



**HAL**  
open science

# Contribution à la caractérisation des stades tardifs de la maturation des graines de *Medicago truncatula* : une étude physiologique et biochimique pour comprendre la longévité

Emilie Chatelain

## ► To cite this version:

Emilie Chatelain. Contribution à la caractérisation des stades tardifs de la maturation des graines de *Medicago truncatula* : une étude physiologique et biochimique pour comprendre la longévité. Biologie végétale. Université d'Angers, 2011. Français. NNT : . tel-01005725

**HAL Id: tel-01005725**

**<https://theses.hal.science/tel-01005725>**

Submitted on 13 Jun 2014

**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.



---

# Contribution à la caractérisation des phases tardives de la maturation des graines de *Medicago truncatula* : une étude physiologique et biochimique pour comprendre la longévité

---

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire végétale  
ECOLE DOCTORALE VENAM  
Présentée et soutenue publiquement,  
le 28 avril 2011, à Angers

par  
CHATELAIN Emilie

Devant le jury ci-dessous :

Christophe Bailly	Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris	Rapporteur
Dominique Job	Directeur de recherche, CNRS Lyon	Rapporteur
Karine Gallardo	Chargé de recherche, INRA Dijon	Examineur
David Macherel	Professeur, Université d'Angers	Examineur
Richard Thompson	Directeur de recherche, INRA Dijon	Examineur

Directeurs de thèse :

Françoise Montrichard, Maître de conférences, Université d'Angers, du 01/12/2007 au 17/01/2010

Julia Buitink, Directeur de recherche, INRA, à partir du 18/01/2010

Thèse préparée au sein du laboratoire UMR Physiologie Moléculaire des Semences 1191  
(Université d'Angers, Agrocampus Angers, INRA Angers-Nantes)  
16, bd Lavoisier, 49045 ANGERS CEDEX 01





---

# Contribution à la caractérisation des phases tardives de la maturation des graines de *Medicago truncatula* : une étude physiologique et biochimique pour comprendre la longévité

---

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire végétale  
ECOLE DOCTORALE VENAM  
Présentée et soutenue publiquement,  
le 28 avril 2011, à Angers

par  
CHATELAIN Emilie

Devant le jury ci-dessous :

Christophe Bailly	Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris	Rapporteur
Dominique Job	Directeur de recherche, CNRS Lyon	Rapporteur
Karine Gallardo	Chargé de recherche, INRA Dijon	Examineur
David Macherel	Professeur, Université d'Angers	Examineur
Richard Thompson	Directeur de recherche, INRA Dijon	Examineur

Directeurs de thèse :

Françoise Montrichard, Maître de conférences, Université d'Angers, du 01/12/2007 au 17/01/2010

Julia Buitink, Directeur de recherche, INRA, à partir du 18/01/2010

Thèse préparée au sein du laboratoire UMR Physiologie Moléculaire des Semences 1191  
(Université d'Angers, Agrocampus Angers, INRA Angers-Nantes)  
16, bd Lavoisier, 49045 ANGERS CEDEX 01



## Remerciements

J'adresse mes plus vifs remerciements à Madame Karine Gallardo ainsi qu'à Messieurs Christophe Bailly, Dominique Job, David Macherel et Richard Thompson pour le privilège qu'ils me font en acceptant de juger ces trois années de travail. Je remercie Olivier Leprince de m'avoir accueillie au laboratoire et le Conseil Général d'avoir permis par leur soutien financier la réalisation de cette thèse.

Je remercie également Julia Buitink d'avoir repris la direction de ma thèse, de m'avoir accueillie au sein de son équipe et de m'avoir rappelé pourquoi j'ai voulu faire une thèse. Son enthousiasme m'a permis de poursuivre ce projet et nos discussions scientifiques m'ont montré que j'ai une place dans la recherche. Je remercie Françoise Montrichard pour m'avoir autant appris sur moi-même et sur mes capacités, ces deux années sous sa direction m'ont appris que nous devons toujours surmonter des épreuves et quels que soient les résultats, on en tire toujours des leçons essentielles pour continuer à avancer.

Je tiens à remercier Dominique et Claudette Job pour m'avoir autant appris sur la séparation 2D des protéines, pour leurs nombreux conseils scientifiques et techniques.

Je remercie Christophe Bailly pour les deux semaines passées dans son laboratoire et pour m'avoir tant appris sur les systèmes antioxydants.

Je remercie Didier Marion de ses conseils et pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour mes mesures d'acides gras.

Je remercie aussi toutes les personnes du laboratoire, Sophie le Gall, Aurélia, Béatrice, Benoit, David L. et David M., Jérôme, Lydie, Marie-Hélène, Nicole et Pascale. Merci à Virginie, attention, Paris n'a qu'à bien se tenir ; William, ne soit pas si bougon ; Céline, Dimitri et Sophie qui sont déjà partis. Merci à ceux qui sont là, Michaela (avec un seul « l »), Marie-Pierre, Adrien, Marie-Paule, Johann, attention à la prononciation ; Sophie, aux deux nouveaux Julien et Emmanuel. Merci Virginie pour m'avoir rappelé que même si on est en thèse, on a le droit de se divertir. Un merci très spécial à Michaela de m'avoir prouvé que lire un livre en anglais n'est pas insurmontable, car maintenant je dévore les livres en anglais. Je remercie Nicole et Benoit qui ont supporté mes prises de tête avec mon ordinateur toute l'année. Une fois que je serai partie, tu fermeras le labo tout seul Abdel.

Une pensée pour Michelle partie en retraite.

Je remercie également ma famille, mon père, ma sœur et ma nièce pour leur soutien au cours de mes années d'études. Je remercie ma mère de m'avoir toujours poussée à aller plus loin et d'avoir toujours cru en moi.

Pour finir voici deux citations :

"Science sans conscience n'est que ruine de l'âme." François Rabelais

« Pour triompher, le mal n'a besoin que de l'inaction des gens de bien. » Edmund Burke



<b>Liste des figures</b>	9
<b>Liste des tableaux</b>	12
<b>Abréviation</b>	13
<b>Contexte et objectifs de la thèse</b>	15
<b>Chapitre 1. Introduction bibliographique</b>	17
<b>1.1. Développement de la graine</b>	19
1.1.1. <i>Formation et remplissage de la graine</i>	19
1.1.2. <i>L'acquisition de la tolérance à la dessiccation</i>	21
1.1.3. <i>L'acquisition de la longévité</i>	22
1.1.4. <i>Dormance</i>	24
1.1.5. <i>Régulation de la maturation</i>	25
<b>1.2. Molécules et mécanismes impliqués dans la survie à l'état sec</b>	28
1.2.1. <i>Les sucres non réducteurs</i>	28
1.2.2. <i>Les protéines 'Late embryogenesis abundant' (LEA)</i>	31
1.2.3. <i>Protéines de choc thermique (HSP)</i>	35
1.2.4. <i>Protection contre le stress oxydatif</i>	36
1.2.5. <i>Régulation du métabolisme</i>	38
<b>Chapitre 2. Caractérisation de la maturation des graines de <i>Medicago truncatula</i></b>	41
<b>2.1. Caractérisation de la maturation des graines</b>	43
2.1.1. <i>Remplissage et dessiccation de la graine</i>	44
2.1.2. <i>Acquisition de la tolérance à la dessiccation et la longévité</i>	46
<b>2.2. Evolution de la teneur en sucres solubles au cours de la maturation</b>	50
<b>2.3. Evolution de quelques systèmes antioxydants et de l'oxydation des protéines</b>	54
<b>Discussion</b>	60
<b>Chapitre 3. Characterization of the LEA proteome in developing <i>M. truncatula</i> seeds identifies a restricted number of LEA proteins to desiccation tolerance and longevity and links the majority to final maturation drying</b>	65
<b>Abstract</b>	67
<b>Introduction</b>	67
<b>Results</b>	68
<i>Characterization of the heat-stable proteome</i>	68
<i>Acquisition of desiccation tolerance and longevity during maturation of <i>M. truncatula</i> seeds</i>	71
<i>Tissue specificity of LEA proteins in <i>M. truncatula</i></i>	73
<i>Analysis of LEA protein abundance during maturation of <i>M. truncatula</i> seeds</i>	74
<i>A small number of LEA polypeptides increase in relation to the acquisition of desiccation tolerance</i>	77

<i>Four LEA polypeptides and a small heat shock protein correlate with the acquisition of longevity</i>	78
<b>Discussion</b>	79
<b>Material and methods</b>	82
<b>Chapitre 4. Analyse du rôle du gène ABI5 dans la maturation des graines de <i>M. truncatula</i></b>	89
4.1. <b>Caractérisation du gène MtABI5</b>	91
4.2. <b>Phénotypages physiologique et biochimique des mutants <i>abi5</i></b>	94
4.2.1. <i>Développement des graines</i>	94
4.2.2. <i>Germination et dormance</i>	95
4.2.3. <i>Longévité</i>	97
4.2.4. <i>Evolution de la teneur en sucres solubles pendant le développement</i>	98
4.3. <b>Identification des protéines LEA différentiellement régulées dans les mutants <i>abi5</i></b>	101
<b>Discussion</b>	105
<b>Discussion et perspectives</b>	109
<b>Matériel et méthodes</b>	115
<b>Références</b>	129
<b>Annexes</b>	145

## Liste des figures :

- Figure 1.1. Principales phases du développement des graines orthodoxes. Evolution de la teneur en eau (wc) des graines orthodoxes, des masses fraîche (fw) et sèche (dw) durant le développement (D'après Bewley and black, 1994). 19
- Figure 1.2. Evolution de la masse sèche et de la composition des embryons de *M. truncatula* au cours de leur développement (exprimé en jours après pollinisation) (D'après Gallardo *et al.*, 2006). 20
- Figure 1.3. Schéma de la voie de synthèse des oligosaccharides de la famille du raffinose (adapté de Obendorf, 1997 ; Obendorf *et al.*, 2009). 20
- Figure 1.4. Chronologie relative de l'acquisition de la capacité à germer des graines fraîches (ligne en pointillée) ou de la tolérance à la dessiccation (ligne continue) positionnée par rapport à la maturité de masse (représentée par la ligne verticale) pour une gamme d'espèces cultivées (1-6, 8) et sauvage (7, 9), tiré de Probert *et al.* (2007). 21
- Figure 1.5. Diagramme illustrant les trois types de profil d'acquisition de la longévité au cours de la post-abscission des fruits et de la dispersion des graines. (D'après Probert *et al.*, 2007). 23
- Figure 1.6. Modèle de régulation de la dormance et de la germination par l'acide abscissique (ABA) et l'acide gibbérellique (GA) en réponse à l'environnement (D'après Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006). 25
- Figure 1.7. Schémas illustrant les voies de signalisation de l'ABA à 3 stades de développement chez *Arabidopsis*. ABF, ABA Binding Facteur, EEL, AtEm1, RAB18, RD29B, COR78 sont des protéines LEA. (D'après Finkelstein *et al.*, 2005). 26
- Figure 1.8. Augmentation de la viscosité dans les axes embryonnaires de pois lors d'un séchage à 20°C. 30
- Figure 1.9. Schéma décrivant les principaux systèmes antioxydants faisant intervenir une catalyse enzymatique chez les plantes (D'après Bailly, 2004). 37
- Figure 1.10. Schéma décrivant l'arrêt de la propagation de la peroxydation des lipides par les tocophérols réduits et leur régénération en présence d'ascorbate et de glutathion (D'après Munné-bosch *et al.*, 2005). 38
- Figure 2.1. Gousses et graines de *Medicago truncatula* récoltées au cours de la maturation à partir de 24 JAP (jours après pollinisation). 44
- Figure 2.2. Evolution de la masse fraîche (MF) (▼) et de la masse sèche (MS) (□) (A) pendant la maturation de graines de *M. truncatula*. Acquisition de la tolérance à la dessiccation (○) et évolution de la teneur en eau (exprimée en g H<sub>2</sub>O/g MS) (●) (B). 45
- Figure 2.3. Evolution des masses fraîche (A), sèche (B) et de la teneur en eau (C) pour la culture 1 (●, bleu, données de la figure 2.2), culture 2 (□, rouge) et culture 3 (▼, vert). 46
- Figure 2.4. Evolution de la viabilité des graines immatures et matures au cours du stockage à 75% HR et 35°C. 47
- Figure 2.5. Evolution du P50 (A) et des paramètres Ki (B) et Sigma (C) déterminés à partir du modèle de Ellis et Roberts (1980) (voir figure 2.4B) au cours de la maturation des graines issues de 3 cultures indépendantes. 49
- Figure 2.6. Relation entre P50 et les valeurs de Ki (A) et sigma (B) déterminées sur les graines immatures et matures issues des 3 cultures étudiées. 50

Figure 2.7. Évolution de la teneur en glucose (A), fructose (B), saccharose (C), raffinose (D), stachyose (E) et verbascose (F) dans les graines avant (●) et après séchage prématuré (□) au cours du développement.	51
Figure 2.8. Comparaison de l'évolution de la teneur en saccharose (A) et stachyose (B) dans les graines après séchage prématuré au cours du développement en fonction de la culture.	52
Figure 2.9. Relation entre les valeurs de P50 et de Ki et la teneur en saccharose (A,B), en stachyose (B,C) et le ratio stachyose/saccharose (E,F).	53
Figure 2.10. Evolution des activités enzymatiques de systèmes antioxydants dans les graines de <i>M. truncatula</i> au cours du développement.	55
Figure 2.11. Profils électrophorétiques bidimensionnels d'extraits de protéines totales (A-C) et solubles (B-D) issues de graines matures de <i>M. truncatula</i> .	57
Figure 2.12. Profils de détection des protéines solubles carbonylées (A-B) et protéines totales colorées au bleu de Coomassie (C-D) au cours de la maturation des graines fraîches (A-C) et des graines après séchage prématuré (B-D) obtenues lors de la culture 1	58
Figure 2.13. Profils électrophorétiques bidimensionnels d'extraits de protéines solubles issues de graines récoltées à 28 JAP (A) et graines matures (B) de <i>M. truncatula</i> .	59
Figure 2.14. Identification putatif des protéines carbonylées dans les graines matures de <i>M. truncatula</i> par comparaison avec une carte protéomique de Alkhalfioui <i>et al.</i> (2007).	60
Figure 3.1. Gel de référence du protéome stable à la chaleur des graines matures de <i>M. truncatula</i> .	69
Figure 3.2. Caractérisation de la maturation tardive des graines de <i>M. truncatula</i> .	71
Figure 3.3. Electrophorèse bidimensionnelle du protéome stable à la chaleur des cotylédons (A) et des axes embryonnaires (A) des graines matures de <i>M. truncatula</i> en utilisant des bandelette de focalisation sur lesquelles sont immobilisées un gradient non linéaire de pH de 3 à 10.	73
Figure 3.4. Évolution du protéome stable à la chaleur durant la maturation des graines de <i>M. truncatula</i> .	75
Figure 3.5. Abondance des spots des polypeptides LEA durant la maturation.	76
Figure 3.6. Évolution des polypeptides LEA accumulés durant l'acquisition de la tolérance à la dessiccation des graines immatures de <i>M. truncatula</i> , identifiés comme EM6 (A, B), PM25 (C, D), PM18 (E, F) et deux polypeptides de CAPLEA (G, H).	78
Figure 3.7. Corrélation entre l'abondance des spots des protéines stables à la chaleur identifiées et la longévité (P50).	79
Figure 4.1. Arbre phylogénétique des protéines AtABI5 (en caractère gras), MtABI5 et ABI5-like identifiées dans le génome de <i>M. truncatula</i> .	91
Figure 4.2. Profil d'expression d' <i>ABI5</i> ( <a href="#">Mtr.21588.1.S1_at</a> ) dans différents tissus et organes, différentes conditions de croissance et/ou au cours de leur développement chez <i>M. truncatula</i> .	92
Figure 4.3. Expression du gène <i>MtABI5</i> au cours de la maturation (A) et au cours de l'imbibition à l'obscurité (B) de graines matures dormantes (●) et non-dormantes (○) chez le génotype R108.	93

Figure 4.4. Structure du gène <i>MtABI5</i> de 1803 paires de bases et du transcrit de 1299 bases. En bleu est schématisé les 4 exons et en violet les 3 introns. En vert est représenté le site bZIP.	93
Figure 4.5. Structure du gène montrant la position de l'insertion <i>Tnt1</i> chez les deux allèles <i>abi5-1</i> et <i>abi5-2</i> .	94
Figure 4.6. Evolution de la teneur en eau (▲, △) et de la masse sèche (■, □) au cours de la maturation des graines du mutant <i>abi5-1</i> (△, □) et du type sauvage (▲, ■).	95
Figure 4.7. Etude de la sensibilité à l'ABA des graines non-dormantes obtenues après post maturation chez le type sauvage (●) et deux mutants <i>abi5</i> (◇, □).	96
Figure 4.8. ABI5 joue un rôle dans la dormance des graines de <i>M. truncatula</i> . Courbes de germination de graines ayant subi 3 jours de post-maturation à sec avant imbibition à l'obscurité à 20°C (A) et 25°C (B).	97
Figure 4.9. Perte de la capacité germinative des graines matures de type sauvage (●) et <i>abi5</i> (◇, □) au cours du stockage à 35°C et 75% HR. Après stockage, les graines sont imbibées dans l'eau à 20°C et à l'obscurité.	98
Figure 4.10. Teneur en sucres solubles des graines âgées de 32 JAP de type sauvage et mutants <i>abi5</i> . Glucose (A), fructose (B), saccharose (C), raffinose (D), stachyose (E).	99
Figure 4.11. Teneur en sucres solubles des graines matures de type sauvage et des mutants <i>abi5</i> . glucose (A), fructose (B), saccharose (C), raffinose (D), stachyose (E) et verbascose (F).	100
Figure 4.12. Corrélation entre la longévité exprimée en temps nécessaire pour obtenir 50% de viabilité (P50) des graines matures (WT) et <i>abi5</i> et les teneurs en saccharose (A) et stachyose (B).	101
Figure 4.13. Comparaison du protéome stable à la chaleur des graines matures sauvages (A) et des mutants <i>abi5</i> (B <i>abi5-1</i> ; C <i>abi5-2</i> ).	102
Figure 4.14. Profils 2D et quantification des spots appartenant à la famille LEA_5 (PF00477) qui sont différentiellement exprimés dans les graines matures de type sauvage et mutants <i>abi5</i> .	103
Figure 4.15. Profils 2D et quantification des spots appartenant au groupe SMP (PF04927) qui sont différentiellement exprimés dans les graines matures de type sauvage et mutants <i>abi5</i> .	104
Figure 4.16. Profils 2D et quantification des spots appartenant au groupe LEA_4 (PF02987) et LEA_1 (PF03760) qui sont différentiellement exprimés dans les graines matures de type sauvage et mutants <i>abi5</i> .	105
Figure D1. Schéma indiquant les changements physiologiques et biochimiques pendant la maturation des graines de <i>M. truncatula</i> . MS, masse sèche; TE, teneur en eau; TD, tolérance à la dessiccation; RFO, oligosaccharides; Sac saccharose.	111
Figure M.1 : Photos du marquage des fleurs à leur ouverture (0 JAP) (A) chez <i>Medicago truncatula</i> et les gousses marquées avant prélèvement (B).	116

## Liste des tableaux :

Tableau 1.1. Principaux phénotypes impliqués dans la régulation du développement des semences (à partir du tableau de To <i>et al.</i> , 2006).	27
Tableau 1.2. Classification des protéines LEA (d'après Hundertmark and Hinch, 2008).	32
Table 3.1. Identification des membres des protéines LEA of chez <i>M. truncatula</i> et la classification selon le numéro Pfam ou Dure (1993).	70
Table 3.2. Concentrations des différentes fractions protéiques dans les graines de <i>M. truncatula</i> à différents stades du développement et des cotylédons et des axes embryonnaires séparés des graines matures.	73
Table 3.3. Spots identifiés du protéome stable à la chaleur ayant une expression au moins deux fois supérieure ( $P < 0.01$ ) entre les axes embryonnaires et les cotylédons.	74
Table 3.4. Analyse <i>in silico</i> de l'expression des gènes LEA codant pour des protéines LEA using the gene expression atlas ( <a href="http://mtgea.noble.org/v2/">http://mtgea.noble.org/v2/</a> ).	77
Tableau 4.1. Polypeptides LEA sous représentés dans les mutants <i>abi5-1</i> et <i>abi5-2</i> . La différence en intensité entre type sauvage et <i>abi5</i> est également indiquée.	102
Tableau 4.2. Polypeptides LEA surexprimés dans les mutants <i>abi5-1</i> et <i>abi5-2</i> . La différence en intensité entre type sauvage et <i>abi5</i> est également indiquée.	104
Tableau M1 : Composition des gels de séparation (A) et de concentration (B) d'acrylamide.	123
Tableau M2 : Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour les expériences réalisées en PCR et Q-PCR.	127

## Abréviations :

1D : Electrophorèse mono-dimensionnelle	N-terminal : Amino-terminal
2D : Electrophorèse bi-dimensionnelle	PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)
ABA : acide abscissique	PCR : réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
ABI : ABA insensitive	PEG : Polyéthylène glycol
ABRE : ABA response element	P50 : temps de vieillissement nécessaire afin de diminuer le % de germination à 50%
ADN : Acide désoxyribonucléique	pI : Point Isoélectrique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire	PMSF : Phénylméthylsulfonyl fluoride
AREB : ABA-responsive element binding protein	PS : protéine solubles
ARNm : Acide ribonucléique messenger	PSC : protéines stables à la chaleur
APS : ammonium persulfate	PVP : polyvinylpyrrolidone
bZIP : basic region/ leucine zipper motif	Q-PCR : PCR quantitative (Quantitative Polymerase Chain Reaction)
CAT : catalase	QTL : Quantitative trait locus
CHAPS : 3-[(3-Cholamidopropyl)diméthyl ammonio]-1-propanesulfonate	RFO : oligosaccharides de la famille des raffinose
CRT : C-repeat temperature response	RO <sub>2</sub> <sup>-</sup> : radical peroxy
CTAB : bromure d'hexadécyltriméthylammonium	RO <sup>-</sup> : radical alkoxy
C-terminal : Carboxy-terminal	SDS : Dodécyl sulfate de sodium
CV : Coefficient de variance	sHSP : small Heat-Shock Protein
Da : dalton	SOD : superoxide dismutase
DEPC : diéthyl pyrocarbonate	TBS : Tampon Tris salin
DHAR : déhydroascorbate réductase	TBS-T : Tampon Tris salin additionné de Tween 0,5%
dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate	TC : Tentative consensus sequences
DNP : dinitrophényl hydrazone	TCA : Acide trichloroacétique
DNPH : dinitrophényl hydrazine	TD : Tolérance à la dessiccation
DO : densité optique	TE : Teneur en eau
DRE : drought responsive element	Tg : Température de transition d'état vitreux
DTT : Dithiothréitol	Tm : Température de transition de phase des membranes
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique	TNT : élément transposable de cellule de type 1 de <i>Nicotiana tabacum</i>
EST : Expressed Sequence Tag	Tris : Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane
FUS : FUSCA	UV : Ultraviolet
GA : acide gibbérelle	σ : temps nécessaire pour diminuer le % de germination d'une valeur d'un écart-type
GR : glutathione réductase	
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute pression	
HR : humidité relative	
HRP : Horseradish Peroxidase	
HSP : Heat-Shock Protein	
IEF : Isoélectrofocalisation	
IgG : immunoglobuline de type G	
IR : Infrarouge	
IRTF : (spectrométrie) infrarouge à transformée de Fourier	
JAP : jour après pollinisation	
LCMS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	
LEA : late embryogenesis abundant	
LEC: LEAFY COTYLEDON	
LTR : low temperature response	
MF : Masse fraîche	
MM : Maturité de masse	
MS : Masse sèche	
Mw : Masse moléculaire	
NaAc : acétate de sodium	
NBT : nitrobleu de tétrazolium	
NDGA : acide nordihydroguaiarétique	



## Contexte et objectifs de la thèse

La qualité des semences représente un enjeu stratégique et économique important. En effet, le marché très compétitif et mondialisé oblige les producteurs de semences à garantir la qualité de leurs produits envers leurs clients. En terme de qualité physiologique, il s'agit d'assurer que les semences vendues sont vigoureuses, lèvent rapidement et de manière homogène dans des conditions aléatoires de l'environnement. La qualité physiologique des semences est sous le contrôle de facteurs polygéniques et son expression est soumise à une forte interaction plante-environnement. Elle s'élabore au cours de la formation et de la maturation de la graine et est maintenue plus ou moins longtemps pendant la conservation selon les conditions de stockage. Elle s'exprime pendant les étapes allant de la germination à la levée en fonction des conditions environnementales (Benech-Arnold & Sánchez, 2004).

