dans ces plantes, une application exogène d'ABA induit l'expression de *AtEm1*.

D'autres protéines régulatrices, comme FUS3 et LEC1 joueraient également un rôle dans la régulation de l'expression des protéines AtEm (Parcy et al., 1997), ainsi que ABI4, un facteur de transcription à domaine APETALA2 (Finkelstein, 1994) (Finkelstein et al., 1998).

Par ailleurs, les teneurs en ARNm et en protéine AtEm sont également réduites chez le mutant *abi5* (*abscisic acid insensitive5*) (Finkelstein, 1994). Finkelstein et Lynch (2000) ont étudié l'accumulation des transcrits *ABI5* dans différents mutants *abi* et observé que l'expression d'*ABI5* y était diminuée. *ABI5* qui code pour un facteur de transcription à domaine bZIP (basic leucine zipper) serait donc régulé par l'ABA *via* un certain nombre de gènes comme *ABI3*, *ABI4*, *ABI1* et *ABI2* (ABI1 et ABI2 sont des protéines phosphatases 2C) (Finkelstein and Lynch, 2000). Il a été proposé qu'*ABI3*, *ABI4* et *ABI5* agiraient dans un même réseau de régulation et exerceraient une régulation combinée de gènes exprimés dans la graine et en réponse à l'ABA (Soderman et al., 2000). Cependant, l'ensemble des interactions entre les différents partenaires de cette voie régulatrice n'est pas encore complètement élucidée. L'existence potentielle d'un complexe ABI3-ABI5 mais également d'homodimères ABI5-ABI5 montrée en double hybride indiquent que l'interaction entre ABI3 et la forme dimérique d'ABI5 pourrait intervenir dans la régulation des gènes *Em*

. Cependant, malgré des interactions génétiques, aucune interaction physique entre ABI4 et ABI5 ouABI4 et ABI3 n'a été démontrée.

Récemment, Nakamura et collaborateurs (2001) et Carles et collaborateurs (2002) ont démontré qu'ABI5 était capable de se lier via son domaine bZIP, à des séquences conservées des promoteurs des gènes *AtEm*, notamment la boîte G d'*AtEm6* (Nakamura et al., 2001) (Carles et al., 2002). Le rôle d'ABI5 serait d'empêcher la croissance et la germination lorsque la pression osmotique est trop importante, ce qui est une situation normale chez une graine en fin de maturation dans la mesure où elle est dans un état de déshydratation croissante (Carles et al., 2002). De façon similaire, cette protéine intervient également dans l'arrêt de croissance post-germinatif en conditions de stress osmotique, où l'augmentation de la teneur en ABA induit l'expression et l'activité de la protéine ABI5 et inhibe sa dégradation (Lopez-Molina et al., 2002) (Lopez-Molina et al., 2003). Toutefois, il semble exister d'autres voies de transduction que celle faisant intervenir ABI5 dans la régulation de la tolérance des graines à la dessiccation. En effet, il active l'expression d'une fraction seulement des gènes LEA, et d'autres facteurs de transcription, notamment des membres de la même famille qu'*ABI5*, contribueraient de façon différentielle à la régulation des LEA (Bensmihen et al., 2002). Enfin, comme dans le cas de l'accumulation des réserves,

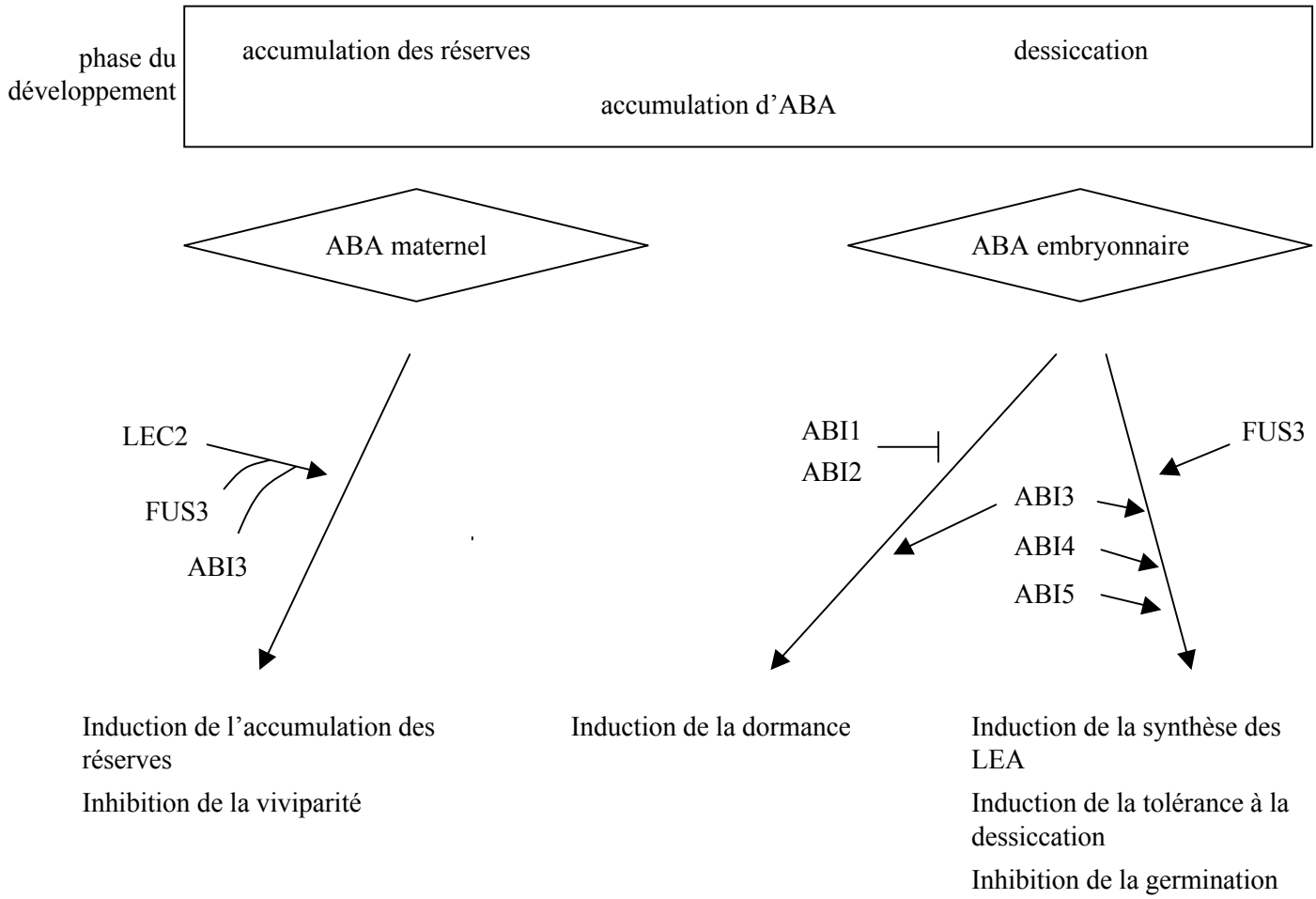


Figure 1.13 : Régulateurs principaux intervenant dans le développement de la graine.

D'après Finkelstein et Rock, 2002

des similarités de mécanismes régulateurs ont été décrites chez différentes espèces et en particulier entre mono- et dicotylédones (Kagaya et al., 2002).

La **figure 1.13** donne un aperçu des régulateurs principaux qui interviennent au cours du développement et de la maturation de la graine.

1.4. Dormance primaire et germination

1.4.1. Définitions et caractéristiques

La **dormance primaire** des graines est définie comme l'incapacité, pour une graine viable, à germer lorsque les conditions environnementales sont favorables (Bewley, 1997). Elle peut être imposée par les téguments qui entourent la graine (dormance tégumentaire) et les embryons isolés sont capables de germer. La germination et la dormance des graines dépendent alors de facteurs structuraux, en particulier les téguments qui entourent la graine, et de facteurs développementaux, qui affectent le potentiel de croissance de l'embryon (Bentsink and Koornneef, 2002). Dans d'autres espèces, l'embryon lui-même est dormant.
Au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis*, il y a seulement une période transitoire au cours de laquelle les graines en développement peuvent germer. Cette capacité est perdue par la suite lorsque la graine développe la dormance primaire. Celle-ci est mise en place tardivement pendant la maturation de la graine et est contrôlée notamment par l'ABA embryonnaire (Karssen et al., 1983). La dormance est généralement associée à des tissus faiblement hydratés.
La **germination** est définie comme la somme des événements qui conduisent la graine sèche à germer : cela commence par la prise d'eau et se termine par l'allongement de l'axe embryonnaire (Bewley and M., 1994). Le signe visible d'accomplissement de la germination est la sortie de la radicule hors des téguments de la graine. La majorité des événements métaboliques et cellulaires subis par une graine non-dormante au moment de sa germination ont également lieu chez les graines dormantes imbibées, à l'exception de la sortie de la radicule (Bewley, 1997).

1.4.2. Rôles des téguments de la graine chez *Arabidopsis*

L'enveloppe (ou testa) des graines matures d'*Arabidopsis*, d'origine maternelle, est constituée de deux couches tégumentaires. La plus externe est impliquée dans la formation du mucilage, excrété lors de l'imbibition des graines. Dans la plus interne, s'accumulent les composés phénoliques responsables de la coloration des graines.
Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées concernant le rôle des téguments dans le maintien de la dormance des graines. Les téguments de la graine empêcheraient la germination, soient parce qu'ils sont imperméables à l'eau et/ou à l'oxygène, composés nécessaires à la reprise d'activité métabolique, soient parce qu'ils produisent des substances

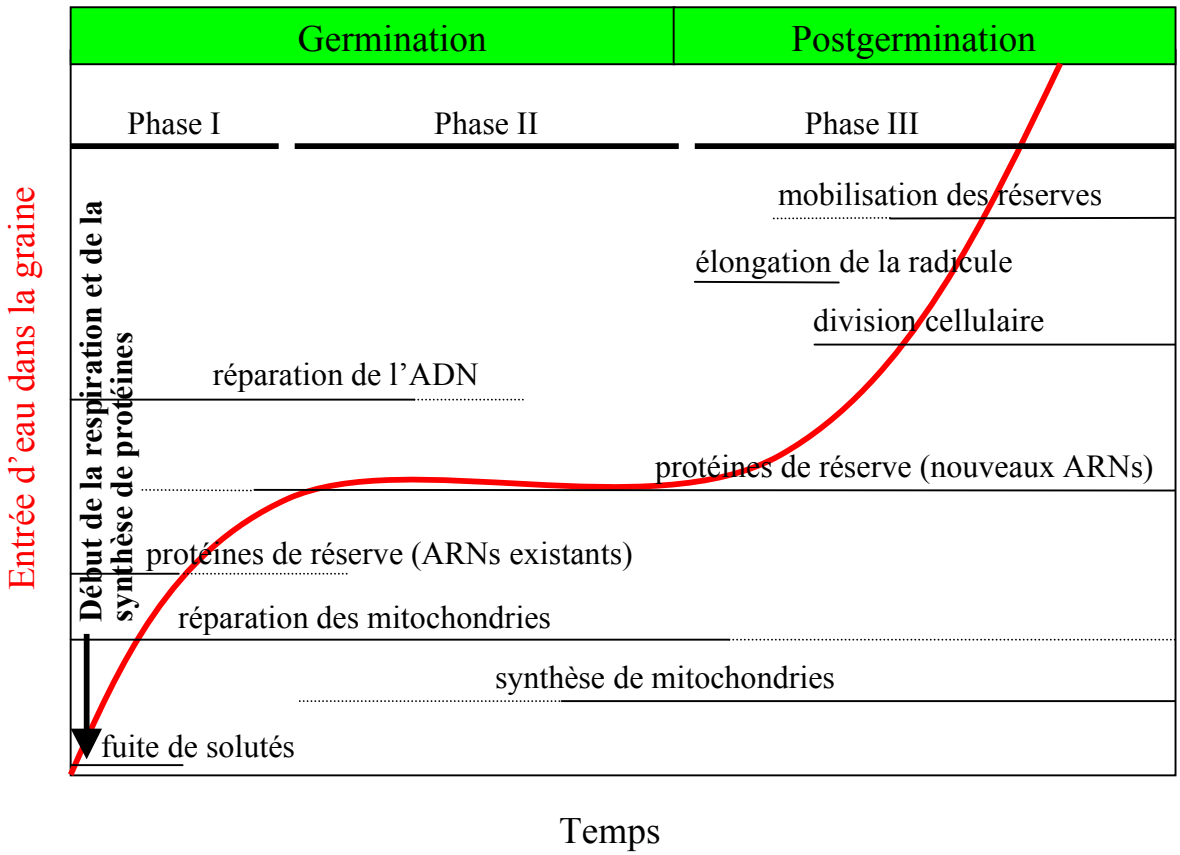


Figure 1.14 : Evénements physiologiques et cellulaires associés à la germination et à la croissance postgerminative. La durée dépend majoritairement des conditions de culture et de l'espèce.

D'après Bewley, 1997

inhibitrices de la germination, ou encore parce qu'ils constitueraient une barrière mécanique empêchant la sortie de la radicule (Bentsink and Koornneef, 2002). Cependant, Debeaujon et collaborateurs (2000) n'ont pas pu montrer que chez *Arabidopsis*, les téguments imposent la dormance en interdisant l'entrée d'eau dans les graines sauvages (Debeaujon et al., 2000).

Toutefois, un défaut au niveau de la structure et/ou de la pigmentation des téguments d'*Arabidopsis* affecte la dormance et la germination des graines, tout comme leur morphologie et leur longévité. Par exemple, les mutants *ban* (*banyuls*), *tt4* et *ttg1* (*transparent testa* et *transparent testa glabra*), déficients dans l'accumulation des flavonoïdes dans l'endothélium (la couche la plus interne de la testa), présentent une diminution de dormance, de même que les mutants de structure des téguments (Debeaujon et al., 2000).

1.4.3. Métabolisme de la graine en germination

1.4.3.1. Réhydratation de la graine

La levée de la dormance commence par l'entrée d'eau dans la graine sèche, ou imbibition, qui s'opère en trois phases. Tout d'abord, une réhydratation rapide (phase I), suivie d'un plateau (phase II), puis une nouvelle prise d'eau, qui n'a lieu qu'avec la germination. Les graines dormantes, qui n'accomplissent pas la germination, n'entrent pas en phase III (**figure 1.14**).

La phase I est le siège de perturbations structurales au niveau des membranes plasmiques. Cet influx d'eau conduit à une fuite de solutés et de petits métabolites hors de la graine. Ceci est caractéristique d'une transition d'état des composants phospholipidiques des membranes qui, d'une structure en gel dans la graine sèche, passent dans un état cristallin lors de la réhydratation (Bewley, 1997). Les dommages occasionnés par la dessiccation et la réhydratation nécessitent des mécanismes de réparation des membranes, des organelles, mais également de l'ADN. Chez le cotonnier, on assiste au cours de l'imbibition à une augmentation de la teneur en N-acétylphophatidyléthanolamine, un phospholipide qui pourrait aider les membranes à conserver leur intégrité (Bewley, 1997).

Cette phase permet l'activation du métabolisme de la graine. Le premier changement à opérer dès l'entrée d'eau dans la graine est la reprise de la respiration. L'activité métabolique de la graine, notamment le métabolisme des sucres, reprend également très rapidement, les enzymes étant certainement stockées dans la graine sèche. Les mitochondries présentes dans les graines sèches sont capables d'assurer une alimentation en ATP suffisante pour supporter le métabolisme plusieurs heures après le début de l'imbibition (Bewley, 1997). De plus, les synthèses protéiques sont facilitées car la graine renferme toute la machinerie nécessaire, en particulier des ARNm y sont accumulés (Rajjou et al., 2004). Cependant, les polysomes en sont absents et dans les premières minutes de l'imbibition, les ribosomes sont recrutés dans les complexes polysomaux de synthèse protéique (Bewley, 1997).

Au cours de la phase II, où la quantité d'eau est stationnaire, la synthèse de protéines ainsi que tous les mécanismes engagés en phase I continuent. Cette phase prépare la croissance cellulaire qui permettra l'allongement de l'axe embryonnaire.
La phase III correspond à l'élongation de la radicule et sa protrusion hors des téguments de la graine. Ceci signe l'accomplissement de la germination et les événements métaboliques et cellulaires qui y sont associés sont englobés dans l'appellation d'"événements post-germinatifs". D'après Grappin et collaborateurs (2000), l'ABA maintiendrait la dormance au cours de l'imbibition et serait ainsi le facteur qui régulerait l'entrée en phase III. En effet, ces auteurs ont démontré la présence d'une néosynthèse d'ABA dans les premières heures de l'imbibition chez *N. plumbaginifolia*, qui empêcherait l'accomplissement de la germination (Grappin et al., 2000)

1.4.3.2. Mobilisation des réserves

Lors de la germination, on assiste à la mobilisation des réserves accumulées dans les organes de stockage de la graine (cotylédons et albumen chez *Arabidopsis*) au cours de sa maturation. Leur dégradation apportera l'énergie nécessaire à la croissance de la plantule jusqu'à ce qu'elle devienne photoautotrophe. Dans ce processus, sont impliquées des enzymes de dégradation des carbohydrates, des protéines et des lipides. Cependant, une étude récente a prouvé l'existence de deux programmes distincts mis en place lors de l'imbibition. L'un, conduisant à la germination, est contrôlé par l'ABA tandis que l'autre impliquant la mobilisation des réserves n'est pas régulé par l'ABA. En effet, la présence d'ABA pendant l'imbibition n'inhibe pas complètement la dégradation des réserves des graines, même chez les graines incapables de germer (Pritchard et al., 2002) D'autres études apportent des précisions sur la régulation de la mobilisation des réserves : le contrôle s'effectuerait différemment dans l'embryon et dans l'albumen. L'ABA inhiberait effectivement le catabolisme lipidique dans l'embryon, par contre, la mobilisation des réserves lipidiques accumulées dans l'albumen serait essentiellement indépendante de l'ABA. Cependant, les GAs sont requises à la fois dans l'albumen et dans l'embryon (Penfield et al., 2004).

1.5. Dormance *versus* germination : une balance hormonale

1.5.1. Théorie de la balance hormonale

La théorie de la balance hormonale suppose que le maintien et la levée de dormance sont régulés par les actions simultanées de deux hormones aux actions antagonistes : l'ABA et les GAs. Le degré de dormance dépendrait alors du ratio entre les concentrations endogènes de ces composés respectivement promoteur et inhibiteur (Wareing and Saunders, 1971). Cependant, les études de Karssen et Laçka (1986) précisent ce concept, puisqu'il leur apparaît improbable que l'action promotrice de germination des GAs soit directement contrée par la teneur endogène en ABA (Karssen and Laçka, 1986). En outre,

chez les graines de *N. plumbaginifolia* imbibées dans une solution de GAs, le pic d'ABA visible à l'imbibition dans les conditions normales n'est pas présent, ce qui suggère un rôle actif des GAs dans le processus de germination (Grappin et al., 2000).

1.5.2. L'ABA induit la dormance et inhibe la germination

Chez *Arabidopsis*, l'approche génétique a été très efficace pour démontrer le rôle de l'ABA et des GAs dans la mise en place et la levée de la dormance respectivement. De nombreux mutants déficients pour la synthèse de l'ABA ou dans sa signalisation, notamment chez *Arabidopsis*, présentent une absence de dormance, démontrant ainsi le rôle crucial que joue l'ABA dans la mise en place de la dormance primaire au cours de la maturation des graines (Karssen and Laçka, 1986). De plus, chez *N. plumbaginifolia*, il a clairement été montré, par transgénèse, que plus la teneur en ABA de la graine est importante, plus la dormance est prononcée, et *vice versa* (Frey et al., 1999).

En 1983, Karssen et collaborateurs ont étudié l'influence de l'origine de l'ABA impliqué dans la mise en place de la dormance des graines d'*Arabidopsis* (Karssen et al., 1983). Ils ont réalisé ces expériences en utilisant les mutants *Ataba1* (initialement appelés *aba*) qui présentent une dormance réduite (Koornneef et al., 1982). Les résultats indiquent que l'ABA présent dans la graine en développement a deux origines. Le premier pic au milieu du développement est le plus important et est contrôlé par le génome maternel. La seconde fraction, d'origine embryonnaire, est synthétisée plus tardivement. Par des croisements réciproques, les auteurs ont déterminé que la dormance est induite seulement chez des graines qui possèdent de l'ABA embryonnaire, l'ABA maternel n'étant pas impliqué. De plus, l'ABA exogène est incapable d'induire la dormance de graines déficientes en ABA (Karssen et al., 1983). La dualité de l'origine de l'ABA a été observée également chez d'autres espèces, comme la tomate par exemple, où toutefois l'ABA maternel pourrait avoir un effet additif à l'ABA zygotique sur la dormance (Groot and Karssen, 1992). Il apparaît donc que pour être actif dans l'induction de la dormance, l'ABA doit être synthétisé près de son site d'action, c'est-à-dire dans l'embryon, et que son transport à partir d'une autre source ne semble pas adéquat (Karssen et al., 1983).

Cependant, l'ABA n'est pas le seul élément impliqué dans le maintien de la dormance des graines, puisque la quantité d'ABA présente dans une graine sèche d'*Arabidopsis* dormante n'est que 1,4 fois plus élevée que dans une graine non dormante. Il s'agit en effet d'un état complexe contrôlé par de nombreux facteurs (Finkelstein et al., 2002).

D'autres facteurs participent également à la levée de dormance des graines. L'un d'eux est le NO (nitric oxide). Plusieurs études, dont celle récemment menée par Bethke et collaborateurs (2004) ont montré que l'imbibition de graines dormantes en présence de NO réduisait la dormance et facilitait la germination. Ce rôle pourrait également être attribué au NO endogène, présent dans la graine. Le NO serait un agent de rupture de la dormance, dont les effets agiraient en amont de ceux de l'ABA (Bethke et al., 2004). De plus, il

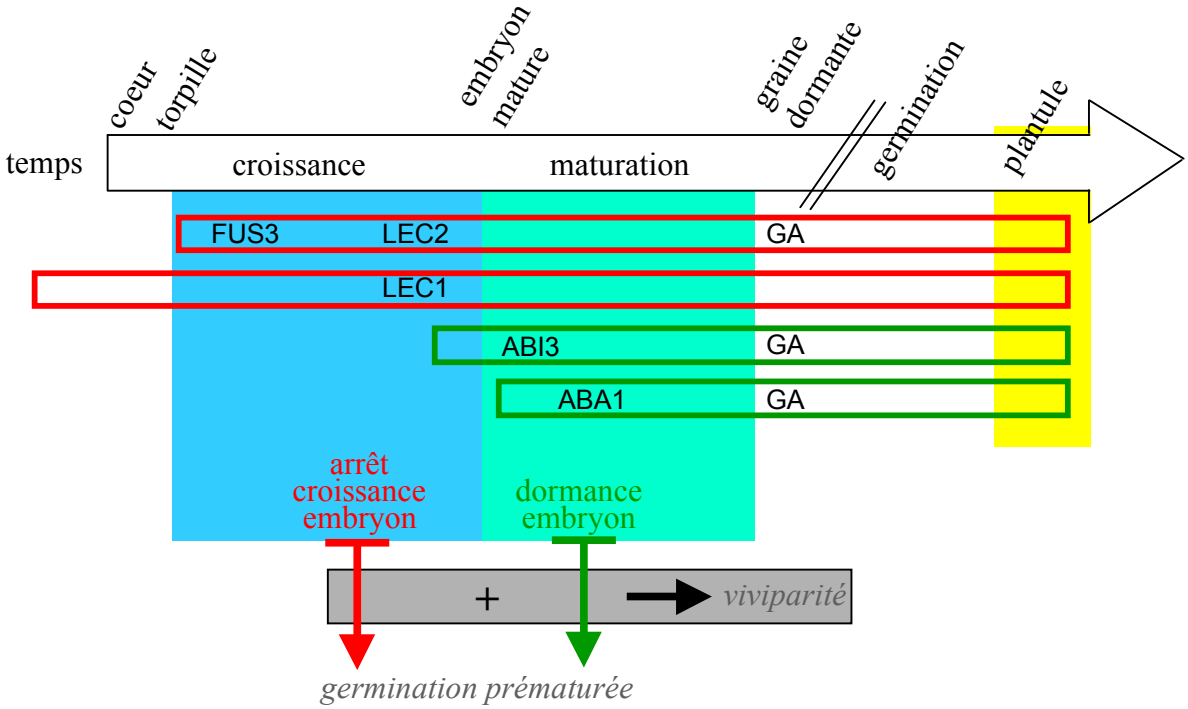


Figure 1.15 : Schéma séquentiel de l'arrêt du développement de l'embryon. Pendant la phase de croissance embryonnaire, l'expression de *FUS3*, *LEC1* et *LEC2* provoque l'arrêt de croissance. La mutation de ces gènes diminue cet arrêt de croissance. Au cours de la maturation de la graine, *ABI3* et *ABA1* induisent la dormance et l'inactivation de ces gènes résulte en une germination prématurée. La germination précoce est régulée par des voies de signalisation dépendantes et indépendantes des GAs. Les doubles mutants affectés à la fois dans l'arrêt de croissance embryonnaire et dans sa dormance sont vivipares. Les boîtes vertes et rouges indiquent l'expression des gènes ainsi que leur fonction.

D'après Raz et al., 2001

semblerait que l'effet du nitrate et du nitrite dans la levée de dormance des graines passerait par une production de NO (Bethke et al., 2004).

1.5.3. Facteurs développementaux associés à la signalisation par l'ABA

La germination précoce peut résulter de deux types de dysfonctionnements dans le programme morphogénétique. Tout d'abord, l'embryon entre dans une phase d'arrêt de croissance à la fin de l'embryogenèse, dans laquelle les gènes *FUS3* et *LEC1* sont impliqués (Cf § 1.3.2) (Raz et al., 2001). En effet, les mutants *fus3* et *lec1* présentent une germination prématurée des embryons immatures, d'origine différente de la dormance. Par contre, les mutants *aba1* et *abi3* germent également précocement, mais seulement à la fin de la maturation de l'embryon. Le contrôle de la dormance par l'ABA (*via* les gènes de biosynthèse de l'ABA et le gène *ABI3*) entrerait donc en jeu plus tardivement. Il s'ajouterait au contrôle développemental exercé par *LEC1* et *FUS3* dans le phénomène général d'arrêt de croissance puisque la combinaison des mutations dans ces deux gènes produit des graines vivipares (Raz et al., 2001) (**figure 1.15**).

La signalisation de l'ABA *via* un réseau complexe de régulateurs positifs et négatifs, implique des cascades de phosphorylation (McCourt, 1999) (Finkelstein et al., 2002). En particulier, des sérine/thréonine phosphatases interviennent dans la signalisation de l'ABA et les mutants correspondants présentent une sensibilité modifiée à l'ABA lors de la germination et une altération de la dormance. Parmi elles, des PP2C (protéine phosphatase de type 2C) comme ABI1, ABI2 et HAB1 en sont des régulateurs négatifs (Gosti et al., 1999) (Merlot et al., 2001) (Saez et al., 2004). Par contre le gène *RCN1*, qui code pour la sous-unité régulatrice d'une PP2A, serait un régulateur positif (Kwak et al., 2002). PKABA1, une protéine kinase impliquée dans ces cascades de phosphorylation est présente dans les graines dormantes. Chez le blé, elle phosphoryle la protéine TaABF, qui appartient à la famille des "ABRE binding factor" et s'exprime dans les graines (Johnson et al., 2002). Les études menées par cette équipe suggèrent qu'en réponse à l'ABA, la phosphorylation de TaABF médiée par la protéine PKABA1 conduirait à la suppression de l'expression de gènes impliqués dans le processus de germination et dans la germination elle-même. Ces deux protéines joueraient ainsi un rôle clef dans le maintien de la dormance des graines de blé.

La transduction du signal ABA requiert également la farnésylation de protéines faisant intervenir ERA1(ENHANCE RESPONSE TO ABA1), une farnesyl transferase qui serait elle aussi un régulateur négatif de la signalisation. En effet les mutants *era1* sont hypersensibles à l'ABA et germent tardivement (Cutler et al., 1996).

Enfin, d'autres éléments intervenant en amont de la signalisation de l'ABA ont été identifiés, dont la mutation confère également une hypersensibilité à l'ABA lors de la germination. Il s'agit de protéines intervenant dans le métabolisme des ARN, telles que HYPNOSTIC LEAVES1 (HYL1), ABA-HYPERSENSITIVE1 (ABH1) ou SUPERSENSITIVE TO ABA AND DROUGHT (SAD1). Il a été montré en particulier que HYL1 intervenait dans l'expression du

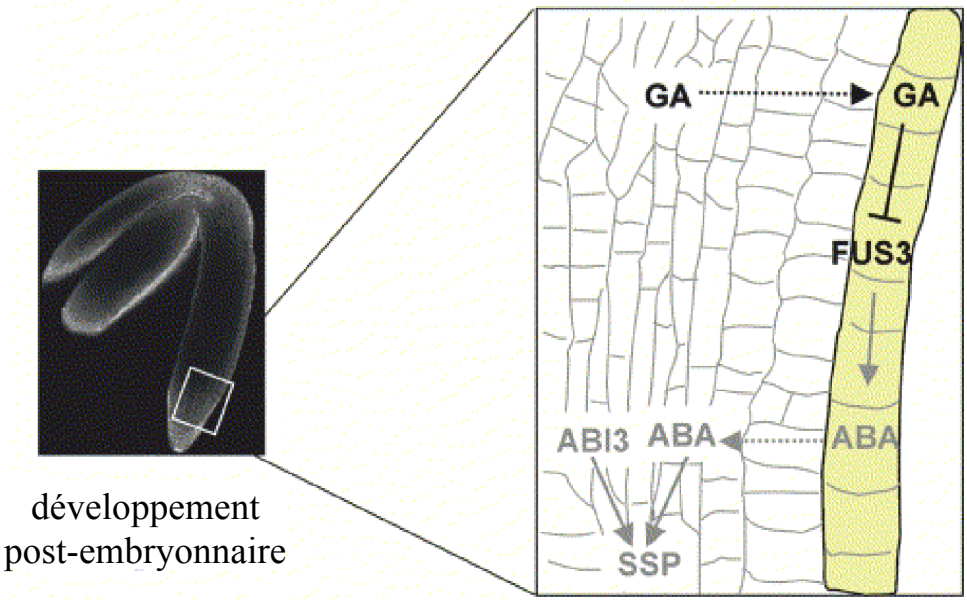


Figure 1.16 : Modèle d'action de FUS3 au cours du développement post-embryonnaire. FUS3 s'exprime dans l'embryon au cours de son développement post-embryonnaire. Au cours de l'imbibition, la quantité de GAs synthétisée par l'embryon augmente et migre dans l'épiderme où elles inhibent l'action de FUS3. Ainsi, le programme embryonnaire dépendant de FUS3 est réprimé et le programme végétatif se met en place.

D'après Gazzarrini et al., 2004

gène *ABI5* et SAD1 dans la régulation de la biosynthèse de l'ABA (Kuhn and Schroeder, 2003).

1.5.4. GAs, régulateurs positifs de la germination

1.5.4.1. La germination nécessite la synthèse de GAs

En accord avec leur implication dans la germination, les allèles forts des mutants déficients dans la biosynthèse des GAs chez *Arabidopsis* sont incapables de germer sans apport de GAs exogènes (Koornneef and van der Veen, 1980). De plus, une synthèse *de novo* de GAs a lieu pendant l'imbibition puisque des inhibiteurs de biosynthèse des GAs empêchent les graines de germer (Nambara et al., 1991). Au niveau moléculaire, des données récentes indiquent que lors de l'imbibition, on assiste à une forte synthèse de GAs dans l'embryon. Dans l'épiderme, ces GAs inhiberaient l'action de FUS3, ce qui réprimerait le programme embryonnaire régulé par l'ABA et permettrait la mise en place des processus de germination (Cf § 1.3.2) (Gazzarrini et al., 2004) (**figure 1.16**). Enfin, les GAs peuvent induire la germination de graines qui nécessitent pour cela de la lumière, du froid (stratification) ou l'after-ripening (stockage à sec). De tels facteurs environnementaux pourraient induire la synthèse de GAs pendant les premières phases de la germination (Bentsink and Koornneef, 2002).

L'effet positif du froid sur l'accumulation de GAs biologiquement actives a été démontré par Yamauchi et ses collaborateurs (2004). De nombreux gènes induits par les GAs seraient également induits par un traitement au froid lors de l'imbibition, de même que certains gènes participant à la biosynthèse des GAs. La répression des gènes impliqués dans le catabolisme des GAs interviendrait également dans l'augmentation de la teneur des graines en GAs actives au moment de la germination. De plus, le nombre de cellules de l'embryon accumulant les transcrits *AtGA3ox1* (codant pour la dernière enzyme de la biosynthèse des GAs) serait augmenté par le froid (Yamauchi et al., 2004).

La lumière est également essentielle dans le contrôle de la germination. Des études ont prouvé que la synthèse de GAs est dépendante de la lumière puisque notamment chez *Arabidopsis*, la lumière induit l'accumulation des transcrits de gènes de biosynthèse des GAs lors de l'imbibition (Yamaguchi and Kamiya, 2002). Ces auteurs ont également effectué une intéressante observation : la corrélation entre les tissus photoréceptifs et les tissus siège de la biosynthèse des GAs confirme que la stimulation de la synthèse des GAs par la lumière serait impliquée au moins en partie dans la germination des graines (Yamaguchi and Kamiya, 2002).

1.5.4.2. Modes d'actions des GAs

Deux modes d'action des GAs ont été proposés pour le contrôle de la germination. Le premier serait une action inductrice des gènes impliqués dans l'affaiblissement des barrières physiques à la germination, telles que l'albumen. En effet, les embryons qui présentent une

dormance tégumentaire doivent nécessairement développer des moyens pour les affaiblir. Chez la tomate ainsi que chez le tabac, des enzymes de dégradation des parois cellulaires ont été mises en évidence, qui faciliteraient la protrusion de la radicule. Chez la tomate, ces enzymes sont, par exemple, des endo-β-mannanases et sont spécifiquement exprimées dans l'albumen où elles participent à la dégradation des parois cellulaires (Nonogaki and Morohashi, 1996). Chez le tabac, l'expression de la β-1,3-glucanase sous le contrôle d'un promoteur répondant à l'ABA augmenterait son activité et faciliterait la rupture de l'albumen (Koornneef et al., 2002) (Leubner-Metzger, 2002). Cela n'a pas été mis en évidence chez *Arabidopsis* jusqu'à maintenant. Cependant, Debeaujon et Koornneef (2000) ont montré que les embryons déficients en GAs germent lorsqu'ils sont débarrassés de leurs téguments. De plus, les doubles mutants *tt* et *ga* sont capables d'accomplir la germination en l'absence de GAs exogènes. Ces données laissent penser que l'affaiblissement de la testa est suffisant pour permettre la germination en l'absence de GAs, et que les GAs seraient impliquées dans cette action (Debeaujon and Koornneef, 2000).

Le second mécanisme serait un effet stimulateur direct des GAs sur le potentiel de croissance de l'embryon (Karssen et al., 1989), nécessaire pour contrer la contrainte mécanique que sont les enveloppes. L'ABA inhiberait cet effet (Debeaujon and Koornneef, 2000). En accord avec cette hypothèse, le gène *AtEPR1* a été isolé lors d'un crible de "promoter-trapping" chez *Arabidopsis* (Dubreucq et al., 2000). Il code pour une protéine extensin-like qui, sous le contrôle des GAs, est spécifiquement exprimée dans l'albumen lors de la germination. Cependant, son implication dans l'accomplissement de la germination n'a pas été démontrée.

1.5.4.3. Signalisation des GAs associée à la germination

Les protéines à domaine DELLA, qui font partie de la famille de facteurs de transcription GRAS, sont au nombre de 5 chez *Arabidopsis* : GAI (GA insensitive), RGA (repressor of *ga1-3*), RGL1 (RGA-like), RGL2 et RGL3. Des études réalisées par plusieurs équipes ont montré que RGL2 est un régulateur négatif majeur de la réponse aux GAs, qui agit spécifiquement dans le contrôle de la germination. En effet, la mutation *rgl2* est capable d'induire la germination des mutants *ga1-3*, déficients en GAs (Lee et al., 2002) (Tyler et al., 2004). Au niveau moléculaire, il semblerait que les GAs induisent la germination selon deux moyens d'action : la réduction de la quantité de transcrits *RGL2* et l'induction de la dégradation des protéines RGL2. Cette dégradation implique un mécanisme de protéolyse dans lequel serait impliqué SLY (SLEEPY), une protéine F-box appartenant au complexe SCF-E3 ubiquitin ligase de dégradation des protéines par le protéasome (Tyler et al., 2004). Notons que le mutant *sly*, tout comme *rgl2*, est insensible aux GAs.

Le mutant *spy* (*spindly*) semble également intervenir dans la transduction du "signal GAs" en tant que régulateur négatif. SPY code pour une protéine ayant des similarités avec les O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) transferases (OGTs) dans son extrémité C-

terminale, dont les substrats chez les animaux seraient des résidus sérine ou thréonine, pouvant modifier l'activité des protéines cibles. Dans la partie N-terminale, SPY possède des répétitions TPR (tetratricopeptide), nécessaires pour les interactions protéine-protéine. Les protéines cibles de SPY ne sont pas identifiées à ce jour mais des candidats potentiels pourraient être les protéines DELLA (Thomas and Sun, 2004) dans la mesure où la mutation spy est capable de supprimer certains des phénotypes présentés par le mutant *gai* (Swain et al., 2001).

1.6. Dormance et germination : un cross-talk hormonal

Souvent, des mutations perturbant la réponse d'une plante à une hormone spécifique causent une sensibilité modifiée à plusieurs autres hormones. En effet, des perturbations génétiques altérant ce type de signalisation peuvent induire des changements dans la synthèse ou la dégradation de ces autres hormones. Ou bien deux voies de transduction hormonale peuvent partager certains composants signalétiques, de sorte qu'une seule mutation peut interrompre les deux. Les voies de signalisation hormonales constitueraient ainsi un réseau complexe de transfert d'informations qui permettrait à différents stimuli d'engendrer des réponses partiellement identiques et chevauchantes (Chow and McCourt, 2004). Ainsi, plusieurs hormones sont impliquées dans la physiologie de la graine, notamment en ce qui concerne la mise en place de la dormance et la germination.

Dans le but d'identifier de nouveaux régulateurs de la réponse à l'ABA, Beaudoin et collaborateurs (2000) et Ghassemian et collaborateurs (2000) ont montré l'implication de l'éthylène dans la germination de la graine : l'éthylène régulerait négativement la dormance en inhibant l'action de l'ABA (Beaudoin et al., 2000) (Ghassemian et al., 2000). Si une première étude suggérait que cette inhibition ne passait que par une inhibition de la signalisation de l'ABA (Beaudoin et al., 2000), l'étude du mutant *ein2* a montré que la sensibilité de la graine à l'éthylène est également liée à la synthèse d'ABA. En effet, la réduction de la réponse à l'éthylène induit la synthèse d'ABA, qui à son tour augmente la dormance de la graine (Ghassemian et al., 2000).

Il a été montré que les sucres comme le saccharose et certains hexoses inhibent le développement des jeunes plantules indépendamment de leur effet osmotique. Sur ce critère, un certain nombre de mutants déficients ou insensibles à l'ABA ont été isolés, comme *sis4* (*sugar insensitive4*), allélique à *aba2* ou *sis5* (*sugar insensitive5*) et *sun6* (*sucrose uncoupled6*), allèles d'*abi4* (Laby et al., 2000) (Huijser et al., 2000). Ces résultats indiquent que le contrôle de la germination implique à la fois l'ABA et les sucres. De plus, la présence d'un cross talk entre la signalisation des sucres et l'éthylène est suggérée par l'insensibilité au sucre du mutant *ctr* (constitutive triple response), également hypersensible à l'ABA (Beaudoin et al., 2000). Cependant, des études récentes réfutent cette interaction sucre-éthylène lors de la germination. En effet, les mutants de signalisation de l'éthylène ou des GAs ne voient pas leur sensibilité au glucose affectée, contrairement à ce qui se produit

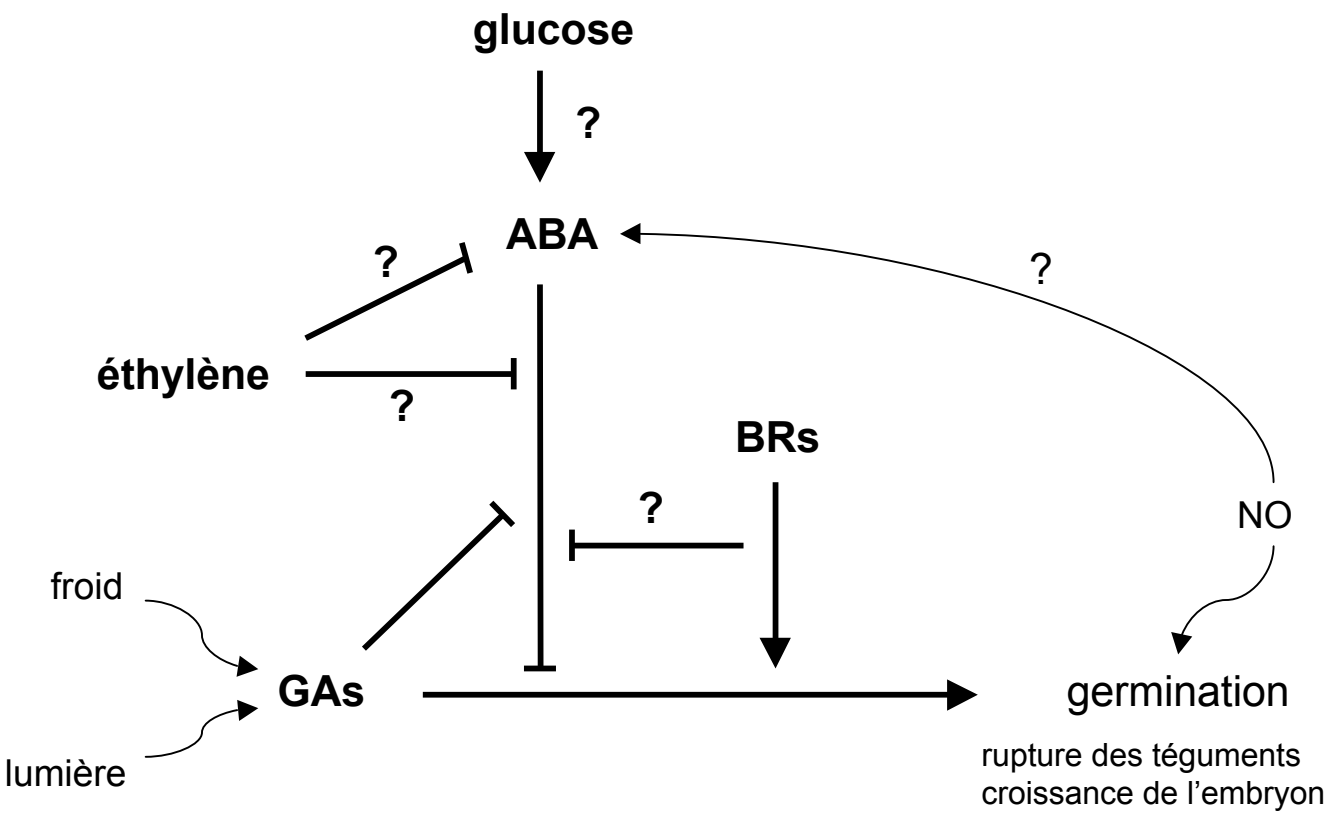


Figure 1.17 : Interactions hormonales et principaux régulateurs menant à la germination de la graine d'*Arabidopsis*. Les brassinostéroïdes (BRs) et les gibberellines (GAs) sont des activateurs directs de la germination ; l'acide abscissique (ABA) inhibe la germination ; l'éthylène en est un activateur indirect puisqu'il inhibe l'action de l'ABA.

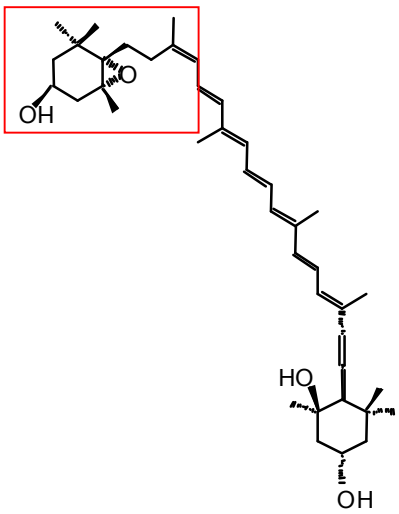
lors de la croissance des jeunes plantules (Dekkers et al., 2004). La seule hormone à intervenir dans le retardement de la germination en réponse au glucose pourrait être l'ABA. En effet, les sucres réduisent le taux de germination des graines sauvages. De plus, la quantité de glucose exogène semble moduler la teneur en ABA de la graine, par la diminution de sa dégradation (Price et al., 2003). Il existerait donc deux voies de signalisation distinctes faisant intervenir la signalisation par les sucres : une inhibant la germination, l'autre inhibant le développement des jeunes plantules (Dekkers et al., 2004).
Les brassinostéroïdes (BRs) sont des hormones impliquées dans la promotion de la germination. Cependant, aucun phénotype relatif à la germination, dans des conditions normales de culture, n'a pu être observé dans les mutants *det2* (*de-etiolated2*) et *bri1* (*BR insensitive1*), déficients dans la synthèse et dans la perception des BRs respectivement. Toutefois, ces mutants présentent une plus grande sensibilité à l'ABA et sont capables d'induire partiellement la germination de mutants déficients ou insensibles aux GAs (Steber and McCourt, 2001). Steber et McCourt (2001) suggèrent que les BRs ne font que stimuler l'élongation de l'hypocotyle lors du processus de germination. Le rôle des GAs dans l'induction de la germination ne peut donc résulter simplement d'une augmentation de la teneur en BRs ou de sa sensibilité (Steber and McCourt, 2001). GPA1, une sous-unité α d'une protéine G chez *Arabidopsis*, serait impliquée dans la signalisation des BRs et potentialiserait l'induction de la germination par les GAs (Ullah et al., 2002). De plus, GPA1 interagit physiquement avec la protéine AtPirin1 (une protéine possédant un domaine cupin) et ensemble, jouent un rôle positif dans l'induction de la germination et dans le développement de la plantule. Pour cela, AtPirin1 agirait en aval de GPA1, comme inhibiteur de l'action négative de l'ABA sur la germination et / ou en activant la signalisation menant à la germination de la graine (Lapik and Kaufman, 2003). La **figure 1.17** récapitule l'ensemble de ces interactions hormonales menant au processus de germination.

L'ABA est impliqué dans de nombreux processus au cours du développement de la graine et de sa germination. Ces phénomènes sont contrôlés de façon très précise par différentes voies où interviennent des facteurs de régulation, qui modulent au sein de la graine, l'action de l'ABA dans le temps et dans l'espace. La teneur en ABA peut être régulée par le taux de synthèse de ses précurseurs, son catabolisme, ou son transport d'un site à un autre. Comprendre la biosynthèse de l'ABA pourrait donc être un moyen de contrôler le niveau d'hormone active et ainsi de participer à la régulation de la physiologie de la graine.

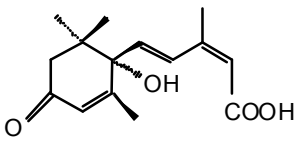
1.7. Biosynthèse de l'ABA

1.7.1. La voie indirecte

La structure de l'ABA a été découverte en 1965 : il s'agit d'un sesquiterpène (C_{15}). Les chercheurs étaient alors partagés entre deux voies de biosynthèse possibles chez les



9'-*cis*-néoxanthine



acide abscissique

Figure 1.18 : Similarité entre la structure terminale des xanthophylles (9'-cis-néoxanthine) et l'ABA.

plantes : la voie directe, dans laquelle l'ABA dériverait d'un précurseur en C_{15}, le farnésyl pyro-phosphate (FPP) et la voie indirecte, où l'ABA serait un produit de clivage des caroténoïdes en C_{40} (Zeevaart and Creelman, 1988). Plusieurs données étaient en faveur de la deuxième hypothèse. Tout d'abord, la structure cyclique terminale de certains caroténoïdes oxygénés (xanthophylles) est proche de celle de l'ABA (**figure 1.18**). Creelman et Zeevaart (1984) ont également rapporté que des feuilles de haricot en état de stress hydrique incorporaient un seul atome d'$^{18}O_2$ sur le groupement carboxyle de l'ABA. Il était donc envisageable que les autres atomes d'oxygène soient déjà présents dans un précurseur tel qu'un xanthophylle (Creelman and Zeevaart, 1984). De plus, certains mutants vivipares de maïs comme *vp2*, *vp5* et *vp9* par exemple, ont été caractérisés pour leur incapacité à synthétiser certains caroténoïdes. Leurs parties aériennes sont albinos et les plantes sont incapables de produire de l'ABA. Toutefois, l'application exogène d'ABA ne suffisait pas à reverser l'ensemble des phénotypes du fait du rôle crucial des caroténoïdes dans le fonctionnement des photosystèmes. Enfin, le norflurazon et la fluridone, inhibiteurs de la biosynthèse des caroténoïdes, bloquent également la synthèse d'ABA. La somme de ces données était bien en faveur d'un précurseur xanthophylle de l'ABA (Zeevaart and Creelman, 1988).

Des expériences menées par Li et Walton (1990) avaient par ailleurs montré qu'un stress hydrique chez des feuilles de haricot poussées à l'obscurité était accompagné d'une diminution de la 9'-*cis*-néoxanthine et de la 9-*cis*-violaxanthine, alors que concomitamment, une augmentation de la quantité d'ABA ainsi que de ses métabolites était observée (Li and Walton, 1990). Ainsi, la 9'-*cis*-néoxanthine et la 9-*cis*-violaxanthine semblaient effectivement être les xanthophylles en C_{40} précurseurs de l'ABA.

1.7.2. La voie du glyceraldéhyde phosphate/pyruvate

Chez les animaux, les isoprénoïdes sont produits à partir d'isopentényl pyrophosphate (IPP, C_5). Deux voies de biosynthèse ont été décrites pour la formation de ce précurseur : celle du mévalonate, décrite chez les mammifères et la levure et celle des trioses phosphates, trouvée chez les bactéries et les algues vertes. Lichtenthaler et collaborateurs (1997), par des expériences de marquage, ont apporté la preuve que les caroténoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes à partir d'IPP provenant du pyruvate et du glyceraldéhyde phosphate, alors que les stérols, produits dans le cytoplasme et dans le réticulum endoplasmique proviennent du mévalonate (Lichtenthaler et al., 1997).

1.7.3. De C5 à C40

Dans les plastes, l'IPP est l'unité élémentaire à l'origine des xanthophylles. Par addition et isomérisation de molécules d'IPP, un composé en C_{20} est formé, le géranylgéranylpyrophosphate (GGPP) par l'IPP isomérase (IDI) et la GGPP synthase (GGPS) (**figure 1.19**). La phytoène synthase (PSY) catalyse l'assemblage de deux molécules de GGPP pour former le phytoène (C_{40}) qui, après désaturation (catalysée par la

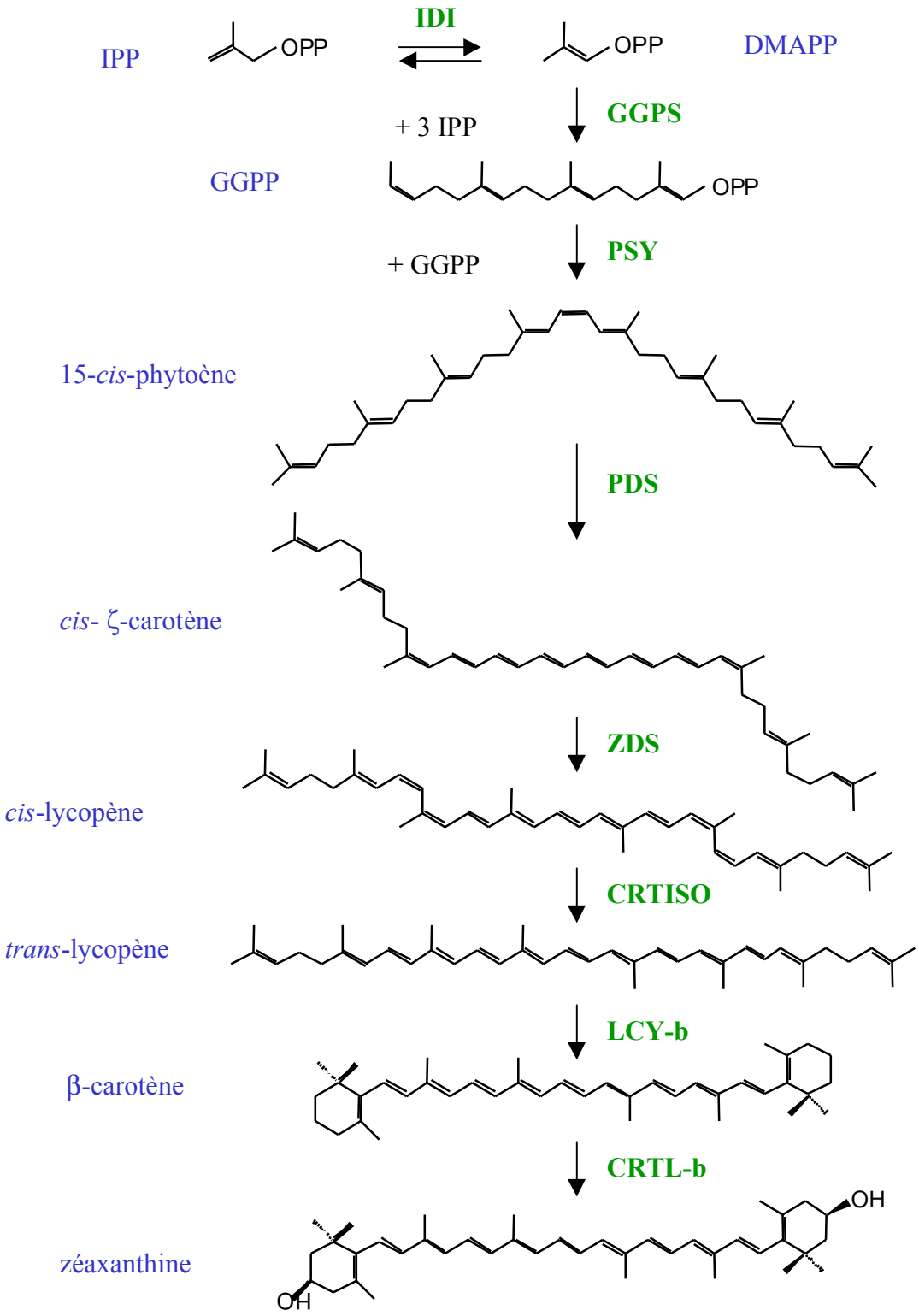


Figure 1.19 : Voie de biosynthèse des caroténoïdes dans les plantes menant à la formation de zéaxanthine, spécifique de l'ABA. IPP, isopentényl pyrophosphate ; DMAPP, diméthyllalyl pyrophosphate ; GGPP, géranygéranyl pyrophosphate ; IDI, IPP isomérase : GGPS, géranygéranyl pyrophosphate synthase ; PSY, phytoène synthase ; PDS, phytoène désaturase ; ZDS, ζ-carotène désaturase : CRTISO, caroténoïde isomérase ; LCY-b, lycopène β-cyclase ; CRTL-b, β-carotène hydroxylase.

phytoène désaturase, PDS), deviendra le lycopène. Ce dernier sera à l'origine du β-carotène quand la lycopène β-cyclase (LCY-b) aura catalysé la formation de deux cycles β à chacune de ses extrémités. Enfin, l'hydroxylation (catalysée par la β-carotène hydroxylase, CTRL-b) de ce composé conduit à la formation de la zéaxanthine, premier xanthophylle spécifique de la voie de biosynthèse de l'acide abscissique (**figure 1.19**) (Liotenberg et al., 1999).