La capacité des graines à tolérer la dessiccation et la longévité (ou aptitude à la conservation) est un facteur essentiel de la qualité physiologique des graines (Sinniah *et al.*, 1998a). La tolérance à la dessiccation correspond à la propriété de résister sans dommage à la perte totale de l'eau cellulaire alors que la longévité correspond au temps pendant lequel la graine reste en vie sans perte de vigueur germinative après conservation à l'état sec. Chez les semences orthodoxes, ces deux propriétés sont acquises pendant la seconde moitié du développement de la graine et perdues au cours de la germination. Il s'agit d'un phénomène multifactoriel qui repose sur plusieurs composantes : 1) la synthèse de molécules protectrices tels que les sucres non-réducteurs et protéines LEA (late embryogenesis abundant) et de choc thermique (HSP, heat shock proteins) (Hoekstra *et al.*, 2001; Leprince & Buitink, 2010), 2) la prévention de dégâts néfastes engendrés pendant la dessiccation ou qui s'accumulent pendant la conservation (Leprince *et al.*, 2000; Bailly *et al.*, 2004; Rajjou *et al.*, 2008) et 3) la réparation de ces dégâts pendant l'imbibition (Oge *et al.*, 2008; Waterworth *et al.*, 2010). Jusqu'à présent, la majorité des recherches a consisté à décrire ces trois phénomènes et mettre en évidence leur importance. Cependant, la mise en place de ces phénomènes pendant la maturation et en lien avec la tolérance à la dessiccation et la longévité n'est à ce jour pas connue.

Les facteurs de régulation qui contrôlent les mécanismes mis en place lors du développement des graines pour permettre la survie à l'état sec sont encore mal connus. Cependant, certains régulateurs, notamment les facteurs de transcription *ABI3*, *FUS3*, et *LEC1*, sont connus pour être des régulateurs importants de l'acquisition de la tolérance à la dessiccation, de la dormance et de la vigueur germinative pendant le développement des graines (pour revue, Holdsworth *et al.*, 2008; Santos-Mendoza *et al.*, 2008). Les facteurs régulant l'acquisition de la longévité restent largement inconnus, bien que la signalisation par l'ABA semble jouer un rôle. En effet, chez *Arabidopsis*, les graines possédant les allèles peu sévères d'*abi3* ont une longévité fortement diminuée (Ooms *et al.*, 1993). Toutefois, les processus en aval de la signalisation par l'ABA ne sont pas encore tous élucidés. Au vu du nombre croissant de facteurs de régulation identifiés et impliqués dans le développement

des graines, notamment pendant le remplissage (North *et al.*, 2010), il est fort à parier que la régulation de l'acquisition de la longévité pendant la maturation soit complexe.

L'objectif de cette thèse est de caractériser finement les stades du développement des graines pendant lesquels la longévité est acquise, de caractériser la mise en place des mécanismes réputés comme jouant un rôle dans la survie à l'état sec pendant ces stades, et de voir si *ABI5*, un facteur de transcription qui, chez *Arabidopsis* joue un rôle dans la tolérance à la dessiccation en aval d'*ABI3* pendant la germination (Lopez-Molina *et al.*, 2002), est également impliqué dans la régulation de la maturation, notamment en relation avec la longévité.

Ce travail a été réalisé sur les graines de la plante modèle des légumineuses, *Medicago truncatula* ou luzerne tronquée. Appartenant à la sous-famille des Papilionacées, tout comme le pois, le lupin et les féveroles, *M. truncatula* est une plante modèle pour l'étude des graines protéagineuses. L'intérêt agronomique des légumineuses tient également du fait de leur capacité à former des nodosités fixant l'azote atmosphérique et répondant à la problématique croissante du coût et de l'impact environnemental de l'amendement azoté nécessaire à une agriculture intensive (Source GLIP, 2006). *M. truncatula* possède un génome de petite taille de 450 Mb et un cycle de vie relativement court de 3 mois environ. La taille des graines permet facilement la dissection des différents organes. La séquence presque complète de son génome (<http://www.medicago.org/>) et la disponibilité d'une banque de mutants d'insertion (<http://bioinfo4.noble.org/mutant>) sont des outils indispensables pour une caractérisation approfondie des mécanismes ayant un rôle dans la maturation et facilitent l'étude fonctionnelle de gènes.

Ce mémoire est divisé en quatre chapitres. Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique présentée en deux parties. La première, portant sur le développement de la graine, décrit l'état de nos connaissances sur la tolérance à la dessiccation, la longévité et la dormance et se termine avec une vue d'ensemble des voies de régulation de la maturation. La deuxième partie expose les mécanismes liés à la survie à l'état sec. Ensuite suivent trois chapitres de résultats. Le Chapitre 2 caractérise l'acquisition de la longévité et les changements physiologiques et biochimiques qui ont lieu dans cette fenêtre du développement de la graine. Une attention particulière est donnée à l'accumulation des sucres solubles de la famille des oligosaccharides issus du raffinose (RFO), l'activité de certaines enzymes des systèmes antioxydants et l'état d'oxydation des protéines. Dans le Chapitre 3, nous nous sommes focalisés sur l'étude du protéome stable à la chaleur, une fraction protéique spécifique enrichie en protéines LEA en relation avec la tolérance à la dessiccation, la longévité et la dessiccation *in planta* survenant en fin de maturation de la graine. Dans le dernier chapitre de résultats, l'implication d'*ABI5* dans la régulation de la maturation au plan biochimique (accumulation des protéines LEA, métabolisme des sucres) et physiologique (dormance, longévité) a été étudiée au moyen de mutants *Tnt1 abi5*.

## **Chapitre 1**

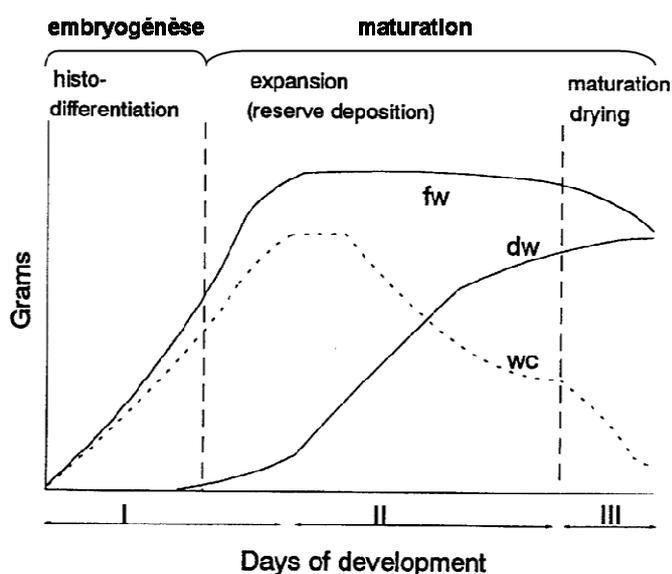
# **Relevé bibliographique**



## 1.1 Développement de la graine

### 1.1.1 Formation et remplissage de la graine

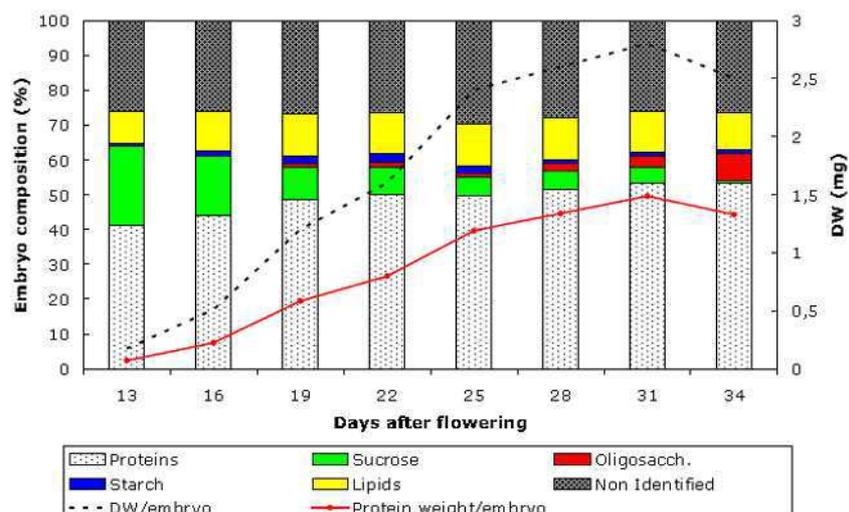
Le développement des graines est divisé en trois grandes étapes, l'embryogenèse, le remplissage et la dessiccation (**figure 1.1**). L'embryon est issu de la fécondation de l'oosphère par un des deux noyaux gamétophytes mâles. L'albumen est issu du second gamétophyte et du sac embryonnaire. Les téguments sont quant à eux d'origine maternelle (West & Harada, 1993). Le zygote résultant de la fécondation subit une série de divisions cellulaires donnant lieu à la formation du plan apex-base et radial de l'embryon et à la mise en place des tissus fondamentaux. A la fin de l'embryogénèse, la division cellulaire s'estompe progressivement et fait place à une expansion cellulaire qui accompagne le remplissage des graines (Baud *et al.*, 2002; Gallardo *et al.*, 2006). Chez les semences exalbuminées telles que *Medicago* et *Arabidopsis*, la croissance de l'embryon se fait au dépend de l'albumen qui régresse fortement et se réduit à une ou plusieurs assises cellulaires. Chez les semences albuminées, la situation inverse est observée (Bewley & Black, 1994; Nonogaki *et al.*, 2007).



**Figure 1.1.** Principales phases du développement des graines orthodoxes. Evolution de la teneur en eau (wc) des graines orthodoxes, des masses fraîche (fw) et sèche (dw) durant le développement (D'après Bewley and black, 1994).

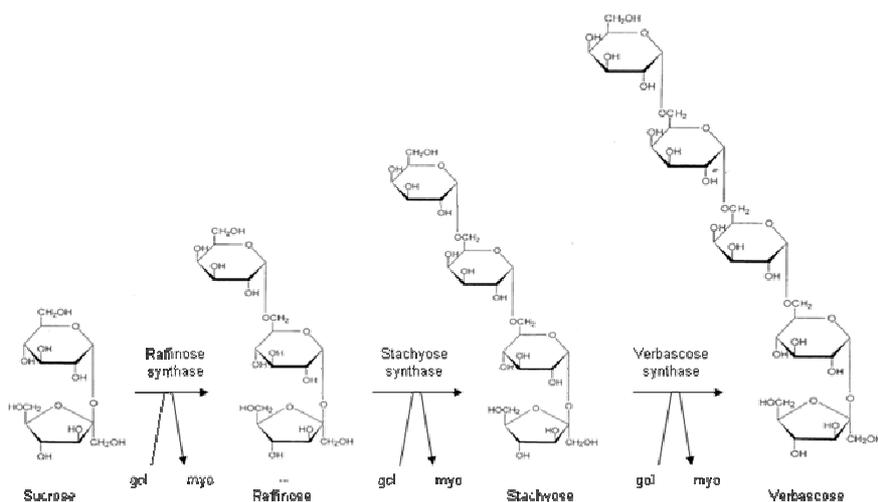
Une fois l'embryogenèse terminée, le remplissage des graines commence. Il se caractérise par une accumulation importante de réserves carbonées et azotées sous forme de protéines, amidon et lipides dans diverses proportions selon les espèces. Chez *M. truncatula*, le remplissage se situe entre 12 et 30 jours après pollinisation (JAP) (**figure 1.2**). Les teneurs en amidon et en saccharose augmentent de façon transitoire jusqu'à 12 à 14 JAP, puis diminuent progressivement (Djemel *et al.*, 2005). La synthèse des protéines de réserve se déroule entre 16 et 30 JAP avec l'accumulation des vicilines, des légumines et des convicilines (Gallardo *et al.*, 2003; Le Signor *et al.*, 2005; Gallardo *et*

al., 2006), qui représentent 35-45% du poids sec de la graine mature. Les lipides constituent environ 10% du poids sec (Djemel *et al.*, 2005) (**figure 1.2**).



**Figure 1.2.** Evolution de la masse sèche et de la composition des embryons de *M. truncatula* au cours de leur développement (exprimé en jours après pollinisation) (D'après Gallardo *et al.*, 2006).

Pendant et après la phase de remplissage, les sucres solubles non-réducteurs s'accumulent sous la forme de saccharose, et, pour les légumineuses, sous forme d'oligosaccharides de la famille du raffinose (RFO) (Horbowicz & Obendorf, 1994; Kuo *et al.*, 1997; Peterbauer *et al.*, 2001). Ces sucres sont formés par l'ajout successif de molécules de galactose au saccharose pour former d'abord du raffinose au moyen de la raffinose synthase (Obendorf, 1997), puis du stachyose (tetrasaccharide) et du verbascose (pentasaccharide) par l'action de la stachyose synthase et de la verbascose synthase, respectivement (**figure 1.3**).



**Figure 1.3.** Schéma de la voie de synthèse des oligosaccharides de la famille du raffinose (adapté de Obendorf, 1997 ; Obendorf *et al.*, 2009). gal, galactinol, myo myo-inositol.

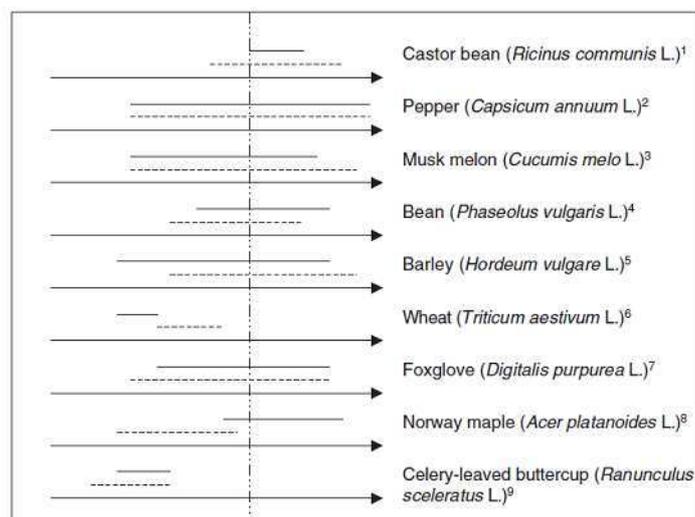
Les RFO sont les sucres solubles majoritaires dans les graines matures de *M. truncatula* et constituent 7 à 9% du poids sec de la graine (contre 0,5-1% de saccharose) (Djemel *et al.*, 2005; Rosnoblet *et al.*, 2007). Le remplissage des graines se fait au dépend de l'eau cellulaire (Bewley & Black, 1994). Par conséquent, une diminution de la teneur en eau de manière concomitante au

remplissage est généralement observée. Cependant, le potentiel hydrique des cellules reste constant pendant cette période (Bewley & Black, 1994). Chez *M. truncatula*, la dessiccation de la graine *sensu stricto* démarre à partir de 36 JAP après pollinisation (Gallardo *et al.*, 2003; Boudet *et al.*, 2006). La teneur en eau en équilibre avec les conditions ambiantes (20-23°C, 60% HR) dans les graines matures est de 0,1 g H<sub>2</sub>O / g de matière sèche (MS).

### 1.1.2 L'acquisition de la tolérance à la dessiccation

La tolérance à la dessiccation est la capacité à survivre à une perte d'eau cellulaire quasi totale. Dans les tissus sensibles, une perte en eau aussi importante induit une forte réduction du volume cellulaire menant à une perte de sa structure par des contraintes mécaniques et physiques, une déstabilisation des voies de métabolisme, et une dénaturation ou perte de structure tertiaire de certaines molécules comme les protéines (Pammenter & Berjak, 1999). Cependant, certaines graines, dites orthodoxes, sont tolérantes à la perte d'eau lors de leur développement et de leur stockage à l'état sec. A l'opposé, les graines qui ne tolèrent pas de perte en eau sont dites récalcitrantes (Pammenter & Berjak, 1999).

Chez les graines orthodoxes, la tolérance à la dessiccation est acquise pendant le remplissage, puis perdue lors de la germination (Leprince *et al.*, 1990; Hong & Ellis, 1992). Les différents organes de la graine acquièrent la tolérance de façon asynchrone (Leprince *et al.*, 1990; Leprince *et al.*, 1993). De plus, la tolérance à la dessiccation, tout comme la capacité des graines à germer, peut être acquise avant, pendant ou après que les graines aient atteint leur maturité de masse (**figure 1.4**) en fonction de l'espèce (Probert *et al.*, 2007).



**Figure 1.4.** Chronologie relative de l'acquisition de la capacité à germer des graines fraîches (ligne en pointillée) ou de la tolérance à la dessiccation (ligne continue) positionnée par rapport à la maturité de masse (représentée par la ligne verticale) pour une gamme d'espèces cultivées (1-6, 8) et sauvage (7, 9), tiré de Probert *et al.* (2007).

La **figure 1.4** montre donc que les programmes de tolérance à la dessiccation et de remplissage des graines ne sont pas dépendant les uns des autres (Probert *et al.*, 2007). Lors de la germination, la tolérance à la dessiccation peut être ré-induite dans les radicules germées par un stress osmotique

pendant une courte fenêtre de développement avant l'établissement de la plantule (Bruggink & van der Toorn, 1995; Buitink *et al.*, 2003).

### 1.1.3 L'acquisition de la longévité

Même si les graines tolérantes à la dessiccation peuvent survivre à la déshydratation complète, s'accumulent dans le temps des dégâts cellulaires qui conduisent à une perte de vigueur et de viabilité des graines. La durée pendant laquelle les graines gardent leur capacité à pouvoir germer après stockage est appelée la longévité, ou l'aptitude à la conservation. En conditions ambiantes, les graines orthodoxes peuvent être conservées longtemps, allant de quelques années à plusieurs siècles, du fait de leur faible teneur en eau qui induit la formation d'un état vitreux stabilisant les réactions moléculaires, et de l'absence de métabolisme (Pour revue, Buitink & Leprince, 2004), voir 1.2.1 ci-dessous). Par exemple, des graines de lotus sacré (*Nelumbo nucifera*) retrouvées sur un site archéologique chinois, ou encore celles d'une espèce de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*), âgées respectivement de 1200 ans et de 2000 ans, ont été capables de germer (Shen-Miller *et al.*, 1995; Sallon *et al.*, 2008).

La vitesse du vieillissement des semences est influencée par les conditions de stockage, principalement la température et l'humidité (Zheng *et al.*, 1998) et probablement la présence d'oxygène (Rao & Roberts, 1990; Hendry, 1993). En général, une augmentation de la teneur en eau ou de l'humidité relative ambiante et/ou de la température de conservation conduit à une augmentation de la vitesse du vieillissement, d'autant plus importante que les graines sont hors de leur état vitreux (Pour revue, Buitink and Leprince, 2004). Par ailleurs, il existe une combinaison optimum de teneur en eau et de température pour la conservation. Ainsi, un séchage trop forcé (en dessous d'une humidité relative de 30%) accroît à nouveau la vitesse de vieillissement (Vertucci *et al.*, 1993; Buitink *et al.*, 1998a).

En 1980, Ellis et Roberts ont développé un modèle permettant de prédire la viabilité des graines au cours du temps en fonction des conditions de stockage selon l'équation :

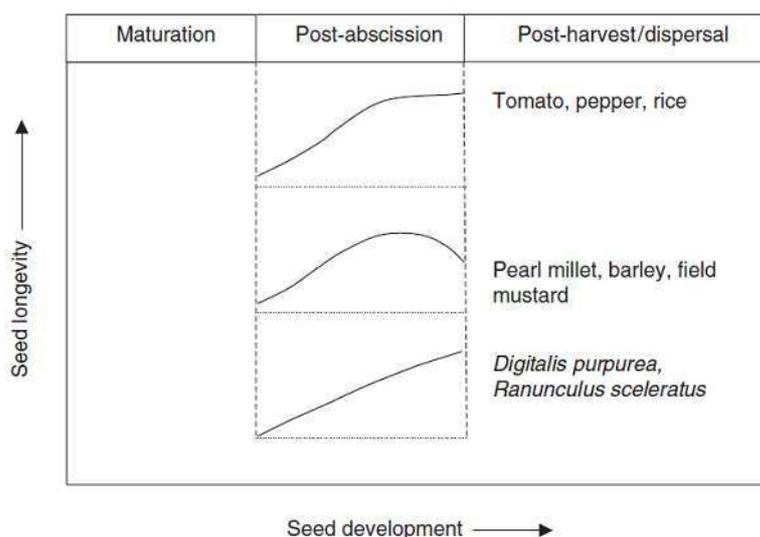
$$v = K_i - p/\sigma$$

où  $v$  correspond à la viabilité des graines après  $p$  jours de vieillissement,  $K_i$  est la qualité initiale du lot exprimée en probit et  $\sigma$  le temps nécessaire pour diminuer le pourcentage de germination d'une valeur d'un écart-type pendant le stockage. Le  $\sigma$  est fonction des conditions de stockage selon l'équation :

$$\log \sigma = K_E - C_w \log m - C_H t - C_Q t^2$$

$K_E$ ,  $C_w$ ,  $C_H$  et  $C_Q$  sont des variables spécifiques de l'espèce étudiée,  $m$  est la teneur en eau des graines (exprimée en % de matière fraîche) et  $t$  est la température à laquelle les graines ont été stockées. La longévité peut donc être exprimée par le  $K_i$  si l'on considère que  $\sigma$  reste constant (Ellis *et al.*, 1993a; Ellis & Hong, 1994; Hay & Probert, 1995; Sanhewe, A.J. & Ellis, R.H., 1996b; Sinniah *et al.*, 1998a). Une autre façon de quantifier la longévité est de déterminer le nombre de jours nécessaires de vieillissement pour diminuer la germination à 50%, aussi appelé le P50 (Mead & Gray, 1999; Tang *et al.*, 1999). Outre le fait que la longévité des graines dépend des espèces (notamment au travers des variables  $K_E$ ,  $C_w$ ,  $C_H$  et  $C_Q$ ), elle dépend également du génotype au sein de l'espèce (Clerkx *et al.*, 2004b), du stade de récolte et des conditions de culture des porte-graines comme décrit ci-dessous.

La longévité des graines est acquise au cours du développement autour ou après la maturité de masse (Demir & Ellis, 1993; Ellis & Hong, 1994; Hay & Probert, 1995; Sanhewe, A.J. & Ellis, R.H., 1996b; Sinniah *et al.*, 1998a). Trois types de profil d'acquisition de la longévité ont été décrits par rapport à l'abscission du fruit ou de la graine de la plante-mère (Probert *et al.*, 2007). Chez la tomate, le poivrier et le riz, la longévité augmente progressivement pendant la phase de post-abscission, puis atteint un plateau. Chez le millet, l'orge de printemps et la moutarde sauvage, la longévité augmente progressivement puis diminue avant même la dispersion des graines (**figure 1.5**). Un troisième profil d'acquisition de la longévité est observable chez *Digitalis purpurea* (Hay & Probert, 1995) et *Anemone nemorosa*. Chez ces espèces, la longévité augmente tout au long du développement pendant et après la phase d'abscission (**figure 1.5**). Ce schéma rend compte du fait qu'en fonction de la date de récolte, la longévité peut varier fortement d'un lot de graines à l'autre. A l'heure actuelle, nous ne savons pas dans quelle catégorie classer les graines d'*Arabidopsis* et *Medicago* ainsi que bon nombre d'espèces à intérêt économique.



**Figure 1.5.** Diagramme illustrant les trois types de profil d'acquisition de la longévité au cours de la post-abscission des fruits et de la dispersion des graines (D'après Probert *et al.*, 2007).

Les conditions environnementales pendant la culture des porte-graines peuvent affecter de manière positive ou négative l'acquisition de la longévité selon les espèces. Parmi celles-ci, des études portées sur plusieurs espèces ont montré que la température, les conditions lumineuses et

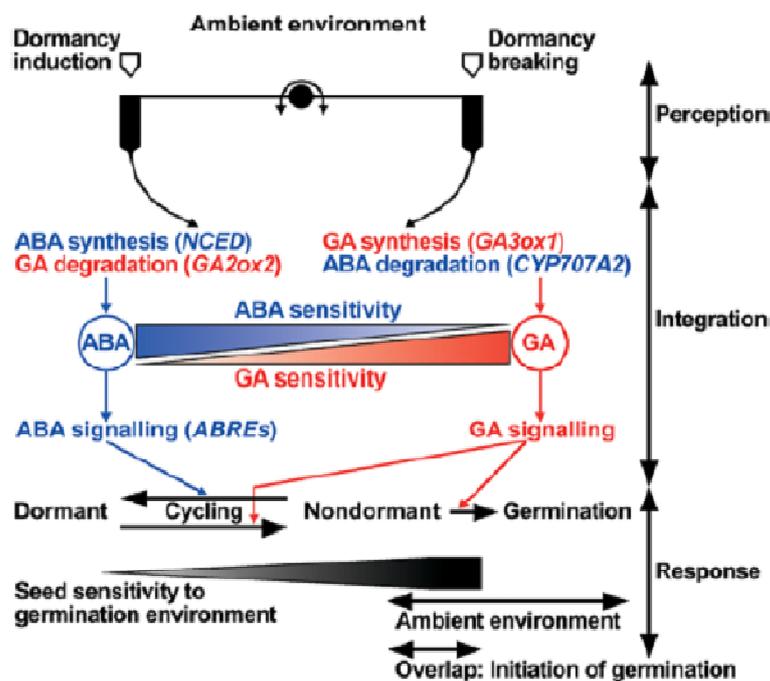
l'irrigation influencent le Ki ainsi que le profil d'acquisition de la longévité (Ellis *et al.*, 1993a; Ellis & Hong, 1994; Sanhewe, A.J. & Ellis, R.H., 1996b), Par exemple, chez le riz (Ellis & Hong, 1994), en condition froide, le Ki tend à décroître en fin de maturation, alors qu'en condition chaude, il reste constant après avoir atteint sa valeur maximale.

#### 1.1.4 Dormance

La dormance est définie comme l'inaptitude temporaire de graines viables à germer malgré des conditions favorables (température, eau, lumière/obscurité) (Pour revue (Bewley, 1997; Koornneef *et al.*, 2002; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Finkelstein *et al.*, 2008). Baskin et Baskin (2004) ont défini plusieurs catégories de dormance selon l'espèce végétale considérée. Chez *M. truncatula* deux types de dormance existent : physique et physiologique. La dormance physique est due à l'imperméabilité des tissus de la graine et peut être levée par une altération du tégument (*i.e.* scarification, (Van Assche *et al.*, 2003; Bolingue *et al.*, 2010a) ou par un traitement chimique modéré dans une solution d'acide sulfurique (Faria *et al.*, 2005). La dormance physique dépend du génotype de *M. truncatula*, des conditions environnementales et varie en fonction des saisons (Taylor, 1996; Van Assche *et al.*, 2003). Le second type de dormance rencontré chez cette espèce est physiologique. Cette dernière se caractérise par une imbibition des tissus de la graine, suivie d'un temps de latence de plusieurs semaines voire plusieurs mois avant la percée de la radicule (Bolingue *et al.*, 2010a).

Les dormances physiques et physiologiques sont progressivement acquises au cours de la maturation des graines et sont régulées par des signaux endogènes, notamment par les régulateurs de croissance GA et ABA (**figure 1.6**). Ces deux hormones ont des actions antagonistes puisque la germination est inhibée par l'ABA et stimulée par les GAs (Kermode, 2005; Kucera *et al.*, 2005). L'état dormant résulte de l'augmentation de la biosynthèse de l'ABA et/ou de sa sensibilité et de la dégradation des GAs.

Les facteurs abiotiques comme la lumière, la température, les nitrates et la durée du stockage (post-maturation) des semences peuvent contribuer à la levée de la dormance (Bewley & Black, 1994; Koornneef & Karssen, 1994; Baskin & Baskin, 2004). La lumière est nécessaire pour lever la dormance d'*Arabidopsis* (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006), mais elle a un effet contraire chez *M. truncatula* (Bolingue *et al.*, 2010a). Pour plusieurs espèces végétales, la présence de nitrates stimule le passage de l'état dormant des semences à la phase de germination, mais ceci ne semble pas être le cas pour *M. truncatula* (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Bolingue *et al.*, 2010a). La dormance primaire est le plus souvent levée par une période de stockage de plusieurs jours à plusieurs mois à température ambiante appelée post-maturation (Baskin & Baskin, 1998; Baskin & Baskin, 2004). La période de post-maturation nécessaire pour que la dormance soit levée dans les semences de *M. truncatula* est de un à neuf mois selon les conditions de stockage et le génotype (Bolingue *et al.*, 2010a). La dormance physiologique de ces graines peut également être levée par une imbibition de 36 h à 4°C (Faria *et al.*, 2005; Bolingue *et al.*, 2010a).



**Figure 1.6.** Modèle de régulation de la dormance et de la germination par l'acide abscissique (ABA) et l'acide gibbérellique (GA) en réponse à l'environnement (D'après Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006). Selon ce modèle, les facteurs environnementaux (la température) affectent la balance ABA/GA et la sensibilité à ces hormones. La synthèse de l'ABA et sa signalisation (catabolisme du GA) contrôle l'orientation vers le maintien de la dormance, alors que la synthèse de GA et sa signalisation (catabolisme de l'ABA) contrôle l'orientation vers la germination.

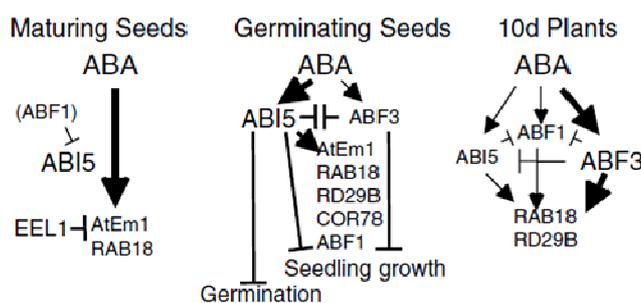
### 1.1.5 Régulation de la maturation en relation avec la survie à l'état sec

Les principaux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la maturation des graines sont *LEAFY COTYLEDON 1* et 2 (*LEC*), *FUSCA3* (*FUS*) et *ABA insensitive 3* (*ABI3*) (Santos-Mendoza *et al.*, 2008). Les mutants *abi3* présentent une forte réduction de l'expression de nombreux gènes spécifiques de la maturation tels que ceux codant pour les protéines LEA (Ooms *et al.*, 1993; Parcy *et al.*, 1994; Clerx *et al.*, 2003). Les mutants *abi3* sont déficients dans les processus de stockage des protéines de réserve ainsi que dans la synthèse et l'accumulation des lipides (Finkelstein & Somerville, 1990). Ce facteur de transcription intervient également dans la dégradation de la chlorophylle en cours de maturation, la mise en place de la dormance, l'acquisition de la tolérance à la dessiccation et la longévité des semences (Ooms *et al.*, 1993) (**tableau 1.1**). Les embryons des mutants *fus3* sont vivipares et sensibles à la dessiccation (**tableau 1.1**) (Meinke *et al.*, 1994; Holdsworth *et al.*, 1999; Finkelstein *et al.*, 2002). La protéine FUS3 agirait comme régulateur des gènes effecteurs impliqués par exemple dans le stockage des protéines de réserve et contrôlerait également d'autres protéines régulatrices (Kirik *et al.*, 1998a; Kirik *et al.*, 1998b).

Le facteur de régulation *ABI5* joue également un rôle dans la régulation de l'expression de certaines protéines LEA pendant la maturation, comme *AtEm1*, *AtEM6* (*LEA\_5*) et *RAB18* (déhydrine) (Finkelstein & Lynch, 2000) (**figure 1.7**). *ABI5* est un facteur de régulation bZIP qui se lie aux éléments *cis* ABRE (ABA response element) (Finkelstein & Lynch, 2000). Comme pour les autres mutants *abi*, les graines d'*abi5* sont insensibles à l'ABA, mais ne montrent pas de phénotypes

sévères, comme c'est le cas pour *abi3* (Finkelstein, 1994; Finkelstein & Lynch, 2000) (**tableau 1.1**). L'expression *ABI5* semble être régulée par *ABI3* durant la maturation et au cours de la germination en présence d'ABA (Lopez-Molina *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2001; Lopez-Molina *et al.*, 2002; Finkelstein *et al.*, 2005).

Le rôle d'*ABI5* dans la maturation, en dehors de son implication dans la régulation de protéines LEA, reste encore mal connu. Chez *Arabidopsis*, la dormance et la teneur en saccharose ne sont pas affectées chez les mutants *abi5*. L'augmentation de l'expression de *ABI5* pendant la phase de post-abscission (Finkelstein & Lynch, 2000) laisse penser que le rôle d'*ABI5* est plus important dans le contrôle de la transition de la maturation vers la germination. Par ailleurs, *ABI5* est également impliqué dans la régulation de la tolérance au stress des jeunes plantules (Parcy *et al.*, 1994; Soderman *et al.*, 2000; Brocard *et al.*, 2002) (**figure 1.7**). De manière intéressante, pendant l'imbibition, *ABI5* est impliqué dans l'arrêt de la croissance de graines germées induite par l'ABA ainsi que dans l'augmentation de la tolérance au séchage qui s'en suit (Lopez-Molina *et al.*, 2001). Bien que plusieurs homologues d'*ABI3* et *ABI5* ont été clonés chez d'autres espèces, leur rôle de ces facteurs de transcription dans la tolérance à la dessiccation chez les légumineuses reste inconnu.



**Figure 1.7.** Schémas illustrant les voies de signalisation de l'ABA à 3 stades de développement chez *Arabidopsis*. ABF, ABA Binding Facteur, EEL, AtEm1, RAB18, RD29B, COR78 sont des protéines LEA. (D'après Finkelstein *et al.*, 2005).

Les sucres et leurs modalités de transport de la plante mère vers l'embryon interviennent également en tant que régulateurs du développement de la graine (Weber *et al.*, 1997; Smeekens, 2000; Gibson, 2005; Rolland *et al.*, 2006). Au cours de l'embryogenèse, l'activité de l'invertase pariétale est élevée, générant dans l'embryon un rapport hexose/saccharose important associé à la division cellulaire de l'embryon. Durant le développement ce rapport diminue, en corrélation avec l'installation d'un système de transport du saccharose et avec l'augmentation de l'activité de la saccharose phosphate synthétase. La forte teneur en saccharose dans l'embryon est associée au stockage des substances de réserve (Weber *et al.*, 1997; Finkelstein & Gibson, 2001). Des interactions entre les voies de signalisation de l'ABA et des sucres ont également été mises en évidence. A la fin de l'embryogenèse, le passage de la phase de division cellulaire à celle d'accumulation des substances de réserve est ainsi régulé simultanément par l'ABA et les sucres (Finkelstein & Gibson, 2001).

**Tableau 1.1.** Principaux phénotypes impliqués dans la régulation du développement des semences (à partir du tableau de To *et al.*, 2006). Références : a, Meinke *et al.*, (1992) ; b, Keith *et al.*, (1994) ; c, Meinke *et al.*, (1994) ; d, Parcy *et al.*, (1994) ; e, West *et al.*, (1994) ; f, Nambara *et al.*, (1995) ; g, Parcy *et al.*, (1997) ; h, Vicient *et al.*, (2000) ; i, Stone *et al.*, (2001) ; j, Kroj *et al.*, (2003) ; k, Finkelstein *et al.*, (2005) ; l, Finkelstein *et al.*, (2005) ; m, Lopez-Molina *et al.*, (2001) ; n, Brocard-Gifford *et al.*, (2003) ; o, Söderman *et al.*, (2000).

	Type sauvage	<i>abi3</i>	<i>fus3</i>	<i>lec2</i>	<i>lec1</i>	<i>abi4</i>	<i>abi5</i>
Présence de chlorophylle dans les graines sèches	Non	Oui (f et g)	Non (c)	Oui, localisée (c,j)	Oui (g)	Non (n)	Non (n)
Présence d'anthocyanes dans les cotylédons	Non	Non (g)	Oui (b et g)	Oui, localisée (i,c,j)	Oui (a,g,c)	Non (n)	Non (n)
Expression des protéines de réserve	Normale	Réduite (d,f,g,j)	Réduite (b,c,g, h,j)	Réduite (c,j)	Réduite (a,c,g,e,h)	Normale (o, n)	Normale (n)
Trichomes ectopique sur les cotylédons	Non	Non (f)	Oui (b,c)	Oui (i,c)	Oui (a,e,j,c)	Non (n)	Non (m)
Sensibilité à l'ABA	Normale	Réduite (g)	Normale (g)	Normale (c)	Réduite dans cotylédons (g ,c)	Réduite (d)	Réduite (k, l)
Tolérance à la dessiccation	Oui	Non (d)	Non (b)	Oui (c)	Non (e)	Oui (n)	Oui (k, n)
Longévité	Normale	Réduite dans les allèles peu sévères, tolérants à la dessiccation	Pas applicable	Inconnu	Pas applicable	Inconnu	Inconnu

En relation avec la signalisation par les sucres, la protéine SNRK1 (Sucrose non-fermenting - related protein kinase1) a un rôle important dans le passage de la phase de division cellulaire à la phase d'expansion cellulaire juste avant le remplissage (Radchuk *et al.*, 2006). De plus, la protéine SNF4b, une autre sous-unité du complexe kinase formé par SNRK1, est accumulée durant le remplissage des graines, puis disparaît des graines matures au cours de l'imbibition (Bradford *et al.*, 2003; Rosnoblet *et al.*, 2007). L'expression de cette sous-unité corrèle avec la dormance (Bradford *et al.*, 2003; Argyris *et al.*, 2008) et, chez *M. truncatula*, la répression de son expression conduit à une accumulation plus faible de RFO, une longévité affectée et une levée de dormance qui est deux fois plus rapide que chez le type sauvage (Rosnoblet *et al.*, 2007; Bolingue *et al.*, 2010b). Le lien entre SNF4b et les facteurs de transcription majeurs dans le développement cités ci-dessus n'est pas encore élucidé.

## 1.2. Molécules et mécanismes impliqués dans la survie à l'état sec

L'eau est un élément fondamental pour l'organisation cellulaire, les réactions biologiques et la stabilisation des structures macromoléculaires (Vertucci & Farrant, 1995). Sans la mise en place de mécanismes de protection, la diminution de la teneur en eau est synonyme de mort cellulaire du fait de la dénaturation des protéines et de la fusion de membranes cellulaires (Pour revue Walters *et al.*, 2001). Cependant, certains organismes ont développé la capacité à survivre après un séchage à l'air libre : ils sont tolérants à la dessiccation et sont qualifiés d'anhydrobiotes (Bewley, 1979; Leopold, 1986). C'est le cas de certains procaryotes comme *Deinococcus radiodurans* (Mattimore & Battista, 1996) ou des cyanobactéries comme *Nostoc commune* (Potts, 1996), ou encore un unicellulaire tel que *Saccharomyces cerevisiae* (Singh *et al.*, 2005a). Parmi les eucaryotes anhydrobiotes, se trouvent des organismes microscopiques tels que les rotifères, les acariens, les nématodes et les larves de crustacés (Crowe *et al.*, 1992). Chez les végétaux, l'anhydrobiose concerne surtout les organes sexués, spores, graines et pollens (Pour revue, Leprince *et al.*, 1993; Vertucci & Farrant, 1995). Certains tissus végétatifs sont également aptes à tolérer la dessiccation chez les plantes dites reviviscentes : *Craterostigma* ssp ou *Xerophyta* ssp (Bernacchia *et al.*, 1996; Sherwin & Farrant, 1998; Ingle *et al.*, 2007).

Plusieurs mécanismes de protection sont mis en place par la cellule pour survivre à la dessiccation. Les sucres, des molécules amphiphiles et des protéines contribuent à la survie de la cellule. Une modification du métabolisme est également nécessaire, menant à l'arrêt du métabolisme. Ces différents processus et molécules permettent à la cellule de limiter les dégâts lors de la phase de perte d'eau. A cela s'ajoute des mécanismes de réparation jouant un rôle pendant l'imbibition. Ces différents mécanismes sont décrits plus en détail ci-dessous.

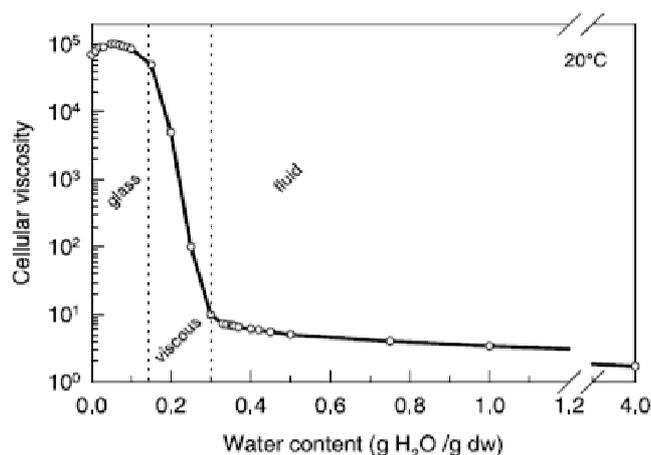
### 1.2.1 Sucres solubles

Les sucres solubles non-réducteurs sont généralement présents en quantités importantes dans les graines orthodoxes (Amuti & Pollard, 1977; Hoekstra *et al.*, 1994) et dans les plantes reviviscentes

(Martinelli, 2008). Pendant la dessiccation, ils auraient différents rôles successifs en fonction de la teneur en eau (Hoekstra *et al.*, 2001). Au début de la dessiccation, qui correspondrait alors à un stress hydrique, ces sucres solubles non-réducteurs agiraient en tant qu'osmoprotecteurs ou osmolytes compatibles (Hare *et al.*, 1998; Hoekstra *et al.*, 2001). L'augmentation de leur concentration permet la diminution du potentiel hydrique sans interférer avec le fonctionnement cellulaire (molécules compatibles). L'eau peut alors, jusqu'à une teneur critique (environ 0,3 g d'eau .g<sup>-1</sup> de matière sèche), continuer à se déplacer dans le sens des potentiels hydriques décroissants. En dessous de cette teneur en eau, les sucres peuvent préserver structurellement et fonctionnellement les membranes et les composants macromoléculaires des cellules (Hoekstra *et al.*, 2001) par le biais de deux mécanismes distincts : le maintien de la structure des membranes cellulaires *via* l'hypothèse du remplacement de l'eau et la formation d'un état vitreux cytoplasmique.

En fin de dessiccation, à des teneurs en eau faibles, les groupements hydroxyles des sucres peuvent progressivement remplacer les groupements OH des molécules d'eau (Crowe *et al.*, 1996). L'hypothèse du remplacement de l'eau peut ainsi expliquer la stabilisation des membranes ou d'autres macromolécules et est corroborée par des études *in vitro* sur des liposomes (Crowe *et al.*, 1997; Hoekstra *et al.*, 1997) et des protéines (Carpenter *et al.*, 1987; Allison *et al.*, 1999). En interagissant avec les têtes polaires des lipides membranaires par leur groupement OH, les sucres, comme le saccharose et les oligosaccharides, remplaceraient les molécules d'eau, maintenant la structure et la fonctionnalité des membranes (Crowe *et al.*, 1987; Crowe *et al.*, 1996; Hoekstra *et al.*, 2001) et des protéines telles que la phosphofructokinase. En effet le saccharose, le maltose et le tréhalose stabilisent et empêchent l'agrégation de cette enzyme à l'état sec dans un système *in vitro* (Carpenter *et al.*, 1987; Carpenter *et al.*, 1990).

Le deuxième phénomène qui peut jouer un rôle dans la stabilisation des macromolécules est la formation d'un état vitreux pendant la dessiccation (Hoekstra *et al.*, 2001). Un état vitreux est caractérisé par un état liquide avec des propriétés d'un solide. Amorphe et thermodynamiquement stable, il est formé par l'augmentation de la concentration des solutés dans la cellule pendant le séchage des graines (**figure 1.8**). La viscosité élevée au sein de l'état vitreux ralentit très fortement les réactions chimiques et protège les molécules en augmentant la stabilité des enzymes et en empêchant la dénaturation des protéines (Prestrelski *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1996; Wolkers *et al.*, 2001). La formation et la présence de l'état vitreux dans les graines n'expliquent pas la tolérance à la dessiccation, car la teneur en eau critique au dessous de laquelle les tissus sensibles meurent est plus élevée que celle à laquelle l'état vitreux se forme (Buitink & Leprince, 2004). En revanche, il a été démontré que la formation de l'état vitreux permet d'expliquer la longévité des graines et pourquoi leur vieillissement est dépendant de la température et de l'humidité relative ambiante (Buitink *et al.*, 1998b; Buitink & Leprince, 2004). Ainsi, il a été mis en évidence que la mobilité moléculaire au sein de l'état vitreux dans des graines et pollens était corrélée à la vitesse de vieillissement, suggérant que la viscosité au sein du cytoplasme contrôle la cinétique des réactions délétères qui entraînent la perte de viabilité (Buitink *et al.*, 2000a).