1.7.4. ZEP

1.7.4.1. Caractérisation biochimique

Une série allélique de mutants d'*Arabidopsis* a été identifiée lors d'une sélection de révertants phénotypiques de la mutation *ga1* de déficience dans la synthèse des gibbérellines, capables de germer sans addition de GAs dans le milieu de culture (Koornneef et al., 1982). Il s'agissait d'un caractère récessif et monogénique. L'étude de ces mutants *aba* (plus tard appelés *aba1*) a montré qu'ils présentaient les caractères typiques de la déficience en ABA : une réduction importante de la dormance, une plus grande perte d'eau par évapo-transpiration, ainsi qu'une teneur en ABA réduite, tant dans les parties aériennes que dans les graines en développement. Cependant, les feuilles restaient vertes, ce qui impliquait une mutation dans une enzyme spécifique de la voie de biosynthèse de l'ABA, et non dans une étape plus en amont de la biosynthèse des caroténoïdes. De plus, tous les phénotypes observés étaient réversibles par des applications exogènes d'ABA (Rock and Zeevaart, 1991).

La comparaison qualitative et quantitative des caroténoïdes présents dans les feuilles des mutants *aba* et des sauvages par HPLC a permis de mettre en évidence une réduction des époxycaroténoïdes majeurs que sont la *trans*-violaxanthine et la 9'-*cis*-néoxanthine, ainsi qu'une accumulation de la zéaxanthine (précurseur de l'anthéraxanthine, de la violaxanthine et de la néoxanthine) et du β–carotène (précurseur de la zéaxanthine) en contexte mutant (Rock and Zeevaart, 1991). Duckham et collaborateurs (1991) ainsi que Rock et collaborateurs (1991) ont donc montré que l'étape catalysée par cette enzyme est l'époxydation de la zéaxanthine en violaxanthine *via* la formation d'anthéraxanthine (**figure 1.20**) (Duckham et al., 1991) (Rock and Zeevaart, 1991).

1.7.4.2. Caractérisation moléculaire

Le gène *ZEP* a été cloné pour la première fois chez *Nicotiana plumbaginifolia*, dans des plantes transgéniques contenant l'élément transposable *Ac* de maïs. (Marin et al., 1996). Parmi des mutants sélectionnés pour l'insertion de ce transgène dans leur génome, une lignée présentait les mêmes phénotypes ainsi que les mêmes perturbations dans sa composition en caroténoïdes que celles décrites pour les mutants *aba1* d'*Arabidopsis* (Koornneef et al., 1982) (Duckham et al., 1991) (Rock and Zeevaart, 1991). L'ADNc du gène *NpABA2*, obtenu par le criblage d'une banque d'ADNc, a une longueur de 2,4 kb. Il code une

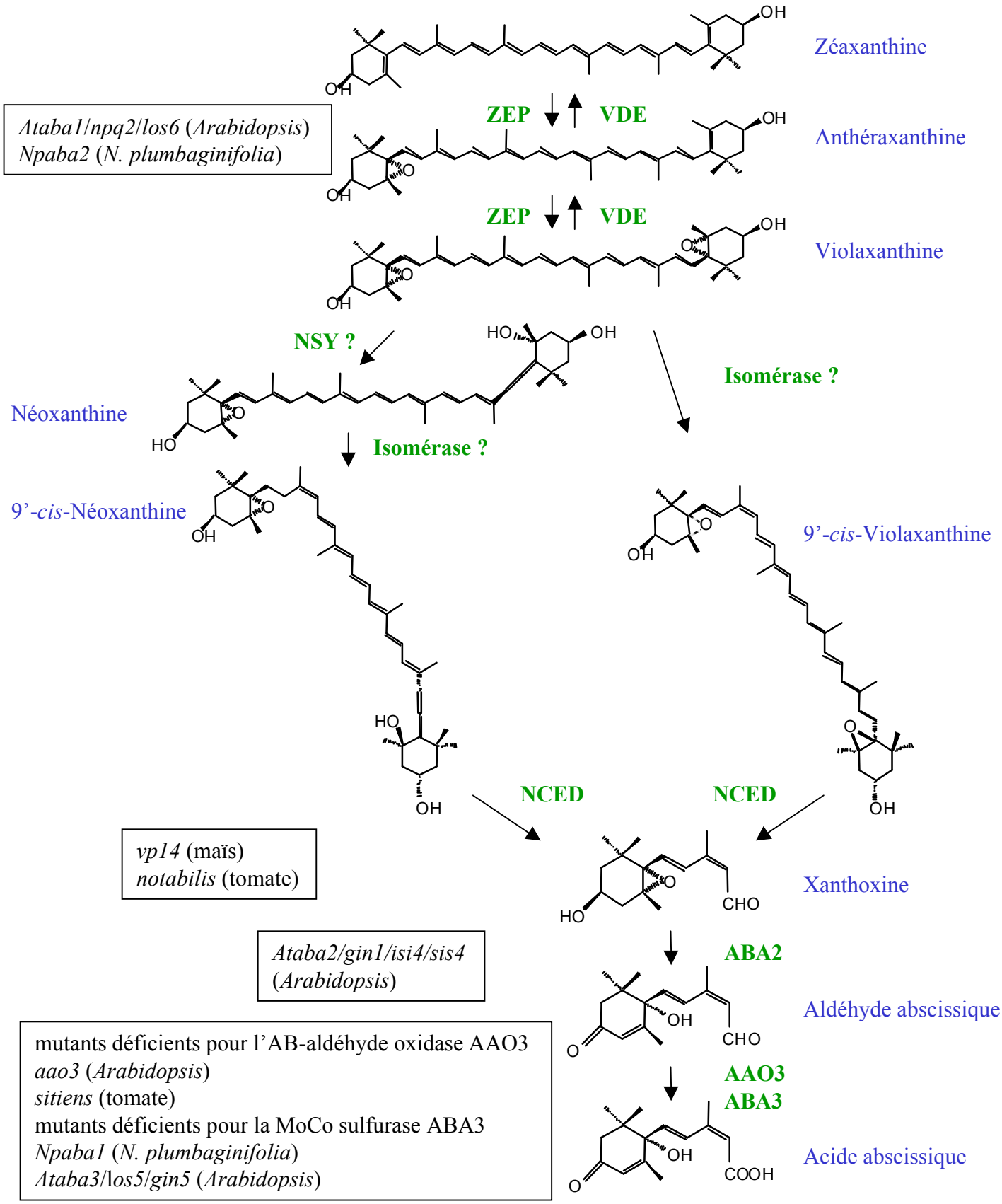


Figure 1.20 : Biosynthèse de l'ABA. ZEP, zéaxanthine époxydase ; VDE, violaxanthine dé-epoxydase ; NSY, néoxanthine synthase ; NCED, 9-*cis*-époxycaroténoïde dioxygénase ; ABA2, déshydrogénase à courte chaîne ; AAO, AB-aldéhyde oxydase.

D'après Nambara et Marion-Poll, 2005

protéine de 72 kDa qui possède un site de liaison au FAD très conservé. Marin et collaborateurs (1996) ont également montré par des analyses de type Southern que le gène *ZEP* semble présent en une seule copie dans le génome de *N. plumbaginifolia*, ainsi que chez *Arabidopsis* (Marin et al., 1996) (Audran et al., 2001).

L'analyse de la séquence de la protéine ZEP montre qu'elle présente des similarités de séquences avec des protéines d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas paucimobilis* impliquées dans l'hydroxylation ou l'oxydation de cycles aromatiques. Ceci correspond à son activité présumée puisque la zéaxanthine, substrat de la ZEP, possède un noyau cyclohexane. De plus, conformément à son rôle présumé, elle est importée dans les chloroplastes où sont accumulés les caroténoïdes et la protéine recombinante catalyse *in vitro* l'époxydation de la zéaxanthine en anthéraxanthine puis violaxanthine (Bouvier et al., 1996) (Marin et al., 1996).

Enfin, la complémentation phénotypique des mutants *aba2* de *N. plumbaginifolia* et *aba1* d'*Arabidopsis* par l'ADNc de *NpABA2*, mais également d'*AtZEP* sous le contrôle de promoteur *35S* du virus de la mosaïque du chou-fleur, a apporté la preuve que ces deux mutants sont affectés dans la synthèse de la ZEP et que ces deux gènes sont orthologues (Marin et al., 1996) (Audran et al., 2001).

1.7.4.3. Expression

1.7.4.3.1. Rythme ciracadien

La *ZEP* s'exprime de façon ubiquitaire dans la plante, mais le niveau des transcrits varie en fonction des organes. Il est en effet plus important dans les parties aériennes et les tiges que dans les racines ou les graines (Audran et al., 1998) (Audran et al., 2001).

Dans les parties aériennes de *N. plumbaginifolia*, d'*Arabidopsis* et de tomate, les transcrits *ZEP* sont soumis à une fluctuation diurne : l'ARNm de *ZEP* s'accumule dans les premières heures de lumière (3 à 5 heures) et diminue jusqu'à atteindre son minimum pendant la période de nuit, avec une légère augmentation 30 minutes avant le début de la nouvelle phase de jour (Audran et al., 1998) (Thompson et al., 2000a) (Audran et al., 2001). Cependant, il est important de noter que le niveau des protéines ZEP n'est soumis à aucune variation tout au long de la journée. Les oscillations circadiennes observées dans l'expression du gène *ZEP* sont coordonnées avec celles observées pour les ARNm des gènes codant le complexe LHCII (light harvesting complex II). Comme les xanthophylles sont associés aux photosystèmes dans les tissus chorophylliens, cette variation pourrait refléter l'expression coordonnée des gènes impliqués dans le fonctionnement des photosystèmes (Audran et al., 1998).

1.7.4.3.2. Stress hydrique

En réponse à un stress hydrique, il a été montré que la quantité d'ABA augmente à la fois dans les parties aériennes de la plante et dans les racines (Zeevaart and Creelman, 1988),

alors que le niveau d'expression du gène *ZEP* de tomate, de pois protéagineux et de *N. plumbaginifolia* ne change pas dans les parties aériennes. La diminution constatée par les auteurs ne correspond en fait qu'au rythme circadien auquel est soumis le gène (Audran et al., 1998) (Iuchi et al., 2000) (Thompson et al., 2000a). Cependant, Xiong et collaborateurs ont montré une importante augmentation de l'expression du gène *ZEP* dans les feuilles d'*Arabidopsis* en réponse à différents types de stress (hydrique, osmotique, salin), de même qu'après application d'ABA exogène. Ces auteurs suggèrent qu'il pourrait exister une boucle de régulation positive par laquelle une augmentation initiale d'ABA permettrait une plus grande production de cette hormone par stimulation des gènes de biosynthèse, afin de mieux répondre au stress (Xiong et al., 2002). Cependant, le pool de xanthophylles précurseurs d'ABA étant très important dans les feuilles, il n'est vraisemblablement pas limitant lors de la synthèse d'ABA, même en cas de stress hydrique. La ZEP ne semble donc pas être l'étape régulatrice de la biosynthèse de l'ABA dans les parties aériennes.

L'étude réalisée par Borel et collaborateurs (2001) sur des plantes transgéniques de *N. plumbaginifolia* exprimant le gène *ZEP* sous contrôle du promoteur *35S* en orientation sens et antisens en apporte une nouvelle preuve. En effet, aucune différence concernant la taille de la plante, le besoin d'eau ou la perte d'eau par évapotranspiration n'a été observée entre les plantes sauvages et les plantes transgéniques. Ceci pourrait en effet être dû à l'expression très importante du gène *ZEP* dans les tissus végétatifs en contexte sauvage.

Par contre, dans les racines, le pool de xanthophylles est très réduit par rapport à celui présent dans les parties aériennes. La ZEP pourrait donc y être limitante pour la production d'ABA en cas de stress. En accord avec cette hypothèse, l'expression du gène *ZEP* est considérablement augmentée en condition de déshydratation dans les racines de tomate, de tabac et d'*Arabidopsis* (Thompson et al., 2000a) (Audran et al., 1998) (Audran et al., 2001) et ceci en corrélation avec l'augmentation de la teneur en ABA. Ces observations suggèrent que l'induction de la ZEP est nécessaire pour l'induction de la synthèse de l'ABA en cas de stress dans les racines (Borel et al., 2001).

1.7.4.3.3. Graines en développement

Dans des graines d'*Arabidopsis*, Karssen et collaborateurs (1983) ont montré que la quantité d'ABA augmente au cours de la maturation de la graine, présente un pic d'accumulation à environ un tiers de son temps de développement, puis diminue au moment de la dessiccation de la graine (Karssen et al., 1983). De plus, l'ABA s'accumule d'abord dans les tissus d'origine maternelle (téguments), puis dans les tissus embryonnaires, où il est impliqué dans la mise en place de la dormance (Karssen et al., 1983).

Les données d'expression de la *ZEP* de *N. plumbaginifolia* sont en accord avec le niveau d'ABA dans la graine, bien qu'on n'ait aucune idée du ratio ABA maternel/ABA embryonnaire (Audran et al., 1998). Chez *Arabidopsis* le patron d'accumulation spatio-temporel du transcrit *ZEP* est corrélé à celui de l'ABA puisque pendant la maturation de la graine, l'ARNm est détecté dans les tissus maternels (téguments de la graine), mais également dans l'embryon

et l'albumen, en corrélation avec la quantité importante d'ABA mesurée à ce stade (Audran et al., 2001). Il serait impliqué dans l'accumulation des protéines de réserves et l'induction des gènes *LEA*. Pendant la phase de dessiccation, l'ARNm de la *ZEP* est fortement détecté dans l'embryon et l'albumen résiduel mais est absent des tissus maternels. Ceci conforte les données de Karssen et collaborateurs (Karssen et al., 1983) selon lesquels l'ABA synthétisé en fin de maturation, d'origine embryonnaire, est impliqué dans le maintien de la dormance primaire, l'inhibition de la croissance embryonnaire et empêche l'expression d'enzymes hydrolytiques. Les données de Frey et collaborateurs (1999, 2004) renforcent cette hypothèse puisque la greffe de plantes déficientes en ABA sur des plantes sauvages restaurent une croissance végétative normale mais les graines descendant de ces plantes présentent toujours une réduction de leur dormance primaire. De plus, des plantes transgéniques surexprimant la *ZEP* sous le contrôle du promoteur endogène présentent une accumulation du transcrit conduisant à une plus grande teneur en ABA dans les graines ainsi qu'à une dormance des graines plus prononcée (Frey et al., 1999) (Frey et al., 2004)
L'expression du gène *ZEP* est donc en bonne corrélation avec le profil d'accumulation de l'ABA au cours du développement embryonnaire. Elle peut donc être considérée comme une étape régulatrice de la biosynthèse de l'ABA dans la graine.

1.7.4.3.4. Photoprotection et VDE : le cycle des xanthophylles

Les xanthophylles jouent un rôle dans la protection des organismes photosynthétiques contre certains effets toxiques de la lumière. En effet, certains herbicides sont en fait des inhibiteurs de biosynthèse des caroténoïdes. Par exemple, des plantes traitées au norflurazon, un inhibiteur de phytoène désaturase, présentent un phénotype albinos.
La VDE (la violaxanthine de-époxydase) catalyse les réactions inverses de la ZEP et est décrite comme participant à la photoprotection des plantes. Sous haute intensité lumineuse, la violaxanthine est rapidement convertie en zéaxanthine, via la formation d'anthéraxanthine. Cette de-époxydation est catalysée par la VDE. Dans des conditions de faible intensité lumineuse, la réaction inverse est observée, catalysée par la ZEP. Ces deux réactions, constituent le cycle des xanthophylles (Liotenberg et al., 1999). Cependant, l'activation de la VDE lors d'un stress lumineux ne semble pas limiter la synthèse d'ABA, même en association avec un stress hydrique (North, H. *et al.,* sous presse). Le cycle des xanthophylles n'a donc a priori aucun rôle dans la régulation de la synthèse d'ABA.

1.7.5. Origine des composés en C15 : les 9-*cis*-époxycaroténoïdes

1.7.5.1. La xanthoxine, premier composé en C_{15}

Il a été proposé que la synthèse d'apocaroténoïdes (C_{15}) à partir des caroténoïdes (C_{40}) est effectuée par clivage oxydatif de la chaine polyène. Il existe une similarité structurale entre la xanthoxine (C_{15}) et les xanthophylles (C_{40}). Ceci suggère que la xanthoxine, précurseur de l'ABA (Sindhu and Walton, 1987), serait un produit de clivage des xanthophylles. En accord

avec cette hypothèse, Parry et collaborateurs (1988) ont montré, en donnant de la xanthoxine marquée à des feuilles de tomate soumises à un stress hydrique, qu'elle est un précurseur de l'ABA et dérive du clivage de molécules de type xanthophylle (Parry et al., 1988).

1.7.5.2. Conformation cis *des précurseurs de la xanthoxine*

L'ABA actif dans la plante est dans la configuration *cis*. Cependant, dans les tissus photosynthétiques, la majorité des caroténoïdes sont dans la conformation *trans*, thermodynamiquement plus stable. En accord avec cette constatation, la grande majorité de la violaxanthine est trouvée sous forme de *trans*-violaxanthine, mais la *cis*-violaxanthine est également présente en petite quantité. Cependant, contrairement aux autres xanthophylles, l'isomère majoritaire de la néoxanthine identifié dans les feuilles est de configuration *cis* (Li and Walton, 1990). Parry et collaborateurs (1988) ont montré que la *cis*-xanthoxine, et non la *trans*-xanthoxine, produit l'ABA, ce qui implique que ses précurseurs doivent posséder une configuration *cis* (Parry et al., 1988). Cette double liaison, en position 2-3, correspond à la position 9-10 chez les précurseurs C_{40}. Les expériences de Li et Walton (1990) confirment cette hypothèse puisque lors d'un stress hydrique, il existe une corrélation entre l'augmentation de la quantité d'ABA et la diminution de la 9-*cis*-violaxanthine et de la 9'-*cis*-néoxanthine. Ceci suggère également que ces deux xanthophylles majeurs sont les précurseurs de l'ABA (Li and Walton, 1990). Par ailleurs, des expériences d'incorporation d'eau deutérée montrent que la *cis*-néoxanthine est synthétisée à partir d'un composé déjà marqué, contrairement à la *trans*-violaxanthine, qui incorpore un atome d'oxygène deutéré (Parry and Horgan, 1991). Il apparaît donc clairement que la 9'-*cis*-néoxanthine est produite à partir de la *trans*-violaxanthine et donc que la *cis*-xanthoxine doit provenir de son clivage oxidatif.

L'étape suivante de la biosynthèse de l'ABA est donc la transformation de la all-*trans*-violaxanthine en 9'-*cis*-néoxanthine (**figure 1.20**). Ceci implique une étape de synthèse de la néoxanthine, donc l'existence d'une néoxanthine synthase, mais également des étapes isomérisations sous le contrôle d'isomérases.

1.7.5.3. Néoxanthine synthase et isomérases

L'isomérisation des *cis*-xanthophylles, précurseurs de l'ABA, à partir des *trans*-xanthophylles n'a pas encore été entièrement élucidée. Taylor et collaborateurs (2000) ont décrit plusieurs voies possibles pour la production de la xanthoxine, faisant ou non intervenir la *trans*-néoxanthine comme intermédiaire (Taylor et al., 2000).

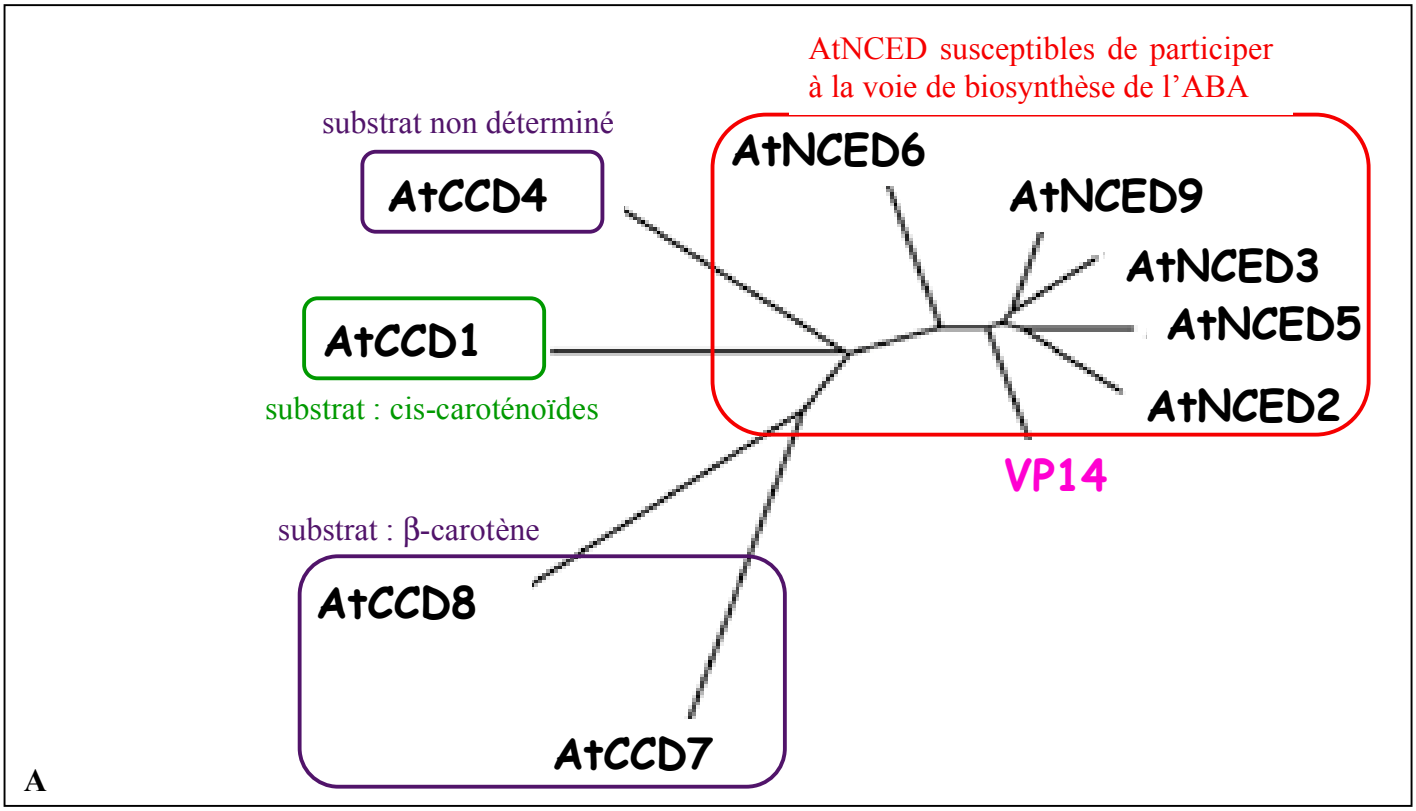
Récemment, deux gènes putatifs de néoxanthine synthase (NSY) ont été identifiés chez la pomme-de-terre et la tomate (Al-Babili et al., 2000) (Bouvier et al., 2000). Ces gènes sont décrits comme très homologues aux lycopène β-cyclases (LCY-b) et à la capsanthine capsorubine synthase (CCS) du poivron. Des expériences d'expression hétérologue de ces

protéines menées dans les protoplastes et dans *E. Coli* ont montré que la NSY de pomme-de-terre et de tomate respectivement catalysent uniquement la formation de *cis* et *trans*-néoxanthine à partir de violaxanthine (Al-Babili et al., 2000) (Bouvier et al., 2000). Pourtant, des mutants de tomate déficients pour une isoforme de la LCY-b, de séquence très similaire à la NSY, sont capables de synthétiser de la néoxanthine mais accumulent le lycopène (Ronen et al., 2000) (Hirschberg, 2001). Il semble donc que les séquences de *NSY* identifiées codent en fait pour des isoformes de la LCY-b. D'ailleurs, chez *Arabidopsis* il n'existe qu'un seul gène *LCY-b* et aucun gène correspondant à une *NSY* n'a été cloné.
Cependant, récemment, des mutants d'*Arabidopsis* et de tomate affectés dans la formation de néoxanthine ont été identifiés (Hirschberg, J. *et al*., non publié) (North, H. *et al*., non publié). Le gène correspondant d'*Arabidopsis* a été cloné (North, H. *et al*., non publié) et des études biochimiques montreront si cette enzyme présente une activité de néoxanthine synthase et est capable de produire les deux isomères de néoxanthine ou seulement la *trans*-néoxanthine, nécessitant l'existence d'une deuxième enzyme : une *trans–cis* isomérase (Nambara and Marion-Poll, 2005).

1.7.6. 9-*cis*-epoxycaroténoïde dioxygénase (NCED)

1.7.6.1. Caractérisation moléculaire et biochimique

Le clivage des 9-*cis*-époxycaroténoïdes est catalysé par une 9-*cis*-époxycaroténoïde dioxygénase, ou NCED (**figure 1.20**).
En 1997, un mutant de maïs, *vp14*, a été identifié et le gène affecté a été cloné. Il présente des phénotypes spécifiques d'une déficience en ABA : les graines sont vivipares, la teneur en ABA est réduite dans les embryons ainsi que dans les parties aériennes, entraînant une mauvaise régulation de la fermeture stomatique (Tan et al., 1997). Les premières études ont montré qu'il devait être affecté dans l'étape de clivage oxydatif conduisant à la synthèse d'ABA (Schwartz et al., 1997b) Des gènes *NCED* de nombreuses espèces ont depuis été identifiés (Burbidge et al., 1997) (Schwartz et al., 1997b) (Qin and Zeevaart, 1999) (Chernys and Zeevaart, 2000) (Iuchi et al., 2000). Ils présentent des similarités importantes avec la séquence de la lignostilbène dioxygénase (LSD) de *Pseudomonas paucimobilis*, qui catalyse le clivage oxydatif d'une double liaison carbone, produisant deux composés qui possèdent un groupement aldéhyde au site de coupure.
In vitro, la protéine VP14 de maïs de même que les NCED d'avocat et de haricot produisent de la xanthoxine (C_{15}) ainsi qu'un époxy apo-aldéhyde en C_{25}. Ces enzymes sont spécifiques des isomères *cis* de xanthophylles dans la mesure où elles sont uniquement capables de cliver la *cis*-violaxanthine et la *cis*-néoxanthine entre les carbones 11 et 12 (Schwartz et al., 1997b) (Qin and Zeevaart, 1999) (Chernys and Zeevaart, 2000). De plus, l'apparition des deux produits de la réaction et la disparition de la 9-*cis*-violaxanthine se fait de façon équimolaire, preuve que le clivage d'une molécule de violaxanthine est à l'origine d'une molécule de xanthoxine.



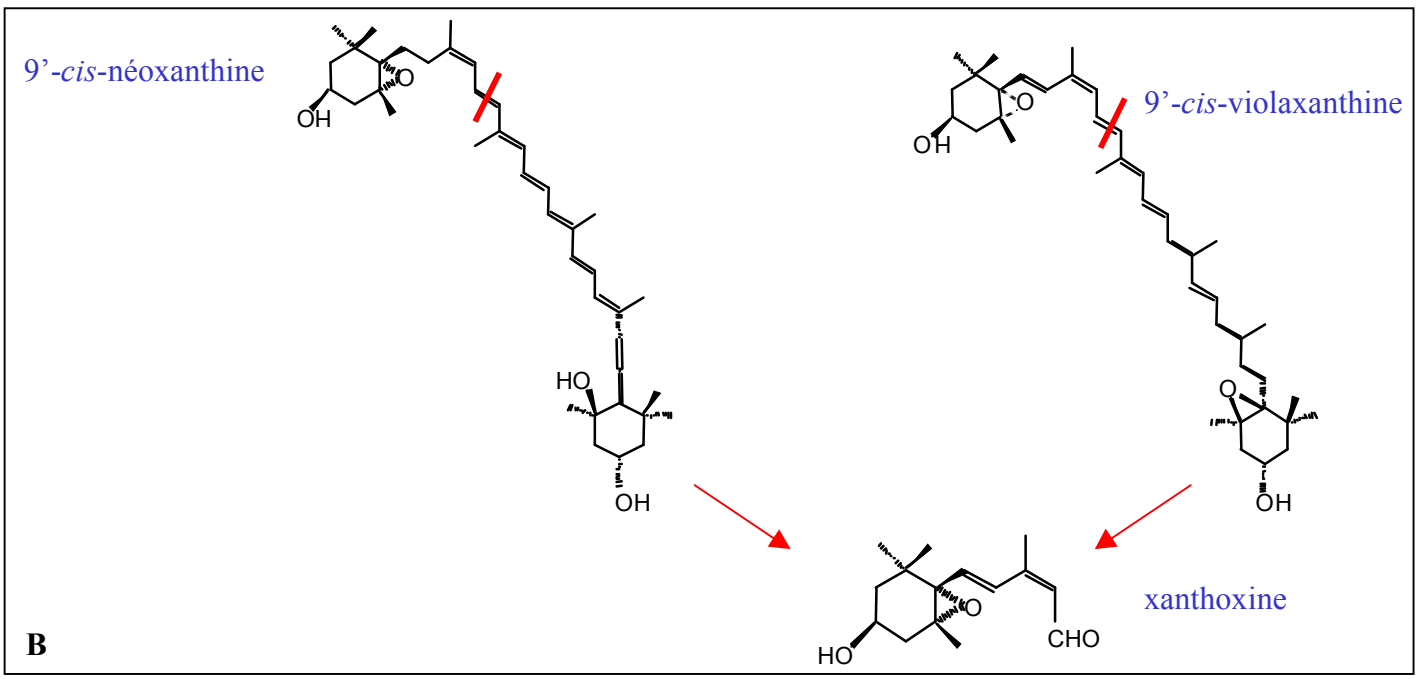


Figure 1.21 : Récapitulatif des activités catalytiques des AtNCED et des AtCCD (**A**). Réactions de clivages des AtNCED (rouge) (coupure en 11, 12 : *AtNCED2, AtNCED3, AtNCED5, AtNCED6, AtNCED9)* (**B**).
AtCCD1, At3g63520 ; AtNCED2, At4g18350 ; AtNCED3, At3g14440 ; AtCCD4, At4g19170 ; AtNCED5, At1g30100 ; AtNCED6, At3g24220 ; AtCCD7, At2g44990 ; AtCCD8, At4g32810 ; AtNCED9, At1g78390.

1.7.6.2. La Famille multigénique NCED *d'*Arabidopsis

Dans le génome d'*Arabidopsis*, 9 séquences codant potentiellement des enzymes de clivage des caroténoïdes ont été identifiées, par homologie avec les gènes identifiés dans d'autres espèces (Schwartz et al., 2001). Un arbre phylogénétique représentant les 9 protéines d'*Arabidopsis* est présenté en **figure 1.21 A**. Les protéines de la famille NCED qui ne clivent pas les 9-*cis*-xanthophylles en position 11-12 ont été nommées CCD pour "carotenoid cleavage dioxygenase".

1.7.6.2.1. Activité

Afin de connaître l'implication de chacune de ces protéines dans la biosynthèse de l'ABA, l'activité de protéines recombinantes a été testée (Iuchi et al., 2001). AtCCD1 catalyse *in vitro* le clivage de nombreux *cis*-caroténoïdes au niveau des doubles liaisons 9-10 et 9'-10', ce qui ne conduit pas à la production d'ABA (Schwartz et al., 2001). AtCCD7 et AtCCD8, les membres les plus éloignés de la famille, sont impliqués dans la régulation de la ramification (Schwartz et al., 2004). Ils interviendraient dans une voie produisant une molécule signal à 18 carbones à partir du β-carotène. L'activité de quatre autres AtNCED (AtNCED2, 3, 6 et 9) a été testée *in vitro* en présence de différents caroténoïdes. Les résultats indiquent que ces enzymes catalysent le clivage de la 9-*cis*-violaxanthine et de la 9'-*cis*-néoxanthine entre les carbones 11 et 12, pour générer de la xanthoxine et un composé en C_{25} (**figure 1.21 B**). Bien que son activité n'ait pas été démontrée, il est très probable qu'AtNCED5 soit également impliquée dans la biosynthèse d'ABA, du fait de sa grande homologie avec les autres membres de la famille (Iuchi et al., 2001) (Tan et al., 2003). Par contre, la fonction d'AtCCD4, reste inconnue, mais la niveau d'homologie de sa séquence avec les NCED suggère que cette protéine ne serait pas impliquée dans la biosynthèse de l'ABA (Schwartz et al., 2003).

1.7.6.2.2. Expression

Tan et collaborateurs (2003) ont étudié l'expression des gènes *AtNCED* chez *Arabidopsis* en utilisant le gène rapporteur codant la β-glucuronidase (GUS), ainsi que la PCR en temps réel (Tan et al., 2003). Les *NCED* sont exprimées dans tous les tissus de la plante ainsi que dans la graine. Cependant, aucune donnée n'est disponible concernant la fusion du promoteur de *AtNCED9* avec le gène rapporteur. Il apparaît tout d'abord qu'*AtNCED3* est le gène majeur exprimé dans les parties aériennes et impliqué dans la réponse au stress hydrique. En conséquence, son patron d'expression dans les cellules de garde, identifié grâce à la fusion du promoteur avec le gène rapporteur *GUS*, semble en bonne corrélation avec le rôle de l'ABA synthétisé. Au niveau des pointes racinaires, deux gènes sont exprimés : *AtNCED3* et *AtNCED2.* Ils le sont également à la base des racines latérales. Ceci correspondrait au rôle de l'ABA dans l'initiation et la croissance des racines latérales. Les ARNm des gènes *AtNCED2*, *5* et *6* sont détectés dans les fleurs par RT-PCR, alors qu'on connaît peu l'implication de l'ABA dans le développement floral, la formation du pollen et dans la

fécondation. L'analyse de l'expression de fusions GUS apporte quelques précisions quant à la localisation des transcrits. *AtNCED2* est exprimé dans les primordia des boutons floraux ainsi que dans les zones d'abscission des fleurs matures. L'ARNm d'*AtNCED3* est localisé dans les tiges des fleurs ainsi que dans les anthères des boutons floraux. Les transcrits d'*AtNCED5* sont présents dans les anthères des boutons floraux en développement ainsi qu'au niveau des filets des étamines, dans les pétales et les sépales. Enfin, *AtNCED6* est exprimé très fortement dans les grains de pollen en développement, matures et en germination. Les données de PCR quantitative indiquent que dans la silique en cours de développement, *AtNCED6* est le transcrit le plus abondant, bien que les ARNm de *AtNCED3*, *5* et *9* soient également présents. Alors que l'expression d'*AtNCED6* diminue dans les siliques matures, celles d'*AtNCED3* et *AtNCED5* augmentent. De plus, les études montrent qu'*AtNCED3*, *5* et *6* présentent une coloration GUS uniquement dans les graines, et non dans les enveloppes des siliques. *AtNCED3* s'exprime dans les ovules immatures, dans les graines en développement ainsi que dans le funicule chez les graines matures. *AtNCED5* et *6* sont transcrits à tous les stades de développement de la graine. Enfin, *AtNCED2* et *AtNCED3* semblent s'exprimer dans les zones d'abscission des fleurs et des graines.

Ainsi, les gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse d'ABA présentent des patrons d'expression distincts, qui reflètent les programmes de développement ainsi que les régulations environnementales auxquels la synthèse d'ABA est soumise (Tan et al., 2003). Il apparaît donc envisageable que chaque gène soit responsable de la synthèse d'ABA impliquée dans un ou plusieurs processus physiologiques déterminés, liés au contrôle développemental ou en réponse à un stimulus environnemental.

1.7.6.3. Le clivage des xanthophylles serait l'étape-clef régulatrice de la synthèse d'ABA

L'étude de l'expression des gènes *NCED* durant un stress hydrique montre qu'il existe une corrélation entre le niveau d'ARNm et la quantité d'ABA produit en réponse à un stress hydrique. En effet, aussi bien dans les racines que dans les feuilles, l'augmentation de la teneur en ABA est précédée par une accumulation des transcrits *NCED* (Seo and Koshiba, 2002). Chez *Arabidopsis*, le gène majeur de réponse au stress est *AtNCED3* (Iuchi et al., 2001). Ce gène y répond de façon très précoce puisque son expression augmente dès les premières minutes de stress. Cependant, on observe également une augmentation de la quantité d'ARNm de *AtNCED5* et *AtNCED9* après déshydratation (Iuchi et al., 2001) (Tan et al., 2003). De plus, chez le haricot, cette corrélation s'étend à une augmentation de l'accumulation de la protéine NCED (Qin and Zeevaart, 1999). Notons qu'il n'a été observé une telle variation pour les transcrits *ZEP* uniquement dans les tissus racinaires. Ainsi, le clivage oxydatif des 9-*cis*-epoxycaroténoïdes a été décrit comme l'étape clef régulatrice de la synthèse d'ABA en réponse à un stress hydrique dans les parties aériennes.

L'analyse des plantes transgéniques en a apporté la confirmation. Chez *Arabidopsis*, *N. plumbaginifolia* et la tomate, des lignées surexprimant un gène *NCED* de façon constitutive accumulent l'ABA et présentent une meilleure résistance au stress hydrique (Thompson et al., 2000b) (Iuchi et al., 2001) (Qin and Zeevaart, 2002). De plus, la synthèse accrue d'ABA conduit aussi à une augmentation de la dormance dans les graines (Thompson et al., 2000b). Il apparaît donc que l'expression ectopique des protéines NCED est suffisante pour induire la synthèse de l'ABA dans tous les tissus où cette enzyme est fonctionnelle.
Par ailleurs, les quantités relatives des différents caroténoïdes et apocaroténoïdes présents dans les plantes par rapport à la teneur en ABA peuvent également expliquer le rôle clef de l'étape de clivage dans la synthèse d'ABA. En effet, les xanthophylles constituent un pool important de précurseurs surtout dans les tissus photosynthétiques, dont l'abondance n'est pas affectée chez le mutant *vp14* (Tan et al., 1997). Ces composés ne peuvent pas, *a priori*, être limitants pour la synthèse d'ABA et l'étape régulatrice doit se situer en aval de leur production. Comme les dernières étapes, catalysées par des enzymes cytosoliques, présentent des activités constitutives qui ne varient pas pendant un stress hydrique, la régulation doit s'opérer au niveau de la production de la xanthoxine, donc du clivage des 9-*cis*-xanthophylles (Sindhu and Walton, 1987).

1.7.6.4. Localisation sub-cellulaire

Les protéines NCED de maïs (VP14), de pois protéagineux (VuNCED1), de haricot (PvNCED1) et d'*Arabidopsis* (AtNCED et AtCCD), exceptée AtCCD1, possèdent un peptide de transit d'adressage chloroplastique prédit à leur extrémité N-terminale (Qin and Zeevaart, 1999) (Iuchi et al., 2000) (Sorefan et al., 2003) (Tan et al., 2003) (Schwartz et al., 2004). De plus, des expériences d'import de protéines réalisées chez le maïs, le haricot et *Arabidopsis* ont montré que certaines de ces protéines sont effectivement présentes dans les chloroplastes. Cependant, elles diffèrent quant à leur localisation à l'intérieur de ces compartiments. Il existe deux localisations pour les AtNCED dans les chloroplastes : celles liées aux membranes des thylakoïdes, comme AtNCED5, celles trouvées dans le stroma, comme AtNCED9 et celles trouvées dans ces deux endroits, comme AtNCED2, 3 et 6. En fait, il semble que les NCED diffèrent au niveau de leur association avec les caroténoïdes substrats contenus dans les membranes des thylakoïdes (Tan et al., 2003).

1.7.7. Les étapes cytoplasmiques

1.7.7.1. De la xanthoxine à l'ABA

L'oxydation de la xanthoxine pour donner l'ABA a été étudiée dans des cellules de feuille de haricot par Sindhu et Walton (1987) et s'effectue dans le cytoplasme. Ceci nécessite le transport du substrat à partir des chloroplastes selon un mécanisme encore inconnu (Sindhu and Walton, 1987). Par ailleurs, cette oxydation semble constitutive et ne serait donc pas impliquée dans l'augmentation de la teneur en ABA dans les plantes en réponse à un stress

hydrique. La conversion de la xanthoxine en ABA, NADP-dépendante, requiert trois modifications : l'ouverture du cycle époxyde ainsi que deux oxydations. Deux enzymes entrent en jeu dans cette transformation, avec comme intermédiaire l'aldéhyde abscisique (AB-aldéhyde) (Sindhu et al., 1990).

1.7.7.2. Conversion de la xanthoxine en AB-aldéhyde

1.7.7.2.1. Caractérisation moléculaire et biochimique

L'étude de la première étape cytoplasmique conduisant à la synthèse de l'ABA a pu être effectuée grâce à la mise en évidence d'un mutant chez *Arabidopsis*, *Ataba2* (Leon-Kloosterziel et al., 1996a). Il présente les phénotypes classiques d'une déficience en ABA mais sa composition en caroténoïdes est identique au sauvage. Ceci laissait penser que sa faible teneur en ABA pouvait provenir d'une déficience dans une étape tardive de la biosynthèse de cette hormone. En effet, il a ensuite été montré que la protéine AtABA2 est impliquée dans la première des étapes cytoplasmiques puisque l'enzyme recombinante catalyse effectivement l'oxydation de la xanthoxine en AB-aldéhyde (**figure 1.20**). Le gène *AtABA2*, unique dans le génome d'*Arabidopsis* code pour une enzyme appartenant à la famille des déshydrogénases/réductases à courte chaîne (SDR) NAD ou NADP-dépendantes (Rook et al., 2001) (Cheng et al., 2002) (Gonzalez-Guzman et al., 2002). De nombreux allèles ont été identifiés, sur la base de cribles différents (Nambara and Marion-Poll, 2005). Certains présentent une complémentation intragénique, ce qui suggère que cette enzyme fonctionne sous la forme d'un complexe multimérique, souvent décrit chez les SDR (Rook et al., 2001).

1.7.7.2.2. Expression chez *Arabidopsis*

Le gène *AtABA2* semble avoir une expression constitutive mais faible dans tous les organes de la plante : racines, tiges, feuilles et siliques (Gonzalez-Guzman et al., 2002). Cependant, les transcrits s'accumulent préférentiellement dans les racines et les tiges, qui ne sont pourtant pas les tissus cibles de l'ABA, plutôt que dans les rosettes et les graines. Ce patron d'expression a été confirmé par la fusion du promoteur de *AtABA2* avec le gène rapporteur *GUS* (Cheng et al., 2002). La protéine GUS s'accumule dans les vaisseaux vasculaires de l'hypocotyle ainsi que dans les racines chez les plantules de 10 jours. Plus tard, l'expression se déplace vers les pétioles des cotylédons et des feuilles. Dans les plantes adultes, *AtABA2* s'exprime dans le pollen des fleurs ouvertes et au niveau du pédicèle des jeunes siliques. Enfin, les transcrits *AtABA2* sont présents dans les septa des siliques ainsi que dans les funicules des graines et faiblement dans les graines elles-mêmes et les embryons (Cheng et al., 2002).

Outre le fait que la protéine AtABA2 puisse être mobile, le patron d'expression du gène *AtABA2* suggère l'existence possible d'un système de transport intercellulaire et interorganes de l'ABA et/ou de ses précurseurs afin de coordonner la biosynthèse de l'ABA et ses

réponses (Cheng et al., 2002). De plus, le promoteur du gène *AtABA2* a été fusionné à la GFP, afin de déterminer la localisation subcellulaire de la protéine, et exprimé dans des protoplastes d'*Arabidopsis*. La protéine AtABA2-GFP est exclusivement présente dans le cytosol (Cheng et al., 2002).

Enfin, la conversion de la xanthoxine en ABA n'est pas augmentée de façon significative par un déficit en eau, un stress osmotique ou par une application d'ABA exogène (Sindhu and Walton, 1987) (Cheng et al., 2002) (Gonzalez-Guzman et al., 2002). Conformément aux observation de Sindhu et collaborateurs (1987), cette étape n'est donc pas limitante pour l'accumulation de l'ABA en cas de stress (Sindhu and Walton, 1987). Cependant, l'expression de *AtABA2* est induite par le glucose (Cheng et al., 2002). Cette activation est dépendante de l'ABA et est abolie en contexte *Ataba2*. Ainsi, les inductions de l'ABA par les stress ou le sucre sont médiées par des mécanismes distincts.

1.7.7.3. L'AB-aldéhyde oxydase

1.7.7.3.1. L'AB-aldéhyde oxydase possède un cofacteur à molybdène

Les premières études menées sur l'oxydation de l'AB-aldéhyde en ABA ont été réalisées sur les deux mutants de tomate *flacca* et *sitiens* (Taylor et al., 1988). Ceux-ci présentent les mêmes phénotypes de déficience en ABA mais leurs mutations ne sont pas situées aux mêmes loci. L'hypothèse a été émise qu'ils coderaient les différentes sous-unités de la même enzyme. Chez l'orge, le mutant *nar2* est déficient dans trois activités enzymatiques : la nitrate réductase, la xanthine déshydrogénase et l'aldéhyde oxydase. La mutation se situe au niveau de la biosynthèse d'un cofacteur à molybdène (MoCo), nécessaire au fonctionnement de ces trois enzymes. Comme ce mutant présente une teneur réduite en ABA, il a été supposé que l'AB-aldéhyde oxydase pourrait être une molybdoenzyme (Walker-Simmons et al., 1989). En 1997, des tests d'activité menés chez les mutants *flacca* et *sitiens*, ont apporté la preuve que l'AB-aldéhyde oxydase est une enzyme à molybdène : *FLC* est impliqué dans la synthèse du cofacteur et *SIT* pourrait être le gène de structure codant l'AB-aldéhyde oxydase (Marin and Marion-Poll, 1997).

Chez *Arabidopsis*, deux équipes ont caractérisé *Ataba3*, un mutant déficient dans la synthèse du MoCo (Leon-Kloosterziel et al., 1996a) (Schwartz et al., 1997a). La protéine AtABA3 recombinante exprimée dans *E. Coli*, est une sulfurase capable d'activer l'AB-aldéhyde oxydase par addition d'atomes de soufre sur le MoCo (Bittner et al., 2001) (Xiong et al., 2001).

1.7.7.3.2. AB-aldéhyde oxydase

Les AB-aldéhydes oxydases appartiennent à des familles multigéniques chez les espèces étudiées (Taylor et al., 2000). Cette famille est constituée de quatre membres chez *Arabidopsis*, *AAO1*, *AAO2*, *AAO3* et *AAO4*, mis en évidence par homologie de séquences avec les enzymes de maïs et de bovin, précédemment découvertes (Sekimoto et al., 1998).

Cependant, seulement un gène, *AAO3*, a été décrit comme effectivement impliqué dans la biosynthèse de l'ABA. En effet, seule la protéine AAOδ, codée par *AAO3*, est capable d'oxyder l'AB-aldéhyde pour donner de l'ABA *in vitro*. Les autres isoformes mises en évidence AAOα (codée par *AAO1*) et AAOγ (codée par *AAO2*) sont respectivement affines pour l'indole-aldéhyde et le naphtaldéhyde. La troisième isoforme, AAOβ (un hétérodimère AAOα-AAOγ) est capable d'utiliser ces deux types de substrats, mais pas l'AB-aldéhyde (Seo et al., 2000a). AAO3 semble donc être la seule AB-aldéhyde oxydase impliquée dans la biosynthèse de l'ABA. Cependant, la fonction de la protéine codée par AAO4 n'a pas encore été démontrée mais elle semble incapable d'oxyder l'AB-aldéhyde (Seo et al., 2004).
De plus, l'expression du gène *AAO3* augmente rapidement en réponse à un stress hydrique, ce qui suggère que ce gène serait effectivement impliqué dans la dernière étape de la synthèse d'ABA *in vivo*. Ainsi, le mutant *aao3*, présente un phénotype de flétrissement des parties aériennes en cas de stress, mais pas de réduction de dormance. *AAO3* serait donc impliqué dans la synthèse d'ABA dans les parties aériennes en réponse à un stress hydrique, mais pas dans l'ABA responsable de la dormance des graines. Cependant, récemment, une étude sur de nouveaux allèles *aao3* a permis de montrer que AAO3 participe effectivement à la synthèse d'ABA dans les graines et que *AAO1* et *AAO4*, également exprimés dans les graines, pourraient contribuer à la synthèse d'ABA en l'absence d'AAO3, chez le mutant *aao3* (Gonzalez-Guzman et al., 2004) (Seo et al., 2004).

1.7.7.3.3. Expression tissulaire et subcellulaire

L'étude du patron d'expression de ces quatre gènes *AAO* montre que chacun possède une spécificité tissulaire : *AAO1* et *AAO2* sont exprimées dans les racines et les jeunes plantules ; *AAO3* dans les racines et très fortement dans les feuilles de rosette et est induit en cas de stress hydrique ; *AAO4* dans les siliques (Seo et al., 2000a). Ceci suggère que les aldéhydes oxydases codées par les gènes *AAO* seraient impliquées dans différents événements physiologiques chez *Arabidopsis,* mais seule la fonction de AAO3 a été identifiée à ce jour (Seo et al., 2000b).
Koiwai et collaborateurs (2004) ont étudié la localisation fine du gène et de la protéine AAO3, afin de connaître les sites de production d'ABA. En effet, l'AB-aldéhyde oxydase catalysant la dernière étape de la synthèse de l'ABA, sa localisation pourrait correspondre aux sites de production d'ABA. La protéine s'accumule dans les faisceaux vasculaires des feuilles, de l'hypocotyle ainsi que de la racine et la tige des inflorescences. Plus précisément, il semble qu'AAO3 soit exprimée dans les cellules compagnes du phloème ainsi que dans les cellules parenchymateuses du xylème. Ces données, de même que les données d'expression du gène *AtABA2*, sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle certains précurseurs de l'ABA seraient mobiles. De plus, la protéine AAO3, de même que le transcrit, a été détectée dans les cellules de garde. Cette dernière observation suggère fortement qu'AAO3 participe à la

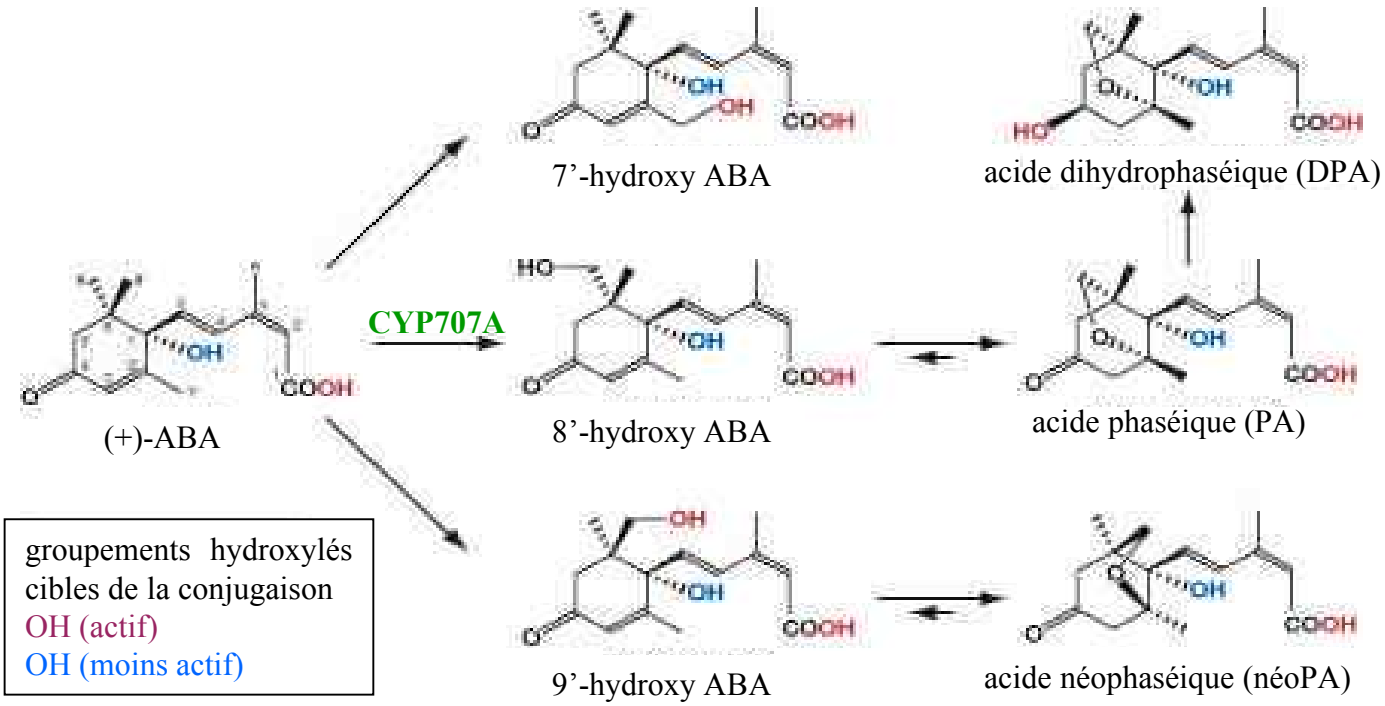


Figure 1.22 : Voie de catabolisme de l'ABA. Trois voies différentes sont présentées. La 8'-hydroxylation est considérée comme la voie prédominante du catabolisme de l'ABA. Les groupements hydroxylés violet et bleu représentent les OH les plus et les moins actifs dans le phénomène de conjugaison, respectivement.

D'après Nambara et Marion-Poll, 2005

synthèse d'ABA à l'intérieur des cellules de garde, en accord avec le rôle de l'ABA dans la fermeture stomatique en cas de stress hydrique (Koiwai et al., 2004).

1.7.8. Catabolisme de l'acide abscissique

Le catabolisme de l'ABA s'effectue de deux façons, par hydroxylation et conjugaison.

1.7.8.1. L'hydroxylation

L'hydroxylation de l'ABA peut avoir lieu sur trois atomes de carbone : C7', C8' et C9' (Zhou et al., 2004). La voie majoritaire est celle conduisant à la formation du 8'-hydroxy ABA (8'-OH ABA) (**figure 1.22**). La (+)-ABA 8'hydroxylase catalyse la première étape de la dégradation oxydative de l'ABA et est considérée comme l'enzyme clef contrôlant la dégradation de cette hormone. Des études menées sur des cellules de maïs en suspension ont montré qu'elle appartenait à la famille des monooxygénases à cytochrome P450 (cyt P450), puisqu'elle en présente les caractéristiques : (i) la réaction requiert de l'oxygène, (ii) nécessite le cofacteur NADP, (iii) est sensible à un inhibiteur des cyt P450 (Krochko et al., 1998). Suit une cyclisation du 8'-hydroxy ABA, composé instable, en acide phaséique (PA), qui est lui même réduit en position 4' par une réductase soluble pour donner l'acide dihydrophaséique (DPA). Ces derniers sont donc les catabolites majeurs présents dans les plantes supérieures (Cutler and Krochko, 1999). Ainsi, l'inactivation de l'ABA se fait en plusieurs étapes. En effet, des études d'activité menées sur ces différents intermédiaires ont montré que le DPA est la forme totalement inactive de l'ABA, alors que le 8'-OH ABA et le PA possèdent encore une certaine activité biologique (Nambara and Marion-Poll, 2005).

Alors que l'hydroxylation en position 7' semble être une voie minoritaire d'inactivation de l'ABA, le 9'-hydroxy ABA et sa forme cyclisée, l'acide néophaséique (néoPA), sont abondants dans les graines immatures de *Brassica napus*. De la même façon que pour le 8'-OH ABA, les formes hydroxylées en 7' et 9' de l'ABA sont capables de médier au moins une partie des effets physiologiques de l'ABA, alors que le néoPA, tout comme le DPA, est inactif (Zhou et al., 2004).