**Figure 1.8.** Augmentation de la viscosité dans les axes embryonnaires de pois lors d'un séchage à 20°C. La viscosité a été déterminée à partir d'une sonde de spin polaire (3-carboxy-proxyl) introduite dans les tissus des graines avant séchage. La mesure du temps de corrélation rotationnel (sR) du spin polaire par résonance paramagnétique électronique permet de déterminer la viscosité du milieu en phase liquide et à l'état solide. Les teneurs en eau correspondant à l'état liquide (fluid), visqueux (viscous) et vitreux (glass) sont indiquées (Buitink & Leprince, 2004).

Il est maintenant connu que les sucres solubles non-réducteurs ne sont pas les seuls agents protecteurs impliqués dans la survie à l'état sec. D'une part, il existe plusieurs exemples montrant qu'il n'existe pas de corrélation entre l'accumulation du saccharose et des oligosaccharides et l'induction de la tolérance à la dessiccation (Black *et al.*, 1999; Leprince & Buitink, 2010). D'autre part, il existe des organismes tolérants à la dessiccation qui n'accumulent pas de sucres non-réducteurs.

Plusieurs travaux ont montré qu'il existait une corrélation entre la longévité des graines et le ratio saccharose/oligosaccharides (Horbowicz & Obendorf, 1994; Lin & Huang, 1994; Sinniah *et al.*, 1998b). Cependant, d'autres études criblant la longévité de plusieurs dizaines d'espèces (Walters *et al.*, 2005; Nagel & Börner, 2010) ou se basant sur la perte de longévité après priming (Gurusinghe and Bradford, 2001) ne confirment pas cette corrélation. De la même façon, chez *A. thaliana*, la variabilité des RFO mesurée dans des graines issues d'une population de lignées recombinantes ne permet pas d'expliquer entièrement la variabilité dans leur longévité (Bentsink *et al.*, 2000; Clercx *et al.*, 2004a).

Les sucres solubles sont des molécules qui forment facilement une matrice vitreuse pendant le séchage (Roos, 1995). A partir de cette observation et en se basant sur les études citées ci-dessus montrant une corrélation entre longévité et oligosaccharides, il a été longtemps estimé que les sucres solubles non-réducteur présents dans les graines étaient les seuls responsables de l'état vitreux détecté dans les graines. Cependant, des observations sur la densité moléculaire des états vitreux chez *A. thaliana* et des modèles *in vitro* suggèrent que les matrices vitreuses au sein du cytoplasme sont nettement plus complexes et résulteraient plutôt d'un mélange de sucres (saccharose et oligosaccharides) et de polypeptides (Wolkers *et al.*, 1998; Buitink *et al.*, 2000b; Buitink & Leprince, 2004). Par ailleurs, par des méthodes biophysiques, Buitink *et al.*, (2000) ont pu démontrer, en manipulant la longévité des graines par *priming*, qu'il n'existait pas de lien entre les propriétés moléculaires des états vitreux, la teneur en oligosaccharides et la survie à l'état sec. Dès lors, les

questions de savoir si les sucres solubles jouent un rôle dans la longévité et quel rôle ils joueraient le cas échéant, ne sont pas encore résolues.

### 1.2.2 Protéines LEA

Le terme de LEA (Late Embryogenesis Abundant) a été introduit pour décrire des ARNm qui s'accumulaient fortement en fin de développement de graines de coton (Galau *et al.*, 1987; Galau & Hughes, 1987). Par la suite, les protéines LEA ont également été trouvées dans un grand nombre d'organismes autant procaryotes qu'eucaryotes (Garay-Arroyo *et al.*, 2000) : les bactéries *Deinococcus radiodurans* (Battista *et al.*, 2001) et *Bacillus subtilis* (Stacy & Aalen, 1998), la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Garay-Arroyo *et al.*, 2000), des arthropodes (Hand *et al.*, 2007), des nématodes (Browne *et al.*, 2002), des rotifères ou encore des cyanobactéries (Wise & Tunnacliffe, 2004; Hundertmark & Hincha, 2008; Leprince & Buitink, 2010). Chez les végétaux supérieurs, nous les rencontrons à la fois dans les structures végétatives et les organes reproducteurs tolérants à la dessiccation (Ingram & Bartels, 1996; Oliver & Bewley, 1997; Blomstedt *et al.*, 1998; Ramanjulu & Bartels, 2002). Cependant, plusieurs études montrent que ces protéines ne sont pas spécifiquement associées à la tolérance à la dessiccation. Certaines d'entre elles ont également été détectées dans les graines récalcitrantes (Bradford & Chandler, 1992; Finch-Savage *et al.*, 1994) ou dans les tissus végétatifs sensibles à la dessiccation mais tolérants à des stress osmotiques moins poussés (Boudet *et al.*, 2006; Tunnacliffe & Wise, 2007; Leprince & Buitink, 2010 pour revue). Dès lors la question de savoir si et comment les protéines LEA jouent un rôle spécifique dans la tolérance à la dessiccation n'est pas résolue. De la même façon, il existe très peu d'informations sur l'implication des protéines LEA dans la longévité des graines. D'un côté, Wechsberg *et al.* (1994) ont observé qu'il n'existait pas de corrélation entre la teneur en déhydrines et la longévité des graines de *Ranunculus sceleratus*. D'un autre côté, l'accumulation d'une protéine stable à la chaleur de 57 kDa et de nature inconnue mais supposée être une protéine LEA est corrélée avec l'augmentation de la longévité pendant le développement des graines de *Brassica campestris* (Sinniah *et al.*, 1998b).

#### a) Caractéristiques et classification des protéines LEA

Les protéines LEA sont des protéines de faible complexité et intrinsèquement désordonnées en solution (McCubbin *et al.*, 1985; Roberts *et al.*, 1993; Ceccardi *et al.*, 1994; Eom *et al.*, 1996; Soulages *et al.*, 2003; Wise & Tunnacliffe, 2004). De plus, elles contiennent un taux élevé de glycine (au moins 6% des acides aminés totaux) et une hydrophilicité élevée. L'ensemble de ces propriétés les rendent stables à la chaleur. En effet, en solution et à température élevée, les protéines LEA ne s'agrègent pas. Les protéines LEA sont aussi, pour certaines d'entre elles, appelées les « hydrophilines » (Garay-Arroyo *et al.*, 2000). Les algorithmes de prédiction de structure suggèrent qu'elles contiennent majoritairement des structures en hélices- $\alpha$  amphiphiles même s'il a été vérifié expérimentalement que les protéines LEA sont essentiellement non structurées à l'état hydraté (Dure 1993; Wise & Tunnacliffe, 2004; Grelet *et al.*, 2005). En fait, plusieurs études ont montré que, *in vitro*, la dessiccation

entraîne un changement de conformation avec formation d'hélices en diverses proportions allant de 40% à 90% (Haaning *et al.*, 2008).

Les protéines LEA ont été regroupées suivant différents classements (**tableau 1.2**), tout d'abord basés sur la similarité de séquences peptidiques (11 acides aminés) ((Dure *et al.*, 1989) : D7, D113, ...). Avec le nombre croissant des séquences publiées, d'autres classifications sous forme de 4-6 groupes plus ou moins homogènes ont été proposées, toutes basées sur l'homologie de séquences (Bray, 1994; Cuming, 1999). Deux autres types de classement ont ensuite été proposés : suivant POPP et PFAM. La classification POPP, ou Protein or Oligonucleotide Probability Profile, a été établie par Wise (2003) et est basée sur la probabilité de rencontrer des multiples de mono-, di ou tripeptides. La classification PFAM (Protein Families Database) comprenant 6 classes est basée sur le regroupement par homologie de certaines séquences d'un ou plusieurs domaines répétés. Nous utiliserons ce type de classement associé.

Le groupe comportant le nombre de gènes le plus important est LEA\_4. Ce groupe LEA comprend deux gènes (*EM6*, *EM1*) particulièrement bien étudiés dans la littérature (Tunnacliffe & Wise, 2007). Les membres des groupes LEA\_2 et LEA\_3 sont atypiques car les protéines sont plus hydrophobiques d'après leur index d'hydrophobicité (GRAVY) qui est d'environ 0 (Hundertmark & Hinch, 2008). Contrairement aux autres LEA, un cristal a pu être obtenu pour la protéine LEA14 d'*A. thaliana* et a été examiné par Singh *et al.* (2005b). L'analyse de sa structure a montré la présence de feuilletts  $\beta$ , ce qui suggère que ces protéines ne sont pas stables à la chaleur.

**Tableau 1.2.** Classification des protéines LEA (d'après Hundertmark and Hinch, 2008).

Pfam	Dure (1993)	Bray (1994)	Cuming (1999)	Signature
LEA_1 (PF03760)	D113	G4	G4	Séquence N-terminale conservée
LEA_2 (PF03168)	LEA14 ; D95	-	G5	
LEA_3 (PF03242)	LEA5 ; D73	-	-	
LEA_4 (PF02987)	D7	G3 et G5	G3	TA(K/Q)AAE(Q/D)K(T/A)XE
LEA_5 (PF00477)	D19	G1	G1	G-[EQ]-TVVPGGT
SMP (PF04927)	D34	G6	G5	
LEA_6 (PF10714)	-	-	-	
Déhydrin(PF00257)	D11	G2	G2	K = [KR]-[LIM]-K-[DE]-K-[LIM]-P-G Y = (V/T)DEYGNP S = S(5)-[DE]-x-[DE]-G-x(1,2)-G-x(0,1)-[KR]

La localisation des protéines LEA au sein de la cellule est diverse. La majorité été détectée dans le cytoplasme et/ou le noyau (Neven *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1993; Goday *et al.*, 1994; Godoy *et al.*, 1994; Houde *et al.*, 1995; Bracale *et al.*, 1997; Colmenero-Flores *et al.*, 1999). Certaines déhydrines semblent également localisées au niveau des structures membranaires (Egerton-Warburton *et al.*, 1997). Des protéines LEA ont également été détectées dans les chloroplastes (Schneider *et al.*, 1993). Une protéine LEA du groupe LEA\_4 (PsLEAm) a été localisée spécifiquement dans la matrice mitochondriale des graines de pois (Grelet *et al.*, 2005).

## b) Fonctions des protéines LEA

Depuis quelques années, de nombreuses études biochimiques *in vitro* et des approches de génétique inverse ont contribué à la compréhension des fonctions des protéines LEA. Ces fonctions sont multiples comme décrites ci-dessous. Souvent plusieurs fonctions sont attribuées à une même protéine LEA (Pour revue, Tunnacliffe & Wise, 2007; Tunnacliffe *et al.*, 2011).

Un des rôles les plus étudiés des protéines LEA est la protection de protéines modèles contre des stress thermo-mécaniques (Tunnacliffe *et al.*, 2011). Par exemple, CuCOR19, un membre du groupe des déhydrines, protège la catalase et la lactate déshydrogénase (LDH) de l'agrégation par le froid (Hara *et al.*, 2001). AtD113, une protéine du groupe LEA\_1, protège l'activité de la LDH au cours d'une déshydratation conduisant à une perte en eau de 99% (Reyes *et al.*, 2005). LjIDP1 (membre du groupe LEA\_3) prévient l'inactivation de la LDH et de la citrate synthase lors d'une lyophilisation ou après congélation (Haaning *et al.*, 2008). Cette capacité est également observée pour plusieurs membres du group LEA\_4. Ainsi LEAm mitochondriale est capable de conserver l'activité enzymatique de la fumarase et la rhodanèse lors d'un séchage (Grelet *et al.*, 2005), tandis que la protéine AavLEA1 de nématode anhydrobiote empêche l'agrégation de la citrate synthase et préserve cette dernière lors d'un chauffage (Goyal *et al.*, 2005a). Ces observations ont également été confirmées pour la protéine EM du groupe LEA\_5 (Goyal *et al.*, 2005b). Les mécanismes moléculaires permettant cette protection restent énigmatiques. Les deux hypothèses en vigueur sont : une action de chaperon moléculaire comme les HSP et une action de bouclier moléculaire. Mais ces hypothèses sont très débattues dans la littérature (Tunnacliffe & Wise, 2007).

Une deuxième fonction attribuée à un certain nombre de protéines LEA est l'interaction et la protection des membranes. *In vitro*, la protéine LEAm (LEA\_4) du pois maintient l'intégrité membranaire de liposomes lors du séchage en interagissant avec les phospholipides. (Tolleter *et al.*, 2007). Cette fonction n'est pas universelle pour toutes les LEA. En effet, EM6 (LEA\_5) et PM25 (SMP) de *M. truncatula* ont un effet déstabilisateur après séchage (Soulages *et al.*, 2002; Boucher *et al.*, 2010).

Les protéines LEA joueraient également un rôle dans les propriétés physico-chimiques de l'état vitreux à l'état sec (Wolkers *et al.*, 1999; Buitink & Leprince, 2004). Ainsi, ajoutée à une matrice de saccharose ou de raffinose, la protéine D7 (LEA\_4) du pollen *T. latifolia* ou la GmPM16 d'embryon de soja (LEA\_1) augmentent la température de transition vitreuse (T<sub>g</sub>) du système à l'état sec (Wolkers *et al.*, 1999; Shih *et al.*, 2004). De plus, au sein de cette matrice, D7 renforce le réseau de liaisons H avec le saccharose (Wolkers *et al.*, 1999) et modifie sa densité moléculaire. Des résultats similaires ont été obtenus pour la protéine LEA GmP16 (Shih *et al.*, 2004) ainsi que EM6 de *M. truncatula* (Boudet *et al.*, 2006).

Les déhydrines acides semblent également diminuer les effets toxiques des ions lors de la dessiccation (Alsheikh *et al.*, 2005). Par exemple, la VcaB45, une déhydrine vacuolaire du céleri et la

ERD14, une déhydrine de type SK2 d'*A. thaliana* séquestrent *in vitro* les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$  (Heyen *et al.*, 2002; Alsheikh *et al.*, 2003). Dans les deux cas, la séquestration des ions est régulée par l'état de phosphorylation de la protéine (Heyen *et al.*, 2002; Alsheikh *et al.*, 2003). De même, une déhydrine de type KS, localisée dans le phloème de ricin, possède la capacité de lier les ions  $\text{Fe}^{3+}$  *in vitro* (Krüger *et al.*, 2002). De par leur capacité à fixer le fer, les déhydrines de type KS pourraient empêcher la formation de ROS *via* la réaction de Fenton et ainsi jouer indirectement un rôle antioxydant (Hara *et al.*, 2003; Hara *et al.*, 2004).

Il reste à savoir si ces phénomènes observés *in vitro*, peuvent expliquer les phénotypes observés des plantes transgéniques surexprimant des gènes LEA. La plupart des études ont essentiellement testé si la surexpression d'une protéine LEA engendrait une tolérance accrue à des stress thermiques, hydriques, salins (pour revue, Leprince and Buitink, 2010). Par exemple, l'expression hétérologue des déhydrines CAP160 et CAP8 d'épinard chez le tabac n'entraîne pas une tolérance accrue des plantes au gel mais diminue les dégâts membranaires subis par la congélation des plantes (Kaye *et al.*, 1998). Par ailleurs, la surexpression de la déhydrine PMA80 du blé chez le riz augmente la tolérance aux stress osmotiques et salins (Cheng *et al.*, 2002). Pour le groupe LEA\_4, la surexpression du gène HVA1 du chou (homologue de CapLEA chez *M. truncatula*) améliore la croissance de plantes de diverses espèces soumises à des stress salins ou à des déficits hydriques (Xu *et al.*, 1996; Babu *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2006).

A notre connaissance, seulement deux études ont décrit l'effet de l'extinction d'un gène LEA avec un phénotype sur les graines. Chez *Arabidopsis*, des mutants déficients en *em6* (groupe LEA\_5) ont été isolés permettant d'obtenir un phénotype spécifiquement lié au développement des graines (Manfre *et al.*, 2006). Cette mutation n'est pas létale car les graines restent tolérantes à la dessiccation et germent à 100%. Cependant, dans ces graines mutantes, la tolérance à la dessiccation est acquise de manière plus précoce lors du développement (Manfre *et al.*, 2009). De plus, il a été observé qu'au sein des siliques de ces mutants, les graines subissent une dessiccation prématurée, suggérant que AtEM6 pourrait contrôler la perte en eau des graines (Manfre *et al.*, 2009). Une deuxième étude, mettant en évidence un phénotype au niveau des graines, implique les membres du groupe LEA\_1 (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010). L'analyse des lignées d'*Arabidopsis* surexprimant *AtLEA\_5* et les mutants d'insertion de ce gène montre que l'absence de cette protéine réduit le nombre des graines produites en condition d'irrigation normale. En condition de stress salin ou de déficit hydrique, la germination des graines déficientes en *AtLEA\_5* est affectée. De plus, la croissance de l'appareil végétatif est également affectée dans ces mutants déficients lors du recouvrement après le stress (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010).

### c) Régulation des protéines LEA

Bartels *et al.* (1988) ont démontré que l'accumulation de protéines LEA pouvait être induite par l'ABA dans des embryons immatures d'orge simultanément à l'induction de la tolérance à la dessiccation.

De plus, les gènes codant les protéines LEA sont également fortement induits pendant les stress abiotiques et dans les semences (Hundertmark & Hinch, 2008). L'effet inducteur de l'ABA tient de la présence du motif ABRE (ABA responsive élément) dans le promoteur de la plupart des gènes codant les protéines LEA. En effet, ces éléments *cis* jouent un rôle essentiel dans la voie de signalisation de l'ABA (Hundertmark & Hinch, 2008). Chez *Arabidopsis*, 69% de gènes LEA contiennent l'élément DRE/CRT/LTRE ((drought responsive/C-repeat/low temperature response). DRE/CRT sont des éléments régulateurs de l'expression des gènes en réponse aux faibles températures, au stress salin et au déficit hydrique mais pas à l'ABA. Cependant, tous les gènes LEA contenant ces éléments dans leurs promoteurs ne sont pas nécessairement inductibles par l'ABA et le froid (Hundertmark and Hinch, 2008).

Deux facteurs de transcription souvent cités comme régulant l'expression des gènes LEA sont *ABI3* et *ABI5* (Parcy *et al.*, 1994; Carles *et al.*, 2002). Chez les mutants *abi3*, certains gènes LEA sont sous-exprimés, tels que les deux membres du groupe LEA\_5 (*AtEm1*, *AtEm6*) et *RAB18* (déhydrine) (Parcy *et al.*, 1994). Cependant d'autres gènes LEA sont surexprimés : *COR47* (déhydrine) et *PAP51* (LEA\_1). D'autres facteurs de régulation importants permettant de réguler l'expression des LEA dans le temps et l'espace sont encore à mettre en évidence. En effet, certaines protéines LEA sont spécifiquement exprimées dans les graines et les plantes tolérantes à la dessiccation alors que d'autres sont préférentiellement exprimées dans les tissus végétatifs lors de stress osmotiques (Illing *et al.*, 2005; Boudet *et al.*, 2006).

### 1.2.3 Protéines de choc thermique (HSP)

Un autre type de protéines associées à la tolérance à la dessiccation chez les plantes sont les protéines de choc thermique (heat shock proteins, HSP). Les protéines HSP sont codées par des familles multigéniques. Elles sont divisées en plusieurs classes suivant leur poids moléculaire, à savoir les HSP110, les HSP90, les HSP70, les HSP60 et celles de bas poids moléculaires (15-30 kDa), les sHSP (Vierling, 1991). Elles ont été trouvées dans différents compartiments cellulaires, y compris les mitochondries et les chloroplastes. Les protéines HSP agissent comme des molécules chaperonnes en cas de stress. Elles se lient de façon transitoire et non covalente aux protéines et permettent à ces dernières de prendre une conformation qui les rendent fonctionnelles et qui leur évitent l'agrégation puis la dégradation (Craig *et al.*, 1993; Hendrick & Hartl, 1993). Les protéines sHSP s'accumulent dans les graines d'*Arabidopsis* (Wehmeyer & Vierling, 2000) et de tabac (Prieto-Dapena *et al.*, 2008) en lien avec la tolérance à la dessiccation. De plus, dans les mutants *abi3-1*, *abi3-6*, *fus3-3* et *lec1-2*, sensibles à la dessiccation, l'expression de la petite protéine *Athsp17.4* est très fortement réduite (Wehmeyer *et al.*, 1996; Wehmeyer & Vierling, 2000). Une partie des sHSP sont régulées dans les graines par le facteur de transcription de type HSF (Almoguera *et al.*, 2002). Chez le tabac, les graines de mutants surexprimant *HaHSFA9* du tournesol montrent une accumulation plus importante de protéines sHSP que les graines sauvages (Prieto-Dapena *et al.*, 2008). Les jeunes plantules transgéniques semblent nettement plus résistantes à un stress osmotique sévère (-20 MPa).

Cependant une dessiccation au-delà de -40 MPa entraîne la mort des plantules. Plus récemment, il a été montré que les graines transgéniques surexprimant une protéine mutée de HaHSF, induisant sa perte de fonction et une diminution importante des sHSP, ne présentaient pas de perte de tolérance à la dessiccation. Toutefois, ces graines transgéniques vieillissent plus vite lors d'une détérioration contrôlée à 50°C par rapport aux graines sauvages (Tejedor-Cano *et al.*, 2010).

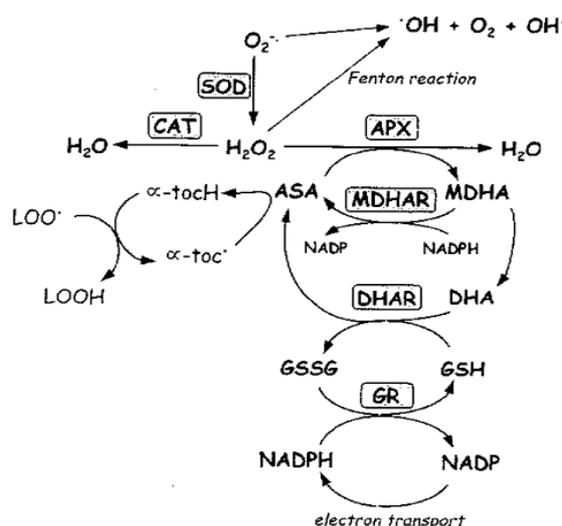
#### 1.2.4 Protection contre le stress oxydatif

Les cellules possèdent différents systèmes de protection cellulaire contre le stress oxydatif. Le stress oxydant survient lorsque des molécules oxydantes s'accumulent au-delà de la capacité antioxydante, entraînant ainsi une oxydation des principaux composants de la cellule tels que l'ADN, l'ARN, les protéines, les sucres et les lipides. En cas de stress biotiques et abiotiques, la réduction partielle de l'oxygène mène à la production d'une série de molécules telles que le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), peroxyde ( $RO_2^{\cdot}$ ), alkoxyde ( $RO^{\cdot}$ ) et hydroperoxyde ( $HO_2^{\cdot}$ ). Selon leur propriété physico-chimique, ces molécules très réactives entraînent la dégradation des composés cellulaires suivant des réactions radicalaires très complexes et peu connues (Hendry, 1993; Bailly, 2004). En ce qui concerne les protéines, les résidus soufrés (cystéines et méthionines) sont les acides aminés les plus sensibles à une oxydation par les ROS, entraînant la formation de ponts disulfures et de l'acide sulfénique (SOH) pour les cystéines, et des méthionines oxydées (Colville & Kranner, 2010). Ces oxydations ont généralement pour conséquence une perte de fonction des protéines. Cependant dans la plupart des cas, ces modifications sont réversibles par l'action des thiorédoxines et des méthionines sulfoxydes réductases. Des fonctions carbonyles (C=O) peuvent également apparaître, soit directement sur les chaînes latérales par modification de certains acides aminés (Ghezzi & Bonetto, 2003), soit indirectement par adduction de lipides ou par glycation (Requena *et al.*, 2003; Winger *et al.*, 2007). La carbonylation est irréversible et conduit à une dénaturation des protéines, qui seront ensuite dégradées.

Plusieurs travaux ont mis en évidence que la dessiccation des tissus sensibles au cours du développement et de la germination engendre des dégâts cellulaires dus à un stress oxydant (Pammenter & Berjak, 1999). Par exemple, la perte en eau des graines de châtaignier entraîne une production de superoxyde en concomitance avec la perte de la capacité germinative (Roach *et al.*, 2010). De la même façon, le séchage des graines d'*Avicennia marina*, également sensibles à la dessiccation, provoque des dégâts attribués à une attaque par les ROS (Greggains *et al.*, 2001). La perte de viabilité pendant la conservation des graines est largement attribuée à une oxydation des macromolécules. Rajjou *et al.* (2008) ont montré que la détérioration contrôlée des graines d'*Arabidopsis* induisant la mort des tissus induisait une carbonylation importante des protéines. La carbonylation est une oxydation irréversible des protéines qui sont alors dénaturées puis dégradées. Quand elle est massive, elle peut toutefois conduire à la formation d'agrégats insolubles et à la mort cellulaire (Dalle-Donne *et al.*, 2006). Elle peut être directe comme dans le cas des résidus Arg, Lys, Thr et Pro, carbonylés directement sous l'action des ROS (Möller *et al.*, 2007). Elle peut être indirecte par adduction de lipides oxydés (Cys, Lys et His) ou de glucides oxydés (Lys) (Nystrom, 2005; Möller

et al., 2007). Chez le blé, la perte de viabilité engendrée par un vieillissement accéléré, à 45°C et à 100% humidité relative est associée à une accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lehner et al., 2006). Chez le tournesol, la perte de viabilité pendant le stockage à 35°C est proportionnelle à l'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alors que la peroxydation des lipides, estimée par la quantité de malonyldialdéhyde (MDA), augmente progressivement une fois que la viabilité du lot de graines stockées descend en dessous de 50% (Kibinza et al., 2006). Cependant, cette tendance semble dépendre fortement de la teneur en eau à laquelle les graines ont été détériorées. Ceci a également été observé au cours de la détérioration des graines de haricot mungo (Murthy et al., 2003). Ces auteurs ont également montré que la présence de l'état vitreux influence fortement les cinétiques d'accumulation du MDA et autres molécules issues de la glycation des acides aminés. Mis à part leurs effets délétères, les ROS pourraient également jouer un rôle positif en intervenant comme molécule signal permettant de réguler la germination (Bailly et al., 2004; Oracz et al., 2007).

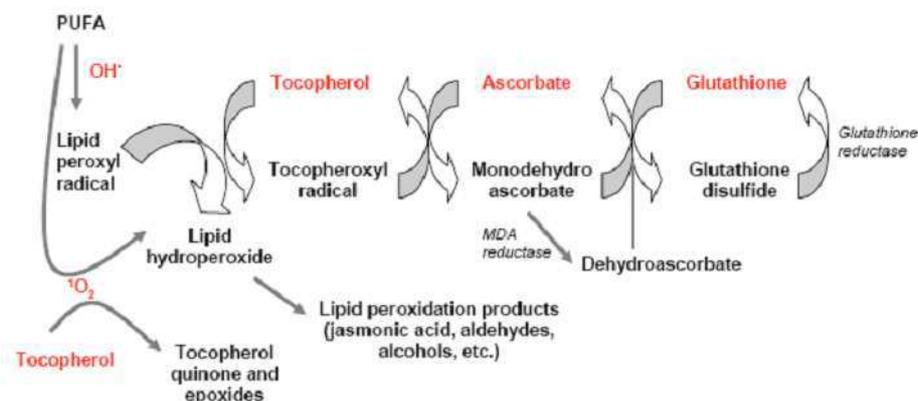
La cellule est capable d'éliminer les ROS au moyen de systèmes antioxydants mettant en jeu des réactions enzymatiques et non enzymatiques (**figure 1.9**).



**Figure 1.9.** Schéma décrivant les principaux systèmes antioxydants faisant intervenir une catalyse enzymatique chez les plantes (D'après Bailly, 2004). CAT, catalase ; SOD, superoxyde dismutase ; APX, ascorbate peroxydase ; MDHAR, monodéhydroascorbate réductase ; DHAR, déhydroascorbate réductase ; GR, glutathion réductase ; ASA, ascorbate ; MDHA, monodéhydroascorbate ; DHA, déhydroascorbate ; GSSG, glutathion oxydé ; GSH, glutathion réduit ;  $\alpha$ -tocH,  $\alpha$ -tocophérol ;  $\alpha$ -toc  $\alpha$ -tocophoryl ; LOOH, lipide peroxydé ; LOO<sup>•</sup>, peroxyde radicalaire au sein d'une chaîne aliphatique d'acide gras.

La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la dismutation du superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>. Le peroxyde d'hydrogène est réduit en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub> par la catalase (CAT) ou par diverses peroxydases telles l'ascorbate peroxydase (APX) en présence d'ascorbate (ASA), la glutathion peroxydase en présence de glutathion, et des peroxydases pariétales. Les enzymes contrôlant l'état redox de l'ascorbate et du glutathion sont la glutathion réductase (GR), l'ascorbate réductase (AFRR) et la déhydroascorbate réductase (DHAR). L'activité de ces enzymes diffère suivant les espèces et le stade de développement des graines (Bailly et al., 2001; De Gara et al., 2003; Lehner et al., 2006). L'activité des enzymes antioxydantes est très fortement augmentée en cas de stress hydrique (Ingram & Bartels, 1996; Ramanjulu & Bartels, 2002). Une étude transcriptomique chez *M. truncatula* a montré

que l'induction de la tolérance à la dessiccation dans des graines germées sensibles induit la surexpression des gènes codant pour ces systèmes oxydants (Buitink *et al.*, 2006). Cependant, dans les tissus sensibles à la dessiccation comme les graines récalcitrantes, une forte augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes a été montrée au cours du séchage avant la perte de viabilité (Pukacka & Ratajczak, 2006). Le lien précis de cause à effet entre l'acquisition de la tolérance à la dessiccation et l'activité de ces systèmes antioxydants n'est pas encore résolu (Bailly *et al.*, 2001; Garnczarska *et al.*, 2009). De la même façon, de nombreux travaux ont porté sur l'impact d'un vieillissement accéléré sur les systèmes enzymatiques (Kibinza *et al.*, 2006; Lehner *et al.*, 2006). Toutefois, Buitink et Leprince (2004) ont suggéré que la présence de l'état vitreux et/ou la faible teneur en eau pourrait inhiber l'activité de ces enzymes dans les graines sèches. A ce jour, aucun lien n'a également pu être montré entre l'acquisition de la longévité et les systèmes antioxydants.



**Figure 1.10.** Schéma décrivant l'arrêt de la propagation de la peroxydation des lipides par les tocophérols réduits et leur régénération en présence d'ascorbate et de glutathion (D'après Munne-Bosch *et al.*, 2005).

Il existe aussi des molécules antioxydantes comme le glutathion, les caroténoïdes et les tocophérols (**figure 1.10**). Les deux derniers étant liposolubles, ils ont la propriété de stopper les réactions radicalaires entraînant la dégradation des lipides (Munne-Bosch, 2005). Les tocophérols sont principalement dans les membranes des plastes et dans les plastoglobules. Chez *Arabidopsis*, des mutants déficients en tocophérols ont été caractérisés (Méne-Saffrané *et al.*, 2010). Les graines sont tolérantes à la dessiccation et accumulent des lipides peroxydés pendant la maturation. En revanche, elles ont une longévité diminuée par rapport aux graines sauvages, suggérant que l'oxydation des macromolécules est une des causes de la détérioration des graines.

### 1.2.5 Régulation du métabolisme

Lors de la dessiccation des graines, le métabolisme est fortement ralenti (Vertucci & Farrant, 1995; Pammenter & Berjak, 1999). Afin de limiter tout stress oxydant lié à la perturbation des chaînes transporteuses d'électrons, une hypothèse a été émise selon laquelle le métabolisme énergétique des semences tolérantes serait réprimé progressivement de façon régulée et réversible avant ou pendant le séchage (Leprince *et al.*, 1994; Leprince & Hoekstra, 1998; Pammenter & Berjak, 1999). La production de  $CO_2$  dans les racines de pois et de concombre devenues sensibles à la dessiccation

pendant l'imbibition des graines est nettement supérieure à celle de radicules germées encore tolérantes à la dessiccation (Leprince *et al.*, 2000). Pour une même teneur en eau, le métabolisme des semences orthodoxes est plus faible que celui de semences récalcitrantes (Espindola *et al.*, 1994; Leprince *et al.*, 1999; Pammenter & Berjak, 1999). La répression contrôlée du métabolisme énergétique pourrait non seulement intervenir pour limiter des processus de production des ROS, mais également empêcher l'autodigestion des lipides ou induire le métabolisme fermentatif (Leprince & Hoekstra, 1998). Les tissus intolérants à la dessiccation se caractérisent par une augmentation de la vitesse de synthèse de l'acétaldéhyde et de l'éthanol avant la perte de l'intégrité des membranes (Leprince *et al.*, 2000). Ce phénomène n'est pas observé dans les radicules tolérantes à la dessiccation. Cependant, à l'heure actuelle, les mécanismes de régulation du métabolisme et de répression coordonnée en lien avec la tolérance à la dessiccation n'ont pas encore été élucidés.



## Chapitre 2

# Caractérisation de la maturation des graines de *Medicago truncatula*



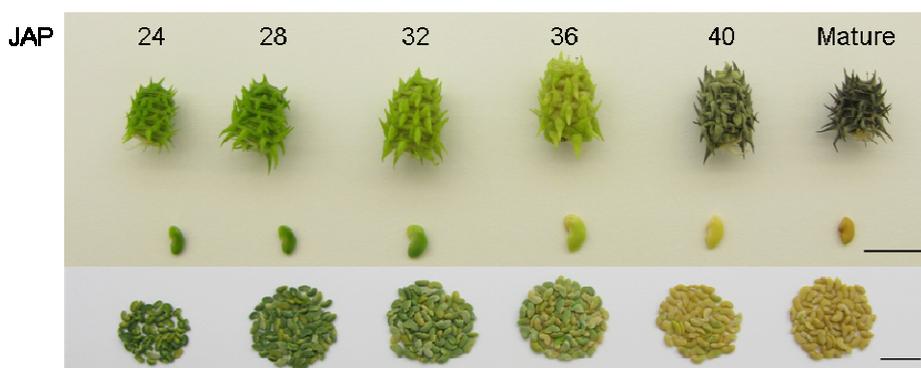
Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 1, l'aptitude à la germination, la tolérance à la dessiccation, la longévité des graines et, le cas échéant, la dormance s'acquièrent progressivement pendant la seconde moitié du développement. Cependant, la chronologie de ces événements varie selon les espèces, les conditions de culture du porte-graines et l'abscission des fruits (Probert *et al.*, 2007). C'est pourquoi, l'objectif de ce chapitre est de caractériser finement, chez *Medicago truncatula*, l'acquisition de la tolérance à la dessiccation et la conservation des graines à l'état sec en les positionnant notamment par rapport au remplissage de la graine, la dessiccation de celle-ci *in planta* et l'abscission de la gousse. Une fois ces processus caractérisés, nous avons déterminé, au plan biochimique, la chronologie de la mise en place de deux mécanismes connus pour être impliqués dans la survie à l'état sec, à savoir l'accumulation des sucres solubles non-réducteurs et la capacité à tolérer des stress oxydants (voir introduction). En effet, les données exhaustives qui existent à propos de ces mécanismes, notamment chez les modèles génomiques *M. truncatula* (Djemel *et al.*, 2005; Benedito *et al.*, 2008) et *Arabidopsis thaliana* (Fait *et al.*, 2006; Angelovici *et al.*, 2010), ne permettent pas de déduire comment la mise en place de ces mécanismes de protection est corrélée soit avec la tolérance à la dessiccation soit avec la longévité des graines. Pour la plupart des mesures, cette étude a été effectuée sur trois cultures successives en chambre de culture dans des conditions contrôlées de lumière, de température et d'apports azotés afin de s'affranchir de l'effet de l'environnement sur la physiologie du porte-graines.

## RESULTATS

### 2.1 Caractérisation de la maturation des graines

Le développement des graines a été suivi quotidiennement en fonction de l'âge des gousses, déterminé par la date de marquage des fleurs pollinisées. Les gousses immatures ont été récoltées directement sur la plante-mère. Les gousses qui se détachent spontanément de la plante par simple toucher du doigt correspondent au stade « abscission ». Celles tombées ont été considérées comme contenant des graines matures. Après dégoussage, les graines ont été réparties en trois lots. Le premier lot a été congelé dans l'azote liquide. Les deux autres ont servi à mesurer les masses fraîches et sèches des graines, la teneur en sucres, l'activité de certains systèmes antioxydants, l'état de carbonylation des protéines, ainsi que la tolérance à la dessiccation et la longévité des graines après séchage rapide. Une étude préalable réalisée au laboratoire avait permis de montrer que le pouvoir germinatif de la graine est acquis dès 14 jours après pollinisation. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés aux graines âgées de plus de 20 jours, soit la seconde moitié du développement pour le génotype Jemalong.

La **figure 2.1** montre l'aspect des gousses et graines récoltées entre 24 et 48 jours après pollinisation (JAP).

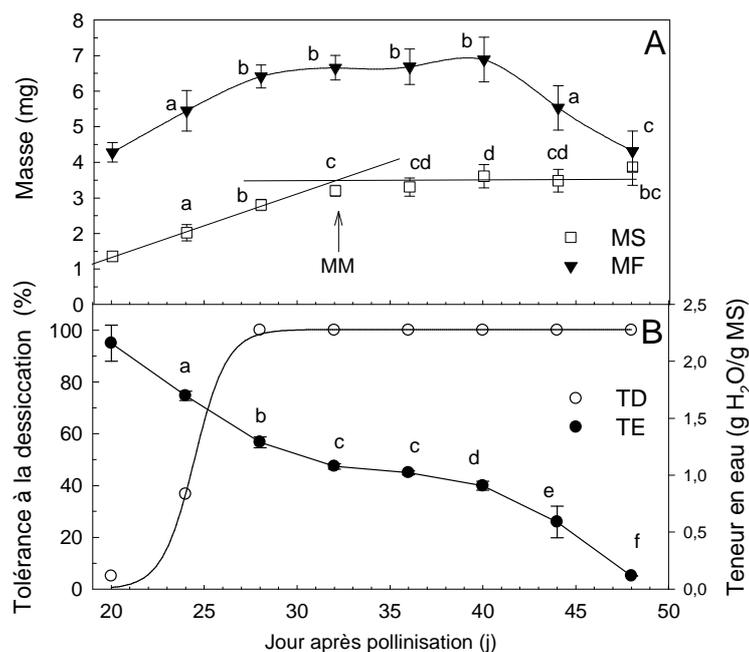


**Figure 2.1.** Gousses et graines de *Medicago truncatula* récoltées au cours de la maturation à partir de 24 JAP (jours après pollinisation). La barre représente 1 cm.

Les gousses et graines restent vertes jusqu'à 32 JAP (**figure 2.1**). Ensuite, les graines perdent progressivement leur chlorophylle. Le séchage rapide, qui amène en moins d'un jour la teneur en eau (TE) à des valeurs similaires à celle de la graine mature, ne semble pas entraîner de différence importante de couleur par rapport aux graines non séchées, les graines immatures restant plus vertes que les graines matures. Cela indique que le séchage rapide « fixe » le stade de développement au moment du prélèvement de la graine. L'abscission de la gousse intervient entre 42-44 JAP.

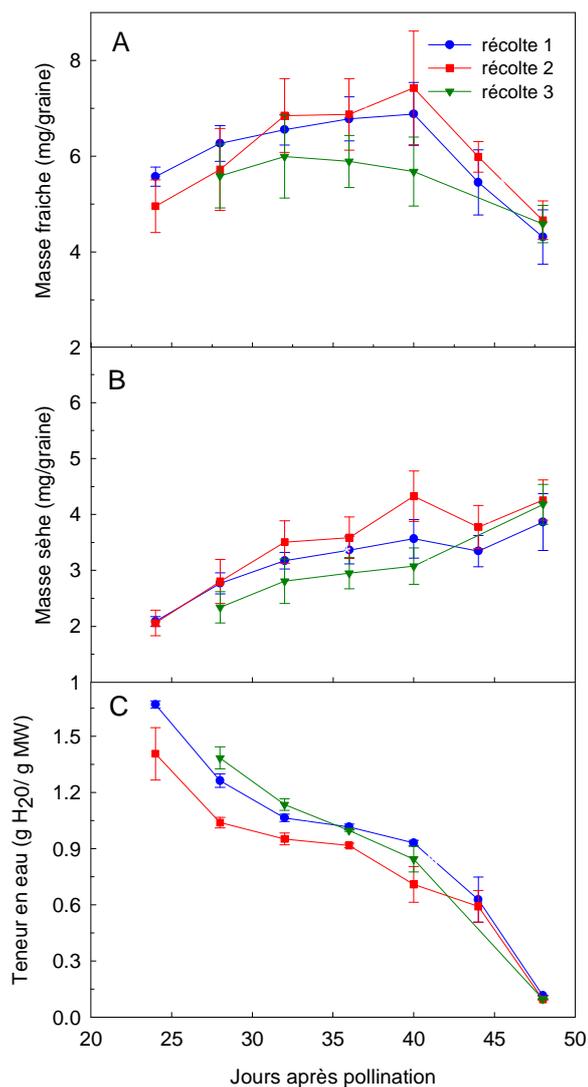
### 2.1.1. Remplissage et dessiccation de la graine

L'évolution des masses fraîches et sèches et de la teneur en eau au cours du développement des graines de la première culture est montrée dans la **figure 2.2**. Entre 24 et 32 JAP, la masse des graines augmente indiquant qu'elles sont en phase de remplissage. La maturité de masse, correspondant à la fin du remplissage, a été déterminée selon le modèle de Pepler *et al.* (2006). Pour ce faire, nous avons calculé par itération deux droites de régression (**figure 2.2A**). La première relie les masses significativement différentes pendant le remplissage et la seconde relie les masses non significativement différentes en fin de développement. Le point d'intersection de ces droites correspond à la maturité de masse. Cette dernière est de 32 JAP pour la culture 1. La teneur en eau diminue constamment pendant la période étudiée (**figure 2.2B**) passant de 1,7 g d'H<sub>2</sub>O/g MS à 24 JAP à 0,12 g d'H<sub>2</sub>O/g MS à 48 JAP. La masse fraîche diminuant significativement à 44 JAP, nous en déduisons que la phase de dessiccation débute à partir de 40 JAP, lorsque les graines ont atteint une teneur en eau de 1 g d'H<sub>2</sub>O/g MS (soit 50% par rapport au poids frais). Cette valeur concorde avec les données obtenues sur la majorité des légumineuses étudiées (Ellis *et al.*, 1987) et correspond à l'abscission de la gousse.



**Figure 2.2. A)** Evolution de la masse fraîche (MF) (▼) et de la masse sèche (MS) (□) pendant la maturation de graines de *M. truncatula*. La maturité de masse (MM) est le point d'intersection entre la phase ascendante de la masse sèche et le plateau après le remplissage (Pepler *et al.*, 2006). **B)** Acquisition de la tolérance à la dessiccation (○) et évolution de la teneur en eau (exprimée en g H<sub>2</sub>O/g MS) (●). Les graines sont considérées comme tolérantes à la dessiccation lorsqu'elles germent après avoir été séchées (20°C et 44% HR) et réimbibées. Les données représentent la moyenne et l'écart-type de 5 réplifications biologiques. Une analyse ANOVA suivie d'un test des étendues multiples ont été effectués afin de déterminer les niveaux de significativité obtenus, les lettres indiquant les groupes homogènes ( $P < 0.05$ ). Pour la tolérance à la dessiccation, les valeurs sont significativement différentes lorsqu'elles montrent plus de 22% d'écart ( $\chi^2$ ,  $P = 0,05$ ).

Ces mesures ont été répétées sur deux cultures indépendantes et comparées avec les données issues de la première culture afin de tester si la maturité de masse et la phase de dessiccation sont reproductibles (**figure 2.3**). Globalement, nous constatons que l'évolution des masses fraîches et sèches est identique entre les différentes expériences (**figure 2.3A,B**). Bien que les vitesses de remplissage soient différentes d'une culture à l'autre, la maturité de masse des graines issues de la culture 2 est atteinte à 32 JAP, comme pour la culture 1. En revanche, les données de masses sèches des graines de la culture 3 ne nous permettent pas de calculer avec précision la maturité de masse. A 48 JAP, le poids sec des graines matures est identique d'une culture à l'autre et est d'environ 4 mg. L'évolution de la teneur en eau présente un profil similaire pour les 3 cultures (**figure 2.3C**). Cependant, à l'abscission des gousses (40 JAP), les teneurs en eau des graines sont significativement différentes entre les trois cultures, alors qu'à 48 JAP ces différences se sont estompées.



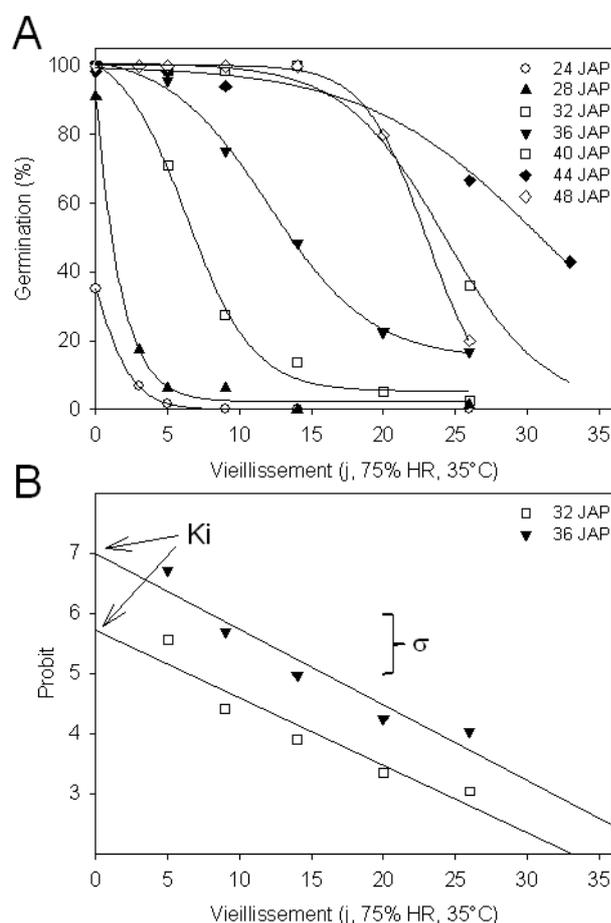
**Figure 2.3.** Evolution des masses fraîche (A), sèche (B) et de la teneur en eau (C) pour la culture 1 (●, bleu, données de la figure 2.2), culture 2 (□, rouge) et culture 3 (▼, vert). La masse fraîche et la masse sèche ont été déterminées sur des graines fraîchement récoltées. Les données représentent la moyenne de 5 répétitions. Les barres correspondent à l'écart type.