Récemment, les gènes *CYP707A*, codant les cyt P450 monooxygénases responsables de l'activité ABA-8'hydroxylase ont été identifiés par homologie de séquence et d'action avec les cyt P450 monooxygénases de différentes espèces (Kushiro et al., 2004) (Saito et al., 2004). Il s'agit d'une famille multigénique de quatre membres (*CYP707A1-4*) capables d'hydroxyler l'ABA en position 8' pour produire le 8'-OH ABA. Ces 4 enzymes sont inactives sur les carbones 7' et 9'. De plus, il semble que la protéine CYP707A ne soit pas impliquée dans la cyclisation du 8'-hydroxy ABA en PA (Saito et al., 2004).

Par RT-PCR, Saito et collaborateurs (2004) ont montré que les gènes *CYP707A1* et *3* étaient plus exprimés que *CYP707A2* et *4*. L'expression des quatre gènes est ubiquitaire dans tous les organes de la plante : les transcrits de tous ces gènes sont présents dans les fleurs et les boutons floraux et y sont relativement abondants comparativement aux autres organes, comme les siliques, où la teneur en ARNm des *CYP707A* est faible. *CYP707A2* et

3 sont majoritairement exprimés dans les feuilles de rosettes ; *CYP707A1* et *3* sont présents dans les racines, les fleurs, les siliques et les tiges ainsi que *CYP707A2*, plus faiblement. Les transcrits les plus abondants dans les graines sèches sont ceux de *CYP707A2*. L'expression de ces gènes est donc différentiellement régulée dans la plante (Saito et al., 2004). La localisation des transcrits est corrélée aux processus physiologiques dans lesquels l'ABA est impliqué. En effet, *CYP707A2* présente un pic d'accumulation en début d'imbibition, qui pourrait être impliqué dans la diminution d'ABA observée à ce moment. Ce gène pourrait donc être requit dans le catabolisme de l'ABA au cours de l'imbibition. Egalement, *CYP707A1* semble être le gène majeur de réponse au stress hydrique puisque son expression augmente progressivement pendant le stress. Après réhydratation, une très grande augmentation d'ARNm est observée, alors que le patron d'expression d'*AtNCED3* est inverse. Ceci démontre que la biosynthèse et le catabolisme de l'ABA sont régulés de façon coordonnée pour contrôler la teneur en ABA en réponse à un stress (Kushiro et al., 2004).

1.7.8.2. La conjugaison

La conjugaison consiste en la fixation d'un glucose sur un groupement carboxyle (en position C1) ou sur les groupements hydroxyle de l'ABA ou de ses catabolites hydroxylés. Le conjugué le plus répandu est l'ABA-GE (ABA glucose ester). Il n'a pas ou peu d'activité biologique et ne semble pas être une forme de stockage de l'ABA (Cutler and Krochko, 1999).

Récemment, le gène *AOG*, une glucosyltransférase spécifique de l'acide abscissique, a été indentifié et cloné chez l'espèce *Vigna angularis*. La protéine recombinante AOG catalyse spécifiquement le transfert d'un glucose provenant de l'UDP-glucose (UDPG) sur le groupement carboxyle (C1) de l'ABA, mais est inactive sur l'acide phaséique (Xu et al., 2002). De plus, l'expression de ce gène est induite en cas de stress et par application exogène d'ABA, ce qui confirme la spécificité d'activité de cette enzyme. L'augmentation du transcrit en réponse au stress pourrait être due à l'accroissement de la teneur en ABA. Ainsi, l'AOG serait impliquée dans la régulation de l'homéostasie hormonale.

Des formes conjuguées de gibbérellines et de cytokinines sont connues pour être impliquées dans le transport longue distance dans le xylème. Il a donc été proposé que l'ABA-GE soit responsable de la signalisation des stress à longue distance (Hartung et al., 2002) (Sauter et al., 2002).

1.8. Présentation du projet de thèse

Les travaux du laboratoire portent sur l'identification et l'analyse moléculaire de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'acide abscissique (ABA) chez les plantes modèles *Nicotiana plumbaginifolia* et surtout *Arabidopsis thaliana* et plus particulièrement dans la graine.

Dans ce cadre, il semblait particulièrement intéressant d'étudier l'étape clef régulatrice de la voie de biosynthèse de l'ABA, à savoir celle catalysée par les gènes *NCED*. Au début de ma thèse en 2001, les gènes *NCED* d'*Arabidopsis* n'avaient pas encore été caractérisés. Toutefois, le démarrage de mon projet a coïncidé avec la publication d'une étude sur le rôle d'*AtNCED3* dans la tolérance au stress hydrique et démontrant l'activité enzymatique de plusieurs protéines recombinantes AtNCED (Iuchi et al., 2001). Nous avons donc concentré nos efforts sur l'analyse des 5 gènes *AtNCED* (*AtNCED2, AtNCED3, AtNCED5, AtNCED6* et *AtNCED9*) potentiellement impliqués dans la biosynthèse de l'ABA.

Alors que l'essentiel des connaissances sur la caractérisation moléculaire de cette famille de gènes chez diverses espèces (avocat, tomate, haricot, maïs, pois protéagineux (Burbidge et al., 1997) (Qin and Zeevaart, 1999) (Chernys and Zeevaart, 2000) (Schwartz et al., 1997b) (Iuchi et al., 2000)), concernait leur implication dans la tolérance au stress hydrique, nous avons choisi de nous intéresser à leur régulation au cours du développement de la graine et de la germination. En effet, de nombreuses études ont montré que le mode d'action de l'ABA et la régulation des gènes cibles dépendait de l'origine tissulaire de la synthèse de l'hormone dans la graine (Finkelstein et al., 2002).

Pour cette étude, nous avons adopté deux démarches : la recherche et l'étude de mutants d'insertion affectés dans les gènes *AtNCED* d'*Arabidopsis*, conjointement à la caractérisation de l'expression des différents membres de la famille chez *Arabidopsis*. Pour obtenir des données fiables sur la localisation tissulaire de l'expression des gènes *AtNCED*, nous avons choisi d'analyser dans un premier temps des plantes transgéniques contenant les gènes rapporteurs *GUS* et *GFP* sous le contrôle de chacun des promoteurs *AtNCED*, puis de confirmer la localisation par hybridation *in situ*.

Au cours de ma thèse, en 2003, Tan et collaborateurs ont décrit l'expression des gènes *AtNCED* en utilisant également le gène rapporteur *GUS* (Tan et al., 2003). Toutefois, les résultats obtenus sur les graines étaient peu détaillés, ce qui a justifié la poursuite de notre travail. En revanche, aucune donnée n'est encore disponible sur l'analyse phénotypique des différents mutants *nced* d'*Arabidopsis* excepté *Atnced3* (Iuchi et al., 2001) (Ruggiero et al., 2004) . Nos deux axes principaux de recherche, analyse de mutants et expression de gènes, nous ont ainsi conduit à relier certains phénotypes (ou absence de phénotype) à l'expression spatio-temporelle de certains gènes. Ainsi, nous étions en mesure d'associer à un lieu de production d'ABA, un rôle dans la physiologie et le métabolisme de la graine.

2. Résultats

2.1. La famille *AtNCED* dans les graines

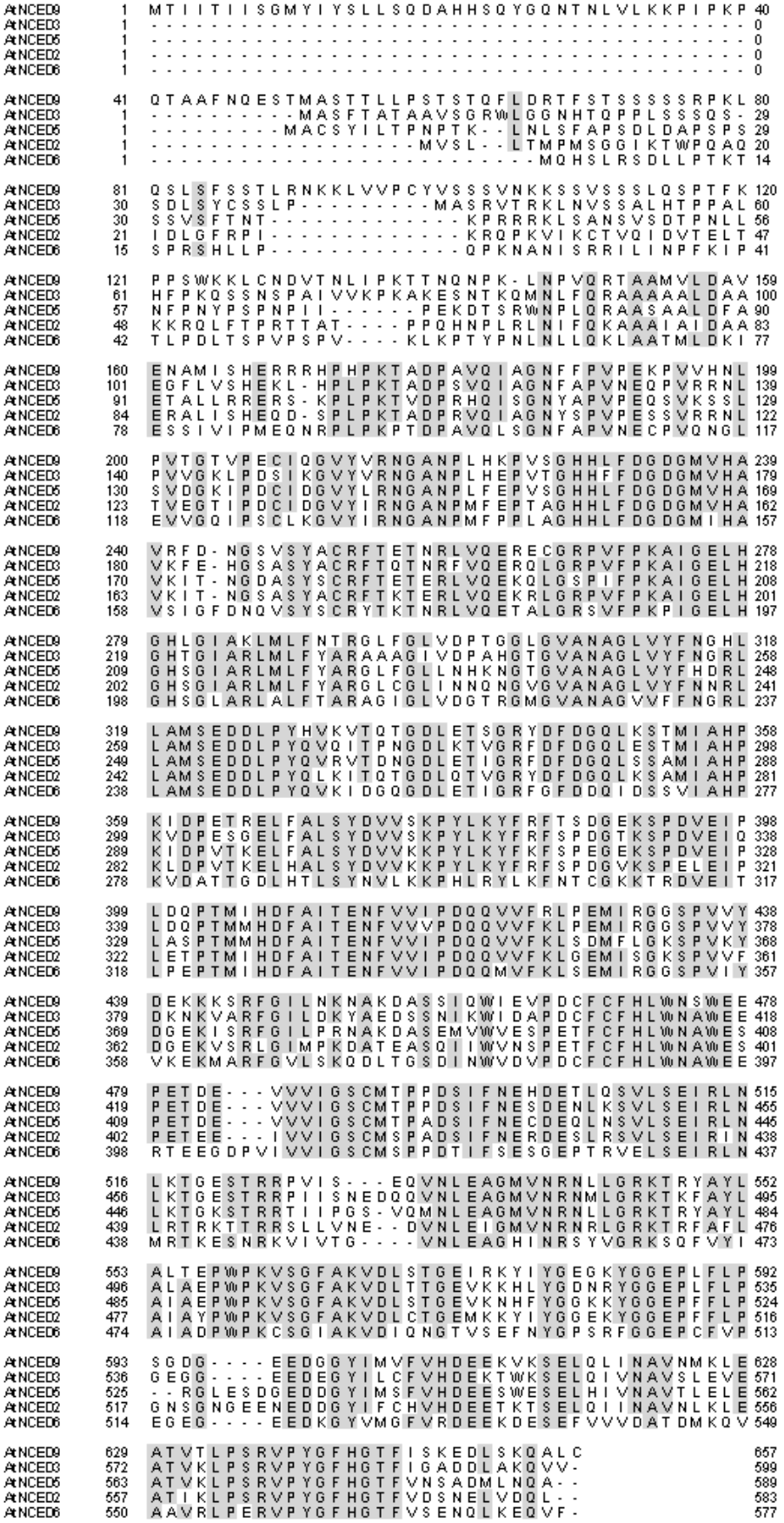


Figure 2.1 : Alignement des 5 protéines les plus homologues de la famille AtNCED. Les boîtes grisées représentent les identités en acides aminés.

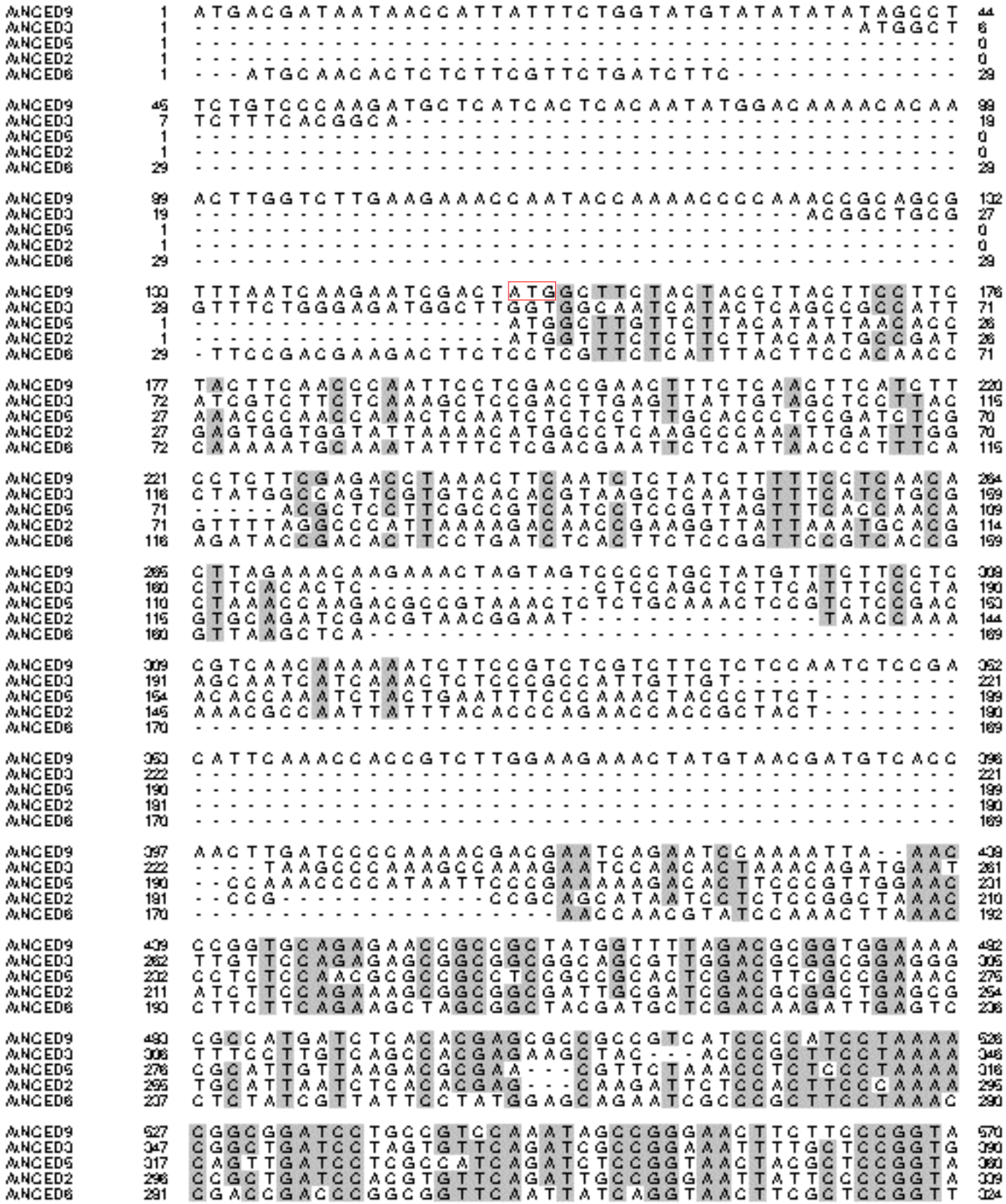


Figure 2.2 : Alignement de la partie 5' des 5 gènes les plus homologues de la famille *AtNCED.* Les boîtes grisées représentent les identités de nucléotides.

2. Résultats

2.1. La famille A*tNCED* dans les graines

2.1.1. Caractérisation de la famille multigénique chez *Arabidopsis*

La famille des 9-cis époxycaroténoïdes dioxygénases chez *Arabidopsis* est consituée de 9 membres, dont 5 AtNCED potentiellement impliqués dans la biosynthèse de l'ABA (Iuchi et al., 2001) (Tan et al., 2003) et 4 AtCCD, utilisant d'autres caroténoïdes comme substrats (Iuchi et al., 2001) (Schwartz et al., 2001) (Schwartz et al., 2004) (Sorefan et al., 2003). Parmi ces 9 gènes, seules les *AtCCD* (sauf *AtCCD4*) présentent des introns.

Les 5 gènes *AtNCED* ont des séquences protéiques très proches et également des séquences nucléotidiques qui présentent des domaines d'homologie. Les alignements effectués sur ces deux types de matrices (**figures 2.1** et **2.2**) illustrent cette constatation. Cependant, les extrémités N-terminales (5') semblent de plus grande divergence. En effet, les "boîtes" d'identité nucléotidiques ou protéiques ne sont pas visibles dès le début des séquences. Chez AtNCED2, 3, 5 et 6, les séquences diffèrent sur 60 à 80 acides aminés et sur 150 pour AtNCED9. Cette observation est caractéristique d'une séquence d'adressage à un organelle comme les chloroplastes ou le réticulum endoplasmique. Ces 5 protéines pourraient donc être localisées dans un compartiment subcellulaire. En accord avec cette hypothèse, des expériences d'import chloroplastique, réalisées dans des chloroplastes de pois ont montré que ces 5 protéines sont adressées aux plastes (Tan et al., 2003). Cette localisation est conforme à celle des caroténoïdes substrats dans les chloroplastes.

2.1.2. Expression des gènes *AtNCED* et *AtCCD*

2.1.2.1. Northern blot in planta

Dans le but de déterminer la contribution de chacun des gènes *AtNCED* dans la synthèse de l'ABA dans la graine, l'expression de ces gènes a été testée par northern blot. la recherche de sondes spécifiques pour chacun des gènes a été entreprise dans la partie 5' des gènes, puisqu'elles y présentent le moins d'homologies (**figure 2.2**).

Afin de tester la spécificité des sondes, 7 dot blots ont été réalisés. Il s'agissait de fixer sur une membrane de nylon les ADN correspondants aux séquences codantes de chacun des gènes et d'hybrider ces membranes avec les différentes sondes radiomarquées. Nous avons ainsi pu vérifier que chaque sonde s'hybridait avec la séquence du gène dont elle est issue mais pas ou peu avec les séquences codantes des autres gènes (**figure 2.3**). Les **tableaux Ia** et **Ib** récapitulent les différents couples d'amorces utilisés pour l'amplification par PCR des sondes, des séquences codantes des gènes et les séquences de tous ces oligonucléotides respectivement.

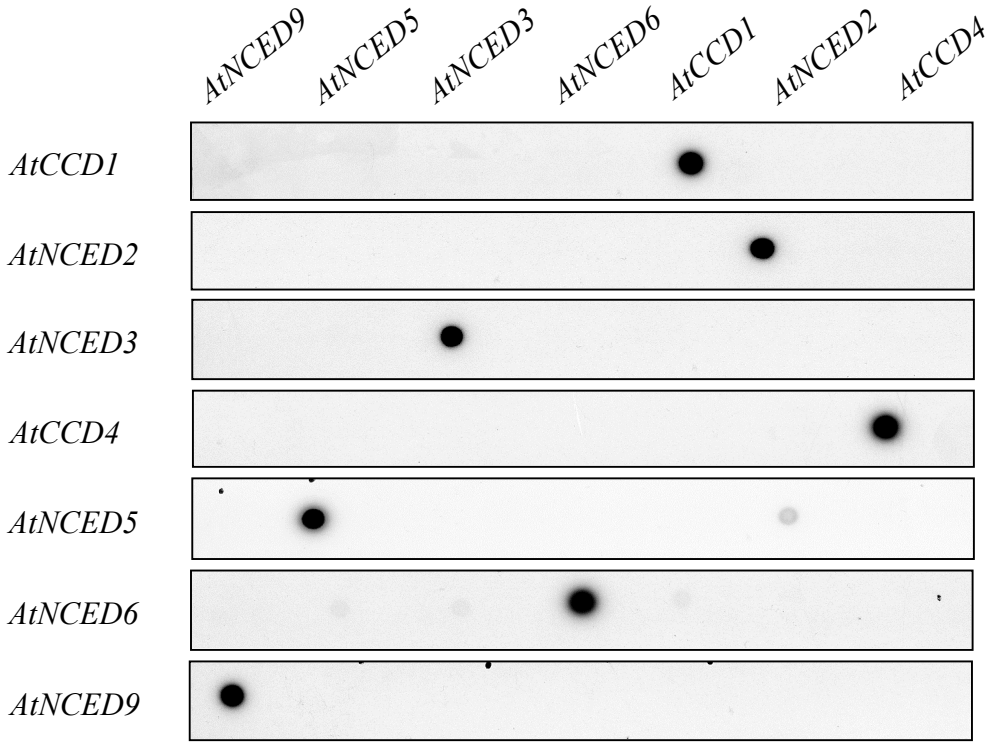


Figure 2.3 : Dot blot des 7 gènes les plus homologues de la famille *AtNCED*. Les séquences codantes des gènes ont été fixése sur une membrane de nylon et chacune de ces membranes a été hybridée avec les sondes définies pour chacun des gènes.

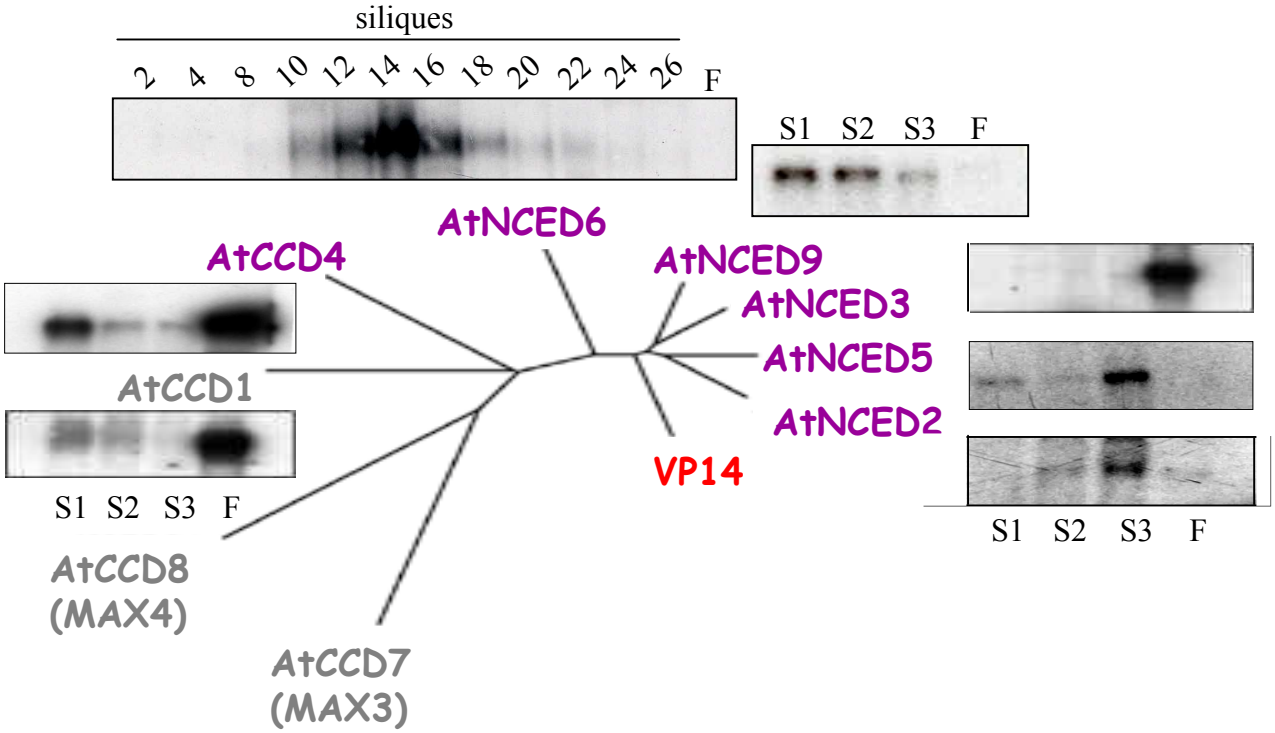


Figure 2.4 : Arbre phylogénétique de la famille AtNCED par rapport à la protéine VP14 de maïs. Pour chacun des membres les plus homologues (violet), l'expression dans trois stades de siliques en développement (S1, S2, S3) et les feuilles (F) a été testée en northern blot. Le profil d'expression du gène *AtNCED6* tout au long du développement de la silique est représenté. S1 : 0-8 JAF ; S2 : 9-18 JAF ; S3 : 19-26 JAF.

Tableau Ia : Couples d'amorces utilisés pour la synthèse des sondes spécifiques des gènes *AtNCED*.

Genes	Forward primers (5 '→ 3')	Reverse primers (5 '→ 3')
AtCCD1	GGC GGA GAA ACT CAG TGA TGG	GAA TCA TCC CAT CTC CAT CAA AC
AtNCED2	TAC AAT GCC GAT GAG TGG TGG	GAT TGT TCC TTC GAC GGT GAG
AtNCED3	ATG GCT TCT TTC ACG GCA ACG	GCT TCT CGT GGC TGA CAA GG
AtCCD4	AAC AAA AGG AGA GCA ATG GAC TCT	GAA GCA TAC CGT CGC CGT CGA A
AtNCED5	ATG GCT TGT TCT TAC ATA TTA AC	GAA CCA TAC CGT CAC CGT CGA A
AtNCED6	ATG CAA CAC TCT CTT CGT TCT	AAT CAT TCC GTC ACC GTC AAA
AtNCED9	ATG ACG ATA ATA ACC ATT ATT TCT GG	GGA TGG GGA TGA CGG CGG CGC

Tableau Ib : Couples d'amorces utilisés pour l'amplification des séquences codantes des gènes *AtNCED* et *AtCCD*.

Genes	Forward primers (5 '→ 3')	Reverse primers (5 '→ 3')
AtCCD1	GGC GGA GAA ACT CAG TGA TGG	ATA ACG CCA TAA TAT GTG
AtNCED2	GAA ACC TCA CCG TCG AAG G	GAT TGT TCC TTC GAC GGT GAG
AtNCED3	ATG GCT TCT TTC ACG GCA ACG	ACT GGT AAA TCT CGC TCT CTC
AtCCD4	AAC AAA AGG AGA GCA ATG GAC TCT	GGA ACC CTT CGC GGC AAC C
AtNCED5	ATG GCT TGT TCT TAC ATA TTA AC	GCT TCA AGC TGG CTC CCA CC
AtNCED6	ATG CAA CAC TCT CTT CGT TCT	TTC AAC TGA TTC TCG CTC ACG
AtNCED9	ATG ACG ATA ATA ACC ATT ATT TCT GG	AGT TGG ATC ATT GGA CAC TTG

Grâce à ces sondes, nous étions alors en mesure d'étudier l'expression de chacun des gènes de la famille des *AtNCED* et des AtCCD les plus proches de la protéine VP14. Nous avons choisi d'effectuer une étude préliminaire sur des siliques entières (enveloppes et graines), ainsi que sur des feuilles. Le développement de la silique a été divisé en trois parties sur les 25 jours nécessaires pour qu'une graine arrive à maturité : de 0 à 8 jours après fécondation (JAF) (début de maturation), de 9 à 18 JAF (milieu de maturation) et de 19 à 25 JAF (fin de maturation). Ceci nous a permis d'ajouter à la localisation spatiale, la localisation temporelle de chaque gène.

Les résultats de ces hybridations mettent en évidence un comportement distinct de chacun des gènes (**figure 2.4**). En effet, les transcrits s'accumulent différemment au cours du développement de la graine et sont présents ou absents dans les parties aériennes. *AtNCED3*, de même que *AtCCD1* et *AtCCD4*, est essentiellement exprimé au niveau végétatif, mais également dans une moindre mesure dans les siliques entières. Alors que *AtCCD1* et *AtCCD4* présentent un niveau de transcrits plus important en début de développement des siliques, les ARNm de *AtNCED3* sont visibles uniquement entre 19 et 25 JAF. *AtNCED2* s'exprime majoritairement dans les siliques, mais un faible signal est également détecté dans les feuilles. Avec *AtNCED5*, il pourrait être impliqué dans la

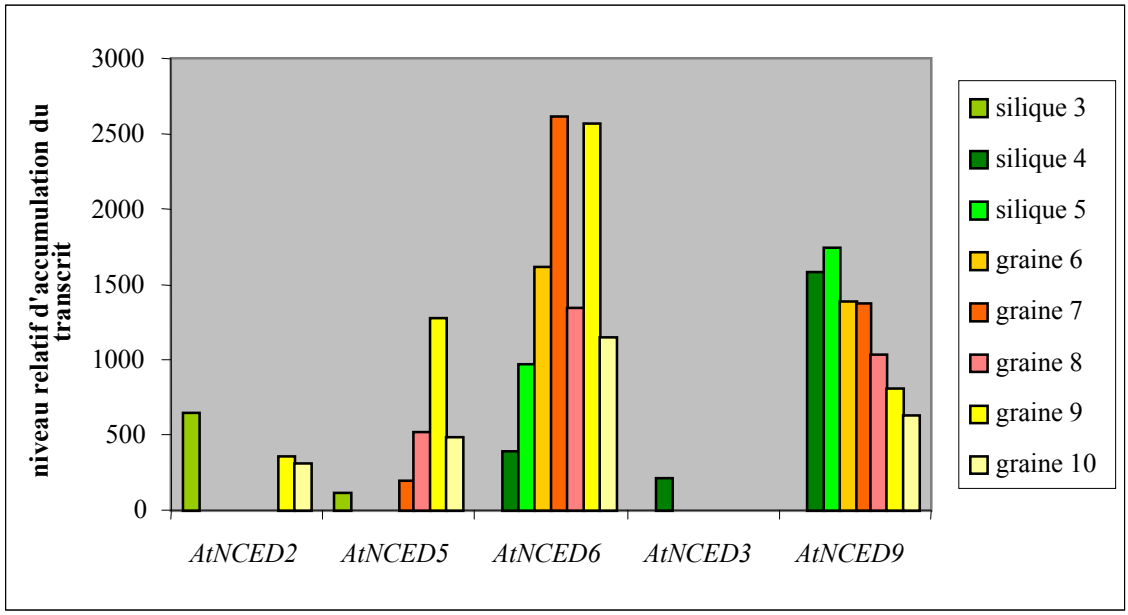


Figure 2.5 : Accumulation relative des transcrits des 5 gènes *AtNCED* potentiellement impliqués dans la biosynthèse de l'ABA, au cours du développement de la graine. Ce développement est divisé en 10 stades. Les stades 3, 4 et 5 sont représentés par des siliques entières ; les stades 6 à 10 sont des graines isolées.

source : http://www. genevestigator.ethz.ch

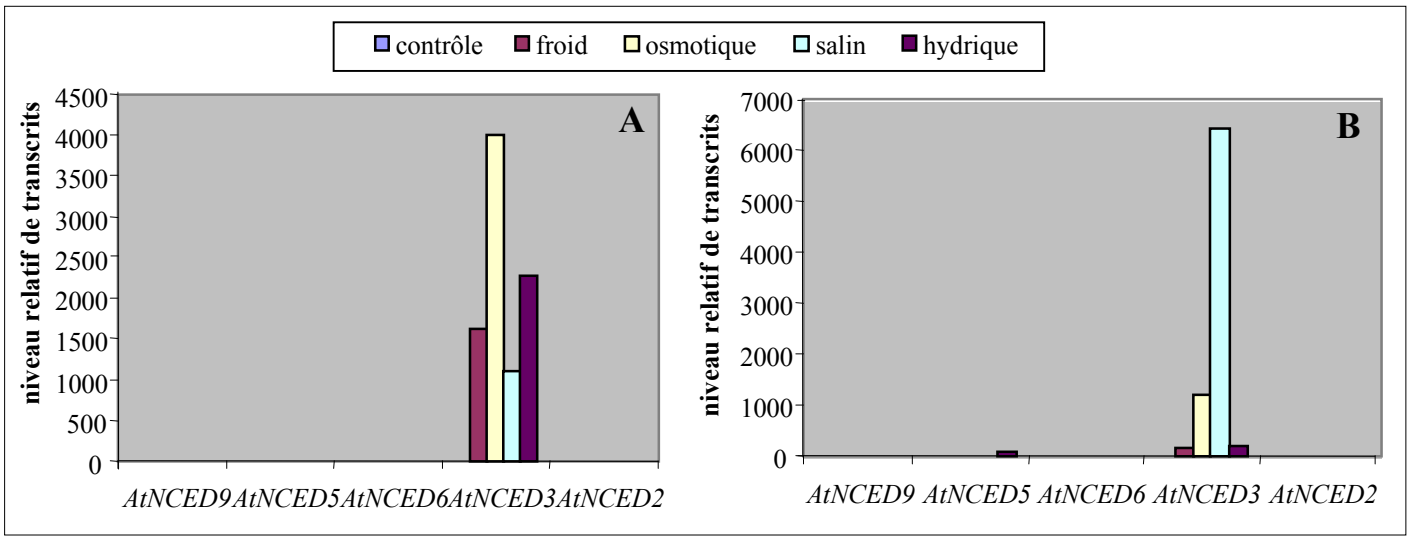


Figure 2.6 : Accumulation relative des transcrits des 5 gènes *AtNCED* potentiellement impliqués dans la biosynthèse de l'ABA, dans les tissus chlorophylliens (**A**) et dans les racines (**B**) soumis à différents stress. Durée des stress : froid, 6h ; osmotique, 6h ; salin, 6h ; hydrique, 1h.

source : http://www. genevestigator.ethz.ch

production de l'ABA dans les graines en fin de maturation. De plus, trois gènes ne sont pas détectés dans les feuilles, il s'agit de *AtNCED5*, *AtNCED6* et *AtNCED9*. *AtNCED6* et *AtNCED9*, présentent le même profil d'expression au cours du développement avec une accumulation de transcrits plus importante dans les deux premiers tiers du développement.
Ces résultats confirment et complètent les analyses décrites par Iuchi et collaborateurs (2001) et Tan et collaborateurs (2003) (Iuchi et al., 2001) (Tan et al., 2003).

2.1.2.2. Northern in silico

Une analyse de northern *in silico* a été effectuée dans les graines, feuilles et racines à l'aide de la base de données "Gene Investigator" (https://www.genevestigator.ethz.ch/) sur les gènes *AtNCED* potentiellement impliqués dans la biosynthèse de l'ABA, *AtNCED2*, *AtNCED3*, *AtNCED5*, *AtNCED6* et *AtNCED9* (**Figures 2.5, 2.6**). Concernant les tissus végétatifs, l'étude a été complétée par l'analyse de la réponse des gènes *AtNCED* à diverses conditions de stress : sécheresse, froid, stress osmotique et stress salin.
Conformément aux résultats précédents, *AtNCED3* est très peu exprimé dans les graines tout au long de leur développement et les transcrits d'*AtNCED2* et *AtNCED5* s'accumulent préférentiellement en fin de développement. Les profils d'*AtNCED6* et *AtNCED9* sont eux aussi très similaires à ceux présentés en northern blot. *AtNCED9* semble fortement exprimé au début du développement de la graine et cette expression diminue au cours du temps, tandis que le pic d'accumulation d'ARNm *AtNCED6* est plus tardif au cours du développement de la graine. Dans les tissus végétatifs, *AtNCED3* est le gène majeur de réponse aux stress puisqu'il est largement surexprimé dans les 4 conditions testées. Dans les feuilles, il est le plus sensible au stress osmotique, alors que dans les racines, *AtNCED3* est induit plus fortement lors d'un stress salin. Cependant, *AtNCED3* ne semble exprimé dans les conditions de contrôle dans aucun de ces deux tissus. Les transcrits *AtNCED3* ont pourtant été observés dans les feuilles non stressées, de même que ceux d'*AtNCED2* et *AtNCED3* dans les racines (Iuchi et al., 2001) (Tan et al., 2003). La sensibilité des puces à ADN paraît donc assez faible.
Ainsi, les résultats recueillis grâce à "Gene Investigator" sont en bonne corrélation avec ceux précédemment décrits. Ils nous apportent également des informations concernant le niveau d'expression des gènes aux différents stades de siliques ou de graines considérés. Il apparaît sur la **figure 2.5** que les gènes majoritaires participant à la voie de biosynthèse de l'ABA dans la graine seraient *AtNCED6* et *AtNCED9*.
En tenant compte de l'ensemble de ces résultats, nous avons décidé d'orienter nos recherches vers une analyse approfondie des gènes *AtNCED6* et *AtNCED9* dans un premier temps. L'étude de *AtNCED2* et *AtNCED3* a ensuite été entreprise afin de préciser leurs rôles dans la biosynthèse de l'ABA dans la graine, notamment par rapport à celui d'*AtNCED6*.

2.2. Analyse fonctionnelle du gène *AtNCED6*

2.2. Analyse fonctionnelle du gène *AtNCED6*

L'étude du gène *AtNCED6* a débuté par l'isolement au laboratoire, du mutant *Atnced6-1*. Tous les membres de la famille n'avaient pas encore été identifiés et aucune étude de ces gènes n'avait encore été réalisée chez *Arabidopsis*. L'analyse préliminaire du mutant *Atnced6-1* a montré qu'il ne présentait aucun phénotype dans les parties aériennes en condition de stress hydrique, mais qu'il était déficient en ABA dans les graines. Cette caractéristique très particulière nous a incité à étudier plus avant ce gène.

Article en préparation : *AtNCED6* is specifically involved in ABA synthesis in *Arabidopsis* seed endosperm

Valérie Lefebvre, Helen North, Anne Frey, Martine Miquel, Bruno Sotta and Annie Marion-Poll

N.B. : Les figures non présentées sont situées en annexe.

2.2.1. Résumé

2.2.1.1. Résumé

Les 9-*cis*-épxycaroténoïde dioxygénases catalysent le clivage des 9-*cis*-époxycaroténoïdes en xanthoxine, étape clef régulatrice de la biosynthèse de l'ABA. Chez *Arabidopsis*, ces enzymes appartiennent à une famille multigénique composée de 9 membres dont 5 seulement semblent impliqués dans la production d'ABA. Parmi elles, AtNCED6 participe effectivement à la biosynthèse d'ABA *in vivo*, puisque des plantes transgéniques surexprimant ce gène produisent davantage d'ABA et les mutants *Atnced6* ont une teneur en ABA réduite dans les graines. En effet, le gène *AtNCED6* est spécifiquement exprimé dans la graine. Une étude cytologique approfondie, par fusion transcriptionnelle du promoteur avec les gènes rapporteurs *GUS* et *GFP* et hybridation *in situ*, a montré qu'*AtNCED6* s'exprime uniquement dans l'albumen de la graine, tout au long du développement. Les graines des deux mutants alléliques *Atnced6* sont résistantes au paclobutrazol, un inhibiteur de biosynthèse des GAs et accumulent moins d'ABA que le WT, cependant qu'elles restent dormantes. De plus, les graines de ces mutants ont une composition en acides gras modifiée avec une teneur accrue en C18:2. Par contre, ces mutants ne sont pas affectés dans leur réponse au stress hydrique.

Les mutants *Atnced6* représentent donc une nouvelle classe de mutants déficients en ABA uniquement affectés dans la graine. L'ABA synthétisé dans l'albumen pourrait participer à la balance hormonale régulant la germination de la graine et à la régulation de la synthèse des lipides.

2.2.1.2. Summary

The cleavage of 9-*cis*-epoxycarotenoids to xanthoxin, catalyzed by 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenases, is considered to be the key regulatory step of ABA biosynthesis. In *Arabidopsis*, these enzymes form a multigene family with 9 members, only 5 of which are thought to be involved in ABA production. Amongst these, AtNCED6 would indeed appear to be required for ABA biosynthesis *in vivo*, as transgenic plants over-expressing the corresponding gene overproduced ABA, and in *Atnced6* mutants ABA levels were reduced in seeds. The latter observation correlated with the seed specific expression of the *AtNCED6* gene. Detailed cytological studies using either transcriptional fusions of the promoter with *GUS* and *GFP* reporter genes, or *in situ* hybridization showed that *AtNCED6* was expressed specifically in the endosperm throughout seed development. Seeds of two independent *Atnced6* mutant alleles were resistant to paclobutrazol, a GAs biosynthesis inhibitor, and had lower levels of ABA in their seeds than WT. Nonethelesss, mutant seeds were still dormant. Furthermore, mutant seeds had an altered fatty acid composition, with increased levels of C18:2. In contrast, no alteration in the response to water deficit was observed in mutant plants.

The *Atnced6* mutants, therefore represent a new class of ABA deficient mutants with seed specific phenotypes. The ABA synthesized in the endosperm apparently participates in the hormonal balance that controls germination, and in the regulation of lipid biosynthesis.

2.2.2. Introduction

The phytohormone abscisic acid (ABA) plays a major role in plant stress adaptation and in seed development and germination. In accordance, most ABA-deficient or response mutants from various plant species show altered phenotypes in response to abiotic stress and in the expression of seed dormancy. Moreover, the regulation of these physiological processes depends largely on the fine-tuning of hormone levels. Indeed, ABA accumulates to high levels when plants are subjected to certain abiotic stresses, such as water deficit, and during seed development.

ABA is derived from carotenoid precursors. The cleavage of *cis*-epoxycarotenoids by nine-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) is the first step specific to ABA biosynthesis. NCED enzymes cleave the *cis*-isomers of violaxanthin and neoxanthin to a C_{15} product, xanthoxin and a C_{25}-by-product (Schwartz et al., 1997b). The first *NCED* gene (*VP14*) was cloned from maize after insertional mutagenesis, and by sequence homology, *NCED* genes have subsequently been identified in several other plant species (Tan et al., 1997) (Schwartz et al., 2003). In *Arabidopsis*, nine NCED related sequences have been identified and phylogenetic analysis has indicated that five of them clustered with functionally-characterized NCED proteins from other species (Schwartz et al., 2003). In agreement, recombinant proteins encoded by four of these genes exhibited *cis*-xanthophyll cleavage activity *in vitro*, nevertheless one of them, AtNCED5, remains to be characterized enzymatically (Iuchi et al., 2001). The remaining four *Arabidopsis* protein sequences, more distantly related to maize VP14, have been named AtCCD for carotenoid cleavage dioxygenase and do not appear to be involved in ABA biosynthesis. The recombinant protein AtCCD1 has been shown to cleave symmetrically a variety of carotenoids at positions 9-10 and 9'-10', whereas NCEDs cleaved carotenoids asymmetrically at 11-12 (Schwartz et al., 2001). The AtCCD7 and AtCCD8 recombinant proteins can sequentially cleave ß-carotene and their activities in plants produce a mobile signal which inhibits branching (Sorefan et al., 2003) (Booker et al., 2004) (Schwartz et al., 2004) ; as yet no enzyme activity has been reported for AtCCD4.

Mutants affected in *NCED* genes have been identified from maize (*vp14*) (Tan et al., 1997), tomato (*notabilis*) (Burbidge et al., 1999) (Thompson et al., 2004) and *Arabidopsis* (*nced3*) (Iuchi et al., 2001) (Ruggiero et al., 2004). As *vp14* and *notabilis*, *Atnced3* mutant plants showed increased water loss and reduced ABA levels in vegetative tissues. In accordance, *AtNCED3* transcript levels increased upon water deficit, whereas other *AtNCED* genes showed no or minor increases (Iuchi et al., 2001) (Tan et al., 2003). Therefore *AtNCED3* likely plays a major role in the regulation of ABA synthesis in response to stress. However, the phenotypes of mutants affected in other *AtNCED* genes remain to be analyzed in order to evaluate the respective contribution of the five members of the gene family. *AtNCED2, 3, 5* and *6* expression studies have been performed by *GUS* reporter gene analysis (Tan et al.,

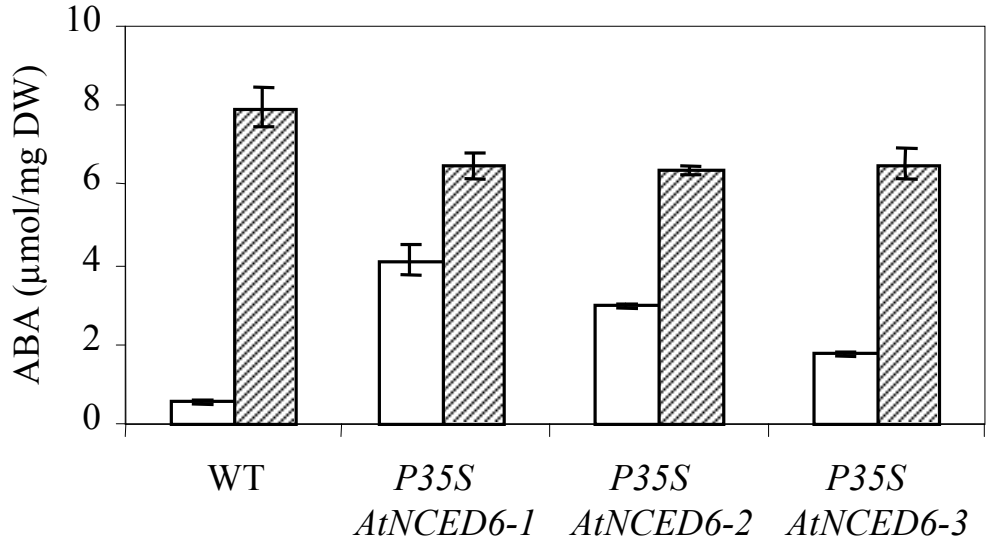


Figure 2.7 : ABA content of detached rosettes of transgenic lines overexpressing a *P35S::AtNCED6* construct.
The ABA content was measured at RWC of either 100% (□) or 80% (▨).
Bars represent standard errors (n = 3).

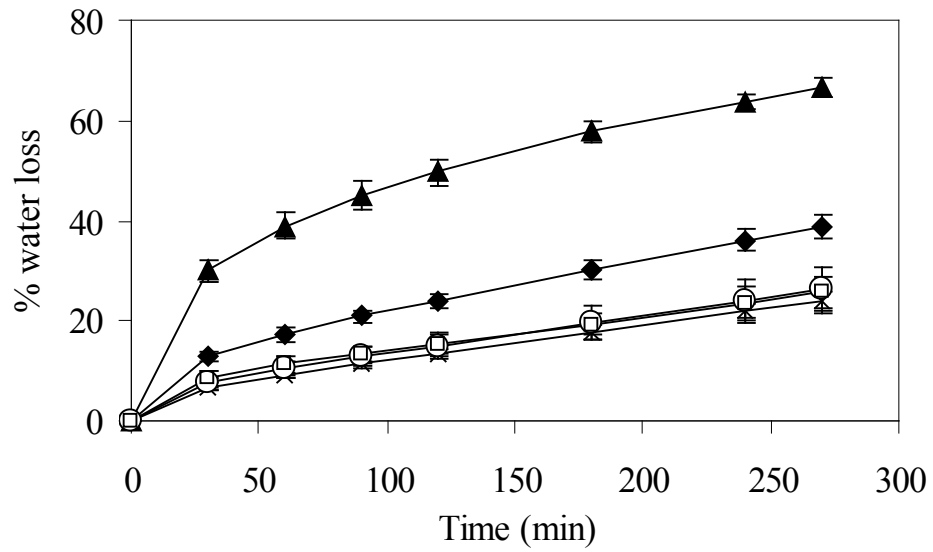


Figure 2.8 : Water loss of detached rosettes from transgenic lines overexpressing *P35::AtNCED6*.
The water loss of (◆) WT, (▲) *Ataba3-1*, (×) *P35S AtNCED6-1*, (○) *P35S AtNCED6-2* and (□) *P35S AtNCED6-3* is expressed as the percentage of the initial fresh weight of detached rosettes.
Bars represent standard deviation.

2003). Only *AtNCED2* and *3* were found to be expressed in roots, whereas in aerial vegetative organs *AtNCED2*, *3* and *5* transcripts were detected. Their pattern of expression was tissue specific and restricted to particular cell types, such as root tips, vascular tissue or guard cells. All four genes were expressed in reproductive organs and seeds, but again with variable patterns. Taken together these results indicate that the tissue-specificity of ABA synthesis might be controlled largely by the differential expression of *NCED* genes. In addition, expression studies and phenotypic analysis of transgenic plants also indicate that carotenoid cleavage is the major regulatory step for ABA accumulation both upon stress and in seeds. Firstly, *NCED* gene and protein expression has been shown to be well correlated to stress-induced ABA accumulation in *Phaseolus vulgaris* (Qin and Zeevaart, 1999) and secondly *NCED* transcript overexpression in transgenic plants from several species increased both water stress tolerance and seed dormancy (Iuchi et al., 2001) (Thompson et al., 2000b) (Qin and Zeevaart, 2002).

In seeds, ABA is synthesized in tissues from different origins, the testa is of maternal origin, the endosperm and the embryo both result from fertilization. The site of ABA synthesis conditions its physiological action. In particular, maternal ABA promotes reserve accumulation and embryonic ABA induces seed dormancy and desiccation tolerance (Finkelstein and Gibson, 2002) As for vegetative tissues, it is expected that the spatio-temporal regulation of certain *NCED* genes might be a key element in the control of ABA levels in seeds for the regulation of physiological processes such as seed development, maturation, desiccation and germination. In this study, we have undertaken the detailed analysis of the function and expression of the *AtNCED6* gene which is, according to a previous study (Tan et al., 2003), only expressed in reproductive organs. We have demonstrated by both mutant and transgenic plant analyses that the *AtNCED6* gene is indeed involved in the ABA biosynthesis pathway. By both reporter gene analysis and *in situ* hybridization, *AtNCED6* expression in seeds was found to be exclusively restricted to the endosperm, leading us to investigate the role of the ABA produced in this tissue in the regulation of seed development and germination.

2.2.3. Results

2.2.3.1. AtNCED6 *gene is involved in ABA biosynthesis* in vivo

Sequence similarity to maize VP14 indicated that AtNCED6, together with four other NCED proteins, might be implicated in ABA synthesis. This hypothesis was supported further by the observation that the recombinant AtNCED6 protein was able to catalyse the *in vitro* oxidative cleavage of the 11,12 double bond of 9-*cis* epoxy carotenoids (Iuchi et al., 2001). Nevertheless, AtNCED6 is, among the 5 putative AtNCED enzymes, the most distantly related to AtNCED3, which has been clearly demonstrated to be involved in ABA biosynthesis (Iuchi et al., 2001) (Schwartz et al., 2003) (Ruggiero et al., 2004). To demonstrate the involvement of AtNCED6 in ABA biosynthesis *in vivo*, we decided to

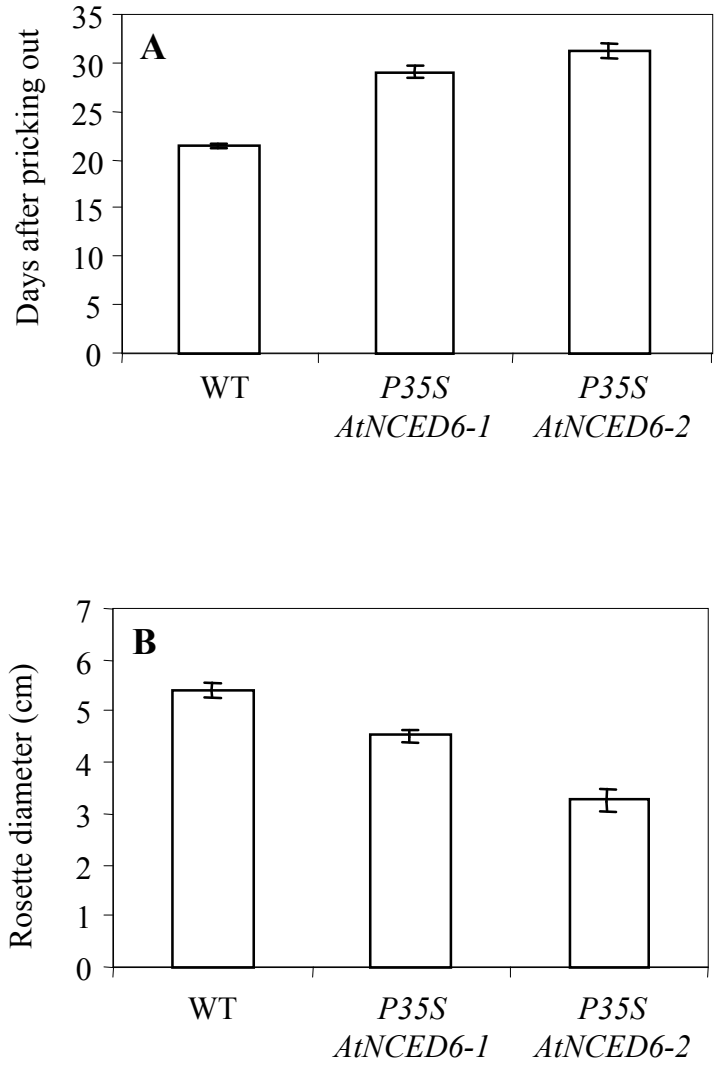


Figure 2.9 : Effect of ABA content on the vegetative growth of WT and two *P35S::AtNCED6* transgenic lines. When the floral spike measured 1 cm, two criteria were measured : (**A**) the number of days after pricking out and (**B**) the rosette diameter.
Bars represent standard errors (n = 23).

express this protein ectopically in transgenic plants. The overexpression of ABA biosynthetic genes, such as *LeNCED1* in tomato, *PvNCED1* in *Nicotiana* and *AtNCED3* in *Arabidopsis* led to increased ABA levels in leaves and seeds (Thompson et al., 2000b) (Iuchi et al., 2001) (Qin and Zeevaart, 2002). It would therefore be expected that the overexpression of the *AtNCED6* gene under the control of the cauliflower mosaïc virus (*CaMV*) *35S* promoter would result in a similar effect.

Primary transformants, carrying a *35S*::*AtNCED6* construct were selected for kanamycin resistance. T2 progeny seeds of several of them showed reduced levels of germination. The number of germinated seeds could, however, be increased by the addition of the ABA biosynthesis inhibitor, norflurazon or by stratification (data not shown), indicating that increased ABA synthesis might be responsible for increased seed dormancy. To facilitate subsequent analyses we selected three independent transgenic lines, segregating with a 3:1 ratio for kanamycin resistance in T2 seeds as predicted for a single T-DNA insertion, which exhibited a complete germination of T2 seeds after stratification. The expression of the *AtNCED6* transgene was verified in the homozygous offspring of these three transgenic lines by RT-PCR analysis. In contrast to wild type (WT) leaves where no *AtNCED6* transcripts were detected, RNA was present in transgenic leaves (data not shown). ABA accumulation was then measured in non-stressed rosettes of the 3 lines and an increase of up to 4 fold was observed in comparison to WT levels (**figure 2.7**). Unexpectedly, when detached rosettes were dehydrated to reduce the relative water content (RWC) to 80 % of that of non-stressed rosettes, the increase in ABA content was lower (1.5 to 4 fold) for transgenic lines than for WT (about 10 fold) (**figure 2.7**). Therefore increased basal levels of ABA would appear to down regulate ABA accumulation upon stress. Furthermore higher ABA levels in turgid tissues increased their tolerance to subsequent desiccation. Firstly, the time required to reduce the water content of transgenic rosettes from 100% to 80% was longer than for WT (respectively 200 min and 80 min). In addition, analysis of the rate of dehydration confirmed that transgenic plants where more resistant to water loss than WT (**figure 2.8**). After 4.5 hours of dehydration, wild-type detached rosettes had lost 40% of their water content, whereas transgenic lines had only lost 30%. These results further demonstrate that the *AtNCED6* gene is indeed implicated in ABA biosynthesis *in vivo*. In addition, they prove that the ectopic expression of *AtNCED6* in vegetative tissues results in increased tolerance to hydric stress as previously shown for *AtNCED3* (Iuchi et al., 2001). Furthermore, increased ABA levels in transgenic lines, not only improved stress tolerance, but also induced alterations in their vegetative development. Indeed, rosette size was reduced and the floral spike appeared later than WT (**Figure 2.9**). Therefore increased ABA synthesis in non-stressed plants reduced growth and delayed flowering time. Retardation of plant development might result from both the inhibition of growth by high levels of ABA and its action on stomatal closure that would reduce photosynthetic activity.