### 2.1.2 Acquisition de la tolérance à la dessiccation et la longévité

La tolérance à la dessiccation a été déterminée sur les graines récoltées à différents stades de maturation au cours de la culture 1. Après dégoussage, les graines ont été séchées rapidement sous flux d'air à 43% HR pendant 3 jours à l'obscurité. Les graines qui germent sont considérées comme tolérantes à la dessiccation. A 20 JAP, aucune graine ne tolère le séchage. Ensuite, la tolérance s'acquiert progressivement jusqu'à 28 JAP (**figure 2.2B**).

Pour tester la longévité, les graines immatures séchées et les graines matures ont été équilibrées à 75% d'humidité relative (HR) et 35°C pendant une période allant jusqu'à 33 jours. Ces conditions sont suffisamment défavorables pour entraîner un vieillissement rapide des graines sans trop s'éloigner des conditions naturelles de conservation (Buitink, données non publiées). Une partie des graines est ensuite prélevée au cours du stockage et la germination est testée. Nous obtenons

ainsi des courbes de perte de viabilité au cours du temps (**figure 2.4A**). Le lot de graines âgées de 24 JAP est partiellement tolérant à la dessiccation. En effet, le pourcentage de germination est de 36% avant stockage. Celui-ci décroît ensuite rapidement pendant les 5 premiers jours de conservation. Les graines âgées 28 JAP, tolérantes à la dessiccation, perdent également très vite leur viabilité. Après 3 jours de stockage, le pourcentage de germination n'est plus que de 17%. Ensuite, nous constatons que l'aptitude à la conservation des graines immatures augmente fortement de 32 à 44 JAP. Par exemple, le temps nécessaire de conservation pour obtenir 50% de mortalité passe de 14 jours pour les graines 36 JAP à environ 30 jours pour les graines 44 JAP. Nous observons qu'en fin de maturation, les graines âgées de 48 JAP vieillissent plus vite que celles âgées de 44 JAP. Ainsi, après 26 jours de conservation, les pourcentages de germination sont de 22 et 66% pour les graines âgées respectivement de 48 et 44 JAP.



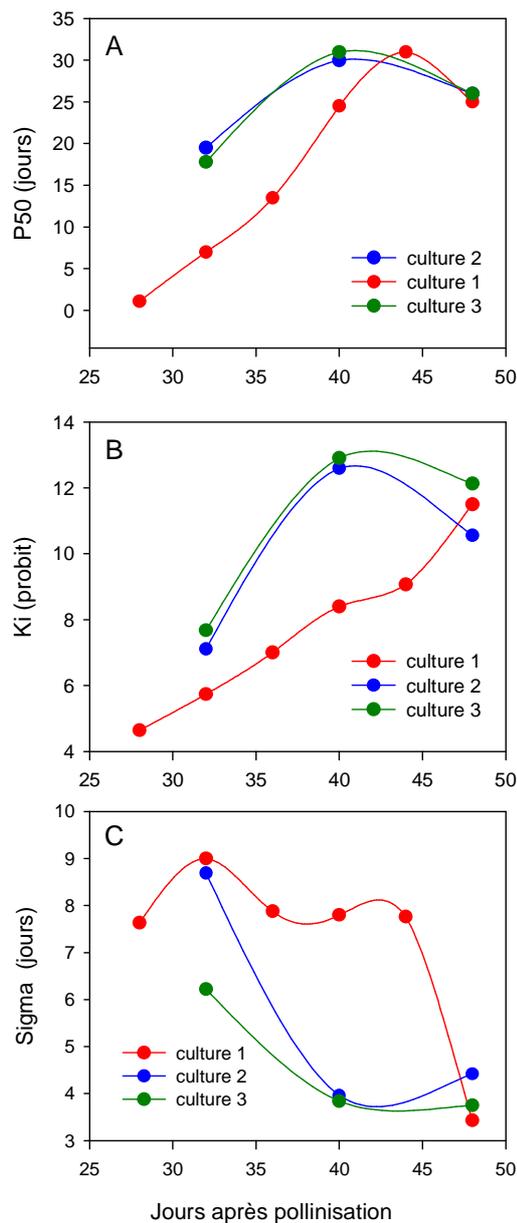
**Figure 2.4.** Evolution de la viabilité des graines immatures et matures au cours du stockage à 75% HR et 35°C. **A**) Pourcentage de germination après x jours de vieillissement pour les différents stades étudiés, 24(○), 28 (▲), 32 (□), 36 (▼), 40 (◻), 44 (Abscission) (◆) et 48 JAP (graines matures) (◇). Les données sont significatives lorsqu'elles montrent plus de 22% d'écart (LSD : Least square deviation) ( $\chi^2$ , P=0,05). **B**) Relation entre temps de conservation et % de viabilité exprimés en probit selon Ellis and Roberts (1980) montrant comment sont déterminés les paramètres  $\sigma$  (correspondant au temps de conservation nécessaire pour diminuer la viabilité d'une valeur d'un probit) et la qualité initiale  $K_i$  (correspondant à l'extrapolation de viabilité au temps 0 de conservation).

Une deuxième étude a été effectuée pour les deux autres cultures avec des graines âgées de 32 JAP, 40 JAP et 48 JAP. Les résultats obtenus sont comparables (données non montrées). Les courbes de vieillissement au cours du stockage confirment que les graines âgées de 48 JAP vieillissent plus vite que des graines immatures 40 JAP.

Afin de mieux rendre compte de l'effet du stade de développement des graines sur leur longévité, nous avons modélisé la perte de viabilité selon 2 modalités :

- une courbe sigmoïde négative de 3<sup>e</sup> ordre (**figure 2.4A**) dont l'équation permet de calculer le P50, correspondant au temps de stockage nécessaire pour diminuer le pourcentage de germination à 50%,
- modélisation selon Ellis et Roberts (1980) (**figure 2.4B**). Dans ce cas, les pourcentages de germination sont convertis en probit. Pour ce faire, il faut considérer que la distribution des mortalités dans le temps correspond à une loi normale inverse. La relation entre temps de conservation et probit est linéaire et permet alors, par régression linéaire, d'obtenir la valeur des paramètres  $\sigma$  (temps nécessaire pour diminuer le pourcentage de germination d'une valeur d'un écart-type pendant le stockage) et  $K_i$  (correspondant à l'extrapolation de l'équation à l'axe des ordonnées).  $\sigma$  rend compte de la vitesse de vieillissement tandis que  $K_i$  correspond à la qualité initiale avant vieillissement (Ellis & Roberts, 1980).

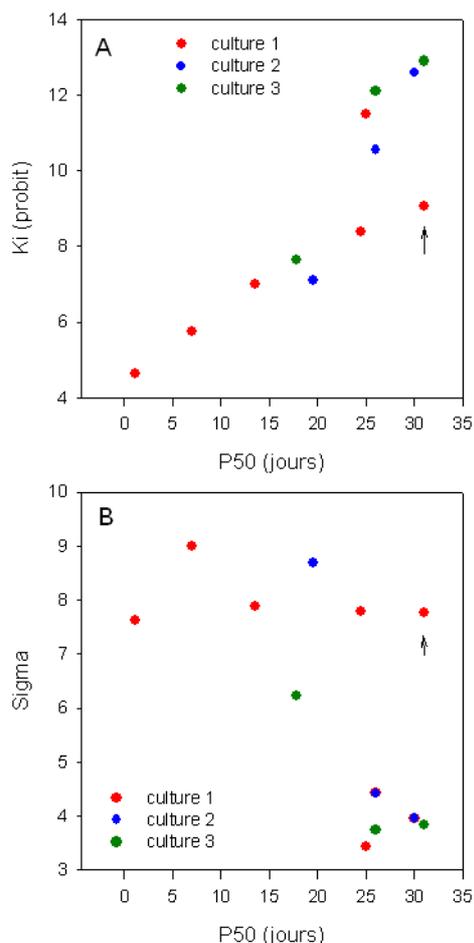
Pour chacune des 3 cultures, les valeurs de P50 sont montrées dans la **figure 2.5A** tandis que les valeurs du  $K_i$  et  $\sigma$  sont présentées dans la **figure 2.5B** et **2.5C** respectivement. Pour la culture 1, la valeur du P50 des graines récoltées entre 24 et 44 JAP (abscission) augmente d'environ 30 fois, puis diminue de 1,3 fois à 48 JAP. Par ailleurs, les graines des cultures 2 et 3 acquièrent leur longévité plus rapidement que celles de la culture 1. Ainsi, les valeurs de P50 à 32 JAP sont 2 fois plus élevées pour les graines de la culture 1 par rapport aux 2 autres expériences. Cependant, l'influence de la culture sur la longévité n'est plus visible chez les graines âgées de 48 JAP. Les données de longévité modélisées selon Ellis et Roberts (1980) montrent que la valeur de  $K_i$  (qualité initiale du lot) augmente tout au long du développement de la graine (**figure 2.5B**). Cette augmentation dépend également des conditions de culture. Les valeurs de  $\sigma$  fluctuent également à la fois en fonction de l'âge de la graine et de la culture (**figure 2.5C**). Cependant, le point commun entre ces conditions semble être une forte diminution de  $\sigma$  en fin de maturation, dès 40 JAP pour les cultures 2 et 3 et à 48 JAP pour la culture 1.



**Figure 2.5.** Evolution du P50 (A) et des paramètres Ki (B) et Sigma (C) déterminés à partir du modèle de Ellis et Roberts (1980) (voir figure 2.4B) au cours de la maturation des graines issues de 3 cultures indépendantes.

Il était intéressant de déterminer s'il existait une relation entre les valeurs de P50, Ki et  $\sigma$ . La **figure 2.6A** suggère qu'il puisse exister une relation proportionnelle entre le P50 et le Ki. En revanche, il ne semble pas y avoir de corrélation entre P50 et  $\sigma$  bien que ces deux paramètres soient des indicateurs de la vitesse de vieillissement (**figure 2.6B**). Cela pourrait provenir d'un manque de robustesse statistique du modèle de Ellis utilisé dû à un nombre de points de mesure trop faible tout au long du vieillissement qui entraîne une erreur importante sur  $\sigma$ .

En conclusion, ces résultats montrent que la longévité de la graine est progressivement acquise au cours des phases tardives de la maturation et dépend des conditions de culture.



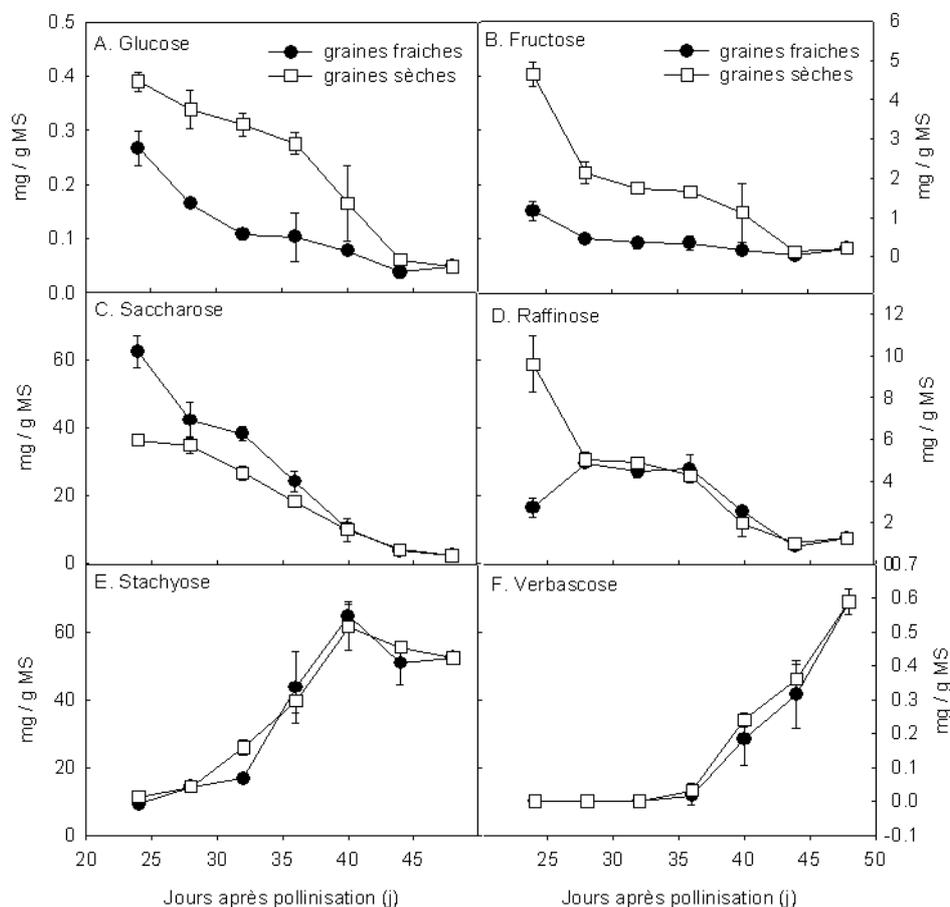
**Figure 2.6.** Relation entre P50 et les valeurs de Ki (A) et sigma (B) déterminées sur les graines immatures et matures issues des 3 cultures étudiées. La flèche indique le point d'abscission des gousses pour la culture 1.

## 2.2 Evolution de la teneur en sucres solubles au cours de la maturation

Selon Djemel *et al.* (2005) et Rosnoblet *et al.* (2007), les sucres solubles identifiés dans les graines de *M. truncatula* au cours de leur développement sont des hexoses (glucose et fructose) en faibles quantités, du saccharose et des oligosaccharides de la famille du raffinose (raffinose, stachyose, verbascose). Dans ce travail, nous avons tout d'abord voulu préciser l'évolution de la teneur de ces sucres pendant la seconde phase du développement des graines fraîches issues de la culture 1 et tester l'influence du séchage prématuré. Ensuite, nous décrivons l'évolution des sucres dans les graines séchées prématurément au cours de leur développement en comparant les 3 cultures.

Le glucose et le fructose, peu représentés dans les phases de développement étudiées ici, voient leur teneur dans les graines fraîches diminuer progressivement entre 24 JAP et 48 JAP, allant de 0,27 à 0,05 mg/g MS pour le glucose et de 1,2 à 0,2 mg/g MS pour le fructose (**figure 2.7A et B**). Entre 24 et 40 JAP, le séchage entraîne une augmentation de ces hexoses de 2 à 4 fois. Pour ces graines immatures sèches, la teneur en hexose est donc nettement plus importante que pour les graines séchées *in planta*. Le contenu en saccharose diminue également fortement dans les graines fraîchement récoltées entre 24 et 36 JAP (**figure 2.7C**), comme l'avait auparavant observé Rosnoblet

*et al.* (2007) pour le génotype R108. A ces stades, un séchage prématuré induit une diminution de ce sucre de manière proportionnelle à l'âge de la graine. Ainsi, près de la moitié du saccharose disparaît pendant le séchage des graines 24 JAP, alors qu'à 36 JAP, cette diminution n'est plus que le quart de la valeur avant séchage. A 40 JAP, le séchage ne semble plus affecter la teneur en saccharose.

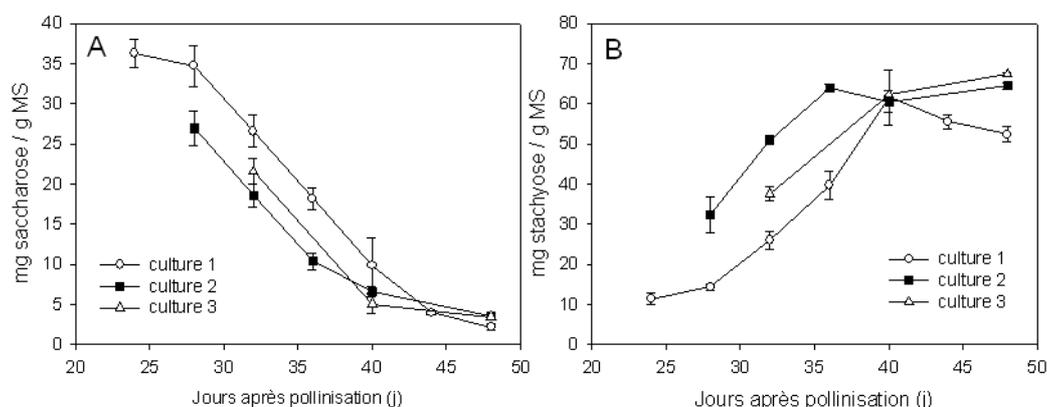


**Figure 2.7.** Évolution de la teneur en glucose (A), fructose (B), saccharose (C), raffinose (D), stachyose (E) et verbascose (F) dans les graines avant (●) et après séchage prématuré (□) au cours du développement. Les graines sont issues de la culture 1. La quantité en sucres est exprimée en mg de sucres par g de MS. Les valeurs représentent la moyenne de 5 réplifications biologiques ( $\pm$  écart-type).

Chez *M. truncatula*, le stachyose représente plus de 95% des oligosaccharides totaux. En accord avec Rosnoblet *et al.* (2007), sa teneur augmente progressivement au cours de la maturation et atteint une valeur palier d'environ 60 mg/g MS dans les graines fraîchement récoltées dès 36 JAP (**figure 2.7E**). Contrairement au mono- et disaccharides, le séchage n'a aucun effet sur la teneur en stachyose, quelque soit l'état de maturité de la graine. Des résultats similaires ont été obtenus pour le verbascose (**figure 2.7F**). Le raffinose, précurseur du stachyose et verbascose, voit son contenu diminuer progressivement au cours de la maturation (**figure 2.7D**). Mise à part le stade 24 JAP, le séchage n'a également aucune influence.

Etant donné que l'acquisition de la longévité pendant le développement des graines varie selon la culture du porte-graines, il était intéressant de comparer les profils d'évolution des sucres dans les graines des cultures 2 et 3 séchées prématurément et qui ont également servi aux expériences de vieillissement (**figure 2.5A**). Seules les teneurs en saccharose et en stachyose varient

en fonction des cultures et sont présentées dans la **figure 2.8**. Ainsi la diminution en saccharose débute plus tôt dans les graines issues des cultures 2 et 3 par rapport à la culture 1 (**figure 2.8A**). Cependant, nous ne notons pas de différence significative entre les graines en maturation provenant des cultures 2 et 3. De manière intéressante, la vitesse à laquelle le saccharose diminue au cours du temps semble identique pour les 3 cultures. A partir de 40 JAP, nous n'observons plus de différence significative entre les graines des différentes cultures. L'augmentation du contenu en stachyose débute également plus tôt dans les graines immatures issues des cultures 2 et 3 (**figure 2.8B**). Contrairement au saccharose, nous observons toutefois des différences significatives dans les profils d'accumulation pour les 3 cultures, concrétisées sous forme d'un décalage de 4 à 5 jours pour chacun des profils. A 40 JAP, toutes les graines ont une teneur en stachyose équivalente à 60 mg/g MS. Ensuite, celle-ci se stabilise dans les graines en fin de maturation des cultures 2 et 3 contrairement à celle de la culture 1 pour laquelle la teneur en stachyose diminue de 15%.



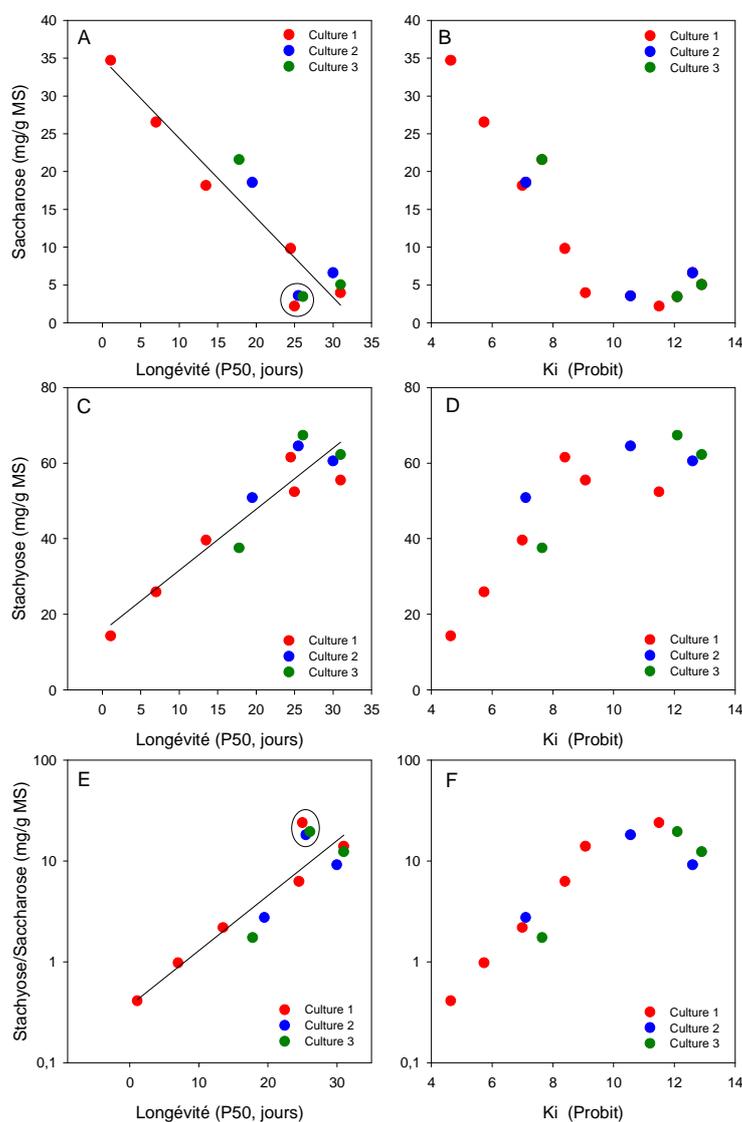
**Figure 2.8.** Comparaison de l'évolution de la teneur en saccharose (**A**) et stachyose (**B**) dans les graines après séchage prématuré au cours du développement en fonction de la culture. La quantité en sucres est exprimée en mg de sucres par g de MS. Les valeurs représentent la moyenne de 3-5 réplifications biologiques ( $\pm$  écart-type).

Au vu de ces résultats, il était intéressant de vérifier si les profils des teneurs en saccharose et stachyose étaient corrélés à l'acquisition de la longévité (P50 et Ki) des graines séchées pendant la maturation pour les données des 3 cultures. Pour ce qui concerne les valeurs de P50, la **figure 2.9** montre qu'il existe une relation linéaire significative négative ( $r=-0.957$ ,  $N=15$ ,  $P=0.000000$ ) avec le saccharose, et positive ( $r=0,952$ ,  $N=15$ ,  $P=0.000000$ ) avec le stachyose quelque soit la culture, suggérant que la régulation du métabolisme de ces sucres et l'acquisition de la longévité sont couplées. Cependant, leurs teneurs ne rendent pas compte de la diminution de l'aptitude au stockage des graines récoltées après abscission. En effet, si nous retirons les valeurs des sucres dosés dans les graines après abscission (cercle **figure 2.9A**), le coefficient de corrélation augmente à 0,983 mais la pente de la droite n'est pas modifiée. Ceci est confirmé lorsque nous exprimons la teneur en saccharose en fonction du Ki (**figure 2.9B**). En effet, il est facile d'imaginer une relation linéaire entre le saccharose et le Ki lorsque les valeurs de ce dernier sont inférieures à 9. Au delà de 9, l'augmentation du Ki n'est plus reliée au contenu en saccharose.

En ce qui concerne le stachyose, des résultats aux tendances similaires à ceux du saccharose ont été obtenus, avec un coefficient de corrélation montrant que plus la longévité

augmente et plus la teneur en stachyose est élevée (**figure 2.9C,D**). Cependant, les nuages de point pour des valeurs de P50 et Ki respectivement supérieures à 25 et 8, rendent difficile une interprétation plus poussée des résultats sous forme d'un modèle linéaire.

Le saccharose étant un des 2 précurseurs de la synthèse du stachyose, il est intéressant de voir s'il existe une relation entre le ratio massique stachyose/saccharose et la longévité. La **figure 2.9E** montre que nous pouvons modéliser une relation linéaire de type exponentielle entre le P50 et le ratio stachyose/saccharose ( $r=0.937$ ,  $N=15$ ,  $P=0.000000$ ). Cependant, les valeurs obtenues pour les graines matures (cercle **figure 2.9E**) semblent s'écarter de cette tendance. Lorsque la longévité est exprimée en Ki, la relation logarithmique avec le ratio stachyose/saccharose suggère également l'implication de ces deux facteurs dans la longévité, tel que décrit pour le saccharose.



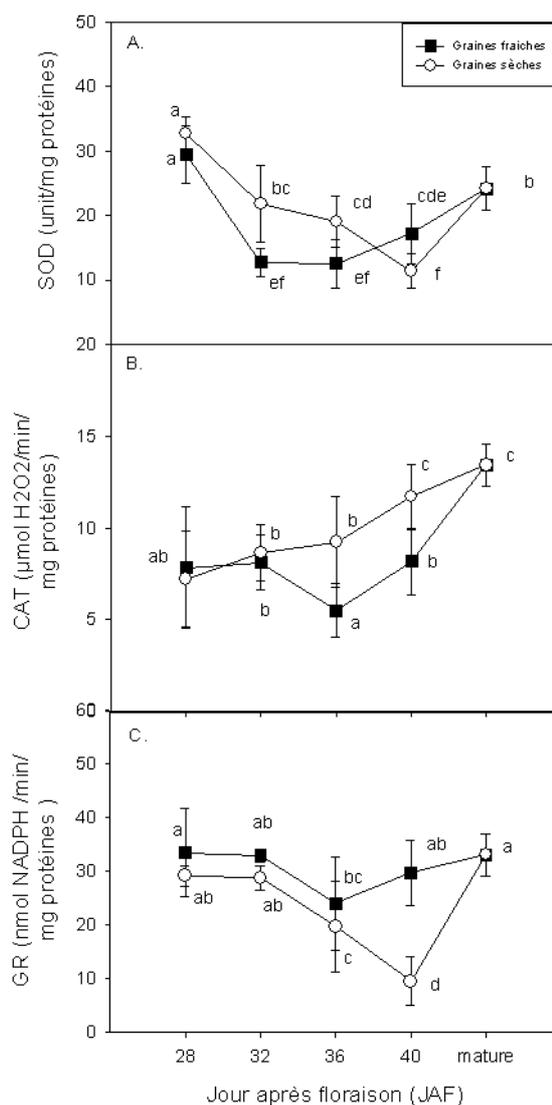
**Figure 2.9.** Relation entre les valeurs de P50 et de Ki et la teneur en saccharose (**A,B**), en stachyose (**B,C**) et le ratio stachyose/saccharose (**E,F**). Les 3 cultures sont représentées en différentes couleurs : culture 1 (rouge), 2 (bleu) et 3 (vert). Le ratio stachyose/saccharose est modélisé en exponentiel. Les points dans les cercles sont les données sur les graines matures.

Ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse de l'existence d'autres mécanismes biochimiques survenant en fin de maturation qui modulent la longévité des graines. C'est pourquoi, nous avons cherché à caractériser la tolérance au stress oxydant des graines au cours de leur développement.

### 2.3 Evolution de quelques systèmes antioxydants et de l'oxydation des protéines

Une des hypothèses expliquant le vieillissement des semences est l'oxydation progressive des macromolécules entraînant la mort des tissus (Kranner *et al.*, 2006; Bailly *et al.*, 2008). Par ailleurs, Bailly *et al.* (2008) ont montré que la production de  $H_2O_2$  est élevée pendant le développement des graines de tournesol, puis diminue au cours de la dessiccation. C'est pourquoi nous avons tenté de déterminer si l'acquisition de la longévité des graines au cours de la maturation était associée à une augmentation de la capacité antioxydante.

Nous nous sommes intéressés aux enzymes antioxydantes qui jouent un rôle important dans l'élimination des espèces actives de l'oxygène (ROS) à savoir la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion réductase (GR). Pour cela, nous avons mesuré l'activité de ces enzymes au cours de la maturation (culture 2) et analysé l'impact d'un séchage prématuré des graines sur cette activité. Ces dosages ont été réalisés en collaboration avec C. Bailly dans le laboratoire de Physiologie des Semences, Université Pierre et Marie Curie, Paris. La SOD catalyse la dismutation du superoxyde  $O_2^-$  en  $O_2$  et  $H_2O_2$ . La CAT transforme  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$ . La GR réduit le glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduite (GSH). La figure **2.10A** montre que l'activité SOD présente dans les graines fraîches diminue d'un facteur 2 entre 28 et 36 JAP, puis augmente jusque 48 JAP. Entre 28 et 40 JAP, le séchage a un effet significatif sur l'activité SOD. En effet, entre 28 et 36 JAP, le séchage induit une augmentation des activités SOD allant de 10 à 40% par rapport aux valeurs obtenues dans les graines fraîches. Inversement, à 40 JAP, le séchage entraîne une diminution de l'activité SOD de 33% par rapport à la valeur d'activité obtenue dans les graines fraîches. Dans les graines fraîches, l'activité CAT reste constante à environ  $8 \mu\text{mol } H_2O_2/\text{min}/\text{mg}$  de protéines jusqu'à 36 JAP. Puis, l'activité CAT augmente régulièrement jusqu'en fin de maturation, pour atteindre une valeur de  $13,4 \mu\text{mol } H_2O_2/\text{min}/\text{mg}$  de protéines dans les graines matures (**figure 2.10B**). A 28 et 32 JAP, le séchage n'induit pas de changement significatif des activités CAT mesurées. Par contre, dans les graines séchées à 36 et 40 JAP, les valeurs d'activité CAT augmentent significativement par rapport au témoin. Par conséquent, le profil d'activité après séchage montre un accroissement constant tout au long de la maturation. Enfin, concernant l'activité de la GR, nos résultats montrent qu'elle n'évolue pas de manière significative au cours de la maturation chez les graines fraîches (**figure 2.10C**). De plus, le séchage n'induit pas de différence significative des valeurs d'activité GR, excepté à 40 JAP où nous pouvons observer une forte diminution de son activité. En conclusion, il n'existe pas de relation claire entre les activités enzymatiques détoxifiant les espèces actives de l'oxygène et l'induction de la longévité des graines (voir **figure 2.5**, culture 2).



**Figure 2.10.** Evolution des activités enzymatiques de systèmes antioxydants dans les graines de *M. truncatula* au cours du développement. Les activités de la superoxyde dismutase (SOD) (A), de la catalase (CAT) (B) et de la glutathion réductase (GR) (C), sont mesurée dans un extrait de graines fraîches (■) et après séchage prématuré (○). Les données représentent la moyenne et écart-type standard de 2-3 répétitions biologiques. Une analyse ANOVA suivie d'un test des étendues multiples ont été effectués afin de déterminer les niveaux de significativité obtenus : les lettres indiquent les groupes homogènes ( $P < 0.05$ ).

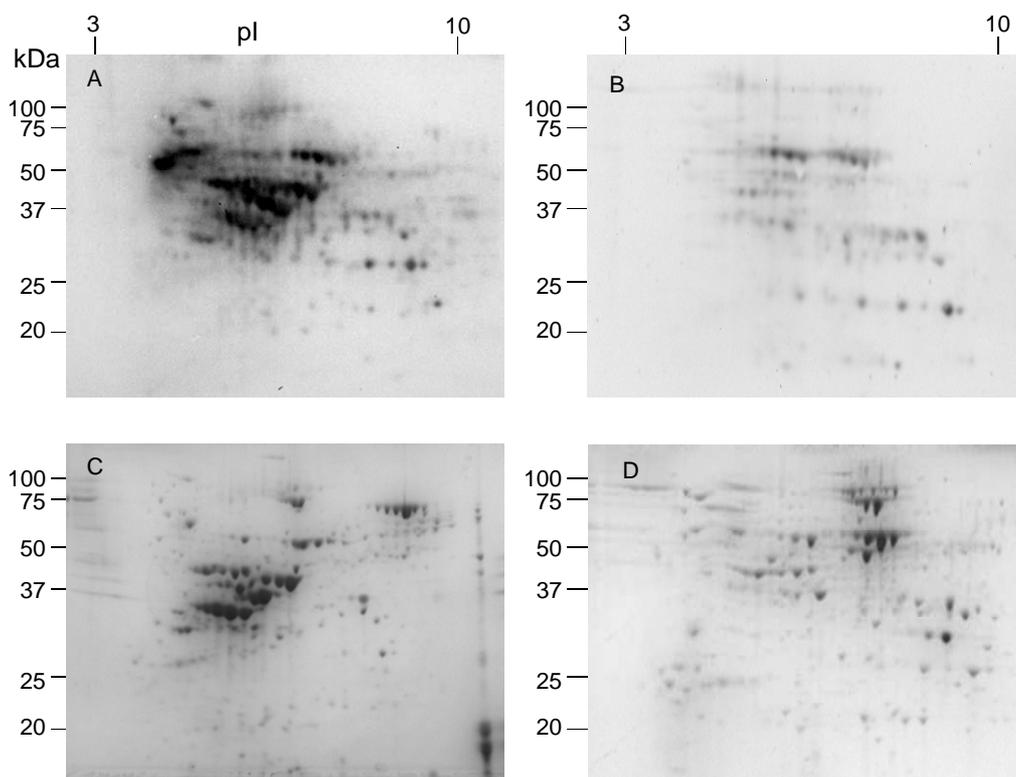
L'analyse de ces systèmes antioxydants présentée en **figure 2.10** n'offre qu'une vue très partielle de la tolérance aux stress oxydants des graines en développement. C'est pourquoi, en parallèle à ces mesures, nous avons également cherché à savoir si le séchage prématuré des graines immatures pouvait engendrer un stress oxydant dont l'intensité pourrait ensuite affecter la longévité des graines. Dans un premier temps, un dosage des acides gras, effectué en collaboration avec D. Marion (UR Biopolymères, Interaction, Assemblages INRA Nantes), a permis de montrer qu'il n'existait pas de différences significatives dans la teneur en acides gras (poly)insaturés entre les graines fraîches et séchées (données non montrées). Cette observation suggère donc que le séchage n'induirait pas une oxydation massive des lipides. Sachant que les graines de *M. truncatula* sont plus riches en protéines qu'en lipides (Djemel *et al.*, 2005), nous avons porté nos efforts sur la mise en évidence de la carbonylation des protéines (oxydation irréversible) comme symptôme de dégâts

causés par un stress oxydant. Le niveau de carbonylation est en effet un bon indicateur du niveau redox qui règne dans les cellules (Dalle-Donne *et al.*, 2003). La délipidation a été effectuée de manière à empêcher une carbonylation artéfactuelle des protéines par adduction de lipides au moment de leur extraction. Cette étape préliminaire est indispensable avant l'extraction des protéines solubles à partir de matériel riche en lipides comme les graines de *M. truncatula* et a été mise au point en collaboration avec D. Marion (UR Biopolymères, Interaction, Assemblages INRA Nantes).

Dans une première série d'expériences, nous avons tenté de quantifier le niveau de carbonylation par spectrophotométrie à 370 nm après marquage des résidus carbonyles au dinitrophénol hydrazine (DNPH) sur des extraits de protéines solubles à partir des graines des cultures 1 et 2 (données non montrées). Malheureusement, pour une raison inconnue, les résultats obtenus étant peu ou pas reproductibles d'une expérience à l'autre, cette méthode a été écartée.

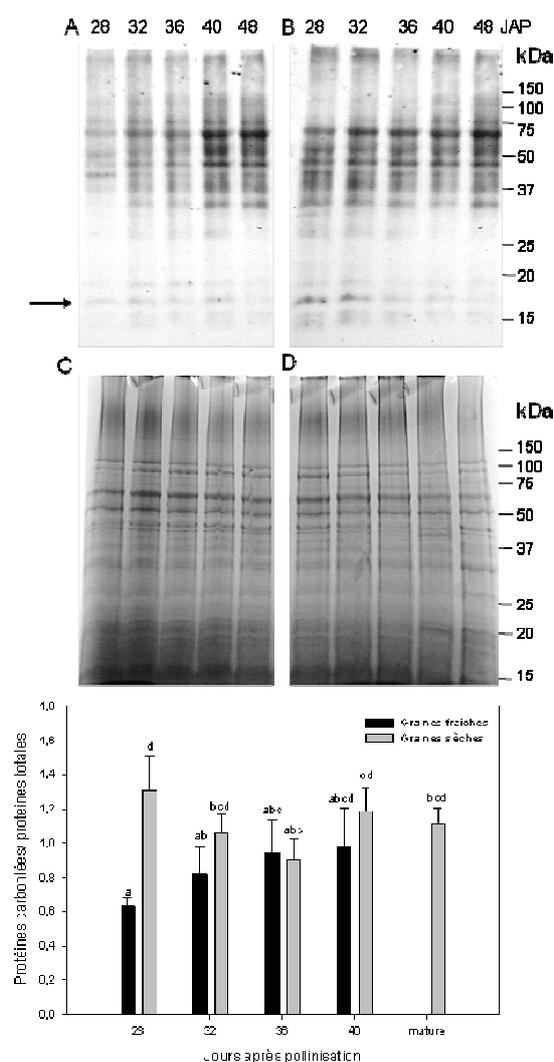
Ensuite, nous avons cherché à savoir s'il existait un lien entre la longévité et le profil des protéines carbonylées analysées. Pour ce faire, les extraits protéiques ont été obtenus à partir de poudres lyophilisées et délipidées de graines, puis les extraits protéiques ont été incubés en présence de DNPH. Les protéines carbonylées marquées au DNPH contenues dans ces extraits sont ensuite immuno-détectées avec un anticorps anti-DNPH après séparation électrophorétique mono- ou bidimensionnelle et transfert sur membrane (Job *et al.*, 2005). Tout d'abord, nous avons voulu comparer le profil de carbonylation des protéines totales et protéines solubles. L'étude des protéines totales a été réalisée en collaboration avec D. Job (UMR 5240 CNRS Bayer CropScience, Lyon).

Dans la **figure 2.11A**, nous observons dans le profil 2D de carbonylation des protéines totales un premier ensemble composé, de cinq groupes de protéines marquées et un second ensemble, de spots moins visibles et dispersés. La comparaison de ce profil avec celui obtenu après coloration au bleu de Coomassie montre que les groupes de polypeptides carbonylés correspondent aux spots les plus abondants des protéines colorées (**figure 2.11C**), ces spots sont probablement à des protéines de réserve. En comparant, le profil immuno-détecté des protéines solubles carbonylées et des protéines totales carbonylées, nous observons que les même spots sont carbonylées mais sans la forte contamination due au marquage des protéines de réserves (**figure 2.11B**). De plus, certains de ces polypeptides dans la fraction des protéines solubles ne sont pas colorés au bleu de Coomassie et correspondent alors à des protéines très minoritaires (**figure 2.11D**). Donc des protéines du métabolisme et des protéines minoritaires sont plus facilement identifiables dans la fraction de protéines solubles. C'est pourquoi par la suite, nous nous sommes intéressés aux protéines solubles uniquement.



**Figure 2.11.** Profils électrophorétiques bidimensionnels d'extraits de protéines totales (**A,C**) et solubles (**B,D**) issues de graines matures de *M. truncatula*. **A-B**) Immuno-détection après marquage au DNPH pour mettre en évidence les résidus carbonylés par hybridation avec un anticorps anti-DNPH. **C-D**) coloration au bleu de Coomassie. 150 µg de protéines totales et 50 µg de protéines solubles ont été séparées le long d'un gradient non linéaire de pH 3-10, puis selon leur MW sur un gel de 12% d'acrylamide.

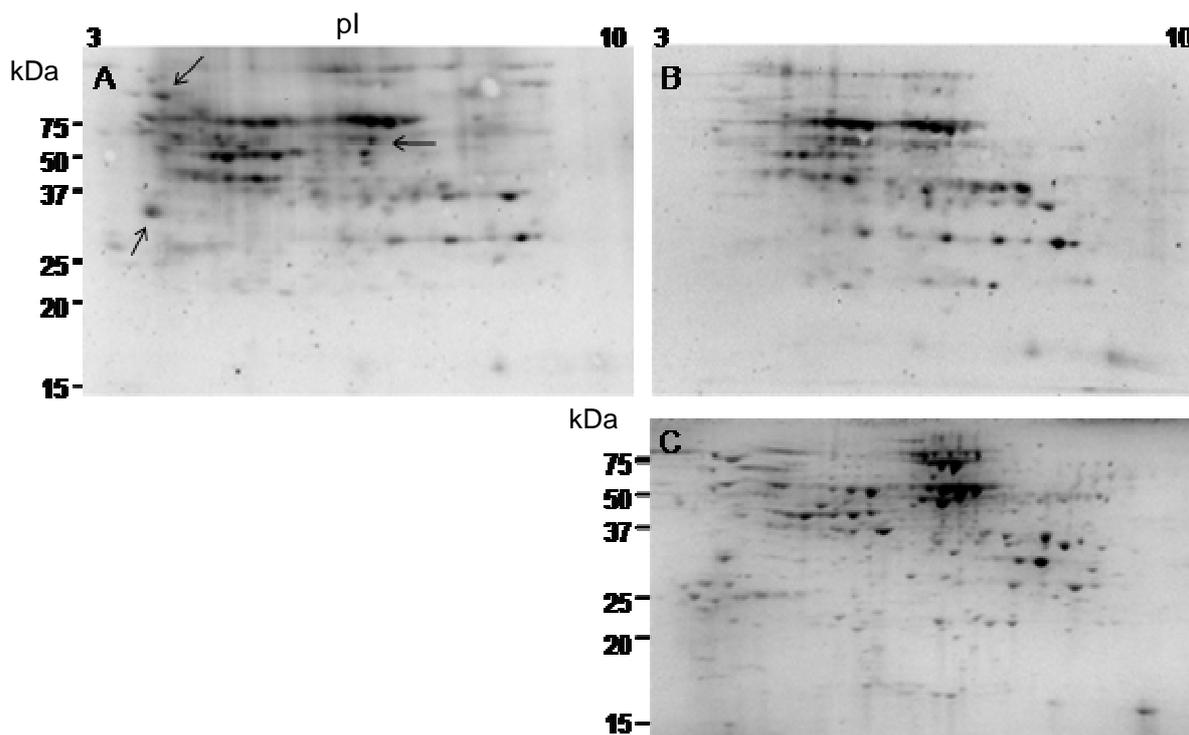
L'évolution des protéines solubles carbonylées au cours de la maturation a d'abord été étudiée après séparation des protéines marquées au DNPH par électrophorèse monodimensionnelle. Les résultats sont présentés dans la **figure 2.12**. De manière générale, nous notons une augmentation de l'intensité du signal au cours de la maturation des graines fraîches (**figure 2.12A**), suggérant une augmentation de la teneur en protéines carbonylées. Par ailleurs, le profil des protéines marquées est similaire entre 40 JAP et graines matures (48 JAP). Il est caractérisé par deux bandes majoritaires, l'une entre 37 et 50 kDa, l'autre entre 50 et 75 kDa dont l'intensité augmente progressivement jusqu'à 40 JAP puis semble se stabiliser ensuite. Le profil des protéines carbonylées obtenues à partir de graines séchées de manière anticipée au cours de la maturation est différent de celui des graines fraîches (**figure 2.12B**). En effet, la comparaison de l'intensité totale des pistes entre graines fraîches et séchées montrent que le séchage induit une augmentation de la teneur en protéines carbonylées. Une analyse quantitative des signaux, obtenus en Western Blot et en SDS-PAGE lors des différentes expériences, a finalement été réalisée à l'aide du logiciel « quantity one » (BioRad) et le rapport calculé pour chaque stade est présenté Cet effet du séchage est très visible à 28 et est d'autant plus prononcé que la graine est immature (**figure 2.12E**). Ainsi la bande majoritaire observée entre 37 et 50 kDa dans les graines matures apparaît dès 28 JAP et n'évolue plus par la suite. L'intensité du signal de cette bande est en effet du même ordre de grandeur à celle observée dans les graines matures. De plus, une bande à environ 17 kDa apparaît clairement dans les extraits de graines de 28 JAP séchées (**figure 2.12**, flèche), cette bande étant à peine visible dans les graines



**Figure 2.12.** Profils de détection des protéines solubles carbonylées (A-B) et protéines totales colorées au bleu de Coomassie (C-D) au cours de la maturation des graines fraîches (A-C) et des graines après séchage prématuré (B-D) obtenues lors de la culture 1. E). Intensité des pistes de western blots par rapport à l'intensité des pistes après coloration en bleu Coomassie. Les données représentent la moyenne et écart-type standard de 2-3 réplifications biologiques. Une analyse ANOVA suivie d'un test des étendues multiples ont été effectués afin de déterminer les niveaux de significativité obtenus : les lettres indiquent les groupes homogènes ( $P < 0.05$ ). Dix  $\mu\text{g}$  de protéines marquées au DNPH ont été chargées sur un gel de 12% d'acrylamide. 48 JAP = graines matures. La flèche indique la présence d'une bande dont l'intensité diminue en fonction de l'acquisition de la longévité. Les marqueurs moléculaires sont indiqués à droite des images.

fraîches. Après séchage anticipé, l'intensité de cette bande diminue progressivement au cours de la maturation et n'est plus visible dans les graines sèches matures. La diminution de l'intensité de cette bande à 17 kDa pendant la maturation a été confirmée sur les graines issues de la culture 2 (données non montrées).