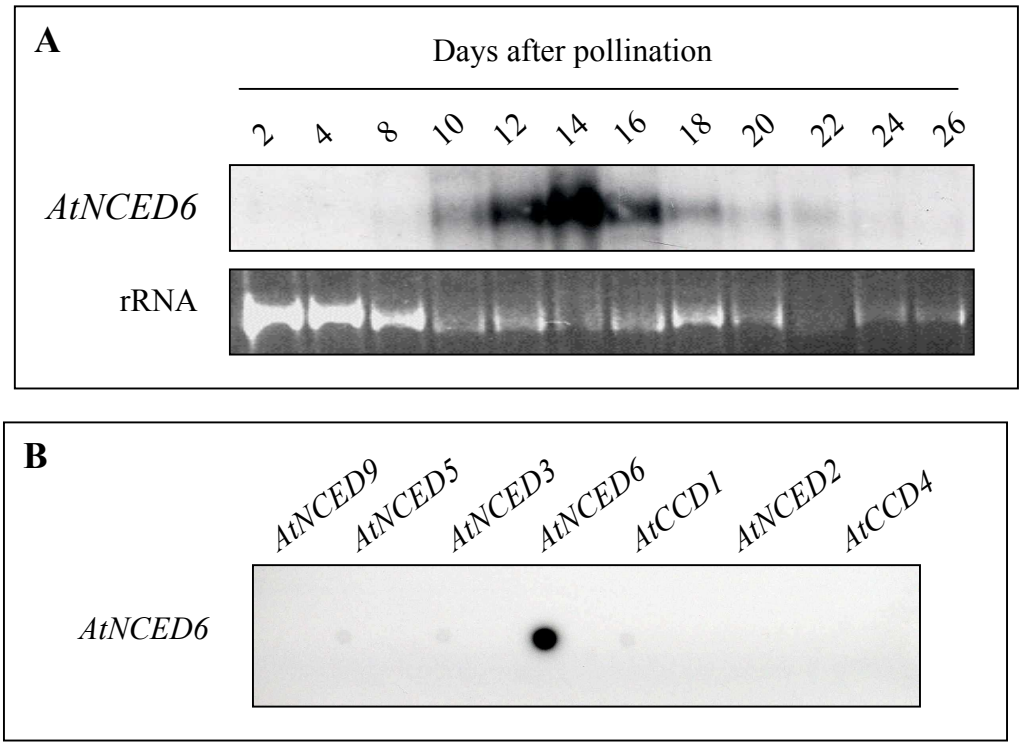


Figure 2.10 : Northern blot analysis of *AtNCED6* transcript abundance in developing wild type siliques **(A)**. RNA loading was visualised by ethidium bromide staining. Hybridization was performed using an *AtNCED6* specific probe, that did not hybridize to full-length genomic fragments of the 6 other *AtNCED or AtCCD* genes most closely related to *AtNCED6* **(B)**.

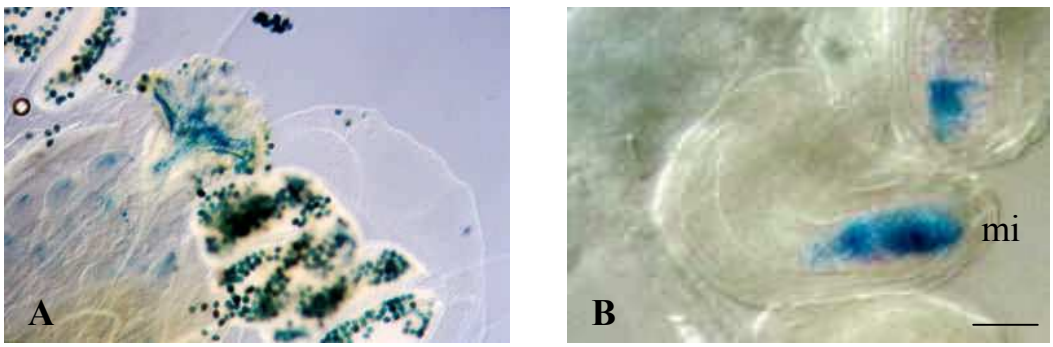


Figure 2.11 : *AtNCED6* promoter::GUS expression in (**A**) mature pollen in anthers and germinating pollen on stigma, and (**B**) in ovules at the micropylar pole. Scale bar = 40 µm

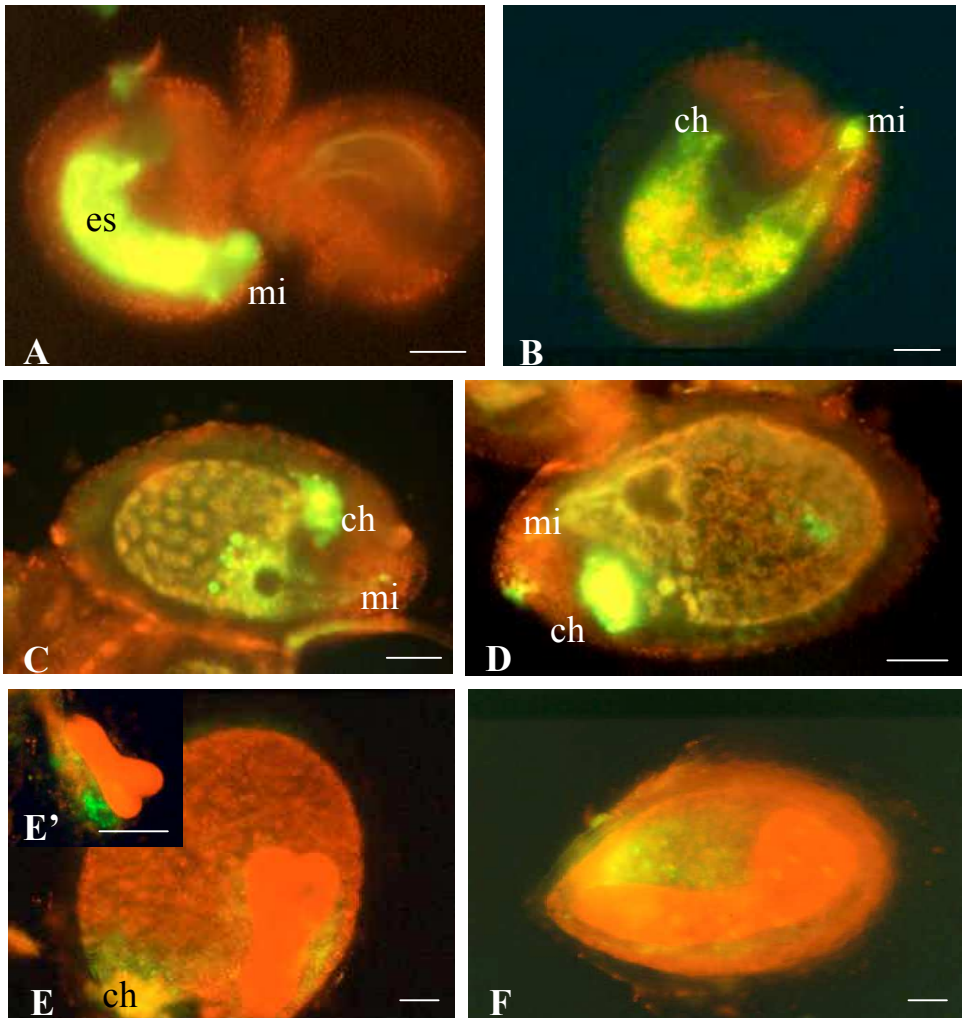


Figure 2.12 : *AtNCED6* promoter::GFP expression (**A**) in the embryo sac of fertilized ovule, (**B**) in the embryo sac of early globular stage embryo seed, at the chalazal pole and surround the embryo at (**C**) late globular, (**D**) heart, (**E**) torpedo and (**F**) curled cotyledon stage embryo. Scale bar = 40 µm (**A**), 50 µm (**B**, **C**, **D**), 50 µm (**E**, **E'**), 60 µm (**F**).

2.2.3.2. Temporal regulation of AtNCED6 *transcript in developing seeds*

In a previous study, Tan *et al.* (Tan et al., 2003) observed that *AtNCED6* transcripts were specifically expressed in reproductive tissues, i.e. flowers and developing siliques. By RT-PCR, we confirmed that *AtNCED6* transcripts were detected in developing siliques, and no expression was found in whole plantlets. In addition, expression was observed only in seeds and not in empty silique envelopes (data not shown). In order to specify the temporal expression pattern of the gene, northern blot analysis was performed on siliques throughout development, from 2 days after pollination (DAP) until seeds were dry (corresponding to 26 DAP). We found high transcript levels at mid maturation, with a peak at 14 DAP (**figure 2.10**). Therefore, the *AtNCED6* expression pattern correlated well with that described for ABA accumulation in developing seeds (Karssen et al., 1983).

Since the ABA accumulated during seed development has been shown to be derived from both maternal and embryonic tissues (Groot and Karssen, 1992), it was possible that tissue specific ABA synthesis might be regulated by the differential expression of the *AtNCED* family members. Indeed, according to previous data (Tan et al., 2003) several *AtNCED* genes showed distinct expression patterns in seeds, however the precise site of *AtNCED6* expression was not reported. Therefore we investigated the tissue-specific localization of *AtNCED6* transcripts by reporter gene analysis and *in situ* hybridization.

2.2.3.3. AtNCED6 *is specifically expressed in the endosperm*

To determine more precisely *AtNCED6* spatial and temporal expression patterns, the gene promoter was transcriptionally fused to two different reporter genes, *GUS* and *GFP*. The results presented here were obtained with four independent GUS transgenic lines and four independent GFP lines, all of which presented the same expression profiles. Before fertilization *AtNCED6* transcripts were present in pollen and at the micropylar pole of ovules, as revealed by GUS activity (**figure 2.11**). After fertilization, *AtNCED6* expression was specifically detected by GFP analysis of whole seeds (**figure 2.12**) and by GUS staining of seed cross-sections (**figure 2.13**). By these techniques, we observed that *AtNCED6* transcripts were present from fertilization up until seed maturity. At early stages after fertilization, i.e. until the early globular embryo stage, GFP expression was uniformly detected throughout the embryo sac (**figure 2.12 A, B**). During this phase, nuclei of the syncytial endosperm are first equally spaced in the embryo sac, then a central vacuole is formed and the syncytium fills the chalazal and micropylar chambers, but is restricted to a single layer of nuclei in the central chamber surrounding the central vacuole (Brown et al., 1999). At the late globular stage, fluorescence remained high in the micropylar endosperm localized around the embryo and also at the chalazal pole, but became weaker in the central endosperm layer (**figure 2.12 C**). The lower GFP signal in this layer might result from the localization of the GFP protein around the widely spaced nuclei that are surrounded by lateral vacuoles, as described by Brown *et al.* (Brown et al., 1999). At the heart stage,

cellularization of the endosperm begins in the micropylar chamber and then proceeds through the central chamber to the chalazal chamber (Berger, 2003). At this point, from heart to curled-cotyledon embryo stage, the GFP signal became lower around the embryo, but remained strong at the chalazal pole. A high fluorescence intensity in the chalazal chamber might correlate with the persistence of a large coenocytic cyst of multinucleate cytoplasm (Olsen, 2004). At all these stages (**figure 2.12 D to F**), no fluorescence was detected in the embryo or seed testa. Therefore *AtNCED6* expression was apparently limited to the endosperm, and its expression pattern correlated with endosperm development.
Localization of *AtNCED6* gene expression in the endosperm was then confirmed by the observation of seed sections after GUS staining or *in situ* hybridization. In 14 day-old seeds, GUS staining was clearly visible in the endosperm at the chalazal and micropylar poles, but also in the cellularized cell layer surrounding the embryo (**figure 2.13**). *In situ* hybridization using seeds at the same stage also showed that transcripts were detected in these tissues (**figure 2.14**). In addition, these observations confirmed that *AtNCED6* expression was tightly restricted to the endosperm as no signal was detectable in either the embryo or the testa.

2.2.3.4. Molecular characterization of Atnced6 *mutants*

In order to investigate the role of ABA biosynthesis in the endosperm during seed development, the effect of mutations in the *AtNCED6* gene were analysed. Two independent insertion mutants were identified in the databases of mutant collections used for systematic sequencing of insertion flanking sequences. The first, *Atnced6-1*, was in the SLAT collection (Tissier et al., 1999) generated by *dSpm* element insertions in the Columbia ecotype. The second, *Atnced6-2* was a Versailles collection T-DNA mutant in the Ws ecotype. Genomic DNA was extracted either from individual plants from a seed pool containing *Atnced6-1*, or from *Atnced6-2* T3 plants, and mutants were identified by PCR amplification from the *dSpm* 5' or LB extremity, respectively. The location of the insertions was then characterised on homozygous mutants (**figure 2.15**).

2.2.4. Atnced6 *mutants exhibited ABA-deficient phenotypes in seeds, but not in vegetative tissues*

As ABA plays a major role in drought stress responses and is involved in stomatal closure, *Atnced6* mutants were tested for their resistance to rapid dehydration. We observed that their dehydration rate and ABA levels increased upon water stress and were similar to that of their respective WT (data not shown). In addition, several ABA-deficient mutants have also been shown to be defective for the post-germinative growth arrest that occurs under adverse environmental conditions. In response to osmotic stress, ABA contents have been shown to increase and block early WT development, in contrast to ABA-deficient seedlings which continued their development (Gibson, 2005). The sucrose resistance of *Atnced6-1* germinating seeds was tested and a normal developmental arrest was observed (data not shown), indicating that impairment in the *AtNCED6* gene did not notably affect ABA

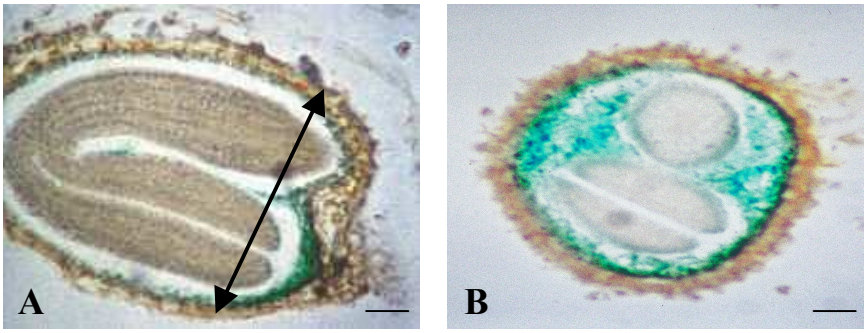
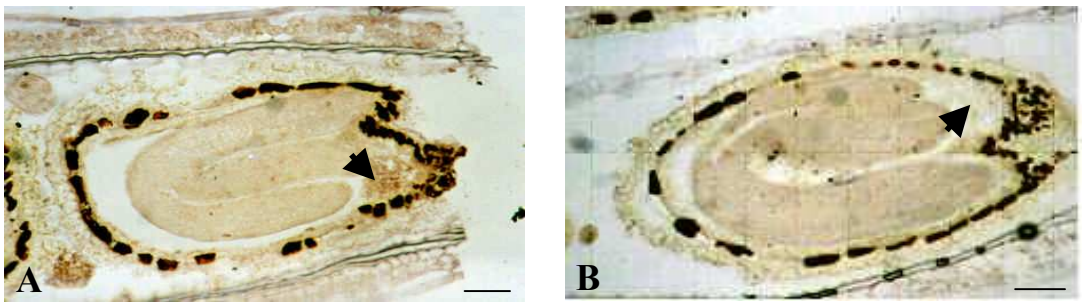


Figure 2.13 : (**A**, **B**) Expression in sections of *AtNCED6* promoter::GUS seeds 14 days after flowering. The double-headed arrow in **A** indicates the position of the cross-section in **B**. Scale bar = 50 µm.



antisense probe control (sense probe)

Figure 2.14 : *In situ* hybridization of wild-type developing seeds using a *AtNCED6* specific probe. The arrows indicate the location of a strong hybridization signal with the antisense probe in the chalazal endosperm, which is not detected with the sense probe. Scale bar = 70 µm.

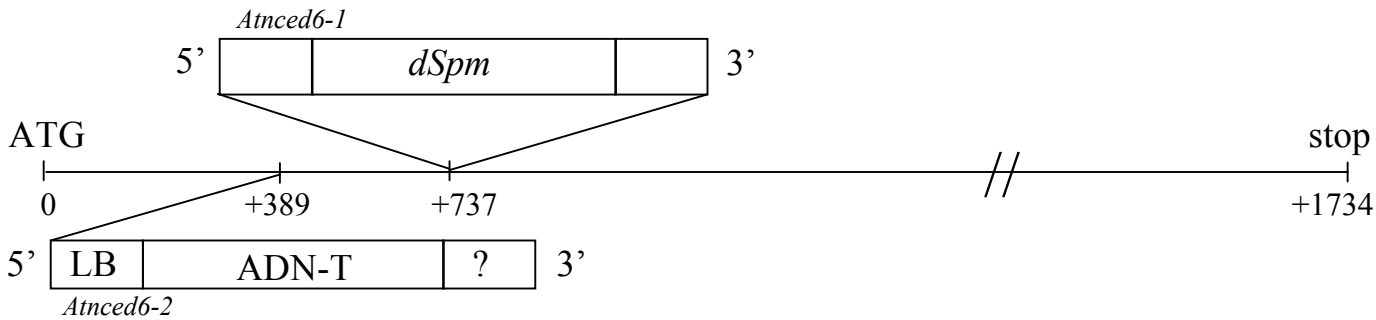


Figure 2.15 : Diagram of *AtNCED6* gene showing *Atnced6-1* and *Atnced6-2* insertion positions.

synthesis in mutant seedlings. The absence of vegetative phenotypes in the *Atnced6* mutants is in good correlation with the observed tissue-specific expression of *AtNCED6* transcripts in reproductive organs and its absence in vegetative tissues.

As the *AtNCED6* gene was highly expressed in seed tissues, ABA levels were measured in dry mutant seeds. ABA content was shown to be reduced to half that of WT, indicating that ABA synthesis in the endosperm makes a significant contribution to the amount of ABA in dry seeds (**figure 2.16 A**).

Most ABA deficient mutants exhibit reduced seed dormancy and genetic studies have demonstrated that embryonic ABA and not maternal ABA is responsible for dormancy induction (Karssen et al., 1983). The availability of an ABA-deficient mutant specifically affected in ABA synthesis in the endosperm allowed the respective roles of ABA synthesized in the endosperm and in the embryo to be evaluated. Freshly-harvested seeds of the *Atnced6* mutants germinated at a similar rate to WT seeds, indicating that dormancy was correctly established, in contrast to a classical ABA-deficient mutant such as *Ataba3-1* (**figure 2.16 B**). Lack of seed dormancy in ABA-deficient mutants has also been described to be associated with increased resistance to paclobutrazol, an inhibitor of gibberellin (GA) synthesis (Karssen and Laçka, 1986). When sown on a medium supplemented with paclobutrazol, *Atnced6* seeds were clearly more resistant than WT (**figure 2.16 C, D**). This indicated that less GAs were required for *Atnced6* germination as has been previously observed for other classical ABA mutants. These observations suggest either that endosperm derived ABA does not contribute to the control of seed dormancy, or that expression of other *AtNCED* genes is sufficient for seed dormancy induction. Nevertheless, decreased ABA levels in mutant seeds reduced the GA level required for germination.

2.2.4.1. ABA synthesis in the endosperm regulates lipid accumulation in seeds

In *Arabidopsis* seeds, reserves are mainly accumulated in the embryo, although low levels are also found in the endosperm. Mobilisation of these endospermic reserves has been shown to be important for germinative growth, in particular to fuel hypocotyl elongation in the dark (Penfield et al., 2004). The availability of *Atnced6* mutants exhibiting reduced ABA synthesis specifically in the endosperm gave us the opportunity to investigate the regulation of storage reserve accumulation by ABA. Since triacyl glycerols are the major storage reserves in *Arabidopsis* seeds, we decided to examine the fatty acid composition and oil accumulation in *Atnced6-1* seeds, compared to WT and to the ABA-deficient mutant *Ataba3-1*, that is defective for ABA biosynthesis in all seed tissues. As previously observed for protein reserves (Koornneef et al., 1989), the total amount of lipids was not significantly altered in ABA-deficient mutants (**Table II**). However, the fatty acid composition was affected since the linoleic acid (C18:2) content was significantly higher in both ABA-deficient mutants compared to WT, whereas alpha-linolenic acid (C18:3) levels decreased in the *Ataba3-1* mutant. These observations indicated that ABA is involved in the regulation of lipid

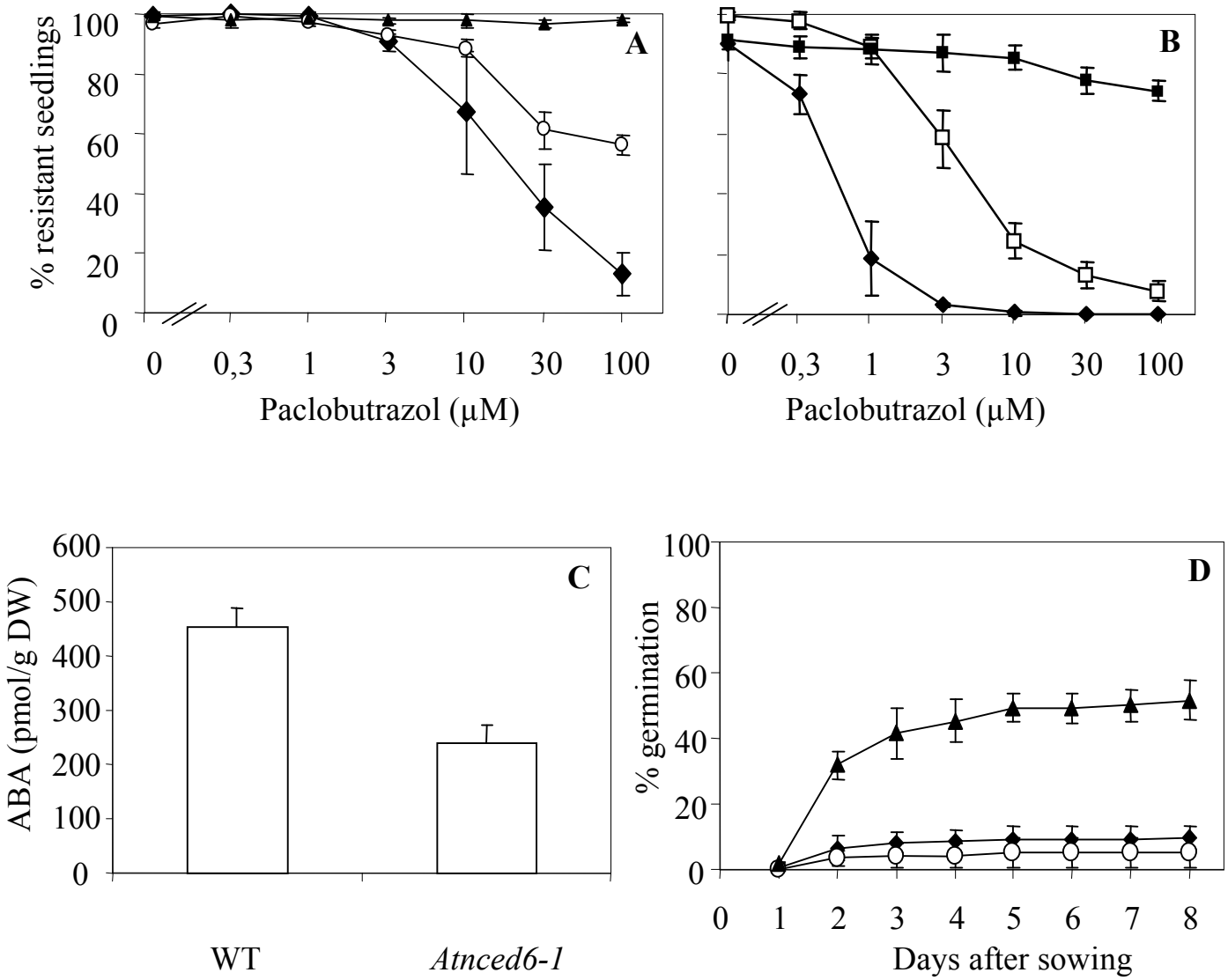


Figure 2.16 : Seed phenotypes associated with *AtNCED6* deficiency**.** (**A**, **B**) Paclobutrazol resistance of germinating seeds of (**A**) (○) mutant *Atnced6-1,* (▲) *Ataba3-1* and (◆) WT (Col-0), and (**B**) ( ) mutant *Atnced6-2* (■) *aba1-13* and (◆) WT (Ws). (**C**) ABA levels in dry seeds of wild type and the *Atnced6-1* mutant. (**D**) Germination of freshly harvested seeds. (◆) WT, (○) *Atnced6-1*, (▲) *Ataba3-1*.
Bars represent standard deviation

accumulation in seeds, and that ABA produced in the endosperm might contribute to this regulation.

	C18:1 (mol %)	C18:2 (mol %)	C18:3 (mol %)	Total FA (nmol.mg^{-1} DW)
WT (Col-0)	15.45	28.01*	20.72*	849.07
Atnced6-1	15.37	29.42*	19.66	840.54
Ataba3-1	14.77	32.85*	17.72*	859.22

Table II : Fatty acid composition of *Atnced6-1* and *Ataba3-1* dry seeds in comparison to WT from the same ecotype (Col-0). Only oleic, linoleic and alpha linolenic acid (C18:1, C18:2 and α-C18:3 respectively) concentrations are shown since significant differences were only observed for C18:2 and C18:3 fatty acids. Similar results were obtained in three independent experiments; only one representative experiment is shown. Respective proportions are expressed as the percentage of total amount of fatty acids in the sample (mol %). Total fatty acid contents (FA) are expressed in nmol.mg^{-1} DW. Each value presented as the mean of three independent measurements, obtained from 3 lots of 20 seeds harvested from three different plants grown in the same conditions. Asterisks indicate statistically significant differences in fatty acids composition (threshold = 0.05%).

2.2.5. Discussion

The enzymes catalysing the downstream steps of ABA biosynthetic pathway, ZEP, AtABA2 and AAO3 are encoded by unique genes in *Arabidopsis*, except for NCEDs which appear to belong to a 5-member family (Schwartz et al., 2003) (Nambara and Marion-Poll, 2005). Activity of recombinant proteins and/or sequence homology have indicated that AtNCED2, 3, 5, 6 and 9 are involved in carotenoid cleavage leading to xanthoxin synthesis (Iuchi et al., 2001) (Tan et al., 2003). However the enzymatic function *in vivo* has as yet only been proven for AtNCED3 by ectopic gene expression under the control of a constitutive promoter and by the analysis of mutant phenotype (Iuchi et al., 2001) (Ruggiero et al., 2004). Using similar approaches, we have demonstrated here that a second *NCED* gene, *AtNCED6* is also involved in ABA biosynthesis, since its overexpression in transgenic plants resulted in increased ABA accumulation, and lack of expression in mutant seeds reduced ABA levels (**figures 2.7, 2.16 A**).

As most ABA biosynthetic genes are unique, mutations in them affected both vegetative and reproductive tissues. In contrast, *AtNCED6* expression was only found in reproductive tissues, i.e. pollen, ovules and seeds (Tan et al., 2003), it was therefore possible to investigate the effect of ABA deficiency in seeds without the interference of deficient phenotypes in the mother plant. Initially, the tissue specific expression of *NCED6* gene was determined more precisely by *GFP* and *GUS* reporter gene analysis in whole seeds as well

as by observation of seed sections after either GUS staining or *in situ* hybridization. After fertilisation, *AtNCED6* expression was reproducibly and exclusively detected in seed endosperm (**figures 2.12, 2.13, 2.14**). Considering the pattern of expression of *AtNCED6* gene, *Atnced6* mutants would be expected to exhibit reduced levels of ABA synthesis specifically in the endosperm, thus giving us the opportunity to investigate the role of ABA produced in this tissue on seed physiology.

The phenotype of *Atnced6* mutants firstly indicated that a significant amount of the ABA accumulated in dry seeds might be synthesized in the endosperm, since ABA content was notably reduced in mutant seeds (**figure 2.16 A**). Since *ZEP* gene expression has been detected in both embryo and endosperm all along seed development (Audran et al., 2001), the presence of xanthophyll precursors in these tissues was expected. In addition, analysis of carotenoid composition indicated that the *cis*-xanthophyll substrates of NCEDs were indeed present in extracts of testa plus endosperm dissected from the embryos of developing seeds (data not shown). Therefore xanthoxin must be produced in the endosperm. However, expression of genes for steps further downstream, *AtABA2* and *AAO3*, has been reported to be very low in seeds (Cheng et al., 2002) (Seo et al., 2004) and their expression in the endosperm has not yet been described. Cheng *et al.* (2002) suggested that ABA precursors might be mobile in vegetative tissues, because *AtABA2* is mainly expressed in vascular tissues instead of target cells. A similar hypothesis may hold true in seeds, with ABA precursors migrating for instance from the endosperm to the embryo prior to conversion into ABA. The precise localisation of downstream ABA biosynthetic genes will be necessary in order to validate the mobility of precursors in seeds.

In contrast to monocotyledons where the endosperm is the major site of reserve accumulation, in *Arabidopsis* seed reserves are mainly stored in the embryo, and the endosperm is simply present as a single cell layer for most of seed development. Nevertheless recent data clearly indicated that the endosperm makes a significant contribution to lipid storage in *Arabidopsis* seeds, and lipid hydrolysis during imbibition was differentially regulated by ABA in the embryo and endosperm (Penfield et al., 2004). Mutants defective for *AtNCED6* gene expression exhibited altered lipid compositions (**table II**), indicating that ABA produced in the endosperm likely regulates lipid synthesis, in particular the conversion of linoleic acid to alpha-linolenic acid (**table II**). In accordance several enzymes of fatty acid biosynthesis have been shown to be induced by ABA in *Brassica napus* (Qi et al., 1998), in particular a desaturase responsible for C18:3 synthesis (Zou et al., 1995). Nevertheless, the *Atnced6* mutant was less affected than *Ataba3-1*, which exhibits a stronger ABA deficient phenotype. Therefore it can be hypothesized that ABA produced in the endosperm might only regulate lipid synthesis in this tissue leaving the fatty acid content of the embryo is not affected. Further studies will be necessary to investigate lipid accumulation in the endosperm and embryo of *Atnced6* mutants.

Germination phenotypes of *Atnced6* mutants were also milder than ABA-deficient mutants affected in unique genes (**figure 2.16 C, D**), indicating that gene redundancy occurs. Embryonic ABA is responsible for the induction of seed dormancy (Karssen et al., 1983) (Groot and Karssen, 1992), however, this ABA might be synthesized in the embryo and/or the endosperm. Early studies in maize indicated that endospermic ABA was not involved in vivipary inhibition (Robertson, 1952). By chromosome translocation, maize grains were obtained that were ABA-deficient in the endosperm and not in the embryo and these were dormant. Our results apparently confirm these observations since *Atnced6* mutant seeds germinated similarly to wild type. Nevertheless germination of *Atnced6* mutants exhibited another characteristic typical of ABA-deficient mutants, since mutant seeds were able to germinate on paclobutrazol concentrations that inhibited WT germination. In most ABA deficient mutants the phenotypes of reduced dormancy and paclobutrazol resistance are associated (Leon-Kloosterziel et al., 1996a). This has been interpreted as a lower requirement for gibberellins for germination when ABA levels are reduced. Nevertheless a class of *rdo* (*reduced dormancy*) mutants has been shown to be non-dormant without being resistant to paclobutrazol (Leon-Kloosterziel et al., 1996b), therefore dormancy mechanisms do not always involve the hormonal balance between ABA and GA.

During seed germination several events occur concomittantly, notably embryo growth is possible due to reserve mobilisation and hydrolysis of the external barriers, endosperm and testa (Bentsink and Koornneef, 2002). These physiological processes are positively regulated by GAs and inhibited by ABA. Lower ABA levels in the endosperm might affect some of these processes such as hydrolysis of endosperm and its reserves, but not other mechanisms that involve embryo growth for instance. Therefore the GAs requirement for germination would be decreased, but dormancy maintained.

Despite an apparent redundancy in gene function, the analysis of *AtNCED6* gene expression and *nced6* mutant phenotypes has yielded insights and working hypotheses about the role of ABA in the endosperm during seed development and germination. Further studies on other members of the *AtNCED* family will be necessary to determine whether other *AtNCED* genes are indeed expressed in the endosperm and which *AtNCED* genes are responsible for ABA synthesis in the embryo.

2.2.6. Material and methods

2.2.6.1. Plant material and growth conditions

Arabidopsis WT and mutant plants were grown either in a greenhouse, with a minimum photoperiod of 13 hours assured by supplementary lighting or in a growth chamber, 16h light, 8h dark photoperiod, 25°C, 70% RH, 250 $\mu E.m^{-2}.s^{-2}$. The *Atnced6-1* mutant (Columbia-0 ecotype) was obtained from SINS (sequenced insertion-site) (Tissier et al., 1999) (http://www.jic.bbscr.ac.uk/Sainsbury-Lab/jonathanjones/SINS-database/sins.htm). The

Atnced6-2 mutant (Wassilewskija ecotype) was obtained from the Versailles mutant collection FlagDB/FST (Balzergue et al., 2001) (http://flagdb-genoplante-info.infobiogen.fr). The mutant *Ataba3-1* (Col-0 ecotype) was kindly provided by Dr M. Koornneef (Leon-Kloosterziel et al., 1996a). The mutant *Ataba1-7* (Ws ecotype) was isolated in our group and contains a nucleotide (A) insertion 2764 bp downstream of the ATG of the *AtZEP* genomic sequence (North, H. and Marion-Poll, A., unpublished data).

2.2.6.2. Germination experiments

For dormancy analysis, freshly-harvested mature seeds were sown in triplicate in Petri dishes containing a 0.5% (w/v) solidified agarose solution and placed in the growth-chamber. Germination was scored each day based on radicle protrusion. For paclobutrazol resistance tests, seeds were surface sterilised and sown on agarose medium supplemented with paclobutrazol (Sopra). The dishes were placed in a cold room (4°C) for 3 days before transfer to the growth chamber for 4 days. Plantlets able to develop 2 green cotyledons were scored as “paclobutrazol resistant”.

2.2.6.3. Water loss assays

Rosettes from plants grown in a greenhouse for 2 to 3 weeks were cut from the root system and weighed. Four plants of each genotype were placed in a laminar flow hood, abaxial surface uppermost for dehydration and weighed at regular intervals over a 4.5 hour period. Water loss was estimated as the percentage of fresh weight lost relative to the initial fresh weight.

2.2.6.4. ABA content

Rosettes or dry seeds were frozen in liquid nitrogen and lyophilized. Extraction in non-oxidative methanol:water (80:20, v/v), prepurification through SepPak C18 cartridges (Waters, USA) and HPLC fractionation in Nucleosil C18 column (Macherey-Nagel, Germany) have been described previously (Kraepiel et al., 1994). Recovery of purified ABA was determined by means of ^{3}H-ABA added to the extracts and scintillation counting of aliquots of the purified fractions. The ELISA procedure was based upon the competition, for a limited amount of monoclonal anti-ABA antibody (LPDP 229, Jussieu, France), between standard ABA-BSA conjugate adsorbed onto the wells of a microtitre plate and free ABA extracted from the samples. Bound antibodies were labelled with a peroxidase-conjugated goat antibody to mouse immunoglobulins (Sigma), and peroxidase activity was then measured. A standard curve was established on each microtitre plate. ABA content was determined five times for each sample.

2.2.6.5. NCED6 probe specificity

A 465 bp fragment of the *AtNCED6* genomic sequence was used as a probe in subsequent northern analysis and *in situ* hybridization. This fragment was amplified from *Arabidopsis*

(Col-0) genomic DNA using the following primers : 5‘-ATG CAA CAC TCT CTT CGT TCT-3’ and 5’-AAT CAT TCC GTC ACC GTC AAA-3’, cloned into the pGEM-T vector (Promega) and sequenced. The specificity of this probe was tested by dot blot analysis against seven *AtNCED* and *AtCCD* genes.

Full-length genomic fragments of *AtCCD1* (At3g63520), *AtNCED2* (At4g18350), *AtNCED3* (At3g14440), *AtCCD4* (At4g19170), *AtNCED5* (At1g30100), *AtNCED6* (At3g24220) and *AtNCED9* (At1g78390) genes, were amplified using primers specific to each gene sequence: *AtCCD1*, 5’-GGC GGA GAA ACT CAG TGA TGG-3’ and 5’- ATA ACG CCA TAA TAT GTG -3’; *AtNCED2*, 5’-TAC AAT GCC GAT GAG TGG TGG-3’ and 5’- GTG TTT GTA TGA TGA AG ATG C-3’; *AtNCED3*, 5’- ATG GCT TCT TTC ACG GCA ACG-3’ and 5’- ACT GGT AAA TCT CGC TCT CTC-3’; *AtCCD4*, 5’-AAC AAA AGG AGA GCA ATG GAC TCT-3’ and 5’-GGA ACC CTT CGC GGC AAC C-3’; *AtNCED5*, 5’- ATG GCT TGT TCT TAC ATA TTA AC-3’ and 5’- GCT TCA AGC TGG CTC CCA CC-3’; *AtNCED6*, 5’- ATG CAA CAC TCT CTT CGT TCT-3’ and 5’- TTC AAC TGA TTC TCG CTC ACG-3’; *AtNCED9*, 5’- ATG ACG ATA ATA CCA TTA TTT CTG G-3’ and 5’- AGT TGG ATC ATT GGA CAC TTG-3’.

The amplification products were verified by checking their size by electrophoresis on agarose gels and sequencing. Amplified DNA (3 ng in a volume of 2 µL) was spotted onto a nylon membrane (Genescreen) after heat denaturation. The membrane was hybridized to the *AtNCED6* radiolabelled using the "prime-a-gene® labeling system" kit from Promega following manufacturer's instructions.

2.2.6.6. Northern blot analysis

Total RNA from seeds or siliques were extracted according to Downing *et al*. (1992) (Downing et al., 1992) except that an additional nucleic acid precipitation with 3M sodium acetate pH 5.2 (0.1V) and isopropanol (1V) was performed prior to the lithium chloride precipitation.

Five to six µg of RNA were loaded onto a 1.2% (w/v) agarose gel (Sambrook et al., 1989) and electrophoresis was performed in 1x MOPS buffer pH 7.0 (20 mM MOPS, sodium acetate 5 mM, EDTA 1 mM) at 60V for 2 hours. Fractionated RNA were then transferred onto nylon membranes (Genescreen) according to manufacturer's instructions. Hybridization was performed using the *AtNCED6* radiolabelled probe.

2.2.6.7. In situ *hybridization*

Single stranded RNA probes were synthesized after linearization of plasmid DNA carrying the 465 bp *AtNCED6* fragment by digestion using *NcoI* and *SalI* restriction enzymes (Invitrogen) for antisense and sense probes, respectively. Transcription was performed using either SP6 (antisense probe) or T7 (sense probe) as the origin of transcription using kit (Riboprobe® combination system SP6-T7 RNA polymerase, Promega). Transcripts obtained were treated with DNAse (10 U, Promega) and then precipitated.

Tissue sections of immature siliques (Col-0 ecotype) were fixed in 4% (p/v) formaldehyde and 0.1% (v/v) triton-X-100 under vacuum for 1 hour and left overnight at 4°C. After fixation, samples were washed in water, dehydrated and treated in histoclear (Histo-clear II, National Diagnostics) before being embedded in paraffin (Paraplast plus, sherwood medical) as described by Jackson (1991) (Jackson, 1991). Nine µm sections were cut and placed on slides (DAKO). Prehybridization was carried out essentially as described by Jackson *et al.* (1991) with following modifications : after dehydration, slides were rinsed in water and incubated for 20 min in 2 x SSC. For protease treatment, slides were incubated for 30 min at 37°C in a solution (20mM Tris-HCl pH 7.5, 2mM $CaCl_2$) containing 1 µg/ml proteinase K. Hybridization was performed using DAKO hybridization buffer at 60°C over night. Slides were then washed with 0.2x SSC for 2 hours at 55°C, followed by 5 min in PBS (Eurobio) at room temperature. Prior to immunological detection, slides were incubated for one hour in 0.5% blocking reagent (Roche), then in 1% (w/v) BSA, 0.1% (v/v) triton-X-100. Detection of hybridized transcripts was performed using anti- digoxigenin antibodies conjugated with alkaline phosphatase (Roche).

2.2.6.8. Cloning and plant transformation

For reporter gene analysis, a 1.8 kb fragment of the *AtNCED6* promoter (–1820 to –4 bp upstream to the ATG codon) was amplified from WT Col-0 genomic DNA and cloned into either pBI101-2 (Ozyme) for GUS expression (pBI101-2::PAtNCED6), or pBINmGFP5-ER (http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/techniques/indexFrame.html) for GFP (pBINmGFP5-ER::PAtNCED6).

To overexpress the *AtNCED6* transcript in transgenic plants, the transformation vector pKYLX71-35S2 was used and the full length *AtNCED6* cDNA cloned in the sense orientation under the control of the *35S* promoter of the cauliflower mosaic virus (Audran et al., 2001). In a second construct, the *35S* promoter *EcoRI-HindIII* fragment was replaced by a 1.2 kb *EcoRI-HindIII* fragment from the promoter of *At2S2* gene encoding 2S albumin (Guerche et al., 1990). Binary vectors were electroporated into the *Agrobacterium tumefaciens* C58C1pMP90 strain and used for agroinfiltration of wild-type (Col-0) (Clough and Bent, 1998). Transformed plants were selected for kanamycin resistance.

2.2.6.9. Reporter gene analysis

GUS staining assays (Jefferson et al., 1987) were performed on dissected *Arabidopsis* siliques at different developmental stages fixed with acetone 90% (v/v) for 30 min at –20°C. Potassium ferricyanide/potassium ferrocyanide were used at 5mM. For sections, siliques were paraffin fixed and embedded as described above for *in situ* hybridization.

Siliques from plants transformed with pBINmGFP5-ER::PAtNCED6 were dissected and seeds were placed between a slide and a coverslip with water. Samples were observed under UV with a microscope (Leica).

2.2.6.10. Lipid composition analysis

Lipid analysis was performed essentially as described by Baud et al. (2002) except for lipid extraction: 20 dry seeds were directly ground in 1 mL of methanol/sulfuric acid (100: 2,5 ; v/v) (Baud et al., 2002).

2.3. *AtNCED9*, un gène de biosynthèse de l'ABA exprimé dans la graine

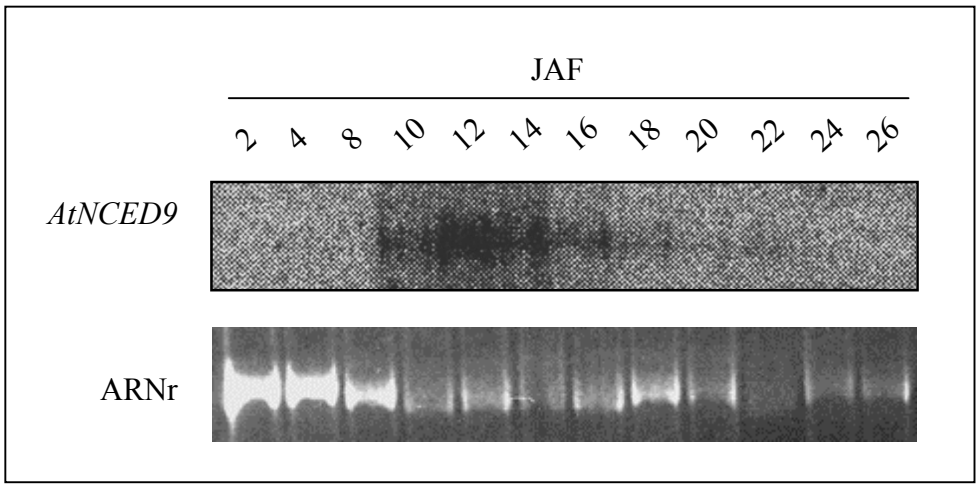


Figure 2.17 : Analyse par northern blot de l'accumulation des transcrits *AtNCED9* dans les siliques sauvages en développement. L'hybridation est réalisée avec la sonde spécifique d'*AtNCED9* ; les ARNs présents sur la membrane sont visualisés grâce au bromure d'ethidium.

2.3. *AtNCED9*, un gène de biosynthèse de l'ABA exprimé dans la graine

2.3.1. Analyse de l'expression de *AtNCED9* dans les graines en développement

2.3.1.1. Expression temporelle de AtNCED9 *par northern blot*

Le patron d'expression du gène *AtNCED9*, exprimé dans la silique entière et non dans les feuilles (**figure 2.4**), suggérait une accumulation des transcrits uniquement dans les graines. Cette hypothèse semble confirmée par les données d'expression *in silico* fournies par Gene Investigator (**figures 2.5, 2.6**).

Une étude plus fine de son profil d'expression a été réalisée par northern blot, tout au long du développement de la silique (2 à 26 JAF). Les résultats, obtenus sur des siliques entières, peuvent être extrapolés à la graine isolée car aucune expression d'*AtNCED9* n'a été détectée dans les enveloppes des siliques (M. Seo, non publié) (**figure 2.17**). Pour un temps total de maturation de 26 JAF, les ARNm d'*AtNCED9* sont visibles à 10 JAF et leur quantité atteint son maximum à 12 JAF, avant de diminuer graduellement et de ne plus être détectables à 22 JAF. Ce pic d'expression précède de 2 jours celui décrit pour *AtNCED6*. Ces deux gènes s'accumulent donc de façon assez similaire au cours du développement de la graine. Afin de déterminer la spécificité tissulaire d'expression d'*AtNCED9* et la comparer à celle d'*AtNCED6*, nous avons entrepris sa détection grâce à l'utilisation de gènes rapporteurs et également par hybridation *in situ* sur coupes fines d'embryons.

2.3.1.2. Utilisation des gènes rapporteurs

La localisation tissulaire des transcrits, par fusion des promoteurs avec le gène rapporteur *GUS* a été réalisée par Tan et collaborateurs (2003), sur les gènes *AtNCED2*, *AtNCED3*, *AtNCED5* et *AtNCED6*. Cependant, aucun résultat n'a pu être obtenu pour *AtNCED9* en utilisant une séquence promotrice de 1,5 kb (Tan et al., 2003).

Nous avons donc réalisé des fusions transcriptionnelles entre un promoteur de 3 kb et les deux gènes rapporteurs *GUS* et *GFP*. L'analyse des transformants GUS et GFP n'a montré aucun signal. Etant donné que l'expression de *AtNCED9* a été détectée par d'autres techniques, il doit nécessairement manquer une séquence régulatrice, soit plus en amont dans le promoteur, soit en aval de l'ATG du gène.

2.3.1.3. Hybridation in situ

Nous nous sommes alors tournés vers l'hybridation *in situ*, qui permet de localiser les transcrits des gènes directement sur des coupes de tissus inclus dans de la paraffine. Afin de nous donner le plus de chance de détecter un signal d'hybridation, nous avons utilisé des siliques immatures récoltées à 10 JAF, où l'expression d'*AtNCED9* est la plus élevée. Les embryons sont alors au stade torpille. Les hybridations ont été réalisées avec des sondes

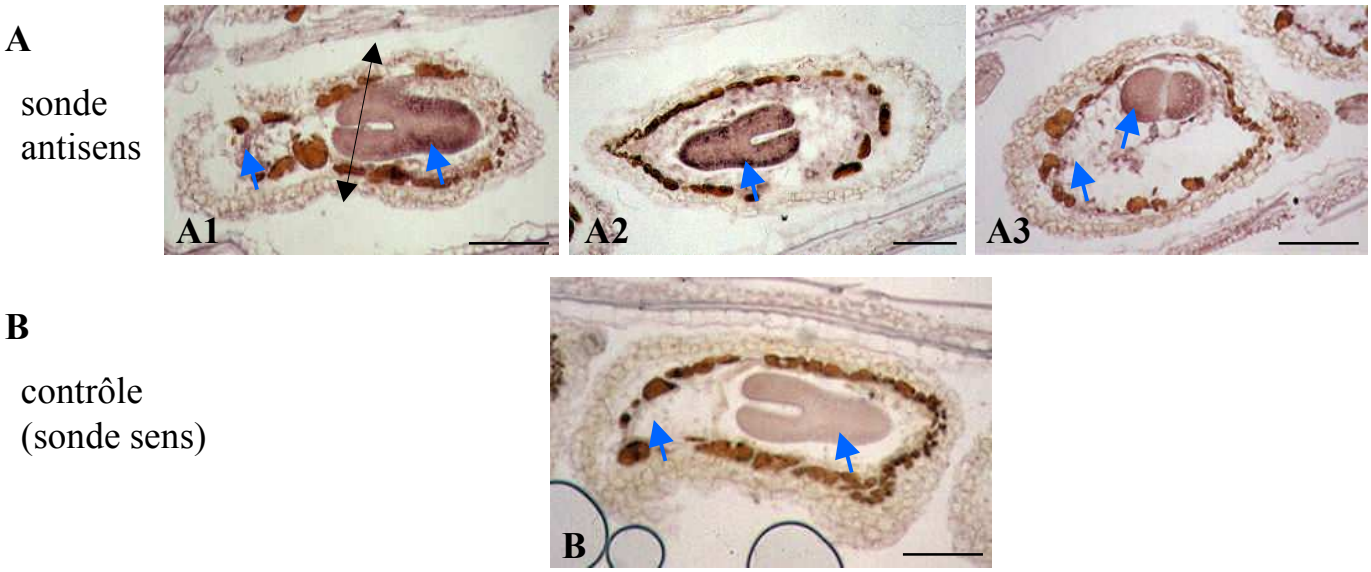


Figure 2.18 : Hybridation *in situ* de graines sauvages de 10 JAF avec la sonde spécifique de *AtNCED9*. Les flèches indiquent le signal d'hybridation détecté avec la sonde antisens (**A**), qui ne l'est pas lors de l'utilisation de la sonde sens (**B**). La double flèche en **A1** indique le plan de coupe de la photo **A3**. barre = 100 µm.

ARN synthétisées à partir de la sonde spécifique du gène *AtNCED9* caractérisée par dot blot (Cf § 2.1.2.1). Pour cela, la sonde a tout d'abord été clonée dans le vecteur pGEM-T, possédant des origines de transcription différentes de part et d'autre du site de clonage. Deux sondes ont été transcrites après linéarisation de ce vecteur : une sonde antisens, capable de se coupler aux ARNm présents dans les tissus car elle leur est complémentaire ; une sonde sens, exacte réplique des ARNm et donc incapable de former des duplex avec eux. Le signal obtenu sur les coupes hybridées avec la sonde antisens reflète la localisation de l'expression du gène étudié. L'hybridation avec la sonde sens constitue donc le témoin négatif de l'expérimentation, permettant de rendre compte du bruit de fond obtenu lors de l'utilisation de sondes marquées.

Le gène *AtNCED9* semble s'exprimer dans l'embryon, mais également dans l'albumen. Les transcrits ont en effet été détectés dans les couches cellulaires externes de l'embryon torpille, au niveau de la jonction hypocotyle-radicule (**figure 2.18 A1**), jusque dans la pointe radiculaire (**figure 2.18 A2**), mais également à la périphérie des cotylédons (**figure 2.18 A3**). Un marquage est également présent dans l'albumen, correspondant à des amas colorés. Il s'agit certainement des DCN (Cf §1.2.3.3), puisqu'à ce stade de développement, l'albumen n'est pas encore cellularisé.

Les marquages mis en évidence sont spécifiques puisqu'ils sont absents des coupes hybridées avec la sonde sens.

2.3.2. Implication de *AtNCED9* dans la biosynthèse de l'ABA

2.3.2.1. Recherche de mutants

Deux mutants d'insertion ADN-T ont été caractérisés et utilisés dans la suite de ce travail, *Atnced9-1* et *Atnced9-2*. Ils proviennent tous deux de lignées SALK (Alonso et al., 2003), dont les graines sont distribuées par la banque NASC (références NASC : N533388 et N623975, respectivement). Chacune de ces insertions a pu être repérée car elle possédait une FST (Flanking Sequence Tag) correspondant au gène d'intérêt. Les FSTs disponibles dans la base de données SIGnAL (http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress) sont définies à partir de la bordure gauche du transgène. Ces deux ADN-T seraient insérés dans la séquence codante d'*AtNCED9*, prédits à respectivement 824 et 1912 pb du codon d'initiation de la transcription.

L'ADN-T utilisé pour la transgenèse dans la banque SALK possède un seul gène de sélection, le gène *NPTII*, encadré par le promoteur et le terminateur de la nopaline synthase. Celui-ci confère à la plante qui l'exprime la résistance à la kanamycine. Il permet donc la sélection *in vitro* des plantes transformées.

2.3.2.2. Caractérisation des insertions

Les graines des lignées SALK sont de génération T3. Au sein des pools de graines reçus, trois génotypes peuvent être trouvés : homozygotes pour l'insertion, hémizygotes et sans

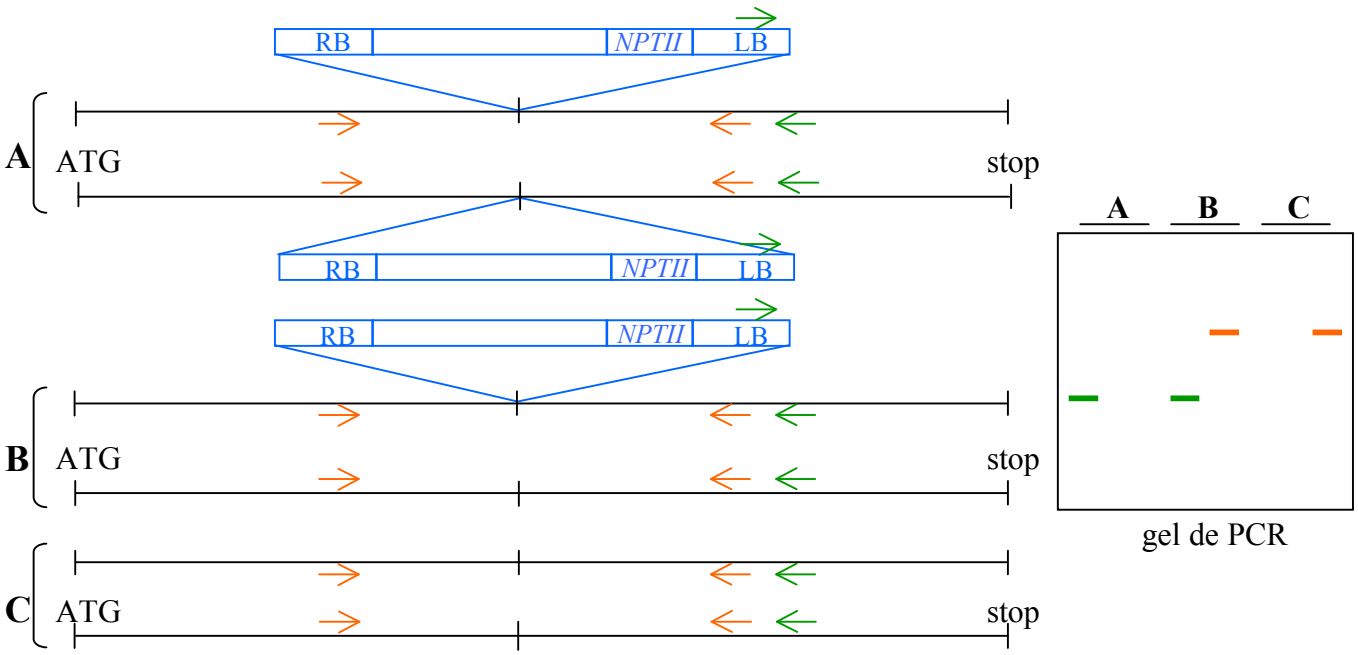


Figure 2.19 : Test de sélection par PCR des lignées homozygotes pour une insertion ADN-T. Lorsque le transgène est présent, l'amplification au moyen des amorces situées de part et d'autre de l'insertion est impossible du fait de la taille trop importante du fragment. La plante A est homozygote, la plante B hémizygote, la plante C ne contient aucune insertion. *NPTII*, gène de résistance à la kanamycine ; LB, bordure gauche ; RB, bordure droite.

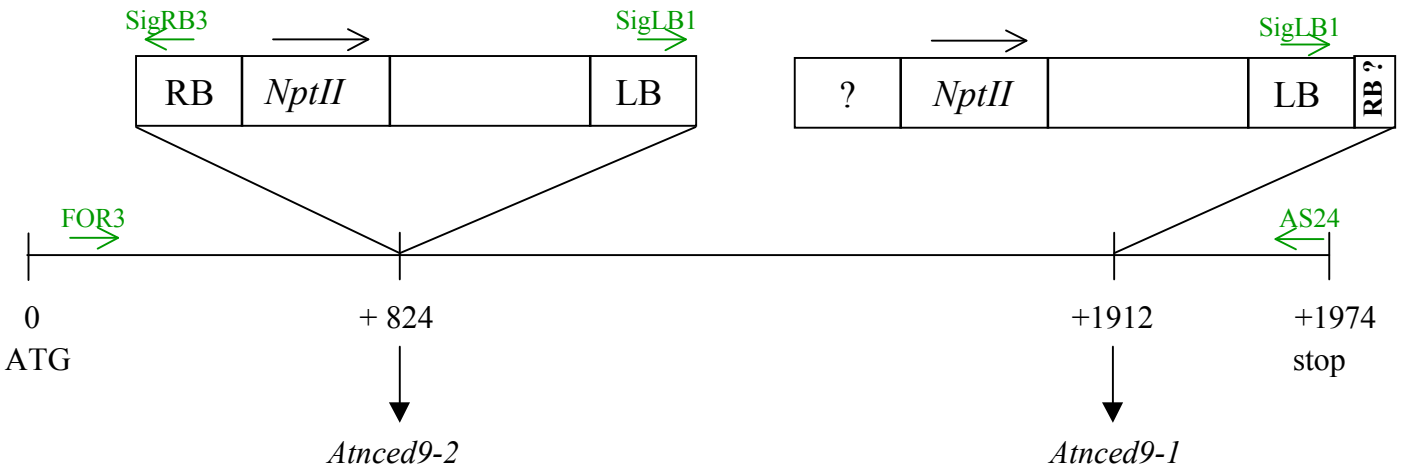


Figure 2.20 : Schématisation des insertions d'ADN-T des mutants *Atnced9-1* et *Atnced9-2* dans le gène *AtNCED9*. Les oligonucléotides utilisés pour la détection des insertions sont signalés : AS24 (AtNCECD9 AS24), FOR3 (AtNCED9 FOR3), SigLB1, SigRB3.

ADN-T. D'après les indications de la base SIGnAL, le gène marqueur *NPTII* peut être "silencé", il est donc possible qu'une lignée possédant une insertion complète ne présente pas le phénotype de résistance à la kanamycine. Nous avons donc recherché par PCR les mutants homozygotes au sein des graines reçues.

Le crible est basé sur l'utilisation de deux couples d'amorces choisis à partir des séquences codantes du gène ou de l'ADN-T. La première PCR détecte la présence de l'ADN-T dans le gène d'intérêt, tandis que la deuxième permet de déterminer les plantes qui possèdent une copie intacte du gène d'intérêt. La synthèse de ces deux types d'informations permet d'identifier les plantes présentant une insertion de l'ADN-T à l'état homozygote ou hémizygote (**figure 2.19**).

Le mutant *Atnced9*-1 nous a été fourni par Seo, M. (non publié) sous forme de graines homozygotes sur lesquelles la sélection avait déjà été effectuée. Une simple vérification de la présence de l'ADN-T au site prédit a été réalisée. Par contre, ce tri a dû être entrepris pour les graines du mutant *Atnced9-2*, qui provenaient du NASC. L'insertion a été déterminée d'abord du côté de la bordure gauche dont la séquence flanquante est disponible dans la base SIGnAL. Pour cela, deux couples d'amorces ont été utilisés : AtNCED9 FOR3 et AtNCED9 AS24, qui produisent un amplicon d'environ 2 kb, soit la totalité de la séquence codante d'*AtNCED9* ; SigLB1 et AtNCED9 AS24, qui amplifient la séquence flanquant la LB (left border, bordure gauche) et permettent d'orienter l'ADN-T à l'intérieur du gène.

Parmi les 21 plantes testées, 9 semblaient contenir l'insertion à l'état homozygote, soit une proportion légèrement supérieure à celle attendue. Les tailles des amplifications obtenues confirment la position de cet ADN-T à environ 800 pb de l'ATG du gène *AtNCED9*. En effet, le produit de PCR correspondant à l'amplification de la LB a une longueur de 1,3 kb.

Afin de mieux connaître la nature de l'insertion, nous avons utilisé un troisième couple d'amorces pour déterminer l'insertion du côté de la bordure droite de l'ADN-T : SigRB3 (sur l'ADN-T) et AtNCED9 FOR3. Les 9 plantes précédemment sélectionnées voient leur homozygotie confirmée par la présence et la taille (900 pb) de cette nouvelle amplification. De plus, ce résultat nous informe que l'ADN-T complet s'est inséré dans la séquence d'*AtNCED9* sans créer de délétion majeure.

L'insertion présente dans le mutant *Atnced9-1* semble en revanche plus complexe. En effet, le couple SigLB1 – AtNCED9 AS24 produit un amplicon d'environ 300 pb, en accord avec la position prédite de l'ADN-T à 1,9 kb du début de la séquence codante d'*AtNCED9*. De plus, le site d'insertion prédit en position +1912 (par rapport à l'ATG) a été confirmé par séquençage. Cependant, aucune amplification n'a été obtenue entre AtNCED9 FOR3 et sigRB3 du côté 5' du gène, par contre, un produit de PCR a été obtenu en mélangeant AtNCED9 AS24 et sigRB3, ce qui suggère qu'un morceau de la bordure droite est collé à la bordure gauche.

Les insertions des ADN-T chez les mutants *Atnced9*-1 et *Atnced9-2* sont schématisées **figure 2.20**.

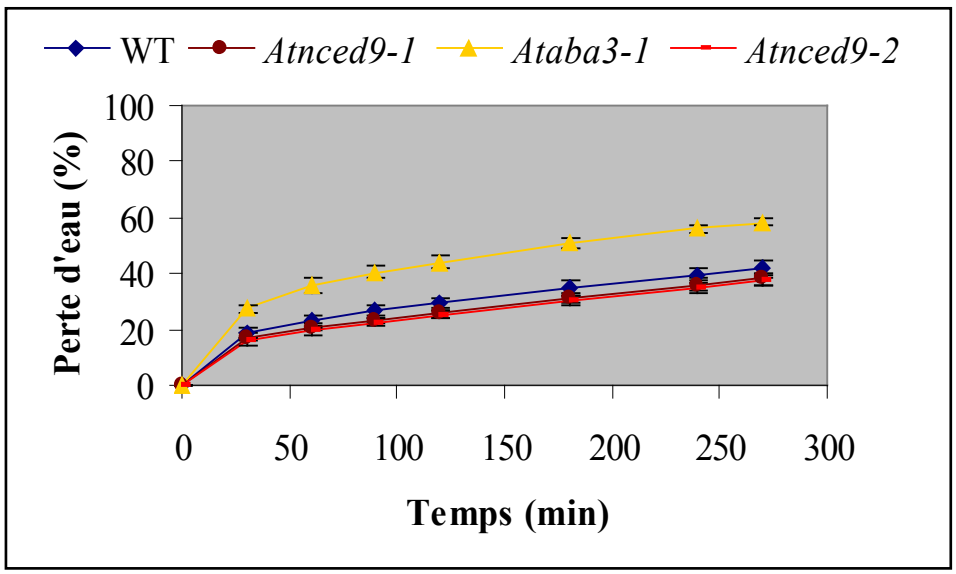


Figure 2.21 : Cinétique de déshydratation des parties aériennes des mutants *Atnced9* en comparaison avec *Ataba3-1* et le sauvage (écotype Col-0). Des rosettes sont séparées de leurs racines et déshydratées sous une hotte à flux laminaire. La perte d'eau est exprimée en fonction du poids frais initial. Barres d'erreur = écarts types.

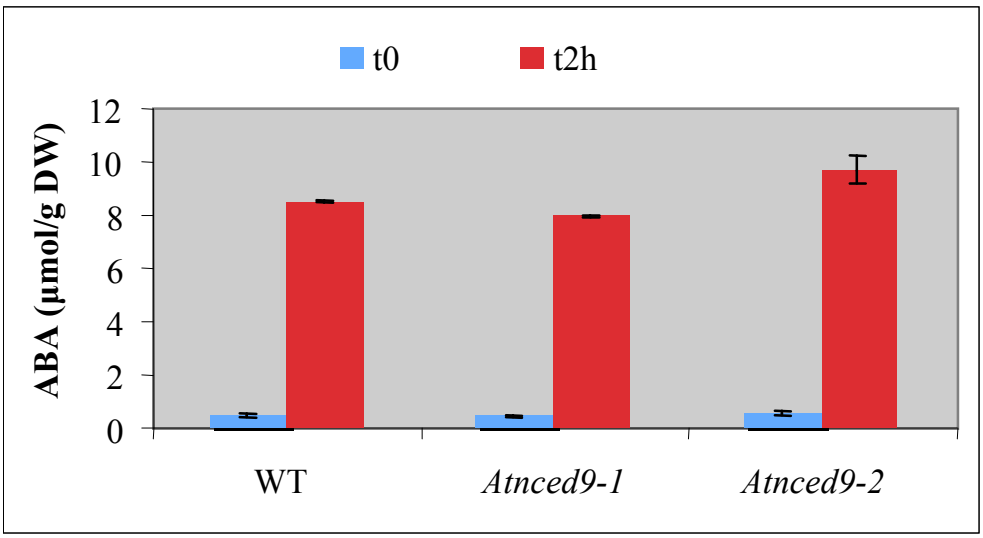


Figure 2.22 : Accumulation d'ABA dans les parties aériennes des mutant *Atnced9-1* et *Atnced9-2* par rapport au sauvage (WT) avant (t0) et après deux heures de déshydratation (t2h) sous hotte à flux laminaire. La concentration est exprimée en µmol d'ABA par gramme de matière sèche. Barres d'erreur = erreurs standards (n=3).

2.3.2.3. Caractérisation physiologique des mutants Atnced9

2.3.2.3.1. Physiologie des parties végétatives

La caractérisation physiologique des deux mutants alléliques *Atnced9* a été entreprise, sur la base des phénotypes associés à une déficience en ABA.

Au niveau végétatif, la déficience en ABA s'accompagne le plus souvent d'un flétrissement des feuilles en cas de déshydratation. En effet, un stress hydrique induit chez le type sauvage une augmentation de la teneur en ABA dans les parties aériennes, à l'origine de la fermeture des stomates, ce qui évite une trop grande perte d'eau par évapotranspiration.

Nous avons déterminé les conséquences de ce stress sur des plantes dont l'expression du gène *AtNCED9* est altérée ainsi que sur des plantes sauvages et des mutants *Ataba3-1*, déficients dans l'activité AB-aldéhyde oxydase. Les quatre génotypes considérés sont issus du même écotype Col-0.

Pour cela, des rosettes séparées de leur système racinaire ont été soumises à une déshydratation rapide et la perte d'eau a été mesurée à intervalles réguliers. Celle-ci est exprimée comme la perte de poids par rapport au poids frais initial (**figure 2.21**). Les résultats de cette expérience sont sans équivoque : les deux mutants *Atnced9* présentent le même profil de perte d'eau que le sauvage, et au bout de 4 heures 30, les rosettes ont perdu 40% d'eau. Par contre, le mutant *Ataba3-1*, incapable de réguler la fermeture de ses stomates (Leon-Kloosterziel et al., 1996a), subit une diminution de son poids frais de 60%. Il semble donc qu'une perte d'expression du gène *AtNCED9* n'ait pas de conséquence visible lors de la réponse à un stress hydrique. Les mutants *Atnced9* sont toujours capables de réduire l'évapotranspiration de leurs feuilles en régulant le fonctionnement des pores stomatiques.

Ce résultat est en accord avec l'absence d'expression du gène *AtNCED9* dans les feuilles (**figure 2.4**) et plus généralement dans les parties végétatives en cas de stress (**figure 2.6**). Toutefois, pour vérifier l'absence d'implication du gène *AtNCED9* dans la biosynthèse de l'ABA dans l'appareil végétatif des plantes, nous avons mesuré l'accumulation de l'ABA dans les parties aériennes des plantes coupées soumises à un stress hydrique de 2 heures et comparé à la quantité d'ABA avant déshydratation. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites ci-dessus et à ce stade, les plantes ont subi une perte d'eau de 25 à 30%. Pour chacun des génotypes testés, la quantité d'ABA est multipliée par 17 entre les deux conditions (**figure 2.22**). Les résultats de ces dosages sont donc sans ambiguité : les mutants *Atnced9-1* et *Atnced9-2* présentent une augmentation de leur teneur en ABA comparable à celle du sauvage en cas de stress hydrique. Il semble donc logique d'en conclure qu'AtNCED9 ne participe pas de façon notable à la synthèse d'ABA dans les parties aériennes. Cependant, on ne peut pas exclure que nos conditions expérimentales (stress hydrique rapide) ne permettent pas de rendre compte de sa contribution éventuelle dans des conditions plus physiologiques.

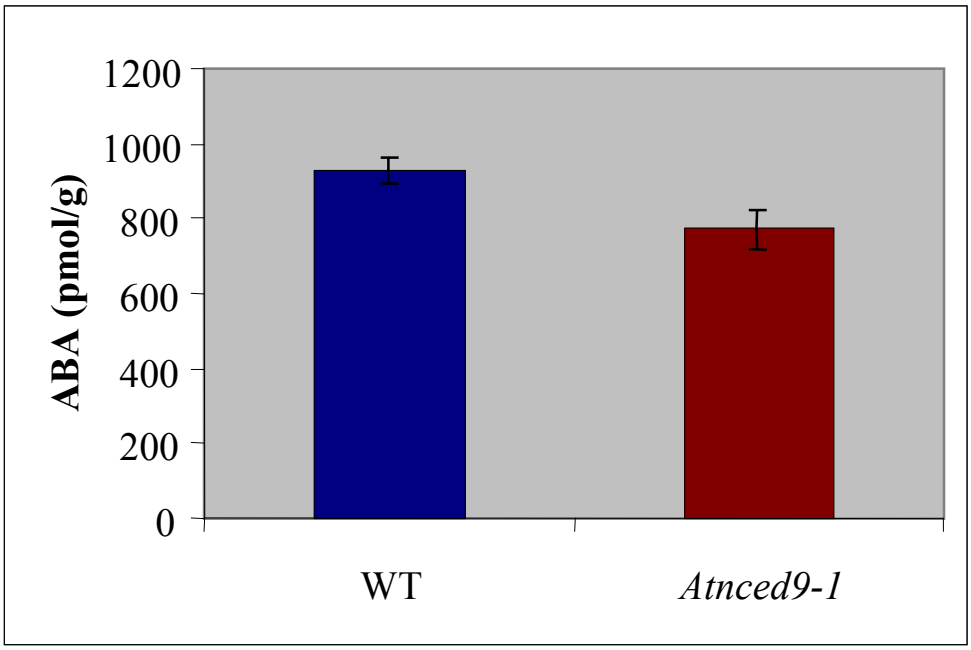


Figure 2.23 : Accumulation d'ABA dans les graines sèches du mutant *Atnced9-1* par rapport au sauvage (WT). La concentration est exprimée en pmol d'ABA par gramme de matière sèche. Barres d'erreur = erreurs standards (n=3).

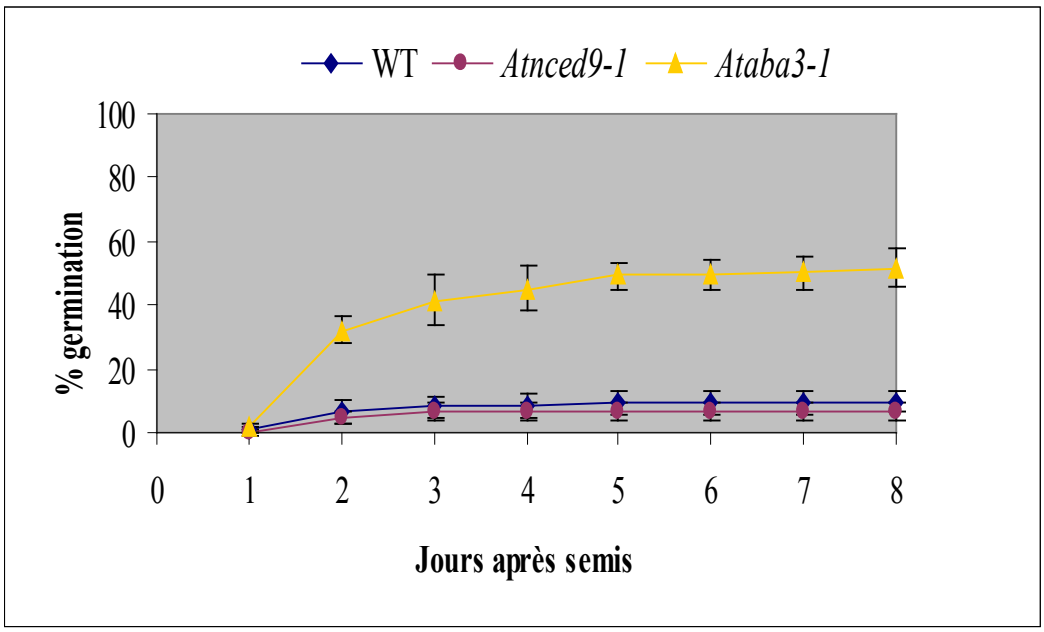


Figure 2.24 : Cinétique de germination du mutant *Atnced9-1* par rapport au sauvage (WT) et au mutant *Ataba3-1*, déficient en ABA. Le pourcentage de graines germées est exprimé en fonction du nombre de jours après le semis des graines. Barres d'erreur = écarts types.

2.3.2.3.2. Physiologie des graines

Accumulation d'ABA

L'ABA est l'hormone majeure impliquée dans la mise en place de la dormance et dans son maintien. La fraction d'ABA nécessaire à l'expression de cette dormance est synthétisée par l'embryon au cours de sa maturation (Cf introduction) et la quantité d'ABA présente dans la graine sèche est fonction de la quantité synthétisée pendant le développement.
Nous avons observé que le gène *AtNCED9* s'exprime dans les graines immatures d'*Arabidopsis* (Cf § 2.1.2.2) (**figure 2.5**). En conséquence, nous pouvions supposer qu'il contribuerait à la synthèse de l'ABA contenu dans la graine sèche. Les dosages réalisés nous en apportent la confirmation puisque les graines sèches du mutant *Atnced9-1* contiennent moins de 800 pmol d'ABA par gramme de matière sèche, alors que celles du sauvage, obtenues dans les mêmes conditions de culture, en renferment plus de 900 (**figure 2.23**). Toutefois, compte tenu de la faible différence entre ces mesures, ces résultats devront être répétés.

Germination

La dormance correspond à l'absence de germination d'une graine lorsque les conditions environnementales sont favorables. L'ABA étant le régulateur majeur de la mise en place de la dormance, une diminution de la quantité d'ABA dans la graine pourrait conduire à une dormance plus faible. Cependant, l'écotype Col-0 d'*Arabidopsis* n'a pas une dormance très prononcée. Afin d'être en mesure de la quantifier, nous nous sommes placés dans des conditions expérimentales suboptimales pour la germination, c'est-à-dire que les graines sont semées sur de l'eau gélosée, sans apport nutritif et sont mises en culture à une température légèrement supérieure à la température optimale (**figure 2.24**). Dans ces conditions, les graines sauvages et les graines du mutant *Ataba3-1* diffèrent par leur capacité germinative : les premières germent dans une proportion de 10% alors que 50% des secondes commencent à se développer puisqu'elles sont non-dormantes.
Dans ces conditions, le profil de germination des graines du mutant *Atnced9-1* est superposable avec celui du WT. Ces graines ont donc la capacité de synthétiser l'ABA nécessaire au développement de la dormance.

Résistance au paclobutrazol

La germination est le résultat de l'action opposée de deux hormones : les GAs, activatrices de germination et l'ABA, qui l'inhibe. L'ajout d'un inhibiteur de synthèse des GAs dans le milieu de culture aura donc pour conséquence d'empêcher les graines sauvages de germer à partir de concentrations relativement faibles. Cependant, lorsque des graines déficientes en ABA sont semées sur un tel milieu, leur germination est possible. En effet, dans un tel fond génétique, l'hormone inhibitrice de germination est absente et moins de GAs sont donc nécessaires à la stimulation du développement des plantules.

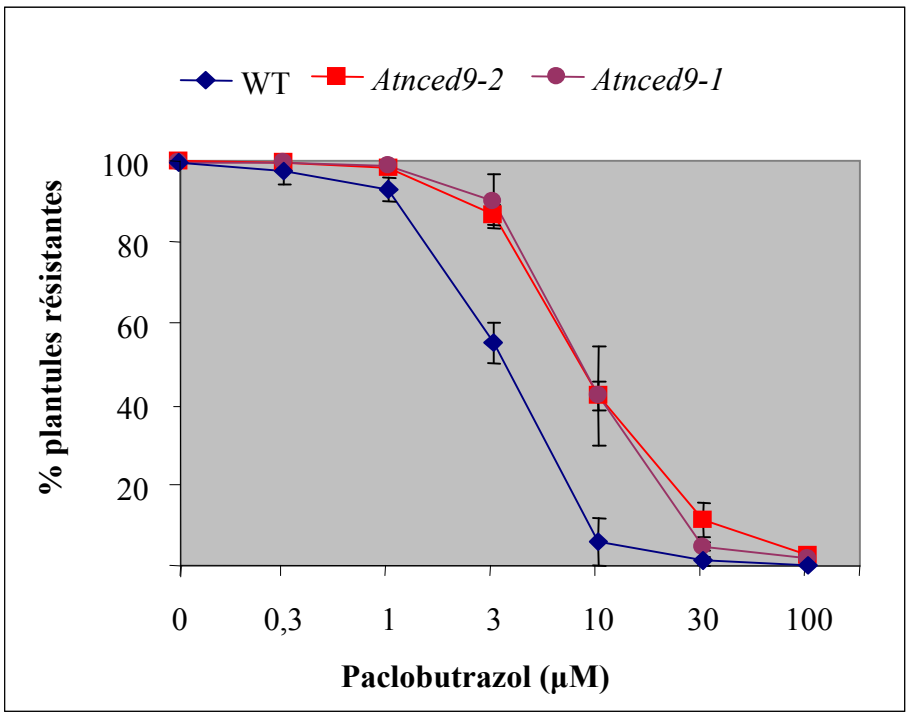


Figure 2.25 : Test de résistance au paclobutrazol de graines de mutants *Atnced9-1* et *Atnced9-2* en comparaison au WT. Barres d'erreur = écarts types.

Nous avons réalisé une gamme de concentration en paclobutrazol allant jusqu'à 100 µM. Les graines considérées comme résistantes à cet inhibiteur sont capables de développer des plantules jusqu'au stade "deux cotylédons". Les mutants *Atnced9-1* et *Atnced9-2* voient ce pourcentage atteindre 50% pour une concentration d'inhibiteur de 10 µM (**figure 2.25**) ou 30 µM (**figure 2.26**), alors qu'elle n'est que de 3 µM pour les WT. Les deux allèles *Atnced9* présentent donc une résistance claire au paclobutrazol en comparaison au sauvage.
En conséquence, la germination des graines des mutants *Atnced9* requiert moins de GAs que celles du WT, ce qui est observé dans le cas des mutants déficients en ABA "classiques". Ainsi, l'ABA synthétisé par cette enzyme, de même qu'AtNCED6, doit contribuer à la balance hormonale entre les GAs et l'ABA lors de la germination.

L'ensemble des phénotypes mis en évidence chez les mutants *Atnced9* lors de ces études sont résumés par le **tableau III**, où ils sont comparés, dans les mêmes conditions, à ceux présentés par des plantes WT et *aba*.

	WT	*Atnced9*	*aba*
Tissus végétatifs stressés	Accumulation d'ABA Contrôle de la perte d'eau par évapotranspiration	Accumulation d'ABA Contrôle de la perte d'eau par évapotranspiration	Pas d'accumulation d'ABA Pas de contrôle de la perte d'eau par évapotranspiration
Graines	Forte teneur en ABA Graines dormantes Requiert des GAs pour germer	Teneur réduite en ABA Graines dormantes Requiert moins de GAs pour germer	Faible teneur en ABA Graines non dormantes Requiert moins de GAs pour germer

Tableau III : Phénotypes observés chez les mutants *Atnced9* dans les tissus végétatifs stressés et dans les graines, en comparaison au sauvage et aux mutants classiques déficients en ABA (*aba*). Les phénotypes des mutants *Atnced9* communs aux mutants classiques déficients en ABA sont soulignés.

Ainsi, le mutant *Atnced9* est le deuxième représentant, après *Atnced6*, de cette nouvelle classe de mutants déficients dans la biosynthèse d'ABA uniquement affectés dans la graine, ce qui est conforme au profil d'expression du gène *AtNCED9* spécifique de la graine.

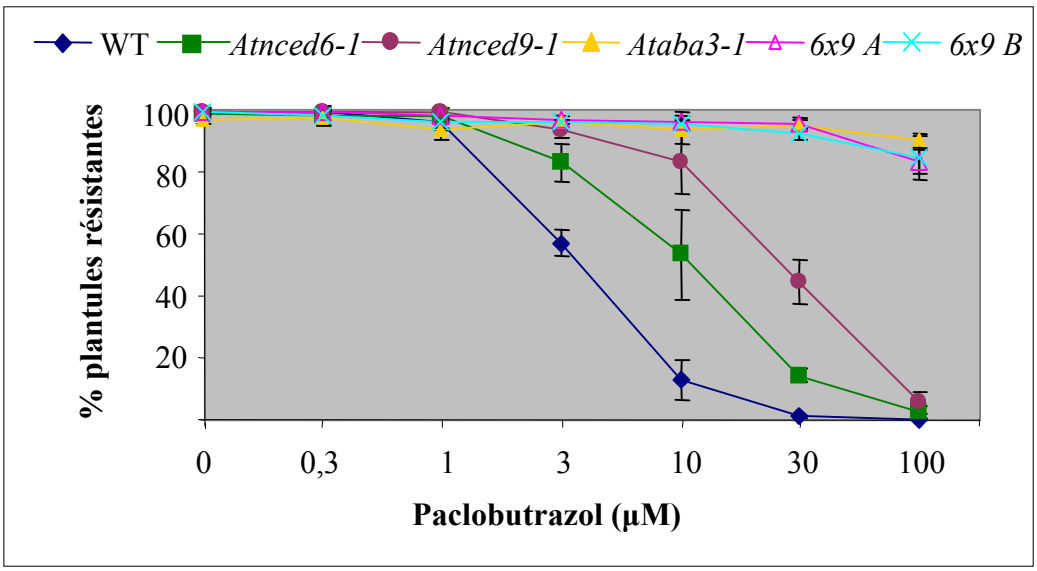


Figure 2.26 : Test de résistance au paclobutrazol des graines des doubles mutants *Atnced6, Atnced9*. La descendance de deux plantes F2 a été testée *(6x9 A et 6x9 B)* en comparaison aux mutants *Atnced6-1, Atnced9-1* et *Ataba3-1*, ainsi qu'au WT. Barres d'erreur = écarts types.

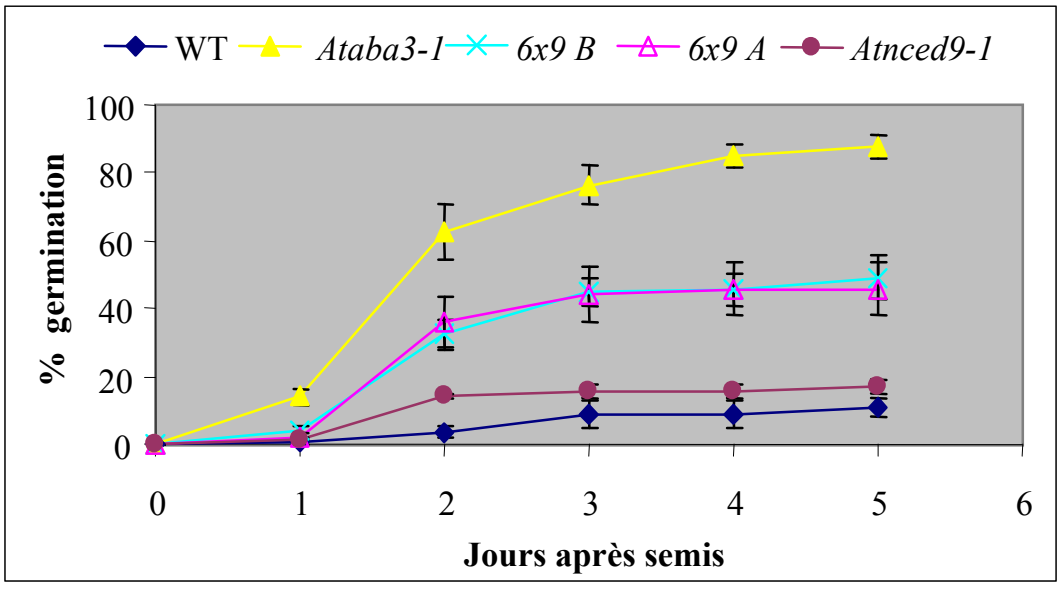


Figure 2.27 : Cinétique de germination des graines issues de 2 plantes A et B du double mutant *Atnced6, Atnced9 (6x9 A et 6x9 B)* par rapport au sauvage (WT), au mutant *Atnced9-1* et au mutant *Ataba3-1*. Le pourcentage de graines germées est exprimé en fonction du nombre de jours après le semis des graines. Barres d'erreur = écarts types.

2.3.2.3.3. Isolement des doubles mutants *Atnced6, Atnced9*

Les mutants *Atnced9* présentent les mêmes phénotypes que les mutants *Atnced6*. Or, ces deux gènes sont actifs dans la même fenêtre de temps au cours du développement de la graine. Il pourrait donc exister une redondance dans l'activité de ces deux enzymes, qui pourrait expliquer les phénotypes discrets des simples mutants.

L'étude du double mutant *Atnced6, Atnced9* a donc été entreprise, afin d'étudier les conséquences d'une diminution plus importante de la quantité d'ABA synthétisé au cours du développement de la graine.

Le double mutant *Atnced6, Atnced9* est issu du croisement entre les mutants *Atnced6-1* (un élément *dSpm* inséré dans le gène *AtNCED6*) et *Atnced9-1* (un ADN-T inséré dans le gène *AtNCED9*). Les plantules possédant les deux insertions dans leur génome ont été sélectionnées par PCR.

2.3.2.3.4. Analyse physiologique de *Atnced6, Atnced9*

Les mutants *Atnced6* et *Atnced9* sont tous deux résistants au paclobutrazol. Nous avons donc mesuré la résistance du double mutant.

Les résultats obtenus montrent que l'effet des deux simples mutations est additif : les graines issues de deux plantes F2 germent sur des concentrations de paclobutrazol plus élevées que *Atnced6-1* ou *Atnced9-1* et similaires à celle d'*Ataba3-1*(**figure 2.26**). Il semble donc que ces deux gènes soient responsables de la majeure partie de l'ABA, sinon tout, intervenant dans la balance hormonale lors de la germination puisque le double mutant a un phénotype voisin de celui d'*Ataba3-1*, dont la synthèse d'ABA est très réduite. De plus, contrairement aux simples mutations *Atnced6* ou *Atnced9*, l'association de ces deux mutations conduit à une réduction nette de la dormance. Le WT et *Atnced9-1* ne germent pas à plus de 15% alors que les doubles mutants présentent un taux de germination supérieur à 45% 5 jours après semis. Cependant, il semble que ces graines présentent une dormance résiduelle puisque dans des conditions similaires le mutant *Ataba3-1* germe à plus de 80% (**figure 2.27**).

Les phénotypes présentés par le double mutant *Atnced6, Atnced9* dans la graine sont résumés dans le **tableau IV** et comparés à la fois aux simples mutants et à un mutant *aba*.

WT	*Atnced6* ou *Atnced9*	*Atnced6, Atnced9*	*aba*
Forte teneur en ABA	Teneur réduite en ABA	(Non déterminé)	Faible teneur en ABA
Graines dormantes	Graines dormantes	Dormance réduite des graines	Graines non dormantes
Requiert GAs pour germer	Requiert moins de GAs pour germer	Requiert moins de GAs pour germer	Requiert moins de GAs pour germer

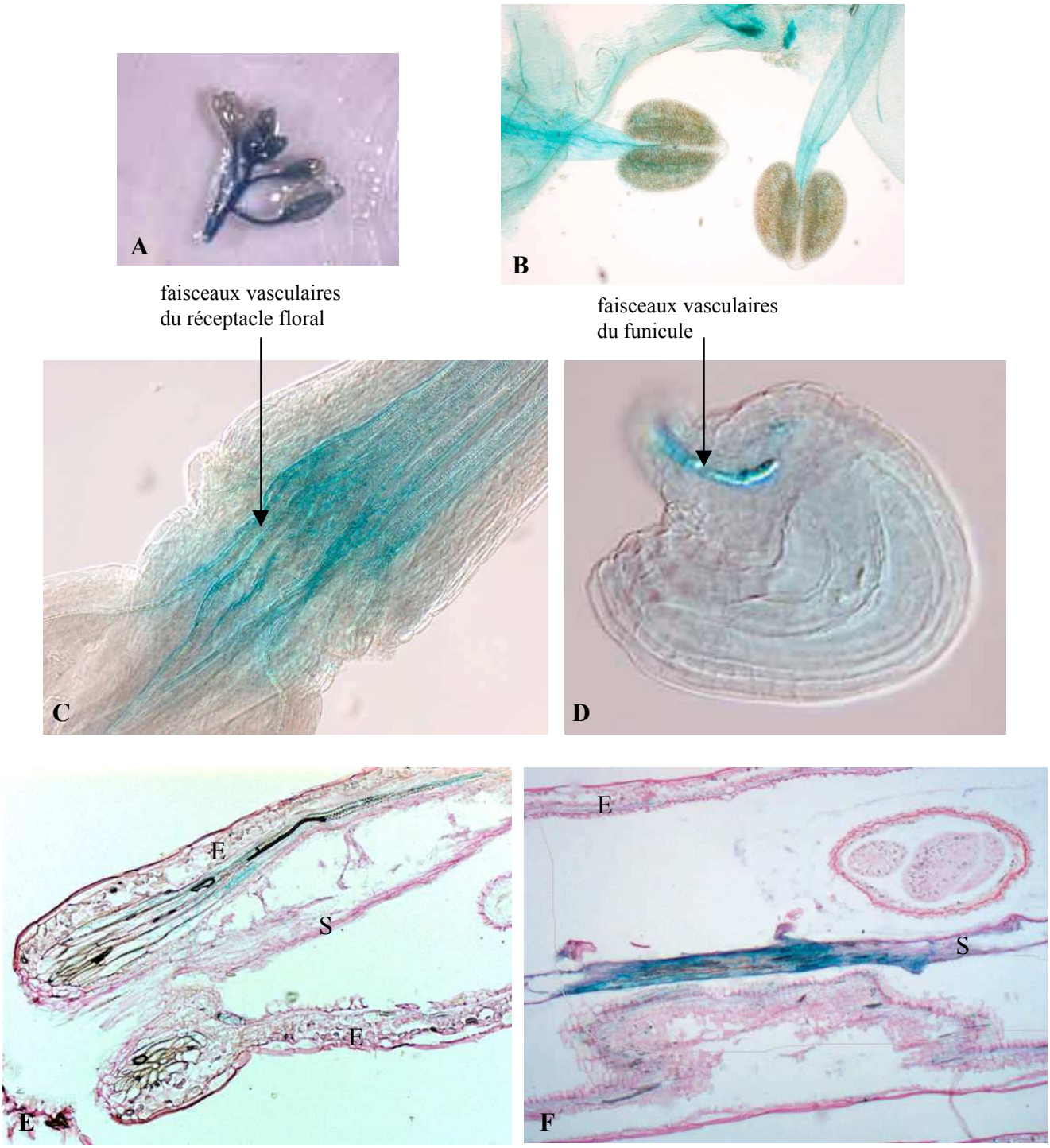


Figure 2.28 : Patron d'expression du gène *AtNCED2* dans les organes reproducteurs. 2 kb du promoteur de *AtNCED2* ont été clonés en amont du gène rapporteur *GUS*. *AtNCED2* s'exprime dans le bouton floral (**A**) ; dans le filet des étamines ainsi que dans les fentes de déhiscence des anthères (**B**) ; dans les faisceaux vasculaires du réceptacle floral (**C**) et du funicule (**D**) ; dans le septum des siliques (**E**) ; dans les tissus vasculaires qui irriguent les enveloppes des siliques (**F**). E, enveloppe de la silique ; S, septum de la silique.

Tableau IV : Phénotypes observés chez les doubles mutants *Atnced6, Atnced9* dans les tissus végétatifs stressés et dans les graines, en comparaison aux simples mutants *Atnced6* ou *Atnced9* et aux mutants classiques déficients en ABA (*aba*). Les phénotypes des mutants *Atnced6, Atnced9* communs aux simples mutants et aux mutants classiques déficients en ABA sont soulignés.

Il doit donc vraisemblablement exister un ou plusieurs autres gènes *AtNCED* exprimés soit dans des tissus différents, soit à des moments différents du développement de la graine, ou lors de l'imbibition, jouant également un rôle dans le maintien de la dormance. L'analyse de l'expression des gènes *AtNCED2* et *AtNCED3* dans les graines a donc été entreprise afin de déterminer leur contribution éventuelle.

2.3.3. Expression tissulaire des gènes *AtNCED2* et *AtNCED3*

D'après l'analyse de northern présentée à la **figure 2.4**, l'expression des gènes *AtNCED2* et *AtNCED3* est assez similaire. Les transcrits s'accumulent dans les siliques entières majoritairement en fin de maturation, et également dans les feuilles. Cependant, il existe une différence importante entre ces deux gènes puisque *AtNCED3* est décrit comme le gène majeur de la réponse au stress (**figure 2.6**) alors qu'*AtNCED2* n'est pas induit (Iuchi et al., 2001) (Tan et al., 2003).

2.3.3.1. Utilisation du gène rapporteur GUS

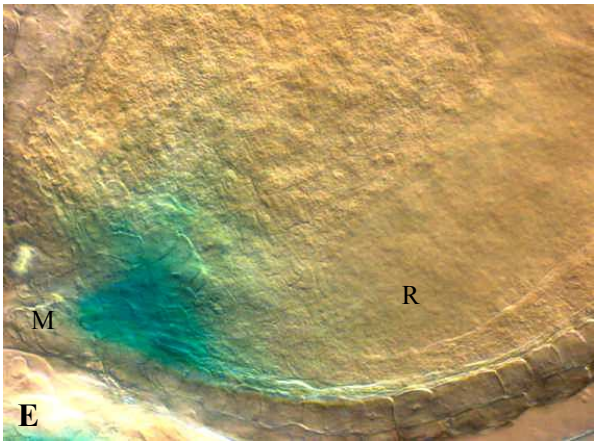
Afin de localiser de façon fine les tissus dans lesquels s'expriment *AtNCED2* et *AtNCED3*, nous avons entrepris la fusion transcriptionnelle de promoteurs de 2 kb avec le gène codant pour la β-glucuronidase. Alors que Tan et collaborateurs (2003) donnent une vision globale du patron d'expression de ces deux gènes dans les différents organes de la plante et au cours du développement des siliques, nous avons au contraire voulu effectuer une étude de ces expressions au niveau tissulaire (Tan et al., 2003). Nous avons restreint notre analyse aux tissus reproducteurs, particulièrement intéressants pour nos recherches.
Afin de mener à bien cette étude, trois types d'observations ont été utilisées : (i) l'observation directe des organes reproducteurs de la plante après coloration sous la loupe binoculaire ; (ii) l'observation des graines et organes floraux après dissection et décoloration dans une solution de chloral hydraté entre lame et lamelle à l'aide d'un microscope ; (iii) l'observation sous microscope de coupes fines d'organes, après inclusion de ceux-ci dans de la paraffine.

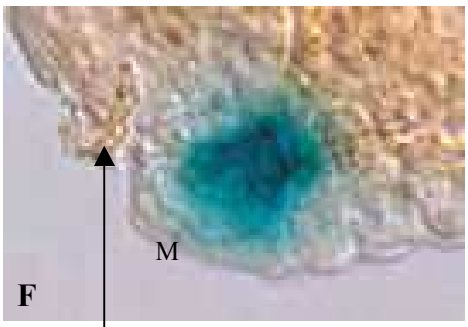
2.3.3.2. Localisation de l'expression de AtNCED2

AtNCED2 est très bien exprimé dans les fleurs et boutons floraux, en particulier dans les tiges (**figure 2.28 A**) et dans les filets des étamines (**figure 2.28 B**). Les transcrits de *AtNCED2* semblent également s'accumuler dans les fentes de déhiscence des sacs polliniques (**figure 2.28 B**) mais également dans la zone d'abscission de la fleur, au niveau de son réceptacle (**figure 2.28 C**). L'observation microscopique du réceptacle floral montre

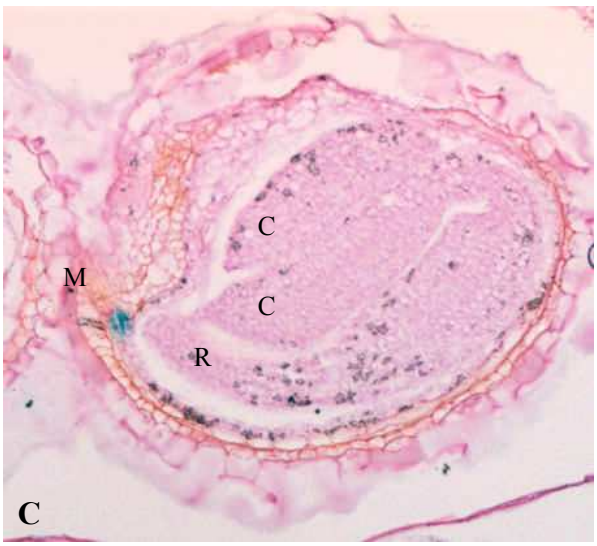








faisceaux vasculaires
du funicule



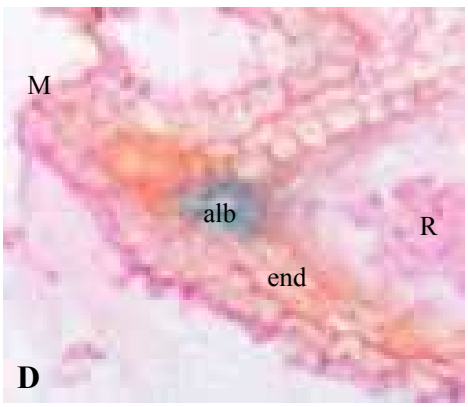


Figure 2.29 : Patron d'expression du gène *AtNCED3* dans les organes reproducteurs. 2 kb du promoteur de *AtNCED3* ont été clonés en amont du gène rapporteur *GUS*. *AtNCED3* s'exprime dans boutons floraux (**A**) ; dans les graines en début de développement (**B**) ; au niveau du micropyle des graines matures (**C**, **E**, **F**), plus précisément dans l'albumen micropylaire des graines matures (**D**) et l'albumen qui entoure la vacuole centrale d'un embryon globulaire (**B**). M, micropyle ; end, endothélium ; alb, albumen ; R, radicule ; C, cotylédons.

que la coloration GUS se situe dans les faisceaux vasculaires, plus précisément dans le xylème (**figure 2.28 C**). *AtNCED2* s'exprime également dans les faisceaux vasculaires présents dans le funicule des graines, qui permettent les échanges entre la plante mère et la graine (**figure 2.28 D**) et aussi dans ceux qui irriguent les enveloppes des siliques (**figure 2.28 E**).

Les coupes fines de matériel végétal coloré nous apportent plus de précision sur la localisation des transcrits. En effet, il semble que *AtNCED2* soit exprimé au sein des faisceaux vasculaires, comme le montre les **figures 2.28 C, D, E**.

Enfin, *AtNCED2* s'exprime dans le septum de la silique, qui sépare les deux compartiments contenant les graines. Cependant, on peut noter qu'aucune coloration n'est présente au niveau de la graine, tant dans la testa que dans l'embryon et l'albumen (**figure 2.28 F**).

2.3.3.3. Localisation de l'expression de AtNCED3

Lors de l'étude de la localisation des transcrits *AtNCED3* dans les organes reproducteurs, la coloration GUS a été observée dans les tiges florales (**figure 2.29 A**) ainsi que dans les graines en développement et matures (**figures 2.29 B-F**).

Au stade globulaire, la graine semble uniformément mais faiblement colorée (**figure 2.29 B**). Par contre, dans les graines matures, l'expression de *AtNCED3* apparaît strictement localisée à l'extrémité micropylaire de la graine, à l'extérieur de l'embryon (**figure 2.29 C-F**). L'observation détaillée de graines entières indique que cette coloration est restreinte dans une zone proche ou faisant partie des téguments de la graine (**figure 2.29 D**). Pour plus de précisions concernant le tissu dans lequel s'accumulent les transcrits *AtNCED3*, nous avons réalisé des coupes fines de graines. Leurs observations ont confirmé que la coloration bleue n'est pas située dans l'embryon, mais dans une région proche de la testa, à l'extrémité du micropyle de la graine (**figure 2.29 E**). De plus, à plus fort grossissement, nous avons pu la localiser précisément : il s'agit de l'albumen micropylaire (**figure 2.29 F**). En effet, la couche la plus interne des téguments, l'endothélium, est le siège d'accumulation de composés phénoliques et prend un teinte orangée en fin de maturation de la graine. L'observation de la **figure 2.29 F** montre que cette couche cellulaire n'est pas marquée, et que la coloration se situe dans un amas cellulaire immédiatement interne à l'endothélium. Il s'agit de l'albumen, présent sous forme cellularisée à ce stade de développement de la graine. A la lumière de cette information, il est possible d'expliquer le patron de coloration obtenu en **figure 2.29 B**. En effet, au début de son développement, la graine contient une grande vacuole centrale, autour de laquelle se développe puis se cellularise l'albumen périphérique. Au stade globulaire tardif, l'albumen n'est pas encore cellularisé (Cf § 1.2.3.3), mais est présent sous forme de DCN présents dans le micropyle, entourant la vacuole centrale sous les téguments de la graine et s'amassant au niveau de la chalaze. La morphologie de l'albumen à ce stade pourrait expliquer la coloration relativement faible qui est détectée. A ce stade précoce,

l'albumen contenant les transcrits *AtNCED3* entoureraient donc complètement l'embryon à l'intérieur de la graine en développement.

2.3.4. Discussion

Les analyses d'expression du gène *AtNCED9* par northern, complétées par l'hybridation *in situ*, ont permis d'identifier un deuxième gène exprimé dans la graine chez *Arabidopsis*. L'étude de deux allèles nuls, possédant une insertion dans leurs séquences codantes, confirme son absence d'implication dans la réponse au stress hydrique des feuilles dans nos conditions expérimentales. D'autres études ont toutefois montré qu'*AtNCED9* était faiblement induit par la déshydratation (Iuchi et al., 2001) (Tan et al., 2003). On ne peut donc pas exclure que dans des conditions de stress plus ménagé, ou dans des conditions de culture différentes des plantes avant déshydratation, ce gène empêche une trop grande perte d'eau par évapotranspiration. Egalement, sa cinétique d'expression pourrait être différente de celle de *AtNCED3* et ne pas avoir été correctement détectée. En effet, Tan et collaborateurs (2003) ont conservé les plantes en état de stress pendant 6 heures avant d'étudier l'expression du gène (Tan et al., 2003).

De plus, nous n'avons pas pu vérifier l'absence d'expression du gène *AtNCED9* dans les autres organes de la plante au moyen de gènes rapporteurs. En effet, la fusion d'une séquence promotrice de 3 kb en amont des gènes *GUS* et *GFP* n'a pas permis d'obtenir de signal. Tan et collaborateurs (2003) n'avaient pas non plus décelé d'activité GUS en utilisant un promoteur de 1,5 kb et avaient conclu que leur promoteur avait une taille insuffisante (Tan et al., 2003). Il doit donc manquer dans les deux cas à la région promotrice utilisée une séquence régulatrice de première importance. La réalisation de l'alignement des séquences protéiques et nucléotidiques (**figure 2.2**) des 5 membres les plus proches nous permet de formuler une hypothèse. Le gène *AtNCED9* possède une extension de séquence du côté 5' du gène, par rapport aux autres membres de la famille. Cet enchaînement de nucléotides de 150 pb, met en évidence la présence d'un deuxième ATG, autour duquel s'alignent les 4 autres gènes. Il paraît donc possible que cette séquence contienne le ou les éléments régulateurs de l'expression d'*AtNCED9* manquant dans la construction utilisée.

Enfin, parmi les quatre gènes dont la localisation spatiale a été étudiée, *AtNCED9* est le seul qui s'exprime dans l'embryon (**figure 2.18**). Pour autant, les mutants correspondants présentent des phénotypes faibles. En particulier ils ne sont pas affectés dans la dormance des graines, alors que l'ABA embryonnaire est essentiel à son induction (Karssen et al., 1983) (Groot and Karssen, 1992). Cet ABA produit dans l'embryon ne semble donc pas jouer un rôle à lui seul dans la physiologie de la graine. Il faut donc supposer que soit un autre gène *AtNCED* est exprimé dans l'embryon comme *AtNCED5* que nous n'avons pas étudié, soit l'induction de la dormance dépend à la fois de la présence d'ABA dans l'embryon et l'albumen.

Dans les organes reproducteurs (boutons floraux, siliques, graines), nous n'avons observé d'expression du gène *AtNCED2* que dans les faisceaux vasculaires. Les transcrits s'accumulent notamment au niveau des zones d'abscission comme dans la base des fleurs, comme Tan et collaborateurs (2003) l'ont déjà décrit (Tan et al., 2003), mais également dans le funicule des graines et les zones de déhiscence des siliques comme leur septum. Par contre, ce gène ne semble exprimé à aucun moment du développement des graines dans les tissus embryonnaires. Nous avons par ailleurs observé une faible expression du gène *AtNCED2* dans les feuilles par northern blot, qui n'a pas été décrite auparavant. Là encore, des différences de conditions de culture pourraient expliquer cette divergence. Ces différents résultats permettent de conclure que l'expression d'*AtNCED2* est spécifique des tissus maternels et en particulier des tissus vasculaires. Cette localisation est similaire à celle d'*AtABA2* (Cheng et al., 2002). Elle avait conduit les auteurs à s'interroger sur le transport éventuel de précurseurs de l'ABA. Toutefois, les caroténoïdes substrats des NCED sont présents dans les chloroplastes et ne sont donc pas mobiles, mais la xanthoxine pourrait se déplacer de la plante mère aux graines.

Nous avons observé qu'*AtNCED3* s'exprime dans les organes reproducteurs de la plante au niveau des boutons floraux, mais contrairement à *AtNCED2*, les transcrits *AtNCED3* sont présents dans les graines en développement. Au cours de la maturation de la graine, cette expression est située dans une région précise à l'extrémité de la graine. Nos études cytologiques apportent des précisions quant à la localisation tissulaire de ces ARNs, par rapport à la description de Tan et collaborateurs (Tan et al., 2003). Il semble qu'*AtNCED3* soit exprimé dans l'albumen de la graine en développement, et que cette expression soit restreinte à l'albumen micropylaire. Ainsi, trois gènes *AtNCED* s'expriment dans l'albumen. A des stades de développement de l'embryon équivalents (cotylédons retournés), les transcrits des gènes *AtNCED3* et *AtNCED6* possèdent une localisation spatiale différente puisque le premier est exprimé dans la région micropylaire, alors que le second l'est plutôt dans l'albumen chalazal. Ceci suggère une régionalisation de ce tissu, créant des territoires au sein desquels les gènes sont différentiellement exprimés. Le rôle de l'ABA produit dans ces domaines particuliers de l'albumen de la graine reste encore à déterminer.

Ainsi, chaque gène *AtNCED* possède un patron temporel d'accumulation de transcrits original au cours du développement de la graine. De plus, ils présentent chacun une localisation des ARNm différente, qui pourrait être à l'origine de rôles dans des processus physiologiques particuliers. Mais la régulation semble encore plus fine puisqu'il semble exister des territoires au sein des tissus, sièges d'une expression génique différentielle, qui permettraient de réguler encore plus finement la physiologie de la graine. En particulier il serait possible que l'ABA puisse réguler de façon localisée la rupture des téguments et de l'albumen. Ainsi, chez la tomate, une endo-β-mannanase est spécifiquement inhibée par l'ABA présent dans l'albumen micropylaire, et non par l'ABA présent dans l'albumen périphérique (Toorop et al., 2000).

2.4. Matériels et méthodes complémentaires

2.4.1. Matériels

*2.4.1.1. Matériel végétal (*Arabidopsis thaliana*)*

Nom de la lignée	Ecotype	Origine
WT	Columbia-0 (Col-0)	Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA de Versailles
Atnced6-1	Col-0	Sequenced Insertion-Site Databank (SINS)
Atnced9-1	Col-0	Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (SIGnAL ; NASC N533388)
Atnced9-2	Col-0	Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (SIGnAL ; NASC N623975)
Ataba3-1	Col-0	(Leon-Kloosterziel et al., 1996a)
WT	Wassilewskija (Ws)	Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA de Versailles
Atnced6-2	Ws	Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA de Versailles (FAC187)
Ataba1-7	Ws	North, H. et Marion-Poll, A., non publié

Tableau V : Liste des lignées d'*Arabidopsis thaliana* utilisées.

2.4.1.2. Souches bactériennes

Escherichia coli souche xl1

Génotype : *sup*E44, *rel*A1, lac (F'*pro*AB*lac*IZΔ-M15 Tn10(tet^r)), *hsd*R17, *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1.

Cette souche thermocompétente (Stratagene) est utilisée pour effectuer l'amplification des vecteurs lors des différents clonages. Elle se multiplie à 37°C.

Agrobactérium tumefaciens souche C58C1 pMP90

Cette souche est utilisée pour la transformation des plantes (Koncz et al., 1984). Elle possède le gène de résistance à la rifampicine et l'ADN de transfert (ADN-T) du plasmide Ti a été remplacé par un gène conférant la résistance à la gentamycine. Elle se multiplie à 28°C.

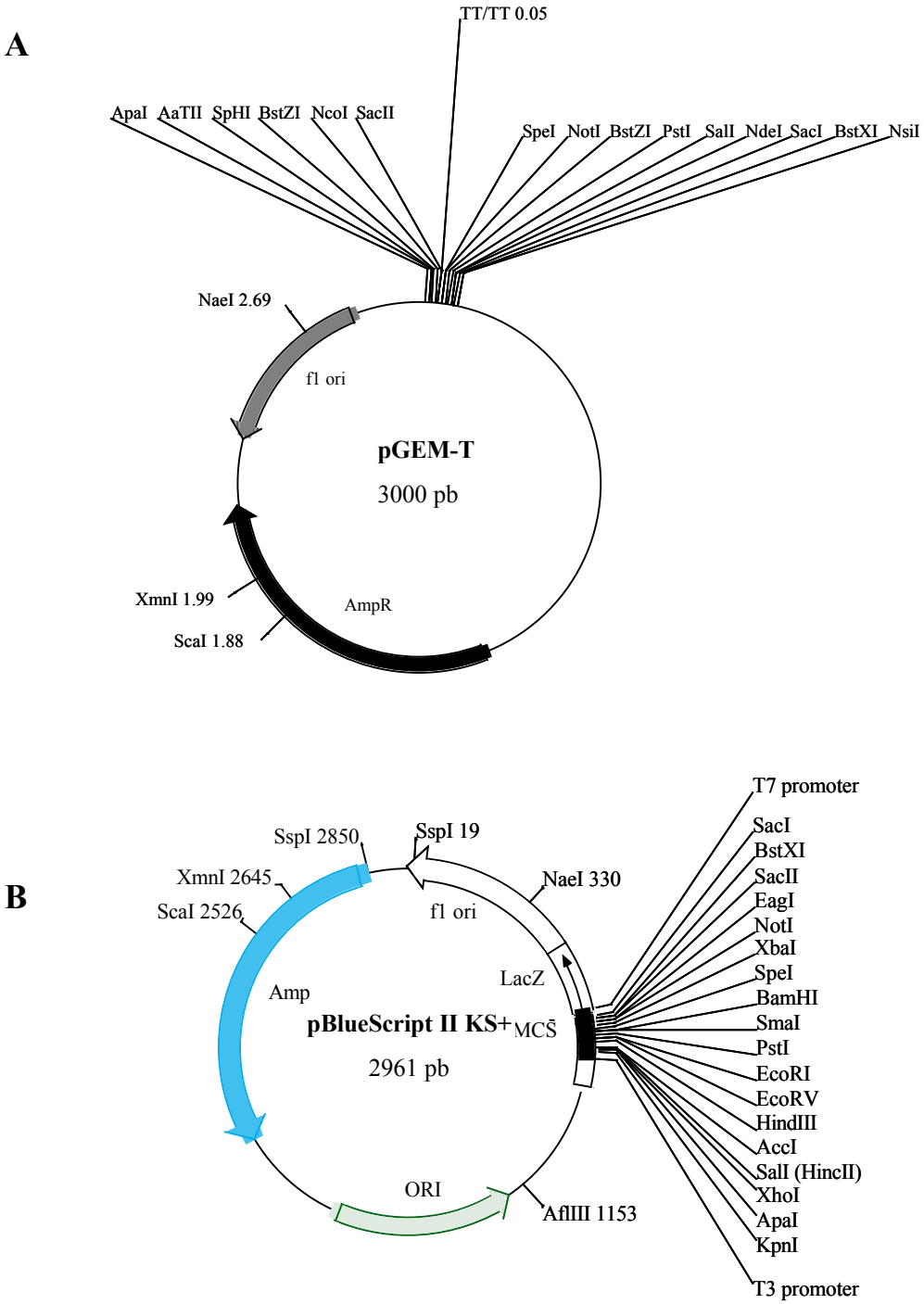


Figure 2.30 : Plasmides utilisés pour le clonage des produits de PCR. (**A**) pGEM-T; (**B**) pBS KS+.