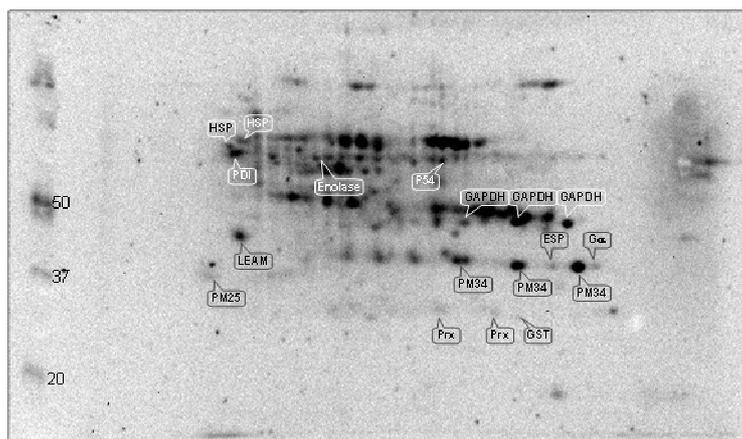
Pour affiner ce résultat et tenter d'identifier les polypeptides carbonylés, nous avons analysé le profil de carbonylation de graines séchées à 28 JAP et matures après séparation par électrophorèse bidimensionnelle. Les profils de carbonylation sont assez semblables entre les deux stades (figure 2.13A et B). Cependant, certains spots sont présent chez les graines de 28 JAP séchées et absentes chez les graines matures (indiqués par des flèches).



**Figure 2.13.** Profils électrophorétiques bidimensionnels d'extraits de protéines solubles issues de graines récoltées à 28 JAP (**A**) et graines matures (**B**) de *M. truncatula*. **A-B**) Western blots réalisés avec un anticorps anti-DNPH montrant les polypeptides carbonylés. **C**) Coloration au bleu de Coomassie des protéines totales issues des graines matures. 50 µg de protéines ont été séparées le long d'un gradient non linéaire de pH 3-10 puis selon leur Mw sur un gel de 12% d'acrylamide.

Il reste à confirmer la reproductibilité de ces profils et à déterminer l'intensité des spots sur les gels colorés au bleu de Coomassie pour vérifier si une diminution d'un polypeptide carbonylé n'est pas due à sa dégradation pendant la maturation. Par ailleurs et contrairement à ce qui a été précédemment observé après séparation électrophorétique 1D (**figure 2.12**, flèche), nous n'observons pas de signal pouvant correspondre à une protéine carbonylée de 17 kDa détectée uniquement à 28 JAP. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que peu de spots sont visibles dans cette zone du gel 2D après coloration au bleu de Coomassie des protéines solubles totales issues des graines matures (**figure 2.13C**).

En utilisant la carte de référence des protéines cibles des thiorédoxines pendant la germination de *M. truncatula* (Alkhalfioui *et al.*, 2007), nous avons tenté d'identifier les protéines carbonylées. Les identifications putatives sont montrées dans la **figure 2.14**. Elles suggèrent qu'une panoplie de protéines est susceptible d'être carbonylées pendant la maturation. Ainsi, nous retrouvons des protéines impliquées dans le métabolisme (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), énalase) et des protéines de réponse aux stress, comme des protéines LEA (LEAm, PM25), un aldose réductase (PM34) et une protéine de choc thermique (HSP). Toutefois, ces observations, basées sur des identifications putatives, restent à valider expérimentalement.



**Figure 2.14.** Identification putative des protéines carbonylées dans les graines matures de *M. truncatula* par comparaison avec une carte protéomique de Alkhalifioui *et al.* (2007). A droite se trouve la masse moléculaire des protéines en kDa.

## DISCUSSION

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la phase tardive de la maturation au cours de laquelle s'acquière la survie à l'état sec : à savoir la tolérance à la dessiccation et la longévité des graines. Ensuite nous avons voulu savoir si les profils d'évolution des sucres solubles non-réducteurs et de la capacité antioxydante pouvaient être corrélés à l'acquisition de la longévité.

Tout d'abord, nous avons montré chez *M. truncatula* que la longévité estimée à partir du P50, Ki et  $\sigma$  est acquise progressivement au cours de la maturation à partir de 28 JAP, immédiatement après l'acquisition de la tolérance à la dessiccation. Le P50 augmente d'un facteur de 30 entre 28 et 44 JAP, puis diminue après l'abscission des graines. Ceci indique qu'il existe chez *M. truncatula* un optimum de longévité qui coïncide avec la dispersion des graines. Les données de la littérature décrivant ce phénomène ne sont pas nombreuses. Un optimum de longévité n'est pas systématiquement présent chez les Angiospermes. Il a été observé sur d'autres espèces sauvages telles que la moutarde sauvage (Sinniah *et al.*, 1998a), le trèfle (Hay *et al.*, 2010) et des espèces cultivées comme l'orge ou le millet (références dans (Probert *et al.*, 2007)). Il a également été observé pour le paramètre Ki chez l'orge (Filho & Ellis, 1991) et le riz (Ellis *et al.*, 1993a; Ellis *et al.*, 1993b). Chez *M. truncatula*, le profil du Ki montre également un maximum à 40 JAP pour les graines issues des cultures 2 et 3 et non pour celles de la culture 1.

Les raisons pour lesquelles une diminution de la longévité est observée après abscission restent inconnues. Probert *et al.*, (2007) a mis en avant le fait que cette diminution est caractéristique des espèces produisant des fruits secs dont les graines ne sont pas libérées après abscission. Ceci est le cas pour *M. truncatula*. La teneur en eau élevée des graines à la dispersion pourrait alors être suffisante pour induire un vieillissement accéléré au sein de la gousse. Effectivement, au moment de l'abscission des gousses la teneur en eau est d'environ 0,6 g H<sub>2</sub>O/g MS (**figure 2.2**). Chez le coton, on sait que d'importantes modifications au niveau de l'expression des ARNm se produisent après l'abscission (Hughes & Galau, 1991). Il faudrait dès lors tester chez *M. truncatula* si des modifications

dans l'expression des gènes pourraient intervenir pendant le séchage ou après abscission et entraîner une perte de longévité des graines. Nos analyses biochimiques permettent dès à présent d'écarter l'implication des sucres solubles et de la régulation rédox dans la perte de longévité en fin de maturation.

Nous avons observé des différences importantes dans le profil d'acquisition de la longévité selon la culture du porte-graines quelque soit le paramètre utilisé (**figure 2.5**). Les données de la littérature montrent que l'acquisition de la longévité est sous l'influence de l'environnement du porte-graines (Filho & Ellis, 1991; Ellis *et al.*, 1993a; Ellis *et al.*, 1993b; Sinniah *et al.*, 1998a) et de l'interaction entre le degré de maturité des graines et les conditions de séchage après récolte (Probert *et al.*, 2007; Hay *et al.*, 2010). Par exemple, chez le riz, en condition froide, le Ki tend à décroître en fin de maturation alors qu'en condition chaude, il reste constant après avoir atteint sa valeur maximale (Ellis & Hong, 1994). Nos graines ont été produites en conditions contrôlées de température, de lumière, d'humidité ambiante et de nutrition azotée. Nous suspectons que la différence observée proviendrait de l'irrigation manuelle des plantes. Cette hypothèse qu'il faudra tester se base sur la similitude de nos résultats avec ceux de Sinniah *et al.* (1998a) sur la longévité des graines de moutarde sauvage. Chez cette espèce, le profil d'augmentation du Ki varie en fonction de l'irrigation du porte-graines. De plus, ces différences observées au cours de la maturation s'estompent dans les graines matures, tout comme chez *M. truncatula*.

Le rôle des sucres non-réducteurs dans la longévité des graines reste énigmatique malgré l'importante masse de données sur la question. Les travaux antérieurs ont essentiellement testé si et comment ils jouaient un rôle protecteur à l'état sec en se basant sur différentes approches : co-localisation de QTL de sucres solubles et de longévité des graines d'*Arabidopsis* (Bentsink *et al.*, 2000), corrélation entre longévité et teneur en sucres chez différentes espèces (Horbowicz & Obendorf, 1994; Walters *et al.*, 2005) ou après différents traitements post-récolte (Buitink, J. *et al.*, 2000). En observant l'acquisition de la longévité pendant la maturation, nous avons établi une corrélation significative entre la longévité exprimée en P50 et la teneur en saccharose et stachyose. La corrélation est négative dans le cas du saccharose et positive dans le cas du stachyose malgré le fait que ces deux sucres soient des agents protecteurs à l'état sec et forment des états vitreux (Buitink & Leprince, 2004). Par ailleurs, lorsque la longévité est exprimée en Ki, la relation n'est plus linéaire mais bimodale (**figure 2.9**). Des corrélations identiques entre la longévité et l'accumulation des oligosaccharides au cours de la maturation avaient été observées chez la moutarde sauvage (basée sur le Ki, (Sinniah *et al.*, 1998b)) et les mutants *snf4b* de *M. truncatula* (basée sur le P50). SNF4b code pour une sous-unité régulatrice du complexe kinase 'sucrose non-fermenting-related kinase' qui est impliqué dans la régulation du métabolisme et l'homéostasie de l'ATP lors de stress nutritifs et pendant le développement (Rosnoblet *et al.*, 2007). Le fait que ces observations sont indépendantes des conditions d'obtention des graines lors des cultures successives, nous conforte dans l'idée que le saccharose et/ou les oligosaccharides participent directement ou indirectement via par exemple un facteur de régulation impliqué dans les deux phénomènes, à l'acquisition de l'aptitude à la

conservation. Cependant, la teneur en saccharose et le ratio saccharose/oligosaccharides ne rendent pas compte de la perte de longévité après abscission (**figure 2.9**). L'ensemble de ces données suggère donc que le rôle des sucres solubles non réducteurs dans la longévité est plus complexe que la simple relation de cause à effet envisagée jusqu'à présent dans la littérature.

Le saccharose ne semble pas jouer un rôle de protection au vu de la corrélation négative avec l'aptitude au stockage. Si on admet que la corrélation n'est pas fortuite, quel rôle jouerait-il dans la longévité ? Le saccharose, de par sa diminution progressive dans l'embryon pourrait participer à l'induction de la longévité en tant que molécule régulatrice. On sait que le saccharose est impliqué dans la régulation du développement des légumineuses (Weber *et al.*, 2005; Sheen, 2010). Ainsi, le transport du saccharose des tissus maternels vers l'embryon induit l'arrêt des divisions cellulaires et le remplissage des graines ainsi qu'à la résorption de l'albumen du pois (Weber *et al.*, 2005; Rolland *et al.*, 2006). Plusieurs gènes sont régulés par le sucrose (Weber *et al.*, 2005). De manière générale, tous les mutants *Arabidopsis* insensibles à l'ABA sont également insensible au glucose ou saccharose. L'expression des facteurs de transcription impliqués dans la signalisation par l'ABA (*ABI3*, *ABI4*, *ABI5*) sont activés par le glucose en fonction de la quantité d'ABA (Sheen, 2010). Chez *Arabidopsis*, le mutant *sun6* (sucrose uncoupled 6) qui est un allèle de *ABI4* est à la fois insensible à l'ABA et incapable de réprimer un certain nombre de gènes en présence du saccharose comme dans les graines du type sauvage (Huijser *et al.*, 2000; Smeekens, 2000). L'ABA participe à l'induction de la longévité puisque les graines *abi3* d'*Arabidopsis* ont une longévité réduite par rapport au type sauvage (Sugliani *et al.*, 2009). Ainsi, il serait donc intéressant de tester si le saccharose pourrait participer à l'induction de longévité en interaction à l'ABA. Une autre hypothèse, plus simple, est que la corrélation négative entre saccharose et longévité serait le reflet de la conversion du saccharose en oligosaccharides qui jouerait alors un rôle plus prépondérant que le disaccharide dans la survie à l'état sec. Ceci se reflète dans la relation linéaire entre le ratio saccharose/oligosaccharide et P50 (**figure 2.9**).

La corrélation positive entre longévité et stachyose est en accord avec l'hypothèse d'un rôle protecteur à l'état sec et l'étude de Horbowicz and Obendorf (1994). Cependant, la relation bimodale observée lorsqu'on considère Ki suggère que la présence du stachyose est nécessaire mais pas suffisante pour conférer la longévité des graines. Le stachyose étant un sucre rapidement métabolisable pendant l'imbibition, il se peut qu'il soit important pour assurer la germination après le stockage comme le suggèrent Rosnoblet *et al.* (2007).

Dans cette étude, l'aptitude à tolérer des conditions oxydantes a été évaluée en dosant d'une part les enzymes clés impliquées dans la défense contre les molécules de ROS, tels que SOD, GR et CAT (Baillly *et al.*, 2001), et d'autre part l'oxydation des protéines par carbonylation, un symptôme de dégât oxydatif identifié lors du vieillissement naturel ou accéléré des graines d'*Arabidopsis* (Rajjou *et al.*, 2008). Nos résultats montrent qu'après le remplissage l'activité de la SOD et de la GR varient peu au cours de la maturation et sont en concordance avec les observations faites sur le pois (Baillly *et al.*,

2001) et le lupin (Garczarska *et al.*, 2009) pendant le développement de la graine. Ainsi au sein des légumineuses, les systèmes impliqués dans l'élimination des ROS ne semblent pas être des facteurs prépondérants dans la longévité des graines. Récemment, il a été mis en évidence que les tocophérols et le plastochromanol-8, des antioxydants liposolubles dérivant de la voie de biosynthèse des tocochromanols jouent un rôle important dans la longévité des graines d'*Arabidopsis* (Méné-Saffrané *et al.*, 2010). Chez les mutants déficients dans les enzymes de cette voie de biosynthèse, la phase de dessiccation des graines pendant la maturation s'accompagne d'une augmentation importante d'acides gras oxydés et peroxydés. Nos données préliminaires n'ont pas mis en évidence une telle augmentation chez *M. truncatula*. Cependant, il serait intéressant de vérifier si les antioxydants liposolubles ainsi que le pool de glutathion s'accumulent pendant la maturation des graines en phase avec l'induction de la longévité.

Nous avons testé si l'état de carbonylation des protéines pourrait être un facteur diminuant l'aptitude au stockage par le biais de cette oxydation irréversible. Ainsi, le séchage prématuré des graines immatures pourrait engendrer un stress oxydant dont l'intensité pourrait ensuite affecter la longévité des graines. Notre étude se distingue de celle de Rajjou *et al.*, (2008) et de Terskikh *et al.*, (2008). Rajjou et collaborateurs ont montré que dans les graines d'*Arabidopsis*, la perte totale de viabilité après un vieillissement accéléré de 7 jours entraîne la carbonylation de protéines, en particulier pour les protéines de réserve. Cette observation a été confirmée sur les semences détériorées de thuya géant de Californie (Terskikh *et al.*, 2008). Dans ce travail, nous avons fait deux observations intéressantes. Tout d'abord, nous avons vu que la teneur en protéines carbonylées semble augmenter progressivement pendant la maturation des graines. L'oxydation de ces protéines, qui conduiraient à leur dénaturation, faciliterait de plus leur mobilisation lors de la germination (Job *et al.*, 2005). Par ailleurs, les oxydations des protéines ne sont pas toutes irréversibles grâce à l'existence d'enzyme de réparation des protéines oxydées comme les thiorédoxines et les méthionine sulfoxyde réductases (MSR). Ceci renforce l'idée que les stress oxydants (ou l'état redox de la cellule) jouent un rôle physiologique dans le développement des graines et la germination (Bailly *et al.*, 2004; Job *et al.*, 2005; Alkhalfioui *et al.*, 2007) et que la carbonylation des protéines -quand bien même irréversible- n'est pas synonyme d'une perte de vigueur des graines de *M. truncatula*. Plusieurs études ont montré directement ou indirectement que l'oxydation des protéines n'est pas un phénomène aléatoire au sein du protéome (références dans Job *et al.*, 2005, Maisonneuve *et al.*, 2009). Une identification préliminaire des polypeptides carbonylés des graines matures de *M. truncatula* à partir de la carte de référence des protéines cibles des Trx (Alkhalfioui *et al.*, 2007) a révélé la présence de protéines notamment impliquées dans la réponse aux stress (HSP, protéines LEA) et dans le métabolisme primaire (GAPDH, enolase). Bien que ces données sont en concordance avec celles obtenues sur les graines d'*Arabidopsis* (Job *et al.*, 2005; Rajjou *et al.*, 2008), elles ne sont pas vérifiées *in silico* en utilisant l'outil de prédiction disponible sur <http://www.lcb.cnrs-mrs.fr/CSPD/> (Maisonneuve *et al.*, 2009). En effet, seule la PDI présente un site putatif de carbonylation. Dès lors, une identification expérimentale « off gel » combinant la mise en évidence des résidus carbonylés s'avère nécessaire afin de tirer des conclusions sur une éventuelle fonction physiologique de la carbonylation pendant la

maturation. De la même façon, il reste à valider si les variations de profil de carbonylation pendant la maturation chez *M. truncatula* sont dues à une augmentation de l'oxydation des protéines synthétisées ou à une augmentation de la synthèse de protéines qui seraient immédiatement carbonylées.

La seconde observation à retenir de notre étude est la variation importante dans le profil de carbonylation lorsque les graines immatures sont séchées de manière anticipée. Ces variations sont à la fois qualitatives et quantitatives, et sont d'autant plus importantes que les graines sont immatures (**figure 2.12**). Nous avons observé que l'activité catalase dans les graines séchées est d'autant plus faible qu'elles sont immatures (**figure 2.10**). Ces données suggèrent que même si le séchage ne tue pas les graines immatures (puisqu'elles ont acquis leur tolérance à la dessiccation dès 28 JAP, **figure 2.2**), elles restent néanmoins sensibles à l'oxydation et que cette sensibilité diminue au cours de la maturation. En réponse à notre hypothèse de travail, le lien entre la carbonylation des protéines et l'aptitude au stockage n'est pas clair. On ne peut toutefois pas rejeter l'hypothèse que des protéines nécessaires pour une bonne maturation ou conservation des graines soient dénaturées par oxydation dans les graines séchées prématurément mais pas lors de la dessiccation naturelle, grâce à la mise en place de systèmes de protection. Le polypeptide responsable du signal observé aux environs de 17k Da pourrait s'avérer être un candidat intéressant. Sachant que la carbonylation n'est pas aléatoire (références dans Job *et al.*, 2005; Maisonneuve *et al.*, 2009), il est nécessaire de l'identifier et de le quantifier sur des graines issues de différentes cultures.

## Chapitre 3

# **Profiling the heat stable proteome identifies different LEA (late embryogenesis abundant) proteins linked to desiccation tolerance, longevity and maturation drying in developing *M. truncatula* seeds**

Emilie Chatelain<sup>1</sup>, Michaela Hundertmark<sup>1</sup>, Sophie le Gall<sup>1</sup>, Olivier Leprince<sup>3</sup>, Pascale Satour<sup>1</sup>, Hélène Rogniaux<sup>4</sup>, Julia Buitink<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Université d'Angers, UMR 1191 Physiologie Moléculaire des Semences, IFR 149 QUASAV, 49045 Angers, France

<sup>2</sup>Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 1191 Physiologie Moléculaire des Semences, IFR 149 QUASAV, 49045 Angers, France

<sup>3</sup>Agrocampus Ouest, UMR 1191 Physiologie Moléculaire des Semences, IFR 149 QUASAV, 49045 Angers, France

<sup>4</sup>Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherche Biopolymères, Interactions, Allergie, 44316 Nantes, France



## Abstract

Late embryogenesis abundant (LEA) proteins are hydrophilic, mainly disordered proteins that accumulate during seed development. Their presence at high concentrations in mature seeds has led to the suggestion that they are associated with seed survival in the dry state. However, in seeds, there are a multitude of different LEA proteins, and a detailed temporal study on when which LEA proteins appear during seed maturation is missing. This study investigates, using 2D gel electrophoresis, the abundance of LEA proteins in relation to seed filling, desiccation tolerance, longevity and final maturation drying in seeds of *Medicago truncatula* by characterizing the heat soluble proteome. The inventory of the LEA proteome identified 38 spots corresponding to 16 LEA genes present in mature seeds, of which most of them were present both in the embryonic axes and the cotyledons. During development, two LEA polypeptides, EM6 and PM25, were correlated with the acquisition of desiccation tolerance, between 24 and 28 days after pollination (DAP). The abundance of only four LEA polypeptides correlated with the acquisition of longevity: one isoform of CAPLEA1, D113.II, D-34.III and EM. These polypeptides were amongst the most abundant ones, corresponding to 45% of the total LEA proteome. The remaining 31 spots, representing 11 LEA genes, increased in intensity at the final maturation drying step, after longevity had been acquired. These observations suggest a new physiological role for a specific set of LEA proteins. Whether they are likely to play a role in facilitating or regulating natural drying and/or exert their function upon imbibition of the dry seeds is discussed. Also, we present data suggesting that posttranslational modification is by far the principal way to regulate LEA protein accumulation during final maturation.

## Introduction

During seed maturation, apart from the accumulation of seed reserves, several physiological processes are acquired that are important for the establishment of physiological seed quality, such as the acquisition of their capacity to germinate, followed by the acquisition of desiccation tolerance and longevity (Hong & Ellis, 1992; Ellis & Hong, 1994; Sanhewe, A. J. & Ellis, R. H., 1996a; Sanhewe, A.J. & Ellis, R.H., 1996b; Sinniah *et al.*, 1998a; Black *et al.*, 1999; Mai-Hong *et al.*, 2003; Mai-Hong *et al.*, 2006). Longevity, i.e. the capacity to remain alive in the dried state for an extended period of time, is for the most part acquired after mass maturity has been reached.

During maturation, there is a strong accumulation of a specific set of transcripts encoding late embryogenesis abundant (LEA) proteins (Galau & Hughes, 1987; Blackman *et al.*, 1991; Black *et al.*, 1999). LEA proteins form a loose group of stress-related proteins comprising several families. Unifying and outstanding characteristics are their high hydrophilicity, high content in Gly and largely unstructured conformation in the hydrated state (Wise & Tunnacliffe, 2004; Battaglia *et al.*, 2008). Over the past years, considerable progress has been made in the understanding of the function of these proteins. LEA proteins are known to exhibit a great diversity of functions, including ion binding,

antioxydant, hydratation buffer, membrane protectant and protein stabilisers (reviewed in (Tunnacliffe & Wise, 2007)). Overexpressing of *LEA* genes in plants leads to enhanced abiotic stress tolerance of whole plants, often being related to salt or drought stress (Figueras *et al.*, 2004; Bahieldin *et al.*, 2005; Roychoudhury *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2007), for review see (Leprince & Buitink, 2010).

The specific temporal accumulation of a certain number of *LEA* mRNAs during seed maturation and desiccation has led to the suggestion that these abundant hydrophilic polypeptides may function to protect the embryo from desiccation damage. In cotton, transcript levels of *LEA* mRNA increase at the point of abscission of the ovules from the mother plant, associated with the termination of seed filling and start of the post-abscission stage. Heat-stable proteins are shown to accumulate during the development of desiccation tolerance and to decrease in germinated seeds that have lost their desiccation tolerance (Blackman *et al.*, 1991; Boudet *et al.*, 2006). However, the amount of heat-stable proteins was also enhanced by detachment from the mother plant irrespective of the acquisition of desiccation tolerance (Blackman *et al.*, 1991). A study on rapid-cycling brassica identified an unknown heat-stable protein that correlated with potential longevity rather than desiccation tolerance (Sinniah *et al.*, 1998b). It should be noted that these studies do not precise the polypeptide