2.4.1.3. Vecteurs

Plasmide pGEM-T (Promega)

Ce vecteur est dérivé du pGEM®-5Zf(+) linéarisé par *EcoRV*, situé dans le site multiple de clonage. Une thymidine a été ajoutée aux extrémités 3'OH, permettant le clonage de fragments d'ADN amplifiés par PCR, puisque la Taq polymérase leur ajoute des adénines aux extrémités 3' OH des amplicons (**figure 2.30 A**). Il contient le gène de résistance à l'ampicilline.

Plasmide pBluescript II KS+ (Stratagene)

Ce vecteur dérive du plasmide pUC19. Il contient un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection du vecteur et le gène *LacZ* renfermant un site multiple de clonage dans l'orientation KS (*KpnI*-*SacI*) (**figure 2.30 B**).

Plasmide pBI101 (Ozyme)

Le plasmide pBI101 est un plasmide binaire de 12,2 kb. Il possède une origine de réplication lui permettant de se maintenir aussi bien dans *E. coli* que dans *A. tumefaciens*, ainsi que le gène de résistance à la kanamycine (*NPTII*) et le gène rapporteur *uidA* (codant la β-glucronidase) sans promoteur, précédée d'un site multiple de clonage. Ce plasmide permet donc de caractériser des séquences promotrices en les insérant en 5' de ce gène rapporteur (**figure 2.31 A**).

Plasmide pBINmGFP5-ER

(http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/techniques/indexFrame.html)

Le plasmide pBINmGFP5-ER est un plasmide binaire de 12 kb. Il possède une origine de réplication lui permettant de se maintenir aussi bien dans *E. coli* que dans *A. tumefaciens*, ainsi que le gène de résistance à la kanamycine (*NPTII*) et la séquence codant pour la GFP précédée du promoteur *35S* inséré entre les deux sites de restriction *HindIII* et *XbaI* (*XbaI* côté 5' de la GFP). Ce plasmide permet de caractériser des séquence promotrices en les insérant à la place du promoteur *35S*, en 5' de la séquence codant pour la GFP (**figure 2.30 B**).

2.4.2. Méthodes

2.4.2.1. Culture des bactéries

Les bactéries sont cultivées dans du milieu LB (Luria Bertani, extrait de levure 5g.L^{-1}, bacto-tryptone 10 g.L^{-1}, NaCl 10 g.L^{-1}, pH 7.2) à 37°C pour *E. coli* et 28°C pour *A. tumefaciens*. Si nécessaire, le milieu de culture est supplémenté par un ou plusieurs antibiotiques (Duchefa) pour atteindre une concentration finale de 100 mg.L^{-1} (ampicilline, kanamycine) ou 50 mg.L^{-1} (gentamycine, rifampicine).

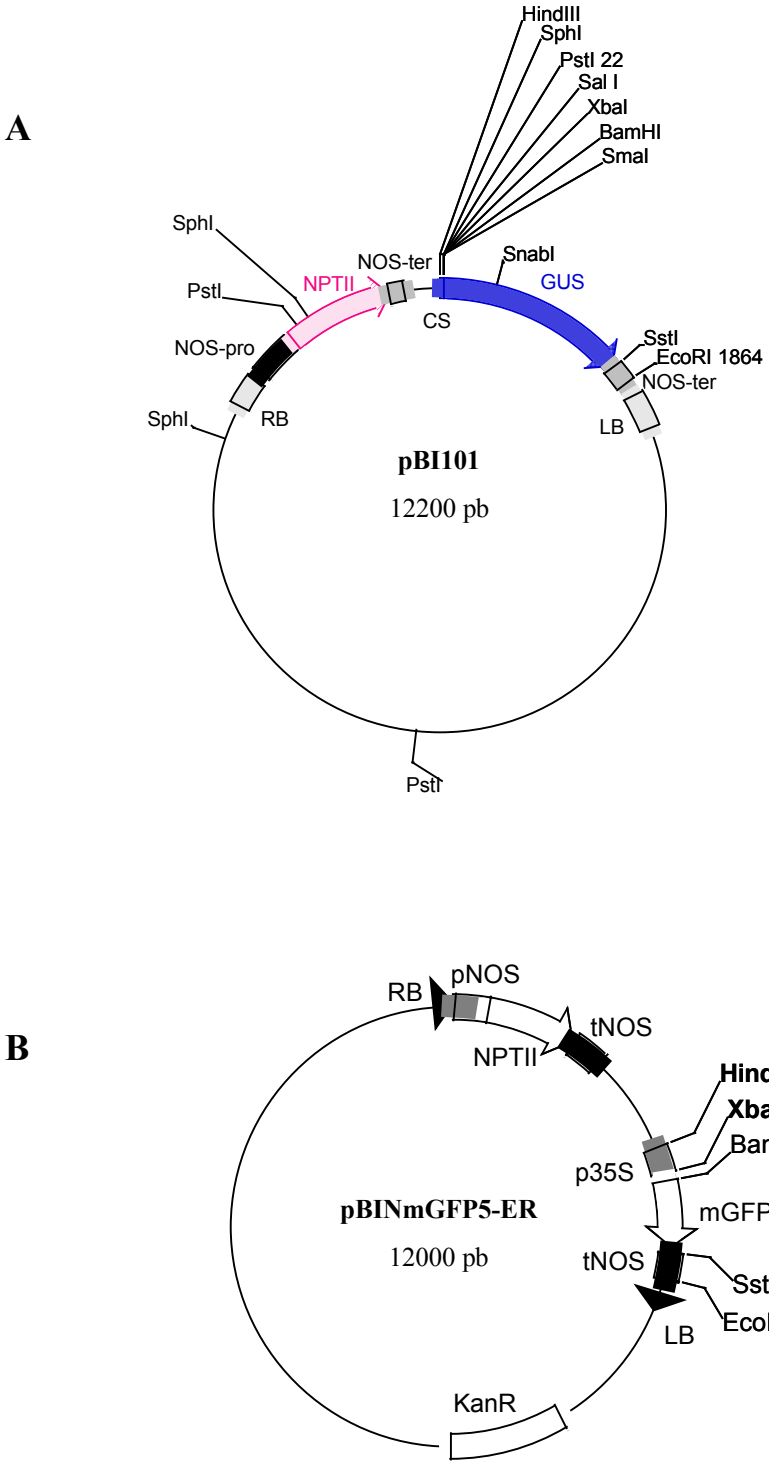


Figure 2.31 : Plasmides binaires utilisés pour les fusions promoteur::gène rapporteur. (**A**) pBI101, portant la cassette GUS ; (**B**) pBINmGFP5-ER, portant la cassette GFP adressée au réticulum endoplasmique.

2.4.2.2. Manipulation du matériel végétal

2.4.2.2.1. Stérilisation des graines

Les graines sont stérilisées avant d'être semées *in vitro* pour les tests de germination sur paclobutrazol, ou avant repiquage en serre mais ne sont pas stérilisées pour les cinétiques de germination.
La solution de stérilisation est réalisée en dissolvant un comprimé de chlore actif (Bayrochlore) dans 40 mL d'eau osmosée, puis en ajoutant 5 mL de cette préparation dans 45 mL d'éthanol à 95 %. Dans un tube Eppendorf contenant les graines, 500 µL de cette solution sont ajoutés et le tout est mis sous agitation pendant 10 min. Les graines sont ensuite rincées à l'éthanol absolu et séchées sous une hotte à flux laminaire.

2.4.2.2.2. Conditions de culture

Germination *in vitro*

Afin de pouvoir les repiquer en serre, les graines stériles sont semées sur boîtes de Pétri (Greiner) sur un milieu de culture de type Gamborg B5 (Duchefa, 3,16 $g.L^{-1}$) contenant 1% (p/v) de saccharose, 0,7% (p/v) d'agar, 0,08 % pourpre de Bromocrésol, pH 6.8. Après stratification (48 à 72h à 4°C dans l'obscurité), la germination et le développement des plantules se déroule en phytotron pendant 7 à 10 jours (hygrométrie 60%, lumière continue à 250 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, 20°C). La sélection des transformants résistants à la kanamycine est réalisée après ajout de l'antibiotique dans le milieu de culture pour atteindre une concentration finale de 50 $mg.L^{-1}$.

Culture en serre

Après 7 à 10 jours de culture *in vitro*, les plantules sont repiquées en serre (photopériode de 13h à une intensité minimale de lumière de 100 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, 22°C le jour, 18°C la nuit, hygrométrie non contrôlée) dans des barquettes de terreau (Stender) et arrosées régulièrement avec de la solution nutiritive (Hurel ARC).
Pour la transformation par *A. tumefaciens*, les graines sont directement semées dans des barquettes 10 x 10 cm et une cinquantaine de plantules y sont cultivées jusqu'à la formation des premières siliques.

2.4.2.2.3. Transformation des plantes par *A. tumefaciens*

La transformation d'*Arabidopsis* repose sur la méthode d'inoculation au silwet (Clough and Bent, 1998). Le silwet (Witco) est un puissant agent mouillant qui facilite la pénétration des agrobactéries dans les plantes de par les lésions qu'il engendre.
Le plasmide binaire d'intérêt qui doit servir à la transformation est introduit dans la souche C58C1 pMP90 d' *A. tumefaciens* par recombinaison triparentale à l'aide du plasmide "helper" pRK2013. Les bactéries recombinantes sont sélectionnées sur milieu LB gélosé contentant de la rifampicine, de la gentamycine et l'antibotique de sélection spécifique du plasmide

d'intérêt. Un clone isolé est cultivé dans 5 mL du même milieu de culture sous forme liquide pendant une nuit. Cette préculture permet d'ensemencer la culture finale de 500 mL, contenant les mêmes antibiotiques de sélection, jusqu'à ce que la DO à 600 nm atteigne 0,8. Les bactéries sont ensuite culotées par centrifugation (6000 x g, 10 min, 4°C) et reprises dans 250 mL d'une solution de saccharose 5% (p/v). 125 µl de silwet sont alors ajoutés à la suspension bactérienne et les fleurs y sont immergées pendant 3 à 10 min, puis remises en culture. Après récolte des graines et semis sur milieu sélectif, on obtient les transformants primaires T1.

2.4.2.3. Tests physiologiques

2.4.2.3.1. Cinétiques de germination

Les graines non stériles à peine matures sont semées sur boîtes de Pétri (Greiner) sur un milieu minimum constitué d'eau osmosée et d'agarose 0,5% (p/v). Les semis sont directement placés dans un phytotron (hygrométrie 60%, photopériode de 16h à 250 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, 25°C). Tous les jours, les graines germées sont comptabilisées, en prenant comme critère d'accomplissement de la germination la déchirure des téguments de la graine par la radicule. Le pourcentage de germination par rapport au nombre total de graines semées renseigne sur la dormance du lot de graines.

2.4.2.3.2. Test de résistance au paclobutrazol

Les graines stériles sont semées sur boîtes de Pétri (Greiner) sur un milieu minimum constitué d'eau osmosée et d'agarose 0,5% (p/v) en présence de paclobutrazol (Sopra) (classiquement, utilisation de la gamme de concentrations suivante : 10^{-4}, 3.10^{-5}, 10^{-5}, 3.10^{-6}, 10^{-6}, 3.10^{-7} M). Les semis subissent une stratification de 72h (4°C à l'obscurité), afin d'homogénéiser la germination, puis sont placés dans un phytotron (hygrométrie 60%, photopériode de 16h à 250 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, 25°C). Après quatre jours de culture, on comptabilise les "graines résistantes au paclobutrazol" : les plantules issues de ces graines présentent deux cotylédons verts. Le pourcentage de plantules par rapport au nombre total de graines semées renseigne sur la résistance ou la sensibilité à l'inhibiteur.

2.4.2.3.3. Test de déshydratation

Les plantes sont repiquées en serre puis les rosettes sont coupées et immédiatement pesées. Elles sont ensuite placées sous une hotte à flux laminaire où elles subissent une déshydratation de 4 h 30 min et sont pesées régulièrement au cours du stress. La différence de poids correspond à la perte d'eau subie par la plante.

2.4.2.3.4. Mesure de la teneur en ABA

La mesure de la teneur en ABA est réalisée à la fois dans les tissus foliaires et dans les graines. Pour l'étude des parties végétatives, les plantes sont stressées comme pour la cinétique de déshydratation, puis les feuilles sont lyophilisées et broyées finement au

mortier. Les graines sèches sont congelées dans l'azote liquide et broyées. Les analyses sont ensuite effectuées au le laboratoire de Bruno Sotta (UMR de physiologie cellulaire et moléculaire des plantes, université Pierre et Marie Curie). Sur ces deux types d'échantillons, l'ABA est extrait des tissus par extraction méthanolique (80% ; v/v) et purifié par HPLC en conditions acides sur une colonne C18 (Kraepiel et al., 1994). La quantité d'ABA contenue dans les échantillons est ensuite détectée par test ELISA et rapportée au poids sec de tissu utilisé (Julliard et al., 1993).

2.4.2.4. Analyses moléculaires

2.4.2.4.1. Extraction, amplification et clonage de l'ADN

Extraction d'ADN

ADN plasmidique bactérien

Minipréparations d'ADN (2 à 5 µg)

Les minipréparations d'ADN plasmidique sont réalisées sur des cultures de bactéries de 2 mL de milieu LB menées à saturation (culture sur la nuit). 1,5 mL de cette culture est centrifugé (6500 x g, 5 min, température ambiante) et le culot obtenu est repris dans le tampon d'extraction (saccharose 8% (p/v), triton X100 0,1% (v/v), EDTA 50 mM pH 8.0, Tris-HCl 10 mM pH 8.0), auquel est ajouté 5 µL de lyzozyme (50 $mg.mL^{-1}$). Le tout est porté à ébullition pendant 1,5 min puis centrifugé à 13000 x g pendant 15 min. Une fois le culot éliminé, les protéines contenues dans le surnageant sont à leur tour précipitées par ajout de 150 µL d'acétate d'ammonium 7,5 M et centrifugation (13000 x g, 15 min). 1 mL d'éthanol 95% (v/v) est ajouté au surnagent afin de précipiter l'ADN en suspension après agitation et centrifugation. Le culot d'ADN est rincé par 500 µL d'éthanol 70% (v/v), séché et finalement resuspendu dans une solution composée de 30 µL d'eau et 2 µL de RNAse (10 $mg.mL^{-1}$).

Midipréparation d'ADN (50 à 100 µg pour les plasmides à haute capacité de réplication, 20 à 100 µg pour les plasmides à faible capacité de réplication)

Les midipréparations d'ADN sont réalisées à l'aide du kit "Qiagen Plasmid purification" (Qiagen), à partir de cultures bactériennes de 25 à 100 mL, suivant le nombre de copies de plasmide par cellule. Le protocole d'extraction consiste en une lyse alcaline des bactéries en présence de RNAse A, suivie d'une séparation de l'ADN génomique par précipitation sélective, puis une purification du plasmide sur une colonne échangeuse d'ions.

ADN génomique végétal

Deux à trois boutons floraux sont congelés dans l'azote liquide et broyés dans un tube Eppendorf. Un volume de 750 µL de tampon d'extraction (CTAB 2 % (p/v), NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM pH 8.0, Tris-HCl 100 mM pH 8, β-mercaptoéthanol 0,2 % (v/v)) chauffé à 60°C est ajouté. Après 30 min d'incubation à 60°C, 750 µL de chloroforme/alcool isoamylique (24:1 v/v) sont ajoutés, l'ensemble est agité puis centrifugé à 13000 x g pendant 10 min. La

phase aqueuse est prélevée et transférée dans un nouvel Eppendorf puis précipitée par 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et 1 volume d'isopropanol. Après une centrifugation de 10 min à 13000 x g, le culot est lavé par 500 µL d'éthanol 70 % (v/v). Le culot est alors repris dans 100 µL de TE (Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 1mM) et de 1 µL de RNase (10 $mg.mL^{-1}$) et incubé 30 min à 37°C. Le tout est à nouveau précipité et lavé comme précédemment. Le culot est enfin séché sous vide et resuspendu dans 30 µL de TE.

Amplification de l'ADN par PCR

La réaction de PCR permet d'amplifier de façon spécifique une séquence d'ADN génomique, plasmidique, ou encore d'ADNc.

Chaque échantillon d'ADN est dilué à environ 5 ng/µL pour servir de matrice. Chaque réaction contient 0,25 U d'ADN polymérase thermostable (Taq Eurobio), 2 µL de tampon 10X (Tris-HCl 670 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 160 mM, tween 20 0,1 % (v/v)), 0,6 µL de $MgCl_2$ 50 mM, 0,8 µL de dNTP 5 mM, 0,8 µL d'amorces 10 mM (MWG) et de l'eau stérile qsp 20 µL. A l'extrémité 3'OH des brins néosynthétisés, cette polymérase ajoute des adénines.

Dans le cas de l'amplification de promoteurs, séquences relativement longues destinées à être clonées, la Pfu Ultra DNA Polymerase (Stratagene) est utilisée car son activité de relecture des brins néosynthétisés limite les erreurs de réplication. Chaque réaction contient 2,5 U d'ADN polymérase haute fidélité (Taq Pfu Ultra), 5 µL de tampon 10X, 0,4 µL de dNTP 25 mM, 1 µL d'amorces 100 $ng.\mu L^{-1}$ (MWG) et de l'eau stérile qsp 50 µL. La Pfu génère des fragments d'ADN bords francs.

La réaction de PCR est constituée d'une première phase de dénaturation à 94°C de 2 min, puis de 40 cycles constitués de trois étapes : 1) dénaturation à 94°C pendant 15 s, 2) hybridation des amorces aux matrices pendant 15 s dont la température est à adapter suivant les amorces utilisées, 3) élongation à 72°C pendant 30 s. Suit la terminaison des élongations en cours à 72°C pendant 2 min. Le produit de la réaction est ensuite conservé à 4°C.

Amorces utilisées

Plusieurs amorces ont été utilisées afin de caractériser l'insertion des ADN-T dans le gène *AtNCED9*, dont les séquences sont reportées dans le tableau suivant.

AtNCED9 for3	5' ATG ACG ATA ATA CCA TTA TTT CTG G 3'
AtNCEDC9 AS24	5' AGT TGG ATC ATT GGA CAC TTG 3'
Sig RB3	5' CCT TAA TTC TCC GCT CAT G 3'
Sig LB1	5' GCC TTG GTG GTA GTT TGT C 3'

Tableau VI : Séquences des amorces utilisées pour la caractérisation des insertions ADN-T chez les mutants *Atnced9-1* et *Atnced9-2*.

Trois couples d'amorces ont été utilisés pour amplifier les séquences promotrices des gènes *AtNCED2* (AtNCED2 pFOR - AtNCED2 pREV, 2 kb), *AtNCED3* (AtNCED3 pFOR – AtNCED3 pREV, 2 kb) et *AtNCED9* (AtNCED9 pFOR – AtNCED9 pREV, 3 kb) afin de les cloner dans les vecteurs contenant les cassettes GUS ou GFP. Les séquences de ces amorces sont reportées dans le tableau suivant.

AtNCED2 pFOR	5' GAA TTC GAT TAT GGA CTA CG 3'
AtNCED2 pREV	5' GGC TTT TGT TTT CTT ATC TT 3'
AtNCED3 pFOR	5' GTT TGG TGT AGG GAT TCT TC 3'
AtNCED3 pREV	5' TTT TCA AGT GTG TTC AAT CA 3'
AtNCED9 pFOR	5' CTA CGT GGT ATG TAT CAC AC 3'
AtNCED9 pREV	5' TCA CGC TAC TAT TTT CTC AT 3'

Tableau VII : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des promoteurs des gènes *AtNCED2*, *AtNCED3* et *AtNCED9*.

Deux couples d'amorces ont été utilisés pour amplifier ADNc lors des réactions de RT-PCR (Cf annexe I) : *AtNCED6* (AtNCED6 FOR – AtNCED6 REV), *EF* (facteur d'élongation, amplifiction contrôle de la RT-PCR) (EF FOR – EF REV). Les séquences de ces amorces sont reportées dans le tableau suivant.

AtNCED6 FOR	5' ATG CAA CAC TCT CTT CGT TCT 3'
AtNCED6 REV	5' AAT CAT TCC GTC ACC GTC AAA 3'
EF FOR	5' ATG CCC CAG GAC ATC GTG ATT TTC AT 3'
EF REV	5' TTG GCG GCA CCC TTA GCT GGA TCA 3'

Tableau VIII : Séquences des amorces utilisées en RT-PCR.

Electrophorèse d'ADN

L'ADN migre dans des gels d'agarose de concentration variable selon la taille des fragments. L'addition de BEt (Bromure d'Ethidium, 0,1 µg/mL final), un intercalant fluorescent de l'ADN, permet de visualiser l'ADN sous UV. La migration s'effectue à 100 V dans une solution de TAE 0,5x (20 mM Tris-Acétate, 0,5 mM EDTA). Les échantillons chargés sur le gel sont au préalable mélangés avec du "bleu de charge" (10 mL de solution contiennent 0,25 % (p/v) de bleu de bromophénol, 0,25 % (p/v) de xylène cyanol et 10 mL de glycérol 0,3 % (v/v)).

Techniques de clonage

Conversion des extrémités 5' sortantes en extrémités franches

La conversion en extrémités franches des extrémités 5' sortantes obtenues lors de la digestion de l'ADN par des enzymes de restriction peut être nécessaire dans certaines

stratégies de clonage. On effectue alors un remplissage de l'extrémité 5' sortante à l'aide du fragment Klenow de l'ADN plymérase I d'*E. coli*, qui possède une activité polymérase (Invitrogen). La réaction a lieu dans un volume réactionnel de 10 µL à 30°C pendant 15 min à 30°C (pour 5 µg d'ADN, 2 U de Klenow, 5 µL de dNTPs 2 mM, dans le tampon de réaction de l'enzyme de restriction utilisée lors de la digestion).

Digestion

Les digestions par des enzymes de restriction sont réalisées à l'aide d'enzymes commerciales (Invitrogen), utilisées dans les conditions préconisées par le fournisseur. La réaction se passe pendant environ 2h dans un volume final de 20 à 50 µL.

Ligation

L'ADN à insérer et le vecteur doivent posséder des extrémités compatibles. Les conditions de ligation sont déterminées empiriquement, sur la base d'un excès de copies de l'insert par rapport au vecteur (rapport molaire d'environ 3:1). La réaction est menée dans un volume de 15 µL contenant, en plus de l'ADN, 1U de T4 DNA ligase (Invitrogen), 3 µL de tampon de ligation 5x (Tris-HCl 250 mM pH 7.6, $MgCl_2$ 50 mM, ATP 5 mM, DTT 5 mM, PEG 8000 25% (p/v)). Le tout est incubé toute la nuit à 16°C dans un tampon de ligation.

Clonage d'un produit de PCR dans pGEM-T

L'ADN à insérer dans le vecteur pGEM-T est amplifié par PCR. Les conditions de ligation sont déterminées empiriquement, sur la base d'un excès de copies de l'insert par rapport au vecteur (rapport molaire d'environ 3:1). La réaction de ligation est menée pendant la nuit à 4°C dans un volume de 10 µL selon les recommandations du fournisseur (Promega) (50 ng de vecteur, 3 U de T4 DNA ligase, 0,75 µL de tampon de ligation 2x (60 mM Tris-HCl pH 7.8), 20 mM $MgCl_2$, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10% (p/v) PEG 8000).

Préparation de bactéries thermocompétentes

Une préculture bactérienne de 2 mL est incubée toute la nuit à 37°C sous agitation. Le matin, une dilution de la préculture au 1/200^{e} est réalisée dans un volume final de 100 mL et les bactéries sont mises à pousser jusqu'à ce que la DO mesurée à 550 nm atteigne 0,5. Les bactéries sont alors centrifugées (6000 x g, 8 min, 4°C) et reprises dans 33 mL de $CaCl_2$ 50 mM stérile et froid. Après incubation dans la glace pendant 20 min, la suspension est centrifugée (4000 x g, 5 min, 4°C) et reprise dans 5 mL d'une solution composée de $CaCl_2$ 50 mM stérile et de glycérol stérile 20% (v/v). Les cellules sont aliquotées et conservées à –80°C.

Transformation de bactéries thermocompétentes

50 µL de bactéries compétentes sont incubées sur glace pendant 15 min, puis mises en contact avec l'ADN plasmidique. Après 2 min sur glace, le choc thermique est réalisé pendant 2 min à 37°C. Les bactéries sont reprises dans 300 µL de LB liquide sans antibiotiques et placées sous agitation à 37°C pendant 30 min. Les clones transformés par le

vecteur sont sélectionnés par étalement un milieu LB solide contenant l'antibiotique approprié.

Conjugaison triparentale

Les constructions sont transférées d'*E. coli* à *A. tumefaciens* par conjugaison tri-parentale à l'aide du plasmide "helper" pRK2013. Un mélange 200 µL contenant, 1/3 de culture d'agrobactéries, 1/3 de culture d'*E. coli* contenant le plasmide "helper" et 1/3 de culture d'*E. coli* contenant le plasmide d'intérêt, est mis en culture à 28°C pendant 24 h sur un filtre millipore (0,45 µm) posé sur une boîte de LB gélosé. Les bactéries sont ensuite resuspendues dans 2 mL d'une solution de NaCl 0,9% (v/v). Différentes dilutions sont étalées sur un milieu LB sélectif (tétracycline 10 µg/mL, rifampicine 50 µg/mL, gentamycine 50 µg/mL) afin de sélectionner les clones d'*A. tumefaciens* transformés.

2.4.2.4.2. Clonage des promoteurs des gènes *AtNCED2*, *AtNCED3* et *AtNCED9* en amont des gènes rapporteurs *GUS* et *GFP*.

Les promoteurs des gènes *AtNCED2*, *AtNCED3* et *AtNCED9* sont amplifiés par PCR avec une ADN polymérase haute fidélité, générant des extrémités franches. Chacun des promoteurs est sous-cloné dans le plasmide pBS KS au site de restriction *EcoRV* situé dans le site multiple de clonage, qui génère également des extrémités franches. Les promoteurs sont extraits de ce plasmide en utilisant des enzymes de restriction situées de part et d'autre du site *EcoRV*, afin d'être cloné dans les plasmides pBI101 et pBIN mGFP5-ER, portant respectivement les cassettes GUS et GFP.

Les fragments correspondant aux promoteurs *AtNCED2* et *AtNCED9* sont extraits des plasmides pBS KS recombinants par digestion avec les enzymes *HindIII* et *XbaI*, qui génèrent des extrémités cohésives. Ils sont simplement insérés dans les vecteurs pBI101 et pBIN mGFP5-ER après digestion par les enzymes de restriction *HindIII* et *XbaI*. Une seule orientation d'insertion des inserts dans ces vecteurs est donc possible.

Pour le promoteur du gène *AtNCED3*, la digestion du plasmide pBS KS recombinant est réalisée avec les enzymes *XbaI* et *ClaI*. L'extrémité cohésive générée par la restriction de *ClaI* est convertie en extrémité franche par action de la Klenow. Le plasmide pBI101 destiné à recevoir le promoteur du gène *AtNCED3* est digéré par *XbaI*, générant des extrémités cohésives, et *SmaI*, générant des bords francs. Ceci afin d'oritenter la ligation du promoteur *AtNCED3* dans pBI101. La digestion du vecteur pBIN mGFP5-ER est réalisée par les enzymes *HindIII* et *XbaI*, dont les extrémités cohésives sont comblées à l'aide de la Klenow. Les deux de digestion *XbaI* et *ClaI*, qui permettent d'extraire le promoteur *AtNCED3* du plasmide recombinant pBS KS, sont également comblés. Les plasmides pBIN mGFP5-ER recombinants présentant la bonne orientation sont donc sélectionnés par restriction.

2.4.2.5. Analyse de l'expression des gènes

2.4.2.5.1. Extraction d'ARN de feuilles

Les tissus (1 à 2 feuilles de rosette) sont broyés dans de l'azote liquide et transférés dans un tube, préalablement chauffé à 80°C, contenant 750 µL de phénol et 750 µL de tampon TLES (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, LiCl 100 mM, EDTA 10 mM pH 8.0, SDS 1 % (p/v)). Après agitation, 750 µL de chloroforme:alcool isoamylique (24:1 ; v/v) sont ajoutés et mélangés. La suspension est transférée dans deux tubes Eppendorf puis centrifugée 5 min à 10000 x g. Le surnageant est récupéré et les ARNs sont précipités par l'addition d'un volume égal d'une solution de LiCl 4M toute la nuit à 4°C. Après une centrifugation de 30 minutes à 10000 x g, le culot d'ARN est lavé à l'éthanol 70 % (v/v) et repris dans 250 µL d'eau traitée au DEPC. Une seconde précipitation des acides nucléiques est réalisée en ajoutant 25 µL d'acétate de sodium 2,5 M et 500 µL d'éthanol absolu soit pendant une heure à -80°C soit une nuit à -20°C. Après une centrifugation de 45 min à 10000 x g, le culot est lavé deux fois à l'éthanol 70 % (v/v), séché sous vide et repris dans 50 µL d'eau traitée au DEPC.
Le rendement attendu est de 500 à 1500 µg d'ARN par g de matière fraîche.

2.4.2.5.2. Extraction d'ARN de graines

Cette méthode dextraction est adaptée du protocole décrit par Downing et collaborateurs (1992) (Downing et al., 1992).
Environ 50 mg de graines ou de siliques entières sont broyés après congélation dans l'azote liquide. A cette poudre sont ajoutés 500 µL de tampon d'extraction (Tris-HCl 25 mM pH 8.0, NaCl 75 mM, SDS 1% (p/v) ; EDTA 25 mM pH 8.0) et le mélange est agité fortement. Puis, sont adjoints 335 µL de phénol saturé d'eau (agitation forte et incubation pendant 10 min à température ambiante) et 165 µL de chloroforme (agitation forte et incubation pendant 5 min). (étape 1). Après centrifugation (15000 x g, 20 min, température ambiante) la phase supérieure est transférée dans un nouveau tube, et cette suspension contentant les acides nucléiques est à nouveau purifiée par ajout de 250 µL de phénol (agitation forte et incubation pendant 10 min à température ambiante) et 250 µL de chloroforme (agitation forte et incubation pendant 5 min à température ambiante) puis centrifugation (15000 x g, 20 min, température ambiante) (étape 2). La phase inférieure de l'étape 1 est extraite à nouveau par 500 µL de tampon d'extraction, centrifugée (15000 x g, 20 min, température ambiante) et traitée selon l'étape 2. Les phases supérieures issues de l'étape 2 sont une dernière fois purifiées avec 500 µL de chloroforme, agitées fortement et incubées 10 min à température ambiante avant d'être centrifugées (15000 x g, 10 min, température ambiante). Les acides nucléiques contenus dans ces phases aqueuses sont alors transférés dans de nouveaux Eppendorf et précipités avec 1/10^{e} V d'acétate de sodium 3 M pH 6.0 et 1 V d'isopropanol. Le mélange est homogénéisé puis incubé 2 h à –20°C. Après centrifugation (15000 x g, 20 min, 4°C), les culots d'acide nucléiques sont lavés avec 500 µL d'éthanol 70% (v/v), séchés et resuspendus dans 200 µL d'eau traitée préalablement au DEPC. Les ARN sont ensuite

précipités spécifiquement au chlorure de lithium (2 M final) à 0°C, toute la nuit. Après centrifugation (12000 x g, 30 min, 4°C) et lavage des culots à l'éthanol 70% (v/v), les ARN sont repris dans 50 µL d'eau DEPC.

2.4.2.5.3. Extraction des ARNs pour l'analyse en RT-PCR

Les ARN des différents tissus sont extraits en utilisant le kit GenElute™ Mammalian Total RNA (Sigma), auquel est ajouté une étape de traitement à la DNAse (Qiagen). Les graines sont congelées dans l'azote liquide et broyées dans un mortier. Quelques mg de polyclar AT (Polyvinylpyrolidone insoluble, Serva), permettant d'adsorber les composés phénolyques (présents en grande quantité dans les téguments), sont ajoutés ainsi que 350µL de tampon de lyse additionné de β-mercaptoéthanol 1 % (v/v) : les ARN sont extraits des cellules. Le tout est filtré sur une colonne qui retient les débris cellulaires. Un volume de 350µL d'éthanol 70% (v/v) est ajouté au filtrat qui est passé sur une seconde colonne. Cette étape permet la précipitation puis la fixation des ARN la colonne. Un premier lavage avec 250µL de "wash solution 1" est réalisé, immédiatement suivi du traitement à la DNase (RNase–free DNase Set, Qiagen) : chaque échantillon est traité par un mélange de 10µL de DNase et de 70µL de RDD (pour "RNase-Free DNA Digest Buffer") pendant 15 min à température ambiante. Les ARN sont lavés un seconde fois avec 250µL de "wash solution 1", puis avec 500µL de "wash solution 2". Ils sont enfin élués dans 50 µL de solution d'élution.

La rétrotranscription des ADNc (kit Superscript II RNase H-Reverse Transcriptase, Invitrogen) se décompose en quatre étapes. La première consiste à dénaturer les structures secondaires formées par les ARNs. Un mélange composé des matrices d'ARN et d'1 µL d'oligo dT (500 ng.μL^{-1}, qui servira d'amorce pour la synthèse du premier brin) est incubé 10 min à 70 °C puis immédiatement placé sur la glace. Le premier brin peut alors être synthétisé. Au mélange précédent, sont ajoutés 1 µL de RNase Out (40 U.μL^{-1}, inhibe les RNases), 4 µL de tampon 5x (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, KCl 375 mM, $MgCl_2$15 mM), 1 µL de dNTP (10 mM) et 2 µL de DTT (0,1 M). La réaction est initiée pendant 2 min à 42°C. La synthèse du premier brin débute lorsque 0,25 µL de la reverse transcriptase SuperScript II (50 U.μL^{-1}) est ajoutée à chaque échantillon. Cette réaction dure 50 mn à 42 °C. Elle est ensuite stoppée en plaçant les échantillons 15 min à 70 °C. La dernière étape consiste à dégrader les matrices d'ARN en traitant par 1 µL de RNase H (2 U.μL^{-1}) 20 min à 37°C. 1 µL des ADNc simple brin obtenus servira de matrice pour l'amplification par PCR à suivre, conduite dans un volume de 50 µL.

2.4.2.5.4. Electrophorèse d'ARN

L'électrophorèse d'ARN est effectuée en conditions dénaturantes, ce qui permet d'éliminer les structures secondaires formées par les ARNs (épingles à cheveux, dimérisation, etc □). Le gel est préparé à partir de 1,5 g d'agarose mélangé à 80 mL d'eau osmosée. Il est fondu, puis 10 mL de MOPS 10x (MOPS 200 mM, acétate de sodium 50 mM, EDTA 10 mM pH 7) et 8 mL de formaldéhyde 37% y sont ajoutés avant refroidissement complet et gélification.

Les échantillons d'ARN (environ 5 à 10 µg) sont dénaturés en les incubant 10 min à 70°C dans un tampon de dénaturation et immédiatement plongés dans la glace (1 mL de tampon contient 625 µL de formamide déionisée, 188 µL de formaldéhyde 37%, 100 µL de MOPS 10X, 67 µL de glycérol, 3 à 5 µL de bleu de bromophénol + xylène cyanol à 2% et 3 à 5 µL de BEt à 10 $mg.mL^{-1}$). La migration se fait à 60 V pendant 2 à 3 heures dans du tampon MOPS 1x.

2.4.2.5.5. Transfert d'ARN sur membrane de nylon : northern blot

Le transfert de ARN du gel vers une membrane de nylon de type "genescreen" s'effectue par capillarité dans un tampon salin de SSC 6x (Tri-citrate Na 0,06 M, NaCl 0,9 M pH 7.0), toute la nuit. Les acides nucléiques sont ensuite fixés aux UV (120 000 $\mu J.cm^{-2}$) dans un stratalinker UV-crosslinking (Stratagene).

2.4.2.5.6. Hybridation des membranes de northern blot

Les membranes sont "préhybridées" dans du tampon Church (SDS 7%, p/v, Na_2HPO_4 0,25 M pH 7.4, EDTA 2 mM, héparine 0,2 $mg.mL^{-1}$, ADN de sperme de saumon soniqué 0,1 $mg.mL^{-1}$) pendant 2 heures à 65°C. La sonde d'ADN, marquée au $\alpha dCT^{32}P$ en utilisant le kit Promega de marquage par marquage aléatoire (Prime-a-gene labeling system, Promega) est purifiée sur colonne afin d'éliminer les dNTPs non incorporés et est ajoutée au tampon après dénaturation pendant 2 à 3 min à 100°C.
L'hybridation a lieu sous agitation pendant la nuit à 65°C dans un four à hybridation. Les membranes sont lavées deux fois durant 15 min dans un premier tampon de lavage (SSC 2x (Tri-citrate Na 0,02 M, NaCl 0,3 M pH 7.0), sarcosyl 17 mM, pyrophosphate de sodium 4,5 mM) à 65°C, puis 10 min dans un deuxième tampon de lavage (SSC 0,2x (Tri-citrate Na 0,002 M, NaCl 0,03 M pH 7.0), 17 mM sarcosyl, 4,5 mM pyrophosphate de sodium) à 65°C. Elles sont ensuite mises en cassette d'autoradiographie contenant un écran amplificateur et un film et placées à -80°C. Après un temps d'exposition à adapter suivant l'intensité du signal, les films sont développés.

2.4.2.5.7. Hybridation *in situ*

Synthèse des sondes ARN

La sonde spécifique du gène *AtNCED9* utilisée pour les hybridations en northern blot a été clonée dans le plasmide pGEM-T (Promega). Les sondes sens et antisens ont été synthétisées après linéarisation du vecteur obtenu grâce aux enzymes *SalI* et *NcoI* respectivement situées en 3' des sondes sens et antisens.
La digestion de 10 µg d'ADN plasmidique (kit Qiagen) est réalisée dans un volume réactionnel de 100 µL, en présence de l'enzyme de restriction adéquate et selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen). La digestion a lieu sur la nuit. Après vérification de la linéarisation totale du plasmide par électrophorèse sur gel d'agarose, le produit de digestion est traité par 1 volume de phénol-chloroforme-alcool isoamylique

(25:24:1 ; v/v ; Invitrogen) puis précipité et repris à une concentration de 0,5 µg.µL^{-1} dans de l'eau (Biofit).

Les sondes sont transcrites par des ARN polymérases à l'aide du kit (Riboprobe® combination system SP6-T7 RNA polymerase, Promega), qui utilise les origines de transcription d'origine phagique T7 (sonde sens) et SP6 (sonde antisens). Au cours de la transcription, réalisée selon les recommandations du fournisseur, les sondes sont marquées par l'incorporation d'un nucléotide couplé à la digoxygénine, le DIG-11-UTP. La réaction de transcription est réalisée dans un volume de 20 µL, contenant 1 µg d'ADN plasmidique linéarisé, 4 µL de tampon 5x (Tris-HCl 200 mM pH 7.9, $MgCl_2$ 30 mM, spermidine 10 mM, $NaCl_2$ 50 mM), 1 µL d'ATP 10 mM, 1 µL de GTP 10 mM, 1 µL de CTP 10 mM, 0,5 µL d'UTP 10 mM froid, 0,5 µL de DIG-11-UTP 10 mM, 20 U d'inhibiteur de RNase (Roche) et 15 U d'ARN polymérase T7 ou SP6.

La transcription a lieu pendant 90 min à 37°C au terme desquelles 1 µL est prélevé et déposé sur gel d'agarose afin de visualiser la synthèse d'ARN. 2 bandes sont visibles : la bande de haut poids moléculaire correspond à l'ADN, matrice de la transcription ; la bande de bas poids moléculaire correspond à l'ARN synthétisé.

L'ADN plasmidique est éliminé par ajout de 10 U de DNase I RNase free (Promega) suivi d'une incubation de 10 min à 37°C. Les transcrits sont ensuite précipités avec 20 µL d'acétate d'ammonium 10 M et 250 µL d'éthanol 100% froid pendant 30 min à –80°C. Après centrifugation et lavage à l'éthanol 70% (v/v), le culot est repris dans 52 µL d'eau "RNase free" (Biofit).

Inclusion du matériel végétal

L'hybridation *in situ* est effectuée sur des coupes fines de siliques WT récoltées à 10 jours après fécondation (pour un développement complet de 26 jours), incluses dans la paraffine.

Le matériel végétal est tout d'abord fixé par infiltration sous vide pendant 1 h dans une solution de formaldéhyde 4% (p/v), triton 0,1% (v/v) préparée extemporanément à partir de paraformaldéhyde dilué dans du PBS 1x (Eurobio). Le paraformaldéhyde est dépolymérisé à température élevée et à pH élevé (> 9.5), puis le pH de la solution est neutralisé (pH 7 à 7.5 avec H_2SO_4 20%). Le matériel est ensuite laissé toute la nuit dans le fixateur à 4°C.

Les échantillons sont rincés 1 h dans de l'eau (Versol) puis déshydratés par des bains de 1 h dans des solutions de concentration croissante en éthanol (10%, 30%, 50%, 70%, 85%, 95%). La déshydratation s'effectue à 4°C. Les échantillons sont conservés dans de l'éthanol 95% additionné d'éosine 0,1% (p/v) à 4°C pendant la nuit.

L'inclusion débute par des bains (3 x 20 min) d'éthanol 100%. Puis l'éthanol est progressivement remplacé par de l'histoclear (Histo-Clear plus, National Diagnostics), dans lequel la paraffine est soluble :

- éthanol 100%/Histoclear 2/1 (v/v) 1 h
- éthanol 100%/Histoclear 1/1 (v/v) 1 h
- éthanol 100%/ Histoclear 2/1 (v/v) 1h

- Histoclear 100% 3 x 20 min

Les échantillons sont ensuite disposés dans des cassettes, avant d'être placés à 59°C dans un mélange Histoclear/paraffine fondue (1:1 ; v/v) pendant 1 h. Les cassettes sont alors transférées dans 3 bains successifs de paraffine fondue pure pendant 12 h à 59°C.
L'inclusion s'effectue dans des moules d'aluminium contenant de la paraffine fondue propre, qu'on laisse se solidifier à température ambiante.

Traitement des lames

Les lames sur lesquelles sont disposées des coupes de 9 µm réalisées à l'aide d'un microtome (Leica) sont d'abord incubées dans de l'Histoclear (10 min, puis à nouveau 15 min) afin d'éliminer la paraffine. Elles sont ensuite réhydratées par passages successifs dans des solutions d'éthanol de concentrations décroissantes (100%, 95%, 75%, 50%, 30%, eau Versol) de 1 min chacun. Après incubation pendant 20 min dans une solution de 2x SSC (Tri-citrate Na 0,03 M, NaCl 0,3 M pH 7.0), puis 5 min dans le tampon pronase (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, $CaCl_2$ 2 mM), les coupes sont traitées à la protéinase K (1 µg/mL dans le tampon pronase) pendant 30 min à 37°C, ceci afin de faciliter l'accès des sondes aux ARN par dégradation des protéines. Les lames sont ensuite rincées dans du PBS 1x, puis les coupes sont fixées dans du formaldéhyde 4% (p/v) pendant 10 min. Après deux bains de 5 min dans du PBS 1x, les lames sont traitées par l'acide acétique anhydre 0,5% (v/v) dans une solution de triéthanolamine (0,1M, pH 8.0) sous agitation, afin de réduire le bruit de fond. Les lames sont à nouveau rincées 2 fois 5 min dans du PBS 1x avant d'être déshydratées dans la série d'alcool utilisée précédemment. Le dernier alcool éliminé, les lames sont conservées à 4°C.

Hybridation

L'hybridation des sondes spécifiques au gène *AtNCED9* est effectuée à la température de 40°C. 1 à 9 µL de sonde est dilué avec de l'eau (Biofit) dans un volume de 10 µL, dénaturé à 80°C pendant 2 min, et ajouté à 210 µL de tampon d'hybridation (DAKO). Ces 220 µL sont suffisant pour l'hybridation de deux lames en sandwich. Toutes les lames sont placées dans une boîte humidifiée avec de la formamide 50% (v/v) dans du 2x SSC et scellée. L'hybridation a lieu sur la nuit à 40°C.

Lavages

Les lames sont ensuite lavées au 0,2 SSC à 55°C (2 x 30 min), puis transférées dans le tampon de réaction de la RNase A (NaCl 500 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM) 2 x 5 min à 37°C avant l'ajout de la RNAse (20 $\mu g.mL^{-1}$, 30 min, 37°C). Après deux nouveaux lavages dans le même tampon (5 min à 37°C), les lames sont partagées en deux lots et lavées dans deux conditions différentes : 0,2 SSC ou 0,02 SSC (2 x 30 min, 55 °C). Cette étape est suivie d'un rinçage dans du PBS 1x à température ambiante. Les lavages permettent d'éliminer les hybrides imparfaits entre les sondes et des séquences

partiellement homologues. Ceux-ci sont dissociés par des lavages de stringence croissante (diminution de la concentration en sels), ainsi que par un traitement des lames à la RNase A, qui détruit les ARN simple brins.

Détection immunologique et révélation

Avant la détection immunologique, les lames sont incubées pendant une heure dans une solution (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 150 mM) contenant un agent bloquant (Roche) puis dans une solution de BSA (BSA 1% (p/v), triton 0,1% (v/v), Tris-HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 150 mM), afin de bloquer les sites non spécifiques de fixation de l'anticorps . La détection des transcrits hybridés par la sonde marquée à la digoxygénine est réalisée en utilisant un anticorps anti-digoxygénine conjugué à la phosphatase alcaline (Roche) : les lames sont incubées une heure dans la solution contenant l'anticorps dilué au 1/1250^{e} (v/v) (Tris 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 50 mM) puis lavées 3 x 20 min dans la même solution. Le marquage des lames est révélé à l'obscurité par une solution (Tris 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 50 mM) contenant deux substrats de la phosphatase alcaline, le NBT (0,338 mg/mL final) et le BCIP (0,175 mg/mL final) (Roche). Un précipité pourpre apparaît en lieu et place des hybrides ARNm-sonde, basé sur l'oxydation du NBT et la réduction couplée du BCIP. La coloration est arrêtée dans une solution de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 50 mM).

2.4.2.5.8. Test histochimique de l'activité β-glucuronidase (GUS)

Le matériel à analyser est placé dans une solution constituée d'un tampon phosphate (tampon $NaPO_4$ 100 mM, pH 7.2, EDTA 20 mM, triton X-100 0,1% (v/v)), auquel est ajouté le substrat, l'acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronique (X-Gluc), dissout dans de la diméthylformamide à la concentration finale de 2 mM. Le tout est placé dans une cloche et infiltré sous vide : le vide est cassé trois fois avant d'être laissé maintenu au moins 1 h. La suite de la réaction, qui produit de l'acide glucuronique et du ClBr-indigo, s'effectue à 37°C pendant au moins 12h.

Les échantillons sont ensuite décolorés dans des bains successifs d'éthanol 70% (v/v) et observés à la loupe binoculaire en première approche. Pour les d'observations microscopiques, les échantillons sont incubés après dissection entre lame et lamelle dans une solution de chloral hydraté/glycérol/eau (8:2:1 ; p/v/v), qui permet l'observation en contraste interférentiel à l'aide d'optiques Nomarski.

3. Discussion générale et perspectives

3. Discussion générale et perspectives

3.1. Expression des gènes *AtNCED*

L'étape clef régulatrice de la biosynthèse de l'ABA est catalysée par les NCED, présentes sous la forme d'une famille multigénique de 9 membres chez *Arabidopsis*.

Ces enzymes catalysent *in vitro* le clivage d'un *cis*-xanthophylle en xanthoxine. Les données initiales d'accumulation des transcrits obtenues par northern blot ont permis d'identifier les gènes spécifiquement exprimés dans la graine, de ceux exprimés également dans les feuilles. Ainsi, *AtNCED5*, *AtNCED6* et *AtNCED9* appartiennent à la première catégorie, alors que *AtNCED2* et *AtNCED3* sont dans la seconde. Une analyse plus poussée de la localisation de l'expression de ces gènes a par la suite été entreprise, afin de déterminer dans quels tissus les différents ARNm sont accumulés. Au cours de ce travail de thèse, la localisation spatiale et temporelle de quatre gènes *AtNCED* (*ANCED2*, *AtNCED3*, *AtNCED6* et *AtNCED9*) a été étudiée. Ces résultats précisent ceux obtenus par Tan et collaborateurs (2003) (Tan et al., 2003).

AtNCED6 est exprimé dans la graine tout au long du développement de la silique, ainsi que dans les grains de pollen. Nos observations de lignées exprimant les gènes rapporteurs *GUS* et *GFP* sous le contrôle du promoteur du gène *AtNCED6* nous ont permis de déterminer la présence des transcrits dans l'albumen des graines tout au long de leur développement. Cette localisation tissulaire a été confirmée par hybridation *in situ* (**figure 2.14).**

Pour *AtNCED9*, aucune donnée n'a pu être obtenue à partir des lignées transgéniques étudiées. La même difficulté avait été rencontrée dans l'étude précédente (Tan et al., 2003) et l'extension de la séquence promotrice à la partie 5' de la séquence codante est envisagée pour de nouvelles constructions (cf § 2.3.4). Par contre, l'hybridation *in situ* montre clairement un marquage dans les couches cellulaires externes de l'embryon au stade torpille, ainsi que dans l'albumen (**figure 2.18**).

Comme Tan et collaborateurs (2003), nos observations indiquent que les gènes *AtNCED2* et *AtNCED3* s'expriment tous deux dans les boutons floraux. Cependant, alors que ces auteurs ne donnent aucune précision sur le patron d'expression d'*AtNCED2* dans les siliques et les graines, nous avons localisé les transcrits dans les faisceaux vasculaires de nombreuses régions : au niveau des zones de déhiscence du réceptacle des fleurs et du pédicèle des siliques, dans le funicule des graines et également dans les septa des siliques (**figure 2.28**).

Enfin, *AtNCED3* est le gène majeur de réponse au stress et est exprimé dans les parties aériennes des plantes (Iuchi et al., 2001) (Tan et al., 2003). Cependant, Tan et collaborateurs (2003) indiquaient qu'il est également exprimé dans la partie basale de la graine (Tan et al., 2003). La réalisation de coupes d'embryons possédant la construction promoteur *AtNCED3::GUS* nous a permis de déterminer précisément que les transcrits

s'accumulent dans l'albumen micropylaire au cours de la maturation de la graine (**figure 2.29**).
La caractérisation des plantes transgéniques *AtNCED5*::GUS et GFP n'a pas pu être achevée avant le terme de cette thèse. Toutefois les résultats décrits dans la littérature montrent une expression dans les étamines (filet et anthères), ainsi que dans les boutons floraux. La coloration GUS a aussi été détectée dans les graines à tous les stades de développement (Tan et al., 2003).

Ainsi, les 5 gènes *NCED* sont exprimés dans la graine d'*Arabidopsis* en développement et pour au moins 3 d'entre eux des transcrits ont été localisés dans l'albumen de la graine, contre un seulement dans l'embryon. De plus, *AtNCED6* dont l'expression est exclusivement détectée dans l'albumen, est le gène le plus exprimé dans la graine (**figure 2.5**). Il semble donc vraisemblable que l'albumen soit le siège de synthèse d'une fraction importante de l'ABA embryonnaire. Par ailleurs nous avons vérifié que les xanthophylles substrats des NCED sont bien présents dans la graine en développement d'*Arabidopsis* dans l'embryon *sensu stricto* comme dans l'ensemble tégument plus albumen (résultats non présentés). De plus le gène *ZEP* intervenant en amont des gènes *AtNCED* dans la voie de biosynthèse est exprimé de façon ubiquitaire dans la graine tout au long de son développement (Audran et al., 2001). Il faut également noter que le gène *ZEP* est exprimé dans la testa pendant le développement de la graine, à l'exception de la phase de dessiccation (Audran et al., 2001), alors qu'aucun des 4 gènes *AtNCED* que nous avons étudié en détail ne semble exprimé dans ce tissu. Il reste à déterminer la localisation précise de l'expression d'*AtNCED5* mais selon nos résultats, les gènes *AtNCED2*, *AtNCED3*, *AtNCED6* et *AtNCED9* ne semblent pas impliqués dans le clivage des caroténoïdes précurseurs présents dans la testa. Comme l'expression des gènes en aval des *NCED* n'a pas été étudiée dans les téguments de la graine, la synthèse d'ABA dans ces tissus est probable mais reste encore à démontrer. Les téguments sont des tissus maternels et il a été amplement démontré que la majeure partie de l'ABA présent dans la graine était d'origine maternelle (Karssen et al., 1983) (Groot and Karssen, 1992) . Toutefois il semble que cet ABA maternel ne soit pas synthétisé dans les tissus maternels de la graine mais soit importé de la plante mère. En effet les graines en développement de mutants déficients en ABA greffés sur des plantes sauvages présentent des teneurs en ABA importantes (Frey et al., 2004).
Par ailleurs, la détection de l'expression des gènes *NCED* ne suffit pas à démontrer l'existence probable de synthèse d'ABA dans un tissu, il faut également que les transcrits des gènes en aval de la voie soient présents. Le gène *AtABA2*, qui code pour l'enzyme située juste après du clivage des caroténoïdes, est exprimée très faiblement dans la graine (Cheng et al., 2002). Le manque de sensibilité des techniques utilisées (fusion des promoteurs avec des gènes rapporteurs et northern blot) est certainement lié à ces observations. Enfin, il a récemment été montré par northern blot et RT-PCR que le dernier

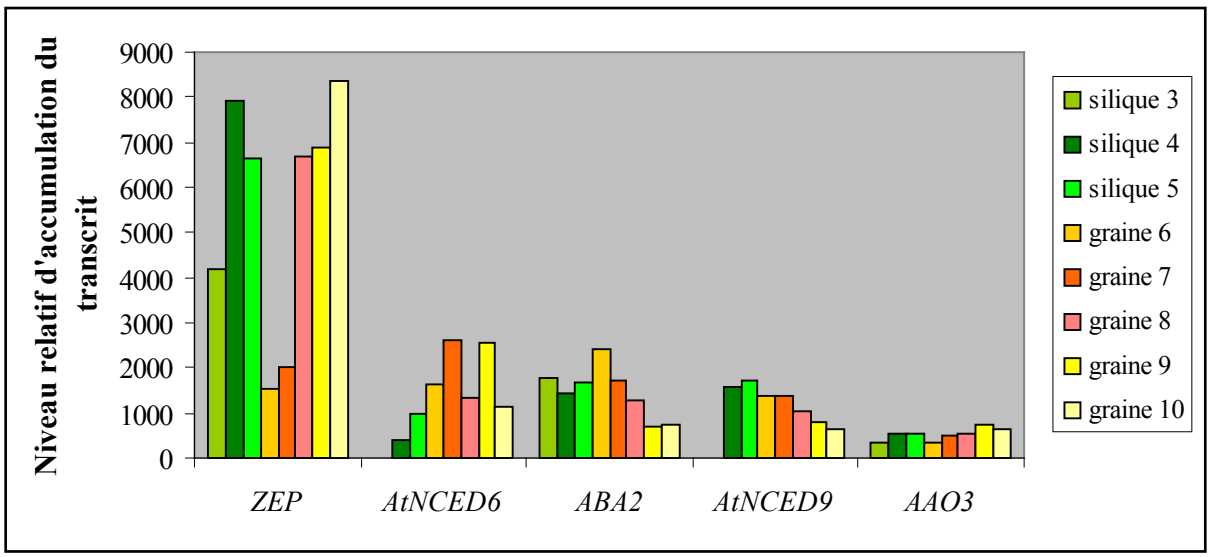


Figure 2.32 : Accumulation relative des transcrits de 5 gènes participant à la biosynthèse de l'ABA (*ZEP*, *ABA2*, *AAO3*, *AtNCED6*, *AtNCED9*) au cours du développement de la graine. Ce développement est divisé en 10 stades. Les stades 3, 4 et 5 sont représentés par des siliques entières ; les stades 6 à 10 sont des graines isolées.

source : http://www. genevestigator.ethz.ch

gène de la voie, *AAO3*, est aussi exprimé dans les graines (Seo et al., 2004) (Gonzalez-Guzman et al., 2004). Cette expression semble faible, en accord avec les phénotypes obtenus pour les mutants *aao3*. Toutefois aucune donnée tissulaire n'est disponible afin de déterminer si ces deux gènes sont exprimés dans l'embryon, l'albumen ou la testa. En comparant les données obtenues pour les gènes codant les trois dernières étapes de la voie de biosynthèse de l'ABA, il semble qu'*AtABA2* et *AAO3* soient plus faiblement exprimés dans les graines que les gènes *AtNCED*.(**figure 2.32**)

Compte tenu de ces diverses observations, il semble possible que la synthèse des xanthophylles précurseurs soit ubiquitaire dans la graine et que la spécificité tissulaire de la synthèse d'ABA soit controlée au niveau de l'étape de clivage des *cis*-xanthophylles. Toutefois la régulation quantitative de la synthèse d'ABA pourrait avoir lieu lors des deux dernières étapes, qui seraient potentiellement limitantes. L'analyse de l'expression des gènes *AtZEP*, *AtABA2*, *AAO3*, *AtNCED6* et *AtNCED9* par northern *in silico* confirment que la première étape de la biosynthèse de l'ABA n'est pas limitante dans les graines, puisque la teneur relative en ARNm *AtZEP* est beaucoup plus importante que les autres. *AtNCED6* et *AtABA2* présentent des niveaux d'expression similaires, mais les transcrits *AtABA2* s'accumulent plus précocement au cours du développement de la graine. Par contre l'expression de *AAO3* paraît plus faible, et pourrait donc intervenir dans le contrôle de la synthèse de l'ABA (**figure 2.32**).

Il est toutefois difficile d'établir de conclusions définitives étant données les connaissances limitées concernant la régulation transcriptionnelle de l'ensemble des gènes de la voie et l'absence d'information sur l'expression, la stabilité et l'activité des protéines correspondantes.

3.2. Redondance fonctionnelle des gènes *AtNCED*

D'après les patrons d'accumulation des transcrits *AtNCED*, chaque gène présente une expression spatio-temporelle précise. Il est donc probable qu'ils soient impliqués chacun dans des processus physiologiques particuliers. En accord avec cette hypothèse, les mutants *Atnced6* et *Atnced9* représentent une nouvelle classe de mutants déficients en ABA uniquement dans la graine, puisque leur capacité à répondre à un stress n'est pas modifiée dans les parties aériennes. Il semble donc qu'il existe effectivement un découplage dans la synthèse de l'ABA, certains gènes de la famille participant à sa synthèse dans les parties aériennes ; d'autres, qui s'expriment dans la silique, joueraient plutôt un rôle dans l'élaboration du pool d'ABA dans la graine (Cf § 2.1.2, **figure 2.4**). De plus, ils possèdent tous un patron d'accumulation de transcrits original, spécifique ou non de l'appareil végétatif ou des graines et sont exprimés différentiellement au cours du développement de la graine. Malgré tout, nous avons pu remarquer un certain chevauchement dans le "timing" d'expression des gènes dans la graine.

Les mutants étudiés présentent des phénotypes faibles dans les graines : moindre besoin en GAs pour germer et diminution de la teneur en ABA mais pas de réduction de la dormance. Chacun des gènes pourrait donc participer à la synthèse d'une partie de l'ABA contenu dans les graines. Dans ces conditions, la mutation d'un seul gène serait à l'origine d'une faible diminution de la quantité totale d'ABA, ce qui n'aurait, *a priori*, que des conséquences mineures sur la physiologie de la graine.
Ainsi, les faibles phénotypes observés semblent être dus à une redondance génique. Toutefois, il n'est pas exclu qu'un autre gène *NCED* soit surexprimé en contexte mutant, prenant le pas sur le gène déficient et assurant ainsi tout ou partie de sa fonction, comme cela a été montré pour la famille des AB-aldéhyde oxydases (Seo et al., 2004). La redondance la plus évidente pourrait être celle qui unirait les deux gènes *AtNCED6* et *AtNCED9*, du fait de la similarité de leur patron d'expression temporelle, mais également spatiale. Cependant, des résultats préliminaires obtenus par northern blot semblent indiquer qu'il n'y a pas de différence notable d'expression des gènes *AtNCED6* et *AtNCED9* chez le WT et en contexte mutant *Atnced9* ou *Atnced6* respectivement. Toutefois, ces expérimentations devront être répétées et mieux adaptées à la recherche de faibles variations d'expression. Pour cela, il serait judicieux d'envisager l'utilisation de techniques comme la RT-PCR quantitative.

3.3. L'expression d'*AtNCED9* est localisée dans l'embryon

Les transcrits *AtNCED9* semblent s'accumuler dans les tissus périphériques de l'embryon, incluant peut-être l'épiderme. Ils pourraient ainsi être la cible du facteur de transcription FUS3. Il a en effet été récemment montré que la protéine FUS3 est exprimée dans l'épiderme de l'embryon au cours du développement de la graine. De plus certaines observations, notamment la teneur réduite en ABA des mutants *fus3*, indiquent que ce facteur régulerait positivement la synthèse d'ABA. L'ABA à son tour contribuerait à l'arrêt de croissance de l'embryon et à l'activation de l'accumulation des protéines de réserve (Gazzarrini et al., 2004). Le rôle clef des NCED dans la biosynthèse de l'ABA ainsi que la localisation spatiale et temporelle des ARNm font donc d'*AtNCED9* un candidat idéal comme cible de la régulation par FUS3. Comme l'ABA semble réguler positivement la stabilité de la protéine FUS3 (Gazzarrini et al., 2004), il serait possible par exemple de tester l'accumulation de la protéine FUS3 dans les mutants *Atnced9*. D'autre part si FUS3 a un rôle activateur sur l'expression du gène *AtNCED9,* l'accumulation des transcrits devrait être diminuée dans les mutants *fus3*.

3.4. Régulation de la synthèse des réserves lipidiques

Les réserves lipidiques de la graine d'*Arabidopsis* sont contenues à la fois dans l'embryon et l'albumen. De plus, la composition en acides gras des réserves de l'albumen est différente de celle des réserves contenues dans l'embryon (Penfield et al., 2004).

L'ABA régule positivement la synthèse des lipides de la graine. En effet, plusieurs enzymes participant à la synthèse des lipides sont induites par l'ABA, comme celles participant à la biosynthèse des acides gras à longue chaîne chez le colza. La synthèse des acides gras à longues chaînes est basée sur la condensation de molécules de malonyl CoA sur du C18:1 CoA, grâce à l'action d'un "complexe élongase" composé entre-autre d'une β-ketoacyl carrier protein (KCS). Qi et collaborateurs (1998) ont montré que la KCS spécifique de la graine est induite par l'ABA chez *Brassica napus* (Qi et al., 1998). Les résultats de l'analyse lipidique effectuée sur les mutants *Ataba3-1* et *Atnced6* confirment ces observations antérieures, puisque ces mutants déficients en ABA possèdent une composition en acides gras altérée. En effet, tous deux présentent une accumulation accrue en C18:2 et la teneur en C18:3 de *Ataba3-1* est diminuée par rapport au sauvage. Cette dernière constatation est en accord avec les études réalisées sur des embryons dérivés de microspores de colza au cours de laquelle une désaturase impliquée dans la synthèse de l'acide linolénique (C18:3) a été décrite comme induite par l'ABA (Zou et al., 1995). De plus, le phénotype du mutant *Atnced6* indique qu'une déficience en ABA uniquement dans l'albumen affecte la composition en acides gras de la graine. Il reste à démontrer si seule la composition de l'albumen est altérée ou si l'ABA synthétisé dans l'albumen régule la synthèse des lipides également dans l'embryon. Alors que la mobilisation des réserves contenues dans l'albumen de la graine n'apparaît pas régulée par l'ABA (Penfield et al., 2004), il existe certainement un contrôle de leur synthèse exercé par cette hormone.

Nous envisageons d'effectuer ces analyses sur les fractions "testa + albumen" *versus* "embryon", afin de savoir si, dans le contexte mutant *Atnced6*, seule la composition en acides gras de l'albumen est affectée. En effet, la différence de composition lipidique observée entre *Atnced6* et *Ataba3-1* peut être expliquée soit par l'origine tissulaire de la déficience en ABA, soit par la faible diminution de la teneur en ABA chez le mutant *Atnced6* par rapport à *Ataba3-1*. Cette étude pourrait également être élargie aux mutants *Atnced9* et *Atnced6, Atnced9*.

3.5. L'ABA synthétisé dans l'albumen participe à la mise en place de la dormance

Alors que l'étude des simples mutants *Atnced6* et *Atnced9*, tous deux dormants, ne le laissait pas supposer, l'analyse de graines affectées dans les deux gènes a apporté la preuve qu'ils interviennent tous deux dans l'expression de la dormance, participant à la synthèse de l'ABA qui la contrôle. En effet, la déficience cumulée de *AtNCED6* et *AtNCED9* permet la germination d'une plus grande proportion de graines dans des conditions suboptimales, ce qui signifie que la dormance est partiellement levée dans ce fond génétique.

Une autre information découle de ce résultat : l'ABA produit dans l'albumen est impliqué dans la synthèse d'ABA nécessaire à la mise en place de la dormance. En effet, dans le double mutant, deux gènes de biosynthèse de l'ABA exprimés dans l'albumen sont abolis et il en résulte des graines dont la dormance est diminuée.

Chez les simples mutants, une fraction de l'ABA n'est plus produite et le pool restant est suffisant pour permettre à la graine de germer en présence de concentrations élevées de paclobutrazol et suffisant pour induire la dormance. Par contre, chez le double mutant, la synthèse d'ABA dans la graine serait en grande partie abolie dans l'albumen et les graines nécessiteraient moins de GAs pour germer et présenteraient un dormance réduite.
La fraction d'ABA d'origine embryonnaire impliquée dans la mise en place de la dormance décrite par Karssen et collaborateurs (1983) et Groot et Karssen (1992) semble donc être en réalité de l'ABA synthétisé dans les deux tissus issus de la fécondation (soit l'embryo et l'albumen), par opposition à l'ABA apporté par les tissus maternels (Karssen et al., 1983) (Groot and Karssen, 1992).
Au contraire, des données obtenues chez des mutants vivipares de maïs indiquent pourtant que le génotype de l'albumen n'influence pas la dormance (Robertson, 1952). En effet par translocation de chromosome, le génotype de l'albumen de graines a été rendu déficient en ABA alors que l'embryon ne l'était pas et ces graines se sont révélées dormantes. Il se peut toutefois que le contrôle de la dormance chez le maïs soit différent de celui d'*Arabidopsis* puisque la déficience en ABA conduit à la viviparité chez le maïs et pas chez *Arabidopsis*.

3.6. Dormance et résistance au paclobutrazol, deux phénotypes dissociables

Les phénotypes des deux simples mutants *Atnced6* et *Atnced9* au niveau de la graine sont faibles : la dormance n'est pas affectée, mais les graines nécessitent un moindre besoin en GAs pour germer. Mais sur quelles bases physiologiques ces deux caractéristiques, qui semblent antagonistes, sont-elles réunies au sein d'un même mutant ? Il semble qu'une faible diminution de la quantité d'ABA dans la graine sèche, telle que celle observée pour *Atnced6* et *Atnced9*, engendre une diminution du besoin en GAs lors de la germination (théorie de la balance hormonale). Cette diminution semble par contre n'être pas suffisante pour affecter la dormance des graines. Il pourrait en effet exister un niveau seuil d'ABA nécessaire à la mise en place de la dormance au cours du développement de la graine, et les mutants *Atnced6* et *Atnced9* synthétiseraient suffisamment d'ABA, restant ainsi dormants.
Afin de tenter de répondre à cette question, nous avons décidé d'associer ces deux mutations dans les graines en construisant le double mutant *Atnced6, Atnced9*.
Comme attendu, les effets des mutations sont potentialisés dans le double mutant, puisque la résistance au paclobutrazol est augmentée par rapport aux simples mutants. De plus, la résistance au paclobutrazol de ces doubles mutants étant aussi prononcée que pour le mutant *Ataba3-1,* ces graines semblent présenter un besoin minimal en GAs pour germer. Il apparaît donc que l'effet additif de ces deux gènes soit également effectif lors de la germination : le besoin en GAs est encore plus faible, les rapprochant des mutants totalement déficients en ABA. Le dosage de l'ABA contenu dans les graines sèches des

doubles mutants confirmera sans doute leur plus faible teneur en ABA par rapport aux simples mutants.

Toutefois la dormance n'est que partiellement réduite chez ces doubles mutants, ce qui semble indiquer que le niveau d'ABA restant serait suffisant pour induire certains mécanismes de dormance qui ne sont pas influencés par les GAs. Dormance et besoin en GAs pour la germination semblent également dissociés chez certains mutants *rdo* (reduced dormancy), qui se sont révélés non-dormants mais sensibles au paclobutrazol (Leon-Kloosterziel et al., 1996b).

3.7. Régulation hormonale de la germination

Les expérimentations menées dans nos travaux ont amené à mesurer la dormance des graines par leur capacité à germer sur milieu minimal, ce qui est le résultat de la balance entre le degré de dormance et la capacité de l'embryon à lever cette dormance. La diminution de "dormance" observée chez les doubles mutants *Atnced6, Atnced9* pourrait donc provenir d'une diminution de la capacité des graines à mettre en place cette dormance, ou bien d'une facilitation du processus de germination.

Or, l'ABA empêcherait l'hydrolyse des parois cellulaires de l'albumen et des téguments. L'albumen, considéré comme une barrière à la sortie de la radicule, serait donc une cible idéale de l'ABA lors de la germination. La diminution de la dormance observée chez les doubles mutants pourrait donc être due à la facilitation de la germination du fait de l'altération de la structure pariétale des cellules de l'albumen en absence d'ABA. Il serait donc envisageable que la déficience en ABA observée dans l'albumen facilite la sortie de la radicule, en ce sens qu'elle permettrait l'accomplissement de la germination pour une activité moins importante des hydrolases ou extensines. Toutefois, l'imbibition de graines sur de fortes concentrations en ABA n'empêche pas l'hydrolyse des tissus qui entourent la graine, même si la germination elle-même est inhibée (Penfield et al., 2004), puisque l'ABA inhibe la croissance de la radicule. En accord avec cette constatation, l'expression d'une extensin-like *AtEPR1*, exprimée dans l'albumen a été observée au moment de la germination, qui est induite par les GAs mais insensible à l'action de l'ABA (Dubreucq et al., 2000). Cependant, l'action de l'ABA exogène, appliqué lors de l'imbibition, ne peut sans doute pas être assimilée à l'ABA directement produit dans l'organe cible, puisque le mutant *Atnced6*, déficient en ABA dans l'albumen uniquement, requiert moins de GAs pour germer. L'ABA synthétisé dans l'albumen pourrait donc intervenir dans le contrôle de la germination par la régulation de l'hydrolyse de l'albumen. Quand sa teneur est réduite chez les mutants, moins de GAs pourraient être nécessaires à l'activation des hydrolases. Toutefois, d'autres processus comme la croissance de l'embryon pourraient être régulés par l'ABA produit dans l'embryon, ce qui expliquerait qu'une déficience en ABA dans ces deux organes soit nécessaire pour réduire la dormance.

3.8. Conclusion et perspectives

L'étude des gènes *NCED* chez *Arabidopsis*, impliqués dans l'étape clef régulatrice de la biosynthèse de l'ABA, a conduit à la mise en évidence du rôle majeur joué par l'ABA présent dans l'albumen, puisque 3 d'entre-eux sont exprimés dans ce tissu au cours du développement de la graine. L'analyse fine de l'expression des autres membres de la famille et des phénotypes des mutants correspondants devrait permettre de mieux connaître le rôle de l'ABA synthétisé dans les différents tissus de la graine. L'observation des expressions des gènes *AtNCED6* et *AtNCED3*, localisées dans des régions précises de l'albumen, suggère que la régulation de l'expression des *AtNCED* s'effectue au niveau temporel et tissulaire, mais également plus finement, au sein de territoires tissulaires définis. Afin de comprendre ce phénomène, il serait utile de rechercher les régulateurs des différents membres de cette famille, par exemple en testant leurs expressions chez des mutants de signalisation de l'ABA, tels que *lec*, *fus3*, *abi3* par exemple, tous trois intervenant au cours de la maturation de la graine. De plus, connaître les "cibles" de l'ABA produit par chacun des gènes *AtNCED* permettrait de mieux comprendre les implications physiologiques de l'ABA produit dans les différents territoires de la graine. Il serait pour cela envisageable d'effectuer des analyses du transcriptome des différents mutants *Atnced*, afin de connaître les gènes dé-régulés dans ces différents contextes.

4. Références bibliographiques

4. Références bibliographiques

Aida, M., Ishida, T. and Tasaka, M. (1999). Shoot apical meristem and cotyledon formation during Arabidopsis embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes. *Development* **126**, 1563-70.

Al-Babili, S., Hugueney, P., Schledz, M., Welsch, R., Frohnmeyer, H., Laule, O. and Beyer, P. (2000). Identification of a novel gene coding for neoxanthin synthase from *Solanum tuberosum*. *FEBS Lett* **485**, 168-72.

Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R. et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.

Audran, C., Borel, C., Frey, A., Sotta, B., Meyer, C., Simonneau, T. and Marion-Poll, A. (1998). Expression studies of the zeaxanthin epoxidase gene in *nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol* **118**, 1021-8.

Audran, C., Liotenberg, S., Gonneau, M., North, H., Frey, A., Tap-Waksman, K., Vartanian, N. and Marion-Poll, A. (2001). Localisation and expression of zeaxanthin epoxidase mRNA in *Arabidopsis* in response to stress and during seed development. *Aust. J. Plant Physiol*. **28**, 1161-1173.

Balzergue, S., Dubreucq, B., Chauvin, S., Le-Clainche, I., Le Boulaire, F., de Rose, R., Samson, F., Biaudet, V., Lecharny, A., Cruaud, C. et al. (2001). Improved PCR-walking for large scale isolation of plant T-DNA borders. *Biotechniques* **30**, 496-504.

Baud, S., Boutin, J.-P., M., M., Lepiniec, L. and Rochat, C. (2002). An intergated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiol Biochem* **40**, 151-160.

Baumlein, H., Nagy, I., Villarroel, R., Inze, D. and Wobus, U. (1992). *Cis*-analysis of a seed protein gene promoter: the conservative RY repeat CATGCATG within the legumin box is essential for tissue-specific expression of a legumin gene. *Plant J* **2**, 233-9.

Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti, F. and Giraudat, J. (2000). Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* **12**, 1103-1115.

Bensmihen, S., Rippa, S., Lambert, G., Jublot, D., Pautot, V., Granier, F., Giraudat, J. and Parcy, F. (2002). The homologous ABI5 and EEL transcription factors function antagonistically to fine-tune gene expression during late embryogenesis. *Plant Cell* **14**, 1391-1403.

Bentsink, L. and Koornneef, M. (2002). Seed dormancy and germination. In *The Arabidopsis book*: The American Society of Plant Biologists.

Berger, F. (2003). Endosperm: the crossroad of seed development. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 42-50.

Berleth, T. and Chatfield, S. (2002). Embryogenesis: pattern formation from single cell. In *The Arabidopsis book*: The American Society of Plant Biologists.

Berleth, T. and Jürgens, G. (1993). The role of the monopteros gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* **118**, 575-587.

Bethke, P. C., Gubler, F., Jacobsen, J. V. and Jones, R. L. (2004). Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* **219**, 847-855.

Bewley, J., D. (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell* **9**, 1055-1066.

Bewley, J., D. and M., B. (1994). Physiology of Development and Germination. In *Seeds*, (ed. P. Press), pp. 1999-271. New York.

Bies-Etheve, N., da Silva Conceicao, A., Giraudat, J., Koornneef, M., Leon-Kloosterziel, K., Valon, C. and Delseny, M. (1999). Importance of the B2 domain of the *Arabidopsis* ABI3 protein for *Em* and *2S* albumin gene regulation. *Plant Mol Biol* **40**, 1045-54.

Bittner, F., Oreb, M. and Mendel, R. R. (2001). ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **276**, 40381-4.

Booker, J., Auldridge, M., Wills, S., McCarty, D., Klee, H. and Leyser, O. (2004). MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr Biol* **14**, 1232-8.
Borel, C., Audran, C., Frey, A., Marion-Poll, A., Tardieu, F. and Simonneau, T. (2001). *N. plumbaginifolia* zeaxanthin epoxidase transgenic lines have unaltered baseline ABA accumulations in roots and xylem sap, but contrasting sensitivities of ABA accumulation to water deficit. *J Exp Bot* **52**, 427-34.
Bouvier, F., D'Harlingue, A., Backhaus, R. A., Kumagai, M. H. and Camara, B. (2000). Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *Eur J Biochem* **267**, 6346-52.
Bouvier, F., d'Harlingue, A., Hugueney, P., Marin, E., Marion-Poll, A. and Camara, B. (1996). Xanthophyll biosynthesis. Cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of beta-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). *J Biol Chem* **271**, 28861-7.
Brown, R., Lemmon, B., Nguyen, H. and Olsen. (1999). Development of endosperm in *Arabidopsis thaliana*. *sex plant reprod* **12**, 32-42.
Burbidge, A., Grieve, T. M., Jackson, A., Thompson, A., McCarty, D. R. and Taylor, I. B. (1999). Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize *Vp14*. *Plant J* **17**, 427-31.
Burbidge, A., Grieve, T. M., Terry, C., Corlett, J., Thompson, A. and Taylor, I. B. (1997). Structure and expression of a cDNA encoding zeaxanthin epoxidase isolated from wilt-related tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J Exp Bot* **48**, 1749-1750.
Carles, C., Bies-Etheve, N., Aspart, L., Leon-Kloosterziel, K. M., Koornneef, M., Echeverria, M. and Delseny, M. (2002). Regulation of *Arabidopsis thaliana Em* genes: role of ABI5. *Plant J* **30**, 373-83.
Cheng, W. H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H. C., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M. et al. (2002). A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell* **14**, 2723-43.
Chernys, J. T. and Zeevaart, J. A. (2000). Characterization of the 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. *Plant Physiol* **124**, 343-53.
Chow, B. and McCourt, P. (2004). Hormone signalling from a developmental context. *J Exp Bot* **55**, 247-51.
Clough, S. J. and Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana. Plant J* **16**, 735-43.
Creelman, R., A. and Zeevaart, J. A. (1984). Incorporation of oxygen into abscisic acid and phaseic acid from molecular oxygen. *Plant Physiol* **75**, 166-169.
Cutler, A. J. and Krochko, J. E. (1999). Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci* **4**, 472-478.
Cutler, S., Ghassemian, M., Bonetta, D., Cooney, S. and McCourt, P. (1996). A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Science* **273**, 1239-41.
Debeaujon, I. and Koornneef, M. (2000). Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiol* **122**, 415-24.
Debeaujon, I., Leon-Kloosterziel, K. M. and Koornneef, M. (2000). Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **122**, 403-14.
Dekkers, B. J., Schuurmans, J. A. and Smeekens, S. C. (2004). Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **218**, 579-88.
Downing, W. L., Mauxion, F., Fauvarque, M. O., Reviron, M. P., de Vienne, D., Vartanian, N. and Giraudat, J. (1992). A *Brassica napus* transcript encoding a protein related to the Kunitz protease inhibitor family accumulates upon water stress in leaves, not in seeds. *Plant J* **2**, 685-93.

Dubreucq, B., Berger, N., Vincent, E., Boisson, M., Pelletier, G., Caboche, M. and Lepiniec, L. (2000). The *Arabidopsis AtEPR1* extensin-like gene is specifically expressed in endosperm during seed germination. *Plant J* **23**, 643-52.
Duckham, S. C., Lindforth, R. S. T. and Taylor, I. B. (1991). Abscisic acid-deficient mutants at the *aba* gene locus of *Arabidopsis thaliana* are impaired in the epoxydation of zeaxanthin. *plant Cell Environ.* **14**, 601-606.
Ezcurra, I., Ellerstrom, M., Wycliffe, P., Stalberg, K. and Rask, L. (1999). Interaction between composite elements in the napA promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Mol Biol* **40**, 699-709.
Finkelstein, R. R. (1994). Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J* **5**, 765-771.
Finkelstein, R. R., Gampala, S. S. and Rock, C. D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14 Suppl**, S15-45.
Finkelstein, R. R. and Gibson, S. I. (2002). ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Curr Opin Plant Biol* **5**, 26-32.
Finkelstein, R. R. and Lynch, T. J. (2000). The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* **12**, 599-609.
Finkelstein, R. R. and Rock, C. D. (2002). Abscisic acid biosynthesis and response. In *The Arabidopsis book*: The American Society of Plant Biologists.
Finkelstein, R. R., Wang, M. L., Lynch, T. J., Rao, S. and Goodman, H. M. (1998). The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell* **10**, 1043-54.
Focks, N. and Benning, C. (1998). *wrinkled1*: A novel, low-seed-oil mutant of *Arabidopsis* with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant Physiol* **118**, 91-101.
Frey, A., Audran, C., Marin, E., Sotta, B. and Marion-Poll, A. (1999). Engineering seed dormancy by the modification of zeaxanthin epoxidase gene expression. *Plant Mol Biol* **39**, 1267-74.
Frey, A., Godin, B., Bonnet, M., Sotta, B. and Marion-Poll, A. (2004). Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta* **218**, 958-64.
Galweiler, L., Guan, C., Muller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. and Palme, K. (1998). Regulation of polar auxin transport by *AtPIN1* in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* **282**, 2226-30.
Gazzarrini, S., Tsuchiya, Y., Lumba, S., Okamoto, M. and McCourt, P. (2004). The transcription factor FUSCA3 controls developmental timing in *Arabidopsis* through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Dev Cell* **7**, 373-85.
Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y. and McCourt, P. (2000). Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 1117-26.
Gibson, S. I. (2005). Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 93-102.
Giraudat, J., Parcy, F., Bertauche, N., Gosti, F., Leung, J., Morris, P. C., Bouvier-Durand, M. and Vartanian, N. (1994). Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Mol Biol* **26**, 1557-77.
Gonzalez-Guzman, M., Abia, D., Salinas, J., Serrano, R. and Rodriguez, P. L. (2004). Two new alleles of the abscisic aldehyde oxidase 3 gene reveal its role in abscisic acid biosynthesis in seeds. *Plant Physiol* **135**, 325-33.
Gonzalez-Guzman, M., Apostolova, N., Belles, J. M., Barrero, J. M., Piqueras, P., Ponce, M. R., Micol, J. L., Serrano, R. and Rodriguez, P. L. (2002). The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell* **14**, 1833-46.

Gosti, F., Beaudoin, N., Serizet, C., Webb, A. A., Vartanian, N. and Giraudat, J. (1999). ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* **11**, 1897-910.
Grappin, P., Bouinot, D., Sotta, B., Miginiac, E. and Jullien, M. (2000). Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta* **210**, 279-85.
Groot, S. P. C. and Karssen, C. M. (1992). Dormancy and germination of abscisic acid-deficient tomato seeds. *Plant Physiol* **99**, 952-958.
Guerche, P., Tire, C., De Sa, F. G., De Clercq, A., Van Montagu, M. and Krebbers, E. (1990). Differential Expression of the *Arabidopsis 2S* Albumin Genes and the Effect of Increasing Gene Family Size. *Plant Cell* **2**, 469-478.
Hamann, T., Benkova, E., Baurle, I., Kientz, M. and Jurgens, G. (2002). The *Arabidopsis BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev* **16**, 1610-5.
Hamann, T., Mayer, U. and Jurgens, G. (1999). The auxin-insensitive *bodenlos* mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the *Arabidopsis* embryo. *Development* **126**, 1387-95.
Hardtke, C. S. and Berleth, T. (1998). The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *Embo J* **17**, 1405-11.
Hartung, W., Sauter, A. and Hose, E. (2002). Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *J Exp Bot* **53**, 27-32.
Hilhorst, H., W., M. (1995). A critical update on seed dormancy. I. primary dormancy. *Seed Science Research* **5**, 61-73.
Hirschberg, J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 210-8.
Hobbie, L., McGovern, M., Hurwitz, L. R., Pierro, A., Liu, N. Y., Bandyopadhyay, A. and Estelle, M. (2000). The *axr6* mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene involved in auxin response and early development. *Development* **127**, 23-32.
Hughes, D. W. and Galau, G. A. (1991). Developmental and environmental induction of *Lea* and *LeaA* mRNAs and the postabscission program during embryo culture. *Plant Cell* **3**, 605-18.
Huijser, C., Kortstee, A., Pego, J., Weisbeek, P., Wisman, E. and Smeekens, S. (2000). The *Arabidopsis SUCROSE UNCOUPLED-6* gene is identical to *ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4*: involvement of abscisic acid in sugar responses. *Plant J* **23**, 577-85.
Ingram, J. and Bartels, D. (1996). The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**, 377-403.
Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* **27**, 325-33.
Iuchi, S., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2000). A stress-inducible gene for 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiol* **123**, 553-62.
Jackson, D. (1991). *In situ* hybridization in plants. In *Molecular plant pathology: a practical approach*, (ed. O. U. Press).
Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J* **6**, 3901-7.
Johnson, R. R., Wagner, R. L., Verhey, S. D. and Walker-Simmons, M. K. (2002). The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiol* **130**, 837-46.

Julliard, J., Pelese, F., Sotta, B., Maldiney, R., Primard-Brisset, C., Jouanin, L., Pelletier, G. and Miginiac, E. (1993). TI-DNA transformation decreases ABA levels. *Plant Physiol* **88**, 654-660.
Kagaya, Y., Hobo, T., Murata, M., Ban, A. and Hattori, T. (2002). Abscisic acid-induced transcription is mediated by phosphorylation of an abscisic acid response element binding factor, TRAB1. *Plant Cell* **14**, 3177-89.
Karssen, C., M., Brinkhorst-van der Swan, D., L., C., Breekland, A., E. and Koornneef, M. (1983). Induction of dormancy during seed development by endogenous abscissic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **157**, 158-165.
Karssen, C., M. and Laçka, E. (1986). A revision of the hormone balance theory of seed dormancy: studies on gibberellin signal transduction. *Plant Growth Substances*, 315-323.
Karssen, C. M., Zagorski, S., Kepczynski, J. and Groot, S. P. C. (1989). Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Annals of Botany* **63**, 71-80.
Koiwai, H., Nakaminami, K., Seo, M., Mitsuhashi, W., Toyomasu, T. and Koshiba, T. (2004). Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in Arabidopsis. *Plant Physiol* **134**, 1697-707.
Koncz, C., Kreuzaler, F., Kalman, Z. and Schell, J. (1984). A simple method to transfer, integrate and study expression of foreign genes, such as chicken ovalbumin and alpha-actin in plant tumors. *Embo J* **3**, 1029-37.
Koornneef, M., Bentsink, L. and Hilhorst, H. (2002). Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 33-6.
Koornneef, M., Hanhart, C. J., Hilhorst, H., W., M. and Karssen, C., M. (1989). In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **90**, 463-469.
Koornneef, M., Jorna, M., L., Brinkhorst-van der Swan, D., L., C. and Karssen, C., M. (1982). The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theoretical and Applied Genetics* **61**, 385-393.
Koornneef, M. and van der Veen, J. H. (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theoretical and Applied Genetics* **58**, 257-263.
Kraepiel, Y., Rousselin, P., Sotta, B., Kerhoas, L., Einhorn, J., Caboche, M. and Miginiac, E. (1994). Analysis of phytochrome- and ABA-deficient mutants suggests that ABA degradation is controlled by light in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant J* **6**, 665-672.
Krochko, J. E., Abrams, G. D., Loewen, M. K., Abrams, S. R. and Cutler, A. J. (1998). (+)-Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Physiol* **118**, 849-60.
Kroj, T., Savino, G., Valon, C., Giraudat, J. and Parcy, F. (2003). Regulation of storage protein gene expression in *Arabidopsis*. *Development* **130**, 6065-73.
Kuhlemeier, C. and Reinhardt, D. (2001). Auxin and phyllotaxis. *Trends Plant Sci* **6**, 187-9.
Kuhn, J. M. and Schroeder, J. I. (2003). Impacts of altered RNA metabolism on abscisic acid signaling. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 463-9.
Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., Hirai, N., Koshiba, T., Kamiya, Y. and Nambara, E. (2004). The *Arabidopsis* cytochrome P450 *CYP707A* encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *Embo J* **23**, 1647-56.
Kwak, J. M., Moon, J. H., Murata, Y., Kuchitsu, K., Leonhardt, N., DeLong, A. and Schroeder, J. I. (2002). Disruption of a guard cell-expressed protein phosphatase 2A regulatory subunit, RCN1, confers abscisic acid insensitivity in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 2849-61.
Kwong, R. W., Bui, A. Q., Lee, H., Kwong, L. W., Fischer, R. L., Goldberg, R. B. and Harada, J. J. (2003). LEAFY COTYLEDON1-LIKE defines a class of regulators essential for embryo development. *Plant Cell* **15**, 5-18.

Laby, R. J., Kincaid, M. S., Kim, D. and Gibson, S. I. (2000). The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J* **23**, 587-96.
Lapik, Y. R. and Kaufman, L. S. (2003). The *Arabidopsis* cupin domain protein AtPirin1 interacts with the G protein alpha-subunit GPA1 and regulates seed germination and early seedling development. *Plant Cell* **15**, 1578-90.
Lara, P., Onate-Sanchez, L., Abraham, Z., Ferrandiz, C., Diaz, I., Carbonero, P. and Vicente-Carbajosa, J. (2003). Synergistic activation of seed storage protein gene expression in *Arabidopsis* by ABI3 and two bZIPs related to OPAQUE2. *J Biol Chem* **278**, 21003-11.
Lee, S., Cheng, H., King, K. E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N. P. and Peng, J. (2002). Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA-like* gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev* **16**, 646-58.
Leon-Kloosterziel, K. M., Gil, M. A., Ruijs, G. J., Jacobsen, S. E., Olszewski, N. E., Schwartz, S. H., Zeevaart, J. A. and Koornneef, M. (1996a). Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant J* **10**, 655-61.
Leon-Kloosterziel, K. M., van de Bunt, G. A., Zeevaart, J. A. and Koornneef, M. (1996b). *Arabidopsis* mutants with a reduced seed dormancy. *Plant Physiol* **110**, 233-40.
Leprince, O., Bronchart, R. and Deltour, R. (1990). Changes in strach and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. *Plant Cell Environ* **13**, 539-546.
Leubner-Metzger, G. (2002). Seed after-ripening and over-expression of class I beta-1,3-glucanase confer maternal effects on tobacco testa rupture and dormancy release. *Planta* **215**, 959-68.
Leung, J. and Giraudat, J. (1998). Abscisic Acid Signal Transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 199-222.
Li, Y. and Walton, D. C. (1990). Violaxanthin is an abscisic acid precursor in water-stressed dark-grown bean leaves. *Plant Physiol* **92**, 551-559.
Lichtenthaler, H. K., Schwender, J., Disch, A. and Rohmer, M. (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* **400**, 271-4.
Liotenberg, S., North, H. and Marion-Poll, A. (1999). Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **37**, 341-350.
Long, J. A. and Barton, M. K. (1998). The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 3027-35.
Lopez-Molina, L., Mongrand, S., Kinoshita, N. and Chua, N. H. (2003). AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. *Genes Dev* **17**, 410-8.
Lopez-Molina, L., Mongrand, S., McLachlin, D. T., Chait, B. T. and Chua, N. H. (2002). ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant J* **32**, 317-28.
Marcotte, W. R., Bayley, C. C. and Quatrano, R. S. (1988). Regulation of wheat promoter by abscisic acid in rice protoplasts. *Nature* **335**, 454-457.
Marcotte, W. R., Russell, S. H. and Quatrano, R. S. (1989). Abscisic acid-responsive sequences from Em gene of wheat. *Plant Cell* **1**, 969-976.
Marin, E. and Marion-Poll, A. (1997). Tomato *flacca* mutant is impaired in ABA aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase activities. *Plant Physiol Biochem* **5**, 369-372.
Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B., Hugueney, P., Frey, A. and 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. *Embo J* **15**, 2331-42.
McCourt, P. (1999). Genetic Analysis of Hormone Signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 219-243.

Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A. and Giraudat, J. (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J* **25**, 295-303.
Monke, G., Altschmied, L., Tewes, A., Reidt, W., Mock, H. P., Baumlein, H. and Conrad, U. (2004). Seed-specific transcription factors ABI3 and FUS3: molecular interaction with DNA. *Planta* **219**, 158-66.
Nakamura, S., Lynch, T. J. and Finkelstein, R. R. (2001). Physical interactions between ABA response loci of *Arabidopsis*. *Plant J* **26**, 627-35.
Nambara, E., Akazawa, T. and McCourt, P. (1991). Effects of the gibberellin biosynthetic inhibitor uniconazol on mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **97**, 736-738.
Nambara, E. and Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and metabolism. *Ann. Rev. Plant Biol.* **56**.
Nonogaki, H. and Morohashi, Y. (1996). An Endo-beta-Mannanase Develops Exclusively in the Micropylar Endosperm of Tomato Seeds Prior to Radicle Emergence. *Plant Physiol* **110**, 555-559.
Olsen, O. A. (2004). Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16 Suppl**, S214-27.
Ono, A., Izawa, T., Chua, N. H. and Shimamoto, K. (1996). The *rab16B* promoter of rice contains two distinct abscisic acid-responsive elements. *Plant Physiol* **112**, 483-91.
Parcy, F., Valon, C., Kohara, A., Misera, S. and Giraudat, J. (1997). The *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3*, *FUSCA3*, and *LEAFY COTYLEDON1* loci act in concert to control multiple aspects of *Arabidopsis* seed development. *Plant Cell* **9**, 1265-77.
Parcy, F., Valon, C., Raynal, M., Gaubier-Comella, P., Delseny, M. and Giraudat, J. (1994). Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development: roles of the *ABI3* locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell* **6**, 1567-82.
Parry, A. and Horgan, R. (1991). Carotenoid metabolism and the biosynthesis of abscisc acid. *Phytochemistry* **30**, 815-821.
Parry, A., Neill, S. and Horgan, R. (1988). Xanthoxin levels and metabolism in the wild-type and wilty mutants of tomato. *Planta* **173**, 397-404.
Penfield, S., Rylott, E. L., Gilday, A. D., Graham, S., Larson, T. R. and Graham, I. A. (2004). Reserve mobilization in the *Arabidopsis* endosperm fuels hypocotyl elongation in the dark, is independent of abscisic acid, and requires PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE1. *Plant Cell* **16**, 2705-18.
Phillips, J., Artsaenko, O., Fiedler, U., Horstmann, C., Mock, H. P., Muntz, K. and Conrad, U. (1997). Seed-specific immunomodulation of abscisic acid activity induces a developmental switch. *Embo J* **16**, 4489-96.
Price, J., Li, T.-C., Kang, S. G., Na, J. K. and Jang, J.-C. (2003). Mechanisms of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **132**, 1424-1438.
Pritchard, S. L., Charlton, W. L., Baker, A. and Graham, I. A. (2002). Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis. Plant J* **31**, 639-47.
Qi, Q., Rose, P. A., Abrams, G. D., Taylor, D. C., Abrams, S. R. and Cutler, A. J. (1998). (+)-Abscisic acid metabolism, 3-ketoacyl-coenzyme A synthase gene expression, and very-long-chain monounsaturated fatty acid biosynthesis in *brassica napus* embryos. *Plant Physiol* **117**, 979-87.
Qin, X. and Zeevaart, J. A. (1999). The 9-*cis*-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 15354-61.
Qin, X. and Zeevaart, J. A. (2002). Overexpression of a 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiol* **128**, 544-51.
Rajjou, L., Gallardo, K., Debeaujon, I., Vandekerckhove, J., Job, C. and Job, D. (2004). The effect of alpha-amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiol* **134**, 1598-613.
Raz, V., Bergervoet, J. H. and Koornneef, M. (2001). Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development* **128**, 243-52.

Robertson, D. S. (1952). The genotype of the endosperm and embryo as it influences vivipary in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* **38**, 580-583.
Rock, C. D. and Quatrano, R., S. (1995). The role of hormones during seed development. In *Plant hormones; Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, (ed.
Rock, C. D. and Zeevaart, J. A. (1991). The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7496-9.
Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D. and Hirschberg, J. (2000). An alternative pathway to beta-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11102-7.
Rook, F., Corke, F., Card, R., Munz, G., Smith, C. and Bevan, M. W. (2001). Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *Plant J* **26**, 421-33.
Ruggiero, B., Koiwa, H., Manabe, Y., Quist, T. M., Inan, G., Saccardo, F., Joly, R. J., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. and Maggio, A. (2004). Uncoupling the effects of abscisic acid on plant growth and water relations. Analysis of *sto1/nced3*, an abscisic acid-deficient but salt stress-tolerant mutant in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **136**, 3134-47.
Saez, A., Apostolova, N., Gonzalez-Guzman, M., Gonzalez-Garcia, M. P., Nicolas, C., Lorenzo, O. and Rodriguez, P. L. (2004). Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant J* **37**, 354-69.
Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohigashi, H., Ohta, D., Sakata, K. and Mizutani, M. (2004). *Arabidopsis CYP707As* encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiol* **134**, 1439-49.
Sambrook, J., Fitsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Srping Harbor, NY: Cold Srping Harbor University Press.
Sauter, A., Dietz, K. J. and Hartung, W. (2002). A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling. *Plant Cell Environ* **25**, 223-228.
Schwartz, S. H., Leon-Kloosterziel, K. M., Koornneef, M. and Zeevaart, J. A. (1997a). Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **114**, 161-6.
Schwartz, S. H., Qin, X. and Loewen, M. C. (2004). The Biochemical Characterization of Two Carotenoid Cleavage Enzymes from *Arabidopsis* Indicates That a Carotenoid-derived Compound Inhibits Lateral Branching. *J Biol Chem* **279**, 46940-5.
Schwartz, S. H., Qin, X. and Zeevaart, J. A. (2001). Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *J Biol Chem* **276**, 25208-11.
Schwartz, S. H., Qin, X. and Zeevaart, J. A. (2003). Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiol* **131**, 1591-601.
Schwartz, S. H., Tan, B. C., Gage, D. A., Zeevaart, J. A. and McCarty, D. R. (1997b). Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* **276**, 1872-4.
Sekimoto, H., Seo, M., Kawakami, N., Komano, T., Desloire, S., Liotenberg, S., Marion-Poll, A., Caboche, M., Kamiya, Y. and Koshiba, T. (1998). Molecular cloning and characterization of aldehyde oxidases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **39**, 433-42.
Seo, M., Aoki, H., Koiwai, H., Kamiya, Y., Nambara, E. and Koshiba, T. (2004). Comparative studies on the *Arabidopsis* aldehyde oxidase (*AAO*) gene family revealed a major role of *AAO3* in ABA biosynthesis in seeds. *Plant Cell Physiol* **45**, 1694-703.
Seo, M., Koiwai, H., Akaba, S., Komano, T., Oritani, T., Kamiya, Y. and Koshiba, T. (2000a). Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **23**, 481-8.
Seo, M. and Koshiba, T. (2002). Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* **7**, 41-48.
Seo, M., Peeters, A. J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J. A., Koornneef, M., Kamiya, Y. and Koshiba, T. (2000b). The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (*AAO3*) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12908-13.

Sindhu, R., Griffin, D. and Walton, D. C. (1990). Abscisic aldehyde is an intermediate in the enzymatic conversion of xanthoxin to abscisic acid in *Phaseolus vulgaris* leaves. *Plant Physiol* **93**, 689-694.
Sindhu, R. and Walton, D. C. (1987). Conversion of xanthoxin to abscisic acid by cell-free preparations from bean leaves. *Plant Physiol* **85**, 916-921.
Soderman, E. M., Brocard, I. M., Lynch, T. J. and Finkelstein, R. R. (2000). Regulation and function of the *Arabidopsis ABA-insensitive4* gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiol* **124**, 1752-65.
Sorefan, K., Booker, J., Haurogne, K., Goussot, M., Bainbridge, K., Foo, E., Chatfield, S., Ward, S., Beveridge, C., Rameau, C. et al. (2003). *MAX4* and *RMS1* are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. *Genes Dev* **17**, 1469-74.
Souter, M. and Lindsey, K. (2000). Polarity and signalling in plant embryogenesis. *J Exp Bot* **51**, 971-83.
Steber, C. M. and McCourt, P. (2001). A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **125**, 763-9.
Swain, S. M., Tseng, T. S. and Olszewski, N. E. (2001). Altered expression of *SPINDLY* affects gibberellin response and plant development. *Plant Physiol* **126**, 1174-85.
Tan, B. C., Joseph, L. M., Deng, W. T., Liu, L., Li, Q. B., Cline, K. and McCarty, D. R. (2003). Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *Plant J* **35**, 44-56.
Tan, B. C., Schwartz, S. H., Zeevaart, J. A. and McCarty, D. R. (1997). Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12235-40.
Taylor, I. B., Burbidge, A. and Thompson, A. J. (2000). Control of abscisic acid synthesis. *J Exp Bot* **51**, 1563-74.
Taylor, I. B., Lindforth, R. S. T., Al-Naieb, R. J., Bowman, W. R. and Marples, B. A. (1988). The wilty tomato mutants *flacca* and *sitiens* are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. *Plant Cell Environ* **11**, 739-745.
Thomas, S. G. and Sun, T. P. (2004). Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. *Plant Physiol* **135**, 668-676.
Thompson, A., Thorne, E. T., Burbidge, A., Jackson, A., Sharp, R. E. and Taylor, I. B. (2004). Complementation of *notabilis*, an abscisic acid-deficient mutant of tomato: importance of sequence context and utility of partial complementation. *Plant Cell Environ* **27**, 459-471.
Thompson, A. J., Jackson, A. C., Parker, R. A., Morpeth, D. R., Burbidge, A. and Taylor, I. B. (2000a). Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol* **42**, 833-45.
Thompson, A. J., Jackson, A. C., Symonds, R. C., Mulholland, B. J., Dadswell, A. R., Blake, P. S., Burbidge, A. and Taylor, I. B. (2000b). Ectopic expression of a tomato 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. *Plant J* **23**, 363-74.
Tissier, A. F., Marillonnet, S., Klimyuk, V., Patel, K., Torres, M. A., Murphy, G. and Jones, J. D. (1999). Multiple independent defective suppressor-mutator transposon insertions in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Plant Cell* **11**, 1841-52.
Toorop, P. E., van Aelst, A. C. and Hilhorst, H. W. (2000). The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germination is under control of ABA. *J Exp Bot* **51**, 1371-9.
Tyler, L., Thomas, S. G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R. and Sun, T. P. (2004). Della proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **135**, 1008-19.
Ullah, H., Chen, J. G., Wang, S. and Jones, A. M. (2002). Role of a heterotrimeric G protein in regulation of *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiol* **129**, 897-907.

Walker-Simmons, M., Kurdna, D. A. and Warner, R. L. (1989). Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley. *Plant Physiol* **90**, 728-733.
Wareing, P. F. and Saunders, P. F. (1971). Hormones and dormancy. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **22**, 261-288.
Weijers, D. and Jurgens, G. (2005). Auxin and embryo axis formation: the ends in sight? *Curr Opin Plant Biol* **8**, 32-7.
Western, T. L., Skinner, D. J. and Haughn, G. W. (2000). Differentiation of mucilage secretory cells of the Arabidopsis seed coat. *Plant Physiol* **122**, 345-56.
Windsor, J. B., Symonds, V. V., Mendenhall, J. and Lloyd, A. M. (2000). *Arabidopsis* seed coat development: morphological differentiation of the outer integument. *Plant J* **22**, 483-93.
Wise, M. J. and Tunnacliffe, A. (2004). POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends Plant Sci* **9**, 13-7.
Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H. and Zhu, J. K. (2001). The *Arabidopsis LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* **13**, 2063-83.
Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M. and Zhu, J. K. (2002). Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the *LOS6/ABA1* locus in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277**, 8588-96.
Xu, Z. J., Nakajima, M., Suzuki, Y. and Yamaguchi, I. (2002). Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings. *Plant Physiol* **129**, 1285-95.
Yamaguchi, S. and Kamiya, Y. (2002). Gibberellins and light-stimulated seed germination. *Journal of plant growth regulation* **20**, 369-376.
Yamauchi, Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamiya, Y. and Yamaguchi, S. (2004). Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell* **16**, 367-78.
Zeevaart, J. A. and Creelman, R., A. (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.* **39**, 439-473.
Zhou, R., Cutler, A. J., Ambrose, S. J., Galka, M. M., Nelson, K. M., Squires, T. M., Loewen, M. K., Jadhav, A. S., Ross, A. R., Taylor, D. C. et al. (2004). A new abscisic acid catabolic pathway. *Plant Physiol* **134**, 361-9.
Zou, J., Abrams, G. D., Barton, D. L., Taylor, D. C., Pomeroy, M. K. and Abrams, S. R. (1995). Induction of Lipid and Oleosin Biosynthesis by (+)-Abscisic Acid and Its Metabolites in Microspore-Derived Embryos of *Brassica napus* L.cv Reston (Biological Responses in the Presence of 8'-hydroxyabscisic Acid). *Plant Physiol* **108**, 563-571.

5. Annexes

Annexe 1

Figures non présentées de la partie **2.2 Analyse fonctionnelle du gène *AtNCED6***

Article en préparation : *AtNCED6* is specifically involved in ABA synthesis in *Arabidopsis* seed endosperm

Valérie Lefebvre, Helen North, Anne Frey, Martine Miquel, Bruno Sotta and Annie Marion-Poll

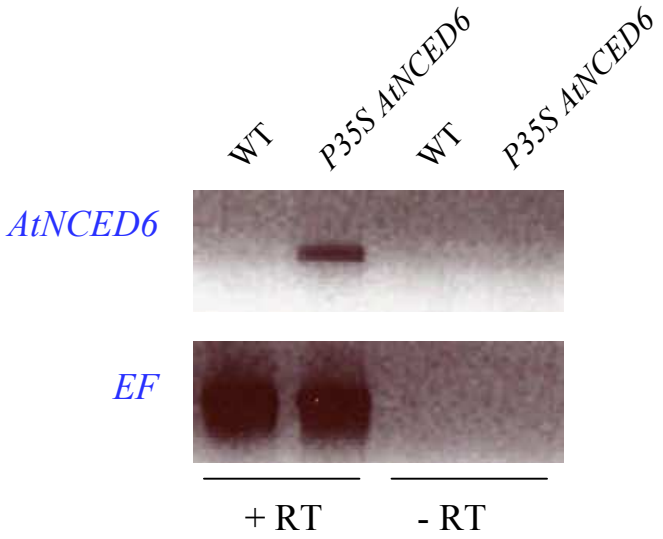


Figure A-1 : Expression du gène *AtNCED6* dans des plantules transgéniques âgées de 10 jours surexprimant le gène *AtNCED6* sous contrôle du promoteur 35S (*P35S AtNCED6*). Les amorces spécifiques du gène *AtNCED6* ont été utilisées pour réaliser la RT-PCR, et l'amplification des ADNc du gène *EF* (un facteur d'élongation constitutif) est utilisée comme contrôle. *AtNCED6* n'est pas exprimé dans les parties végétatives chez le sauvage, contrairement aux plantes transgéniques.
+RT : amplification PCR après transcription inverse ; -RT : expérience contrôle en absence de transcriptase inverse.

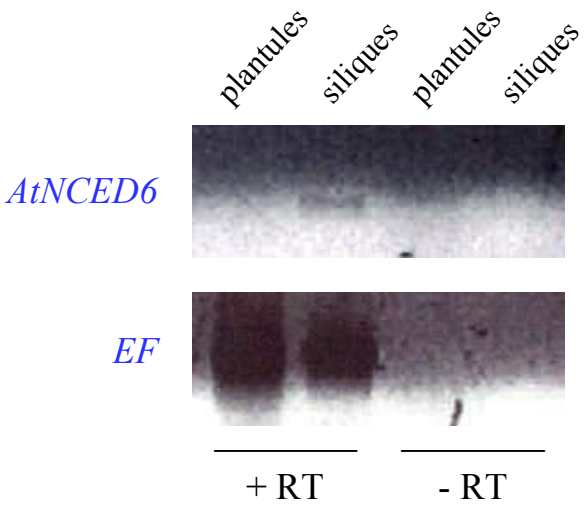


Figure A-2 : Expression du gène *AtNCED6* dans des plantules âgées de 10 jours et des siliques en développement de plantes sauvages. Des amorces spécifiques du gène *AtNCED6* ont été utilisées pour réaliser la RT-PCR, et l'amplification des ADNc du gène *EF* (un facteur d'élongation constitutif) est utilisée comme contrôle. *AtNCED6* n'est pas exprimé dans les parties végétatives, mais est exprimé dans les siliques.
+RT : amplification PCR après transcription inverse ; -RT : expérience contrôle en absence de

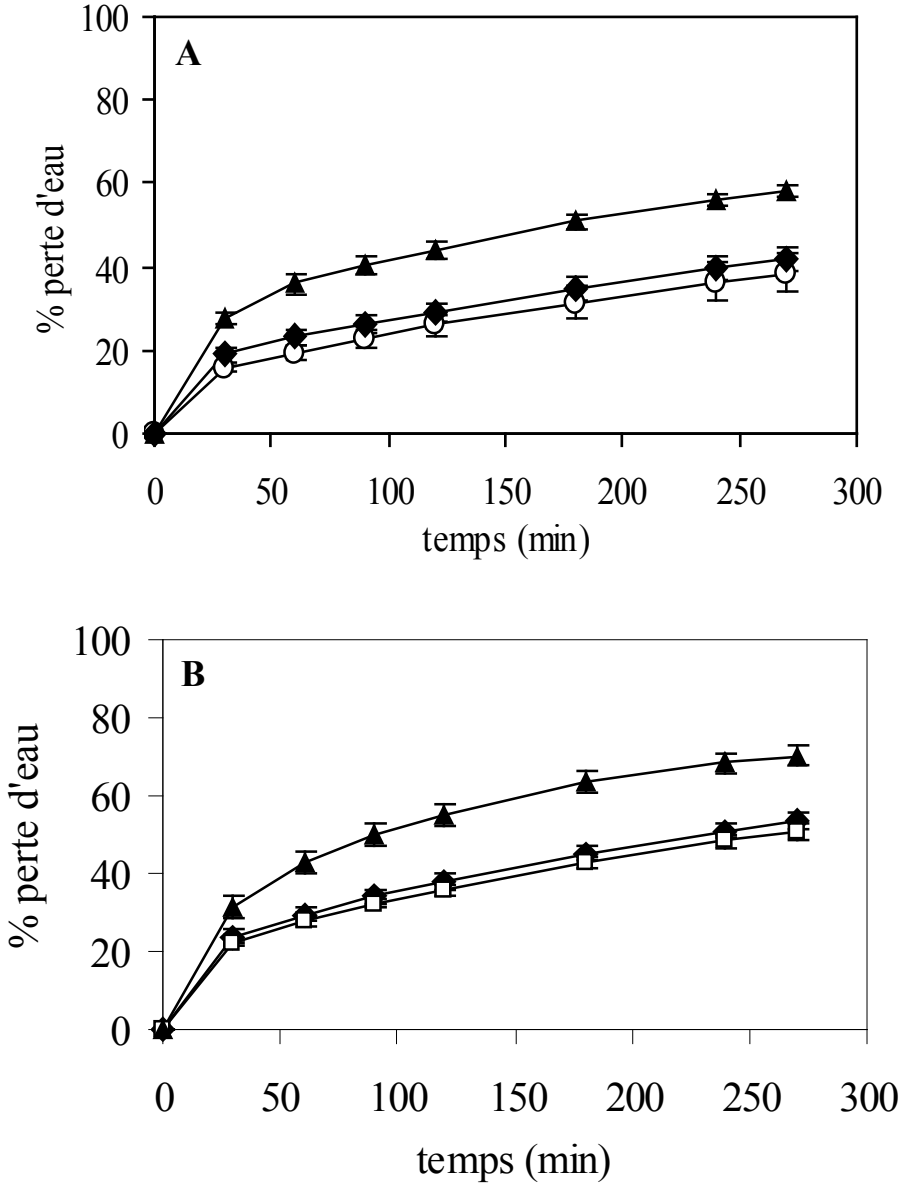


Figure A-3 : Cinétiques de déshydratation des parties aériennes du mutant *Atnced6-1* (○) en comparaison avec *Ataba3-1* (▲) et le WT (◆) (**A**, écotype Col-0) et du mutant *Atnced6-2* (□) en comparaison avec *Ataba1-13* (▲) et le WT (◆) (**B**, écotype Ws). Des rosettes sont séparées de leurs racines et déshydratées sous une hotte à flux laminaire. La perte d'eau est exprimée en fonction du poids frais initial. La cinétique de perte d'eau des mutants *Atnced6* est similaire à celle du WT, en accord avec l'absence d'expression d'*AtNCED6* dans les parties végétatives des plantes. Barres d'erreur = écarts types.

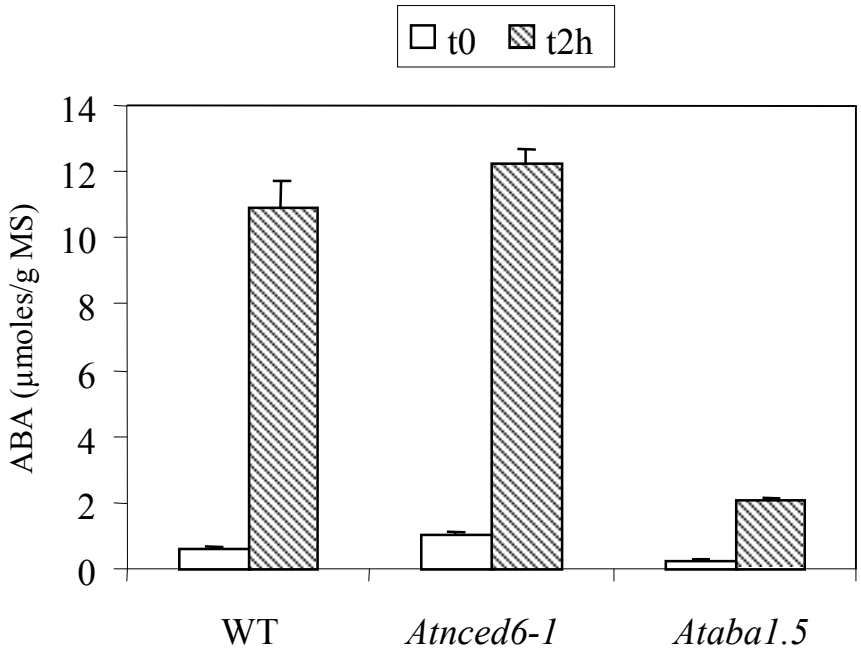


Figure A-4 : Accumulation d'ABA dans les parties aériennes du mutant *Atnced6-1* par rapport au sauvage (WT) et au mutant *Ataba1-5*, avant (t0) et après deux heures de déshydratation (t2h) sous hotte à flux laminaire. La concentration est exprimée en µmol d'ABA par gramme de matière sèche (MS). L'augmentation de la teneur en ABA du mutant *Atnced6-1* en réponse à un stress hydrique est similaire à celle du WT, en accord avec l'absence d'expression d'*AtNCED6* dans les parties végétatives des plantes. Barres d'erreur = écarts types.

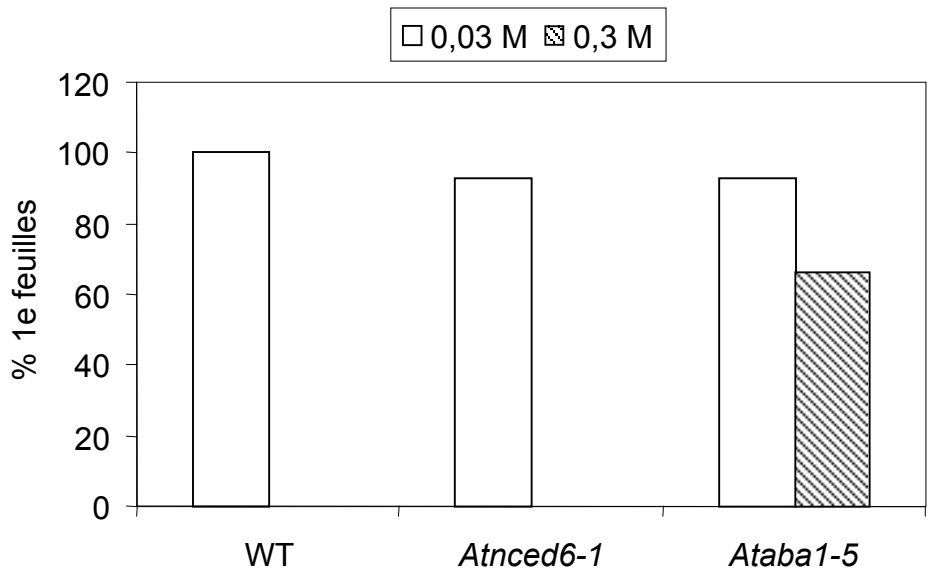


Figure A-5 : Test de résistance au saccharose de graines du mutant *Atnced6-1* en comparaison au sauvage et au mutant ABA-déficient *Ataba1-5*. La germination a été testée sur 2 concentrations en saccharose : 0,03 M (concentration classique en sucre dans un milieu de culture) et 0,3 M. Les plantules développant des premières feuilles sont considérées comme résistantes. Les plantules du mutant Atnced6-1, comme le WT, ne sont pas capables de se développer su une telle concentration en sucre, contrairement à un mutant classique déficient en ABA.

Annexe 2

Article paru dans *Plant Journal* (2002) **30**(4), 601-609

Use of infrared thermal imaging to isolate Arabidopsis mutants defective in stomatal regulation

Sylvain Merlot, Anna-Chiara Mustilli, Bernard Genty, Helen North, Valérie Lefebvre, Bruno Sotta, Alain Vavasseur and Jérôme Giraudat

The Plant Journal (2002) **30**(4), 601–609

TECHNICAL ADVANCE

Use of infrared thermal imaging to isolate Arabidopsis mutants defective in stomatal regulation

Sylvain Merlot[1,†], Anna-Chiara Mustilli[1], Bernard Genty[2,‡], Helen North[3], Valérie Lefebvre[3], Bruno Sotta[4], Alain Vavasseur[5] and Jérôme Giraudat[1,*]

[1]*Institut des Sciences du Végétal, Centre National de la Recherche Scientifique UPR2355, Avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette, France,*

[2]*Laboratoire d'Ecophysiologie Végétale, Bât. 362, UPRESA 8079, Université Paris Sud/CNRS, 91405 Orsay, France,*

[3]*Laboratoire de Biologie des Semences, INRA, Route de Saint Cyr, 78026 Versailles Cedex, France,*

[4]*Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Plantes, UMR CNRS 7632, Université Pierre et Marie Curie, 4 place Jussieu, 75252 Cedex 05, Paris, France, and*

[5]*CEA/Cadarache-DSV-DEVM, Laboratoire des Echanges Membranaires et Signalisation, UMR 163 CNRS-CEA, 13108 St Paul-lez-Durance, Cedex, France*

Received 25 January 2002; revised 8 March 2002; accepted 13 March 2002.

[*]For correspondence (fax +33 1 69 82 36 95; e-mail jerome.giraudat@isv.cnrs-gif.fr).

[‡]Present address: CEA/Cadarache-DSV-DEVM, Laboratoire d'Ecophysiologie de la Photosynthèse, UMR 163 CNRS-CEA, 13108 St Paul-lez-Durance, Cedex, France.

[†]Present address: Section of Cell and Developmental Biology and Center for Molecular Genetics, University of California San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093–0634, USA.

Summary

In response to drought, plants synthesise the hormone abscisic acid (ABA), which triggers closure of the stomatal pores. This process is vital for plants to conserve water by reducing transpirational water loss. Moreover, recent studies have demonstrated the advantages of the Arabidopsis stomatal guard cell for combining genetic, molecular and biophysical approaches to characterise ABA action. However, genetic dissection of stomatal regulation has been limited by the difficulty of identifying a reliable phenotype for mutant screening. Leaf temperature can be used as an indicator to detect mutants with altered stomatal control, since transpiration causes leaf cooling. In this study, we optimised experimental conditions under which individual Arabidopsis plants with altered stomatal responses to drought can be identified by infrared thermography. These conditions were then used to perform a pilot screen for mutants that displayed a reduced ability to close their stomata and hence appeared colder than the wild type. Some of the mutants recovered were deficient in ABA accumulation, and corresponded to alleles of the ABA biosynthesis loci *ABA1*, *ABA2* and *ABA3*. Interestingly, two of these novel *aba2* alleles were able to intragenically complement the *aba2–1* mutation. The remaining mutants showed reduced ABA responsiveness in guard cells. In addition to the previously known *abi1–1* mutation, we isolated mutations at two novel loci designated as *OST1 (OPEN STOMATA 1)* and *OST2*. Remarkably, *ost1* and *ost2* represent, to our knowledge, the first Arabidopsis mutations altering ABA responsiveness in stomata and not in seeds.

Keywords: abscisic acid (ABA), biosynthesis, drought, guard cell, infrared thermography, signal transduction.

Introduction

Abscisic acid (ABA) plays an important role in various aspects of plant growth and development (Koornneef *et al.*, 1998; Leung and Giraudat, 1998; McCourt, 1999). In seeds, ABA promotes the acquisition of nutritive reserves, desiccation tolerance and dormancy, and it inhibits seed germination. In vegetative tissues, ABA mediates adaptive

© 2002 Blackwell Science Ltd

responses to abiotic environmental stresses. In particular, ABA is synthesised in response to drought and ABA-induced stomatal closure is vital for plants to conserve water by reducing transpirational water loss. The closing and opening of the stomatal pore result from the osmotic shrinking and swelling, respectively, of the two surrounding guard cells. ABA acts directly on guard cells and induces stomatal closure via efflux of potassium and anions from guard cells and removal of organic osmolytes (Assmann and Wang, 2001; MacRobbie, 1998; Schroeder *et al.*, 2001).

In various plant species, genetic analysis based primarily on ABA promotion of seed dormancy has yielded a series of mutants that are defective in ABA biosynthesis (Koornneef *et al.*, 1998; Liotenberg *et al.*, 1999). Many of these mutants, including the Arabidopsis *aba1*, *aba2* and *aba3* mutants, display increased transpirational water loss in addition to reduced seed dormancy (Koornneef *et al.*, 1982; Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996). ABA-deficient mutants have also been instrumental in the recent cloning of genes encoding ABA biosynthetic enzymes (Marin *et al.*, 1996; Seo *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 1997), which has led to a better understanding of the regulation of ABA biosynthesis. In particular, available evidence suggests that the 9-*cis*-epoxycarotenoid cleavage reaction catalysed by 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) is an essential regulatory step in drought-induced ABA biosynthesis (Qin and Zeevaart, 1999). However, there is apparently a NCED gene family in plants, and mutations in each of these genes would be useful to elucidate the roles of individual NCED genes in different tissues and under different environmental conditions. Moreover, the upstream signalling cascade that links water stress perception to stimulation of the ABA biosynthetic pathway still awaits elucidation.

Pharmacological and cell biological studies have led to major advances in understanding the transduction pathway by which ABA regulates stomatal movements (Assmann and Wang, 2001; Blatt, 2000; Hetherington, 2001; Schroeder *et al.*, 2001). This signalling pathway involves oscillations in cytosolic free calcium, increases in cytoplasmic pH, protein kinases and phosphatases, and activation of phospholipase D. In recent years, important advances have been made in developing single-cell techniques applicable to Arabidopsis guard cells. Combining the use of mutants with single cell physiological analyses on this model species thus opens up promising avenues for the identification of the remaining elements of the ABA signalling network in guard cells. Thus far, genetic dissection of ABA action in *Arabidopsis* guard cells has been primarily limited to pleiotropic mutants, including *abi1*, *abi2*, *era1*, *gca2* and *abh1*, that were all initially selected in screens based on ABA inhibition of seed germination and seedling growth (Allen *et al.*, 2001; Hugouvieux *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2001; Pei *et al.*, 1998). However, the AAPK protein kinase from *Vicia faba* is activated in guard cells but not in leaf epidermal or mesophyll cells (Li *et al.*, 2000), suggesting that certain elements of the ABA signalling network are specific to guard cells. Hence, in parallel to reverse genetic approaches (Lemichez *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001), there is a need to develop novel forward genetic screens more specifically targeted towards the identification of mutations affecting stomatal regulation.

The ABA-deficient *aba* mutants of Arabidopsis, as well as the ABA-insensitive *abi1* and *abi2* mutants mentioned above display an increased tendency to wilt (Koornneef *et al.*, 1982; Koornneef *et al.*, 1984). However, this visual phenotype is rather variable in intensity and hence not ideally suited for large scale mutant screens. Transpiration causes leaf cooling because evaporation of water is associated with heat loss (latent heat loss). Leaf surface temperature can be measured continuously and non-destructively using infrared thermography, and thus provides a convenient indicator of the transpiration of individual plants (Chaerle and Van Der Straeten, 2000; Hashimoto *et al.*, 1984; Jones, 1999). In particular, infrared thermography was used by Raskin and Ladyman (1988) to isolate the barley mutant *cool* that is unable to close its stomata in response to ABA treatment. This mutant was not studied further but, interestingly, the *cool* mutation did not affect ABA sensitivity of embryo germination. Despite these promising results, to our knowledge, thermal imaging has not been used since then to screen for mutants affected in stomatal regulation.

In this study, we tested the suitability of thermal imaging for stomatal mutant screening in Arabidopsis. Leaf temperature depends on stomatal aperture and on a complex range of additional factors, including leaf shape and position, radiation absorption, air humidity, air temperature, and wind speed (Jones, 1999). Using available ABA-deficient and ABA-insensitive mutants as positive controls, we optimised experimental conditions for thermographic detection of individual plants with altered stomatal responses to drought. These conditions were then used to perform a pilot screen for mutants that displayed a reduced ability to close their stomata in response to drought stress and hence appeared colder than the wild type. Some of the mutants recovered were deficient in ABA accumulation, whereas others were affected in ABA responsiveness in guard cells. In particular, we identified mutations at two novel loci that inhibit the ABA regulation of stomatal aperture but do not alter ABA sensitivity in seeds.

Results

Optimisation of the experimental protocol

We investigated whether thermal imaging is appropriate for high-throughput screening of Arabidopsis mutants

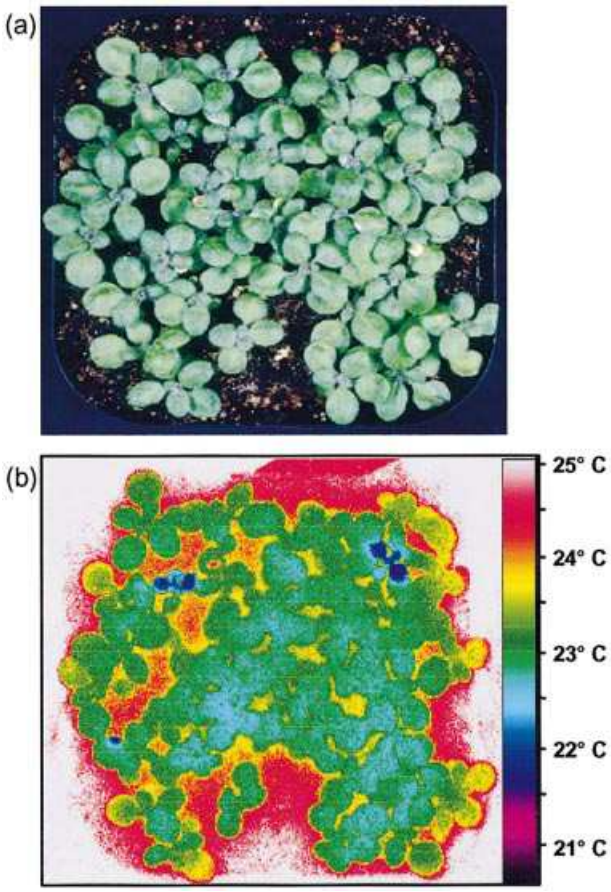


Figure 1. Thermal imaging can easily distinguish *abi1-1* mutant individuals amidst a wild-type population.
(a) Photograph of a pot containing two *abi1-1* mutant plantlets spiked into a population of approximately 40 wild-type plantlets. Plantlets were grown for 10 days under well-watered conditions and then subjected to drought stress for 3 days.
(b) False colour infrared image of the same pot. The two *abi1-1* plantlets are colder than the wild-type plantlets.

with a reduced ability to close their stomata in response to water stress. In order to define appropriate experimental conditions for such a screen the ABA-deficient *aba1–1* (Koornneef *et al.*, 1982) and ABA-insensitive *abi1–1* mutants (Koornneef *et al.*, 1984) were used as positive controls. As *in vitro* culture has been shown to alter stomatal development and ABA sensitivity (Willmer and Fricker, 1996), we used soil grown plants. Plants were first grown in the greenhouse under well-watered conditions. They were then subjected to drought stress by transferring the pots to a growth cabinet with a drier atmosphere and by withholding watering. The plants were analysed by thermal imaging in this same growth cabinet.

To simplify screening procedures, the aim was to be able to identify individual mutants amidst a population of wild-type plants by visualising the differences in leaf temperature between several plants in a given image, rather than by measuring the absolute leaf temperature of each individual plant independently. Hence the parameters required to obtain an accurate image of absolute leaf temperature were not determined. Instead environmental conditions were defined that would maximise the difference in temperature between leaves with closed stomata and leaves with open stomata, while maintaining an homogeneous temperature response for a given transpiration rate in all the plants observed over the image field. The growth cabinet was equipped with fluorescent rather than incandescent lights to minimise the short-wave infrared background that could bias the estimation of leaf temperature when using the 3.4–5 μm infrared band for thermal imaging. After a series of empirical tests, the temperature in the growth cabinet was set to 24°C, the relative humidity to 50%, and the ventilation to low air speed (0.4 m sec^{-1}).

To obtain a homogeneous and progressive drought stress within a few days of withholding watering the suitability of different types of soil were compared. Sand (2–3 mm diameter) was satisfactory in this respect, but plants grew rather poorly on this support during the initial well-watered phase. Commercial compost, which has a high water retention capacity, dried very slowly and furthermore had a tendency to collapse during drying. A mixture composed of 50% sand and 50% compost (v/v) was retained as a good compromise.

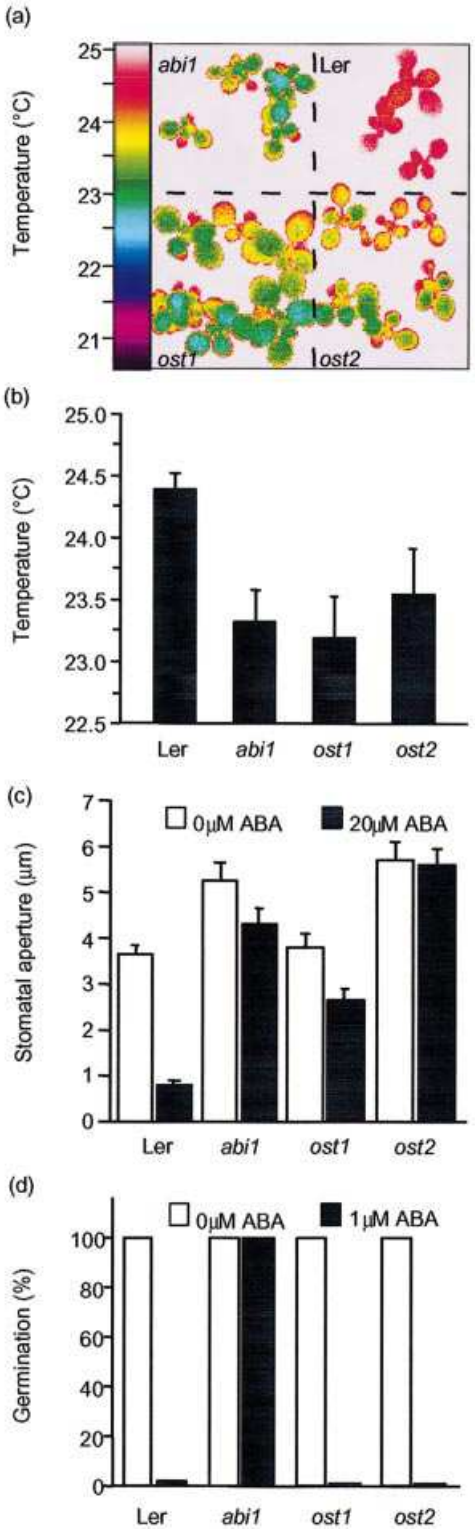
Figure 1 shows that after 3 days of drought stress, the leaf temperature of wild-type plants was high and homogeneous, indicating the uniformity of stomatal closing response. The leaves of *abi1–1* plants were approximately 1°C colder because this ABA-insensitive mutant failed to close its stomata. Since the sensitivity of the camera in this range of temperature is less than 0.1°C, the *abi1–1* mutant plants could be easily and reliably distinguished from the surrounding wild-type individuals on the thermal image. It is noteworthy that, at this stage of the drought stress, the *abi1–1* plants did not yet display any sign of wilting. Similar results were obtained with the ABA-deficient *aba1* mutant (data not shown).

This protocol could be applied to young plantlets with only 2–4 true leaves, thus allowing a sowing density of approximately one seed per 1.5 cm^2, while still permitting individual plantlets to be distinguished on the thermal image. This allowed to minimise the culture surface needed for mutant screens.

Mutant screen

An M_2 population, derived from ethyl methanesulfonate (EMS) mutagenised wild-type Arabidopsis, was screened by thermal imaging for mutants with a 'cold' phenotype under drought stress. Seeds were germinated and grown for 1 week under well-watered conditions. Plantlets were

then subjected to drought stress, and analysed by infrared thermography 3–4 days later. Individuals displaying a lower leaf temperature than the other plants in the same pot were selected as candidate mutants. From an estimated total of 85 000 M_2 seeds screened (derived from seven parental groups of 1450 M_1 plants each), 85 candidates were selected during the primary screen. Out of these, 75 were fertile and 44 showed a heritable 'cold' phenotype in the M_3 generation. For each of these 44 mutant lines, the amount of ABA present in the leaves of drought-stressed plants was quantified. Thirty-six lines displayed ABA levels that were at least 30% lower than in wild-type controls (data not shown), and further analysis confirmed that these lines corresponded to ABA biosynthesis mutants (see below). The remaining eight mutant lines contained 3–8 times more ABA than the wild type upon drought stress (data not shown), and these lines were subsequently shown to correspond to ABA-insensitive mutants.



ABA-insensitive mutants

ABA-insensitive mutants, including *abi1–1* and *abi2–1*, contain more ABA than the wild type (Koornneef *et al.*, 1984). As the *abi1–1* and *abi2–1* mutations lead to ABA-insensitive stomata, the presence of these mutations was examined in the eight mutant lines with enhanced ABA contents. The CAPS assay described by Leung *et al.* (1997) indicated that line II-38 was homozygous for the *abi1-1* mutation, and that lines II-3 and II-33 were heterozygous for this dominant mutation. These results were confirmed by sequencing the *ABI1* gene in these three lines. Since lines II-3, II-33 and II-38 originate from the same parental pool, it is likely that they all derived from a single M_1 plant (Table 1).

Table 1 ABA-insensitive mutants isolated in the screen

Isolation number [a]	Mutation
II-3, II-33, II-38	*abi1-1*
II-52, II-56, II-123	*ost1-1*
VII-149	*ost1-2*
VII-8	*ost2*

[a]In each isolation number, the roman numeral indicates the pool of M1 plants from which the mutant line originates.

Figure 2. Phenotypic comparison of the *abi1-1*, *ost1-1* and *ost2-1* mutants.
(a) False colour infrared image of drought-stressed plantlets. 9-day-old-plantlets were subjected to drought stress for 3 days.
(b) Leaf temperatures of drought-stressed plantlets. The leaf temperatures were calculated by quantification of the image shown in (a). Values presented are mean ± SD of measurements on at least 5000 pixels.
(c) ABA-induced stomatal closure. Epidermal strips were incubated for 3 h in the presence or absence of 20 µM ABA. Data presented are the means of 60 stomatal apertures and bars represent standard error of the mean.
(d) ABA inhibition of seed germination. Seeds were plated on medium supplemented or not with 1 µM ABA, chilled for 4 days at 4°C in darkness, and incubated for 3 days at 21°C with a 16-h-photoperiod. The number of germinated seeds was expressed as the percentage of the total number of seeds plated (100–200).

Table 2 ABA-deficient mutants isolated in the screen

Locus	Isolation number[a]
ABA1	II-83
	III-52, III-53, III-60, III-61, III-64, III-139
	V-115[b]
	VI-32, VI-101, VI-104, VI-137[c], VI-142
	VII-91
ABA2	II-47[de], II-51[de]
	III-20[de]
	IV-64[df], IV-82
	VI-24, VI-78
	VII-10, VII-46, VII-59, VII-89, VII-108
	VIII-104
ABA3	IV-29
	V-18
	VI-48, VI-63
	VII-6
	VIII-33, VIII-41, VIII-43, VIII-49

[a]In each isolation number, the roman number indicates the pool of M1 plants from which the mutant line originates.
[b]*aba1-11*
[c]*aba1-12*
[d]Complemented the *aba2-1* allele
[e]*aba2-11*
[f]*aba2-12*

Each of the five remaining lines was crossed with the wild type. Analysis of the resulting F_1 progenies by thermal imaging showed that the 'cold' phenotype was recessive in lines II-52, II-56, II-123 and VII-149, and was dominant in line VII-8. The lines II-52, II-56, II-123 and VII-149 were crossed with each other, and were found to belong to a single complementation group that was called *OST1* for *OPEN STOMATA* 1. Lines II-52, II-56 and II-123 originating from the same parental pool of M_1 plants were assumed to be siblings, and only II-52 was retained for further analysis. Lines II-52 and VII-149 originate from distinct parental pools, and thus correspond to two independent mutant alleles of *OST1* which were renamed *ost1-1* and *ost1-2*, respectively. The locus identified by the dominant mutation VII-8 was designated as *OST2* (Table 1).

Like *abi1–1*, drought-stressed *ost1* and *ost2* plantlets were approximately 1°C colder than wild-type plantlets (Figure 2a,b). The stomatal behaviour of these mutants was analysed further by bioassays on epidermal peels. Like *abi1-1*, *ost1* and *ost2* were impaired in their ability to close their stomata in response to applied ABA (Figure 2c). However, the stomata of both mutants did close in response to darkness (data not shown), indicating that the *ost1* and *ost2* mutations do not lead to a global defect in stomatal functioning but rather alter the ABA-regulation of stomatal aperture. Interestingly, unlike other guard cell ABA signalling mutants, the *ost1* and *ost2* mutants displayed a wild-type seed dormancy (data not shown) and a wild-type sensitivity of seed germination to applied ABA (Figure 2d).

ABA-deficient mutants

As mentioned above, the 36 other mutant lines showed reduced levels of ABA compared with wild type. Furthermore, these 36 mutants displayed reduced seed dormancy and, when grown under low relative humidity (50%), were smaller and darker green than wild-type plants (data not shown). All these phenotypes are characteristic of the ABA biosynthesis mutants *aba1*, *aba2*, and *aba3* (Koornneef *et al.*, 1982; Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996). Hence we tested whether the ABA-deficient lines isolated here were allelic to these biosynthetic mutants.

The *ABA1* gene encodes zeaxanthin epoxidase (Audran *et al.*, 2001; Duckham *et al.*, 1991; Marin *et al.*, 1996; Rock and Zeevaart, 1991). HPLC analysis of carotenoids in leaf extracts revealed that, like the *aba1* mutants, 14 of the 36 ABA-deficient lines lacked the epoxy-carotenoids violaxanthin and neoxanthin and accumulated high levels of their biosynthetic precursor zeaxanthin (data not shown). Complementation tests with the *aba1-5* mutant confirmed that all 14 of these mutant lines represent *aba1* alleles (Table 2). DNA sequence analysis of the *ABA1* gene in two of these lines revealed that in line V-115 (designated as *aba1-11*) the residue Trp-363 is converted to a TGA, thus generating a premature STOP codon, and that in line VI-137 (designated as *aba1-12*) the residue Ser-374 is converted into Phe.

The *ABA3* gene encodes a molybdenum cofactor sulfurase (Bittner *et al.*, 2001; Xiong *et al.*, 2001) that produces the desulfo form of the cofactor required for abscisic aldehyde oxidase activity (Schwartz *et al.*, 1997). Xanthine dehydrogenase requires the same sulfurylated cofactor, and its activity can be easily assayed in plant extracts (Marin and Marion-Poll, 1997). Nine of the present ABA-deficient lines were found to lack xanthine dehydrogenase activity (data not shown). Nitrate reductase uses the dioxo form of the cofactor and, as these lines were able to grow on a medium containing nitrate as sole nitrogen source, the lack of xanthine dehydrogenase activity was not due to a defect in the molybdenum cofactor synthesis prior to its sulfuration (Marin and Marion-Poll, 1997). Hence, these results indicate that the nine mutant lines are most likely *aba3* alleles, although direct complementation tests were not performed (Table 2).

Each of the remaining 13 ABA-deficient lines was crossed to the *aba2-1* mutant. The resulting F_1 progenies were subjected to drought stress and analysed by thermal imaging. For nine lines, the F_1 plants displayed a 'cold' phenotype like the parents, indicating that they were *aba2* alleles (Table 2). In contrast, the F_1 plants derived from

Table 3 Complementation tests between *aba2-1, II-51* and *IV-64*

Genotype	Number of seeds analysed	Number of seedlings with first leaves	Percentage of seedlings with first leaves
Ler	300	0	0
Col	299	0	0
aba2-1	300	290	97
II-51	298	209	70
IV-64	298	252	85
aba2–1 × *ler* F_2	295	76	26[a]
IV-64 × *II-51* F_2	273	243	89
aba2–1 × *II-51* F_2	300	161	54[b]
aba2–1 × IV-64 F_2	300	166	55[b]

Seeds were grown on medium containing 0.3M sucrose for 21 days, and the number of seedlings with first leaves was scored.
[a]Not significantly different from 3 : 1 segregation ratio (χ^2 analysis, $P > 0.05$)
[b]Not significantly different from 1 : 1 segregation ratio (χ^2 analysis, $P > 0.05$)

crosses between *aba2-1* and lines II-47, II-51, III-20 and IV-64 displayed a wild-type 'warm' phenotype (data not shown), suggesting that these four lines were not allelic to *aba2*. The mutant lines II-47, II-51, III-20 and IV-64 were crossed with each other. The resulting F_1 plants showed a 'cold' phenotype (data not shown), indicating that the four lines belonged to the same complementation group. Using molecular markers, the mutation IV-64 was mapped between the BAC clones F2J6 and F14J6 on chromosome 1 (data not shown). This region contains the BAC clone F19K6 that harbours the *ABA2* gene (Rook *et al.*, 2001). Sequencing the *ABA2* gene revealed that line IV-64 contains a point mutation converting Asp-271 into Asn, and that all three lines II-47, II-51 and III-20 contain another point mutation that converts Gly-27 into Glu. These data suggest that these four lines represent *aba2* alleles that can intragenically complement the *aba2-1* mutation. Like other *aba2* alleles (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Huijser *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000; Rook *et al.*, 2001), lines II-51 and IV-64 displayed sucrose-insensitive seedling development (Table 3). The F_2 progenies of crosses between *aba2-1* and II-51 or IV-64 showed a 1 : 1 segregation of this phenotype (Table 3), which is consistent with intragenic complementation. Intragenic complementation between *aba2-1* and another *aba2* allele (*isi4*) has been reported recently (Rook *et al.*, 2001). Interestingly, the *aba2-1* (S-264 to V), IV-64 (D-271 to N) and *isi4* (A-236 to V) mutations map to the same region of the ABA2 protein. This region is highly conserved in the ABA2-like short-chain dehydrogenase/reductase superfamily and corresponds to one of the b-strand containing domains at the C-terminus. In contrast the II-51 (G-27 to E) mutation concerns the first G in a GxxxGxG motif proposed to be the fixation site for the NAD(H) or NADP(H) coenzyme (Jornvall *et al.*, 1995). The mutations identified in the ABA2 protein thus highlight the importance of these regions in the functional properties of this multimeric enzyme.

Discussion

Leaf temperature depends not only on stomatal conductance to water vapour but also on a range of other environmental and plant variables, including absorbed net radiation, air humidity, air temperature and boundary layer conductance, which also determine the leaf energy balance (Jones, 1999; Nobel, 1999). In this context, there is an ongoing debate as to whether cooling in leaves derives predominantly from convection or from transpiration (Beerling *et al.*, 2001; Hedrich and Steinmeyer, 2001). Moreover, changes in evaporative cooling might be brought about not only by changes in stomatal aperture but also by changes in stomatal density or in water loss through the cuticle. It is thus noteworthy that all the mutations isolated in the present screen are related to ABA biosynthesis or responsiveness in guard cells. This indicates that under these experimental conditions leaf temperature depends mainly on stomatal conductance, and it confirms that ABA plays a prominent role in controlling stomatal aperture in response to drought.

All the ABA-deficient mutants isolated during this screen correspond to alleles of the *ABA1*, *ABA2* and *ABA3* loci, which control ABA biosynthesis in both seeds and vegetative tissues. The same range of ABA-deficient mutants was recovered in a screen for germination in the presence of the gibberellin biosynthesis inhibitor paclobutrazol (Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996). It is surprising that we did not isolate additional ABA biosynthetic mutants affected more specifically in stomatal regulation. In particular, loss-of-function mutations in the Arabidopsis ABA-aldehyde oxidase *AAO3* and 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase *AtNCED3* genes have been shown to increase transpiration rates (Iuchi *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2000). However, these two mutations produce milder symptoms than the *aba* mutations mentioned above (Iuchi *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2000). It is plausible that, during our first screen by thermal imaging, such mutants exhibiting more subtle temperature differences were discarded in favour of individuals with most conspicuous phenotypes. We have verified that under our experimental conditions the *aao3* mutant displays a lower leaf temperature than the wild type (data not shown). It should thus be possible to recover such mutants in more extensive screens by thermal imaging. An attractive possibility is that, in addition to ABA biosynthesis enzymes, this type of screen may identify elements of the putative signalling cascade

between the perception of water stress and the stimulation of ABA biosynthesis.

The ABA-insensitive mutants isolated during this screen correspond to three different loci: *ABI1*, *OST1* and *OST2*. The mutation recovered in *ABI1* is identical to the well-characterised *abi1-1* mutation that reduces ABA sensitivity in both seed and vegetative tissues (Koornneef *et al.*, 1984; Leung *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1994). In contrast, *ost1* and *ost2* mutant seeds displayed a wild-type sensitivity to ABA. Several mutations, including *abi3*, *abi4* and *abi5*, which inhibit ABA action in seed without affecting ABA responsiveness in guard cells have been described (Finkelstein, 1994; Koornneef *et al.*, 1984). Conversely, to our knowledge, *ost1* and *ost2* represent the first Arabidopsis mutations altering ABA responsiveness in stomata and not in seeds. This result thus illustrates the usefulness of thermal imaging for the genetic dissection of ABA signalling in Arabidopsis guard cells. The present screen was most likely not at saturation because *gca2* and *abi2-1* mutations, which markedly inhibit ABA-induced stomatal closure (Koornneef *et al.*, 1984; Pei *et al.*, 2000), were not recovered. Hence, more extensive screening for mutants with a 'cold' phenotype under drought will presumably reveal additional elements of the ABA signalling network.

The *era1* and *abh1* mutants show ABA-supersensitive stomatal closing and reduced transpirational water loss during drought (Hugouvieux *et al.*, 2001; Pei *et al.*, 1998). However, under our experimental conditions, we did not detect any significant difference between the leaf temperatures of *era1* and wild-type plants (data not shown). It thus seems that ABA-supersensitive mutants cannot be readily identified by thermal imaging amidst a population of wild-type plants. ABA-supersensitive mutations may be more easily isolated as suppressors of the 'cold' phenotype of ABA-deficient or ABA-insensitive mutants. An intragenic revertant of the ABA-insensitive *abi2-1* mutant displayed a clear warmer leaf phenotype than the *abi2-1* parental line (Merlot *et al.*, 2001), indicating that such a suppressor screen is technically feasible. In addition to ABA-supersensitive mutations, this type of screen may also identify mutations leading to enhanced ABA accumulation under drought, as a result of increased biosynthesis or reduced catabolism.

Guard cells integrate a variety of environmental and endogenous signals to tightly regulate the stomatal pore aperture. In most cases the corresponding signalling cascades are still poorly understood (Assmann and Wang, 2001; MacRobbie, 1998; Schroeder *et al.*, 2001). The approach described here for ABA should be effective for the genetic dissection of some of these pathways. For instance, infrared thermal imaging should be able to identify Arabidopsis mutants with a reduced ability to open their stomata in response to light or to atmospheric CO_2 depletion. Conversely, mutants can be screened for their reduced ability to close their stomata in response to darkness or to CO_2 enrichment. An automated infrared imaging system would clearly facilitate screenings in darkness or under confined atmospheric conditions, and would also permit to design screens based on the kinetics of the stomatal response to a given signal (Chaerle *et al.*, 1999).

Experimental procedures

Plant material

All the Arabidopsis lines used in this study are in the ecotype Landsberg *erecta* (Ler). The *abi1-1* (Koornneef *et al.*, 1984), *aba1-1* (Koornneef *et al.*, 1982), *aba1-5* (Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996), and *aba2-1* (Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996) mutants were provided by M. Koornneef. EMS-mutagenised Ler M_2 seeds were purchased from Lehle Seeds (Round Rock, TX, USA).

Mutant screen

Approximately 50 M_2 seeds were uniformly sown on 9 cm $\times$ 9 cm pots containing a mixture of 50% sand (2–3 mm particles) and 50% horticultural compost (v/v). The pots were incubated in the dark at 4°C for 3 days to break seed dormancy. Plants were then grown for 1 week under well-watered conditions in the greenhouse (21°C, 70% RH, 16 h light photoperiod). The pots were then incubated without watering in a growth cabinet (24°C, 50% RH, 16 h light photoperiod). The plants were examined 3 and 4 days later by thermal imaging. Individuals with a lower leaf temperature than the wild type were selected in real time using the live infrared image visualised on a colour monitor. These candidates were grown to maturity under well-watered conditions, and their phenotype was retested in the next (M_3) generation.

Thermal imaging

Thermal images were obtained using a Thermacam PM250 infrared camera (Inframetrics, FLIR Systems, North Billerica, MA, USA) equipped with a 16° lens. The camera used a cooled 256 $\times$ 256 PtSi array detector responsive to the short wave infrared (3.4–5μm band). Specified temperature resolution was below 0.1°C at room temperature. Straight temperature images generated by the camera software on the basis of manufacturer calibration were used. Leaf emissivity was set to 1 since an accurate absolute measurement of leaf temperature was not required. The camera was mounted vertically at approximately 40 cm above the leaf canopy for observations, and was connected to a colour monitor to facilitate visualisation of individual plants. Images were saved as 8-bit TIFF files on the PMCIA memory card of the camera, and were subsequently analysed for temperature determination on a Macintosh using version 1.56 of the public domain image analysis program NIH Image (available on the Internet at http://rsb.info.nih.gov/nih-image/).

ABA determinations

The aerial parts from 20 to 30 drought-stressed plantlets were frozen in liquid nitrogen, lyophilised and ground into powder. ABA was then extracted, HPLC purified and quantified by ELISA

as previously described (Kraepiel *et al.*, 1994), using a mouse monoclonal anti-ABA antibody (LPDP 229, Jussieu, France) and a peroxidase-conjugated goat antibody to mouse immunoglobulins (Sigma, Saint Quentin Fallaries, France). For each sample, the ABA content was determined five times.

Stomatal aperture bioassays

Measurements of stomatal aperture were carried out on parade-rmal sections of leaf abaxial epidermis as described previously (Leymarie *et al.*, 1998; Merlot *et al.*, 2001).

Germination and seedling development assays

Seed dormancy and sensitivity of seed germination to inhibition by exogenous ABA were assayed as described previously (Merlot *et al.*, 2001). Sucrose sensitivity of seedling development was assayed by plating surface-sterilised seeds onto solid Gamborg B5 medium (Duchefa Biochemie BV, Haarlem, The Netherlands) supplemented with 0.3M sucrose. The plates were then incubated at 20°C with a 16 : 8 h light/dark photoperiod for 3 weeks, and seedlings that had formed true first leaves were scored as sucrose resistant.

Carotenoid analysis

Carotenoids were extracted from leaf discs with acetone:methanol:petroleum ether (50 : 30 : 20, v:v:v) and analysed by reverse phase HPLC on a C18 column (Audran *et al.*, 2001).

Xanthine dehydrogenase

Xanthine dehydrogenase activity was detected after native gel electrophoresis as previously described (Marin and Marion-Poll, 1997), except that crude leaf extracts were used directly.

Acknowledgements

We thank Jeffrey Leung, François Parcy and Annie Marion-Poll for discussions and comments on the manuscript. We are grateful to Magda Bonnet for her assistance in ABA analysis. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, a joint grant from CNRS and Université Paris-Sud for the purchase of the infrared camera, an EMBO long-term Fellowship to A.-C. M., a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche to S.M., and an IFCPAR grant to A.V.

References

Allen, G.J., Chu, S.P., Harrington, C.L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y.Y., Grill, E. and Schroeder, J.I. (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature*, **411**, 1053–1057.

Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J. and Leon, P. (2000) Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev.* **14**, 2085–2096.

Assmann, S.M. and Wang, X.-Q. (2001) From milliseconds to millions of years: guard cells and environmental responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 421–428.

Audran, C., Liotenberg, S., Gonneau, M., North, H., Frey, A., Tap-Waksman, K., Vartanian, N. and Marion-Poll, A. (2001) Localisation and expression of zeaxanthin epoxidase mRNA in Arabidopsis in response to drought stress and during seed development. *Aust. J. Plant Physiol.* **28**, 1161–1173.

Beerling, D., Osborne, C.P. and Chaloner, W.G. (2001) Do drought-hardened plants suffer from fever? *Trends Plant Sci.* **6**, 507–508.

Bittner, F., Oreb, M. and Mendel, R.R. (2001) ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276**, 40381–40384.

Blatt, M.R. (2000) Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 221–241.

Chaerle, L., Van Caeneghem, W., Messens, E., Lambers, H., Van Montagu, M. and Van Der Straeten, D. (1999) Presymptomatic visualization of plant–virus interactions by thermography. *Nat. Biotechnol.* **17**, 813–816.

Chaerle, L. and Van Der Straeten, D. (2000) Imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends Plant Sci.* **5**, 495–501.

Duckham, S.C., Linforth, R.S.T. and 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 Environ.* **14**, 601–606.

Finkelstein, R.R. (1994) Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J.* **5**, 765–771.

Hashimoto, Y., Ino, T., Kramer, P.J., Naylor, A.W. and Strain, B.R. (1984) Dynamic analysis of water stress of sunflower leaves by means of a thermal image processing system. *Plant Physiol.* **76**, 266–269.

Hedrich, R. and Steinmeyer, R. (2001) Do drought-hardened plants suffer from fever? *Trends Plant Sci.* **6**, 506.

Hetherington, A.M. (2001) Guard cell signaling. *Cell*, **107**, 711–714.

Hugouvieux, V., Kwak, J.M. and Schroeder, J.I. (2001) An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Cell*, **106**, 477–487.

Huijser, C., Kortstee, A., Pego, J., Weisbeek, P., Wisman, E. and Smeekens, S. (2000) The Arabidopsis SUCROSE UNCOUPLED-6 gene is identical to ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4: involvement of abscisic acid in sugar responses. *Plant J.* **23**, 577–585.

Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J.* **27**, 325–333.

Jones, H.G. (1999) Use of thermography for quantitative studies of spatial and temporal variation of stomatal conductance over leaf surfaces. *Plant Cell Environ.* **22**, 1043–1055.

Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J. and Ghosh, D. (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, **34**, 6003–6013.

Koornneef, M., Jorna, M.L., Brinkhorst-van der Swan, D.L.C. and Karssen, C.M. (1982) The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor. Appl. Genet.* **61**, 385–393.

Koornneef, M., Léon-Kloosterziel, K.M., Schwartz, S.H. and Zeevaart, J.A.D. (1998) The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* **36**, 83–89.

Koornneef, M., Reuling, G. and Karssen, C.M. (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **61**, 377–383.

Kraepiel, Y., Rousselin, P., Sotta, B., Kerhoas, L., Einhorn, J., Caboche, M. and Miginiac, E. (1994) Analysis of phytochrome- and ABA-deficient mutants suggests that ABA degradation is controlled by light in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant J.* **6**, 665–672.

Laby, R.J., Kincaid, M.S., Kim, D. and Gibson, S.I. (2000) The Arabidopsis sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J.* **23**, 587–596.

Lemichez, E., Wu, Y., Sanchez, J.P., Mettouchi, A., Mathur, J. and Chua, N.H. (2001) Inactivation of AtRac1 by abscisic acid is essential for stomatal closure. *Genes Dev.* **15**, 1808–1816.

Léon-Kloosterziel, K.M., Alvarez Gil, M., Ruijs, G.J., Jacobsen, S.E., Olszewski, N.E., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A.D. and Koornneef, M. (1996) Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant J.* **10**, 655–661.

Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P.-C., Guerrier, D., Chefdor, F. and Giraudat, J. (1994) *Arabidopsis* ABA-response gene *ABI1*: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science*, **264**, 1448–1452.

Leung, J. and Giraudat, J. (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 199–222.

Leung, J., Merlot, S. and Giraudat, J. (1997) The *Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 2* (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell*, **9**, 759–771.

Leymarie, J., Vavasseur, A. and Lascève, G. (1998) CO_2 sensing in stomata of *abi1–1* and *abi2–1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* **36**, 539–543.

Li, J., Wang, X.Q., Watson, M.B. and Assmann, S.M. (2000) Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science*, **287**, 300–303.

Liotenberg, S., North, H. and Marion-Poll, A. (1999) Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **37**, 341–350.

MacRobbie, E.A. (1998) Signal transduction and ion channels in guard cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **353**, 1475–1488.

Marin, E. and Marion-Poll, A. (1997) Tomato *flacca* mutant is impaired in ABA aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase activities. *Plant Physiol. Biochem.* **35**, 369–372.

Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B., Hugueney, P., Frey, A. and Marion-Poll, A. (1996) Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to *ABA* locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* **15**, 2331–2342.

McCourt, P. (1999) Genetic analysis of hormone signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 219–243.

Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A. and Giraudat, J. (2001) The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J.* **25**, 295–303.

Meyer, K., Leube, M.P. and Grill, E. (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **264**, 1452–1455.

Murata, Y., Pei, Z.-M., Mori, I.C. and Schroeder, J.I. (2001) Abscisic acid activation of plasma membrane Ca2+ channels in guard cells requires NAD (P) H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in the *abi1–1* and *abi2–1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell*, **13**, 2513–2523.

Nobel, P.S. (1999) *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*, 2nd edn. San Diego, USA: Academic Press.

Pei, Z.-M., Ghassemian, M., Kwak, C.M., McCourt, P. and Schroeder, J.I. (1998) Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channels and plant water loss. *Science*, **282**, 287–290.

Pei, Z.-M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G.J., Grill, E. and Schroeder, J. (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, **406**, 731–734.

Qin, X. and Zeevaart, J.A. (1999) The 9-*cis*-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 15354–15361.

Raskin, I. and Ladyman, J.A.R. (1988) Isolation and characterization of a barley mutant with abscisic acid-insensitive stomata. *Planta*, **173**, 73–78.

Rock, C.D. and Zeevaart, J.A. (1991) The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **88**, 7496–7499.

Rook, F., Corke, F., Card, R., Munz, G., Smith, C. and Bevan, M.W. (2001) Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *Plant J.* **26**, 421–433.

Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M. and Waner, D. (2001) Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 627–658.

Schwartz, S.H., Léon-Kloosterziel, K.L., Koornneef, M. and Zeevaart, J.A.D. (1997) Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **114**, 161–166.

Seo, M., Peeters, A.J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J.A., Koornneef, M., Kamiya, Y. and Koshiba, T. (2000) The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (*AAO3*) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 12908–12913.

Tan, B.C., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A. and McCarty, D.R. (1997) Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 12235–12240.

Wang, X.Q., Ullah, H., Jones, A.M. and Assmann, S.M. (2001) G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells. *Science*, **292**, 2070–2072.

Willmer, C. and Fricker, M. (1996) *Stomata*, 2nd edn. London, UK: Chapman & Hall.

Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H. and Zhu, J.K. (2001) The Arabidopsis *los5*/*aba3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell*, **13**, 2063–2083.

Résumé
L'acide abscissique (ABA) est une hormone végétale impliquée dans la réponse des plantes aux stress et également dans la maturation et la germination des graines. L'ABA est issu du clivage des caroténoïdes (C_{40}) et les étapes précoces sont communes à la formation de pigments, tels que le carotène et le lycopène par exemple. L'étude d'un mutant vivipare de maïs, *vp14*, déficient en ABA, a permis de cloner l'un des gènes impliqués dans l'étape de clivage des caroténoïdes en xanthoxine (C_{15}), catalysé par les 9-*cis*-époxycaroténoïdes dioxygénases (NCED) et considéré comme l'étape limitante dans la biosynthèse de l'ABA (Schwartz et al., 1997). L'étude ultérieure de ces enzymes dans plusieurs espèces a montré qu'elles étaient codées par des familles multigéniques et cette famille comporte 9 membres appelés *AtNCED* chez *Arabidopsis*, mais seulement 5 d'entre-eux seraient impliqués dans la biosynthèse de l'ABA (Iuchi et al., 2001) (Tan et al., 2003).
Ce travail de thèse a porté sur la caractérisation des gènes *AtNCED* impliqués dans la biosynthèse de l'ABA dans la graine d'*Arabidopsis*. Dans ce but, nous avons tout d'abord déterminé les expressions des 7 *AtNCED* les plus homologues à *VP14* au cours du développement des siliques et dans les parties végétatives. Cette étude a montré que les 5 gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse de l'ABA sont exprimés dans les graines. Parmi eux, *AtNCED6* et *AtNCED9* présentent une accumulation de leurs transcrits exclusivement dans les siliques. L'analyse détaillée de leurs patrons d'expression a permis de localiser les transcrits d'*AtNCED6* dans l'albumen des graines à tous les stades de développement, avec un pic d'accumulation à 14 JAF. Le gène *AtNCED9* s'exprime légèrement plus tôt qu'*AtNCED6*, et ses transcrits ont été détectés dans l'embryon, ainsi que dans l'albumen des graines. Les mutants *Atnced9* présentent des phénotypes similaires aux mutants *Atnced6*, plus faibles que des mutants ABA-déficients affectés dans des gènes uniques. Ils présentent une déficience en ABA uniquement dans les graines, qui se traduit par une réduction de la teneur en ABA et une résistance au paclobutrazol, mais la dormance des graines n'est pas affectée. La dormance et le besoin en gibbérellines pour germer seraient donc deux événements physiologiques régulés différemment par l'ABA. Par contre, les graines des doubles mutants *Atnced6, Atnced9* présentent une dormance réduite. Ceci implique la participation de l'ABA synthétisé dans l'albumen dans le phénomène de mise en place de la dormance au cours du développement de la graine. De plus, la composition en acides gras des mutants *Atnced6* est différente du sauvage, donc l'ABA synthétisé dans l'albumen intervient également dans la régulation de l'accumulation des réserves de la graine.
L'analyse de l'expression de deux autres gènes, *AtNCED2* et *AtNCED3*, montre que leurs transcrits s'accumulent en même temps au cours du développement de la graine, mais leurs patrons spatial d'expression diffèrent, suggérant que chaque enzyme pourrait permettre la synthèse de pools d'ABA impliqués dans des processus physiologiques distincts.

Abstract
The plant hormone abscisic acid (ABA) is involved in the response and adaptation to stress, as well as seed maturation and germination. ABA is produced from cleaved carotenoids (C_{40}) and the early steps in its biosynthesis are common with those for the formation of pigments such as carotene and lycopene. Identification of the ABA deficient, viviparous mutant (*vp14*), enabled the cloning of a gene encoding a 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) (Schwartz et al., 1997) responsible for the cleavage of carotenoids to form xanthoxin (C_{15}), considered to be the rate limiting reaction of the biosynthesis pathway. The subsequent analysis of these enzymes in other species found that they were encoded by multigene families, and that in *Arabidopsis* the family was composed of 9 members, termed *AtNCED*, only 5 of which appeared to be involved in ABA biosynthesis (Iuchi et al., 2001) (Tan et al., 2003).
The work presented in this thesis concerns the characterisation of the *AtNCED* genes implicated in ABA biosynthesis in *Arabidopsis* seeds. An initial study of the 7 genes most homologous to *VP14* was carried out with regard to their expression during seed development and in vegetative tissues. This found that 5 of the genes were expressed in seeds. Of these, *AtNCED6* and *AtNCED9* showed transcript accumulation that was specific to siliques. The detailed analysis of their expression patterns enabled *AtNCED6* transcripts to be localised to the endosperm throughout seed development, with a peak in abundance at 14 DAF. The *AtNCED9* gene was expressed slightly earlier that *AtNCED6*, and transcripts were detectable in both seed embryos and endosperm. The phenotypes observed for *Atnced9* and *Atnced6* mutants were similar and weaker than those observed for ABA deficient mutants affected in unique genes. ABA biosynthesis was apparently only affected in seeds, as observed by reduced ABA levels and paclobutrazol resistance; seed dormancy was, however, unaltered. Dormancy and the requirement of gibberellins for germination would appear, therefore, to be differentially regulated by ABA. In contrast, seeds of the *Atnced6, Atnced9* double mutant were less dormant. This implies that ABA synthesized in the endosperm participates in the process of dormancy imposition during seed development. Furthermore, seed fatty acid composition in the *Atnced6* mutant was different from that of wild-type, which indicates that ABA synthesized in the endosperm is also involved in the regulation of seed reserves.
Analysis of the expression of two other genes, *AtNCED2* and *AtNCED3*, found that although their temporal expression patterns were similar during seed development, the spatial expression patterns were different, suggesting that each enzyme could participate in the synthesis of ABA pools with distinct physiological roles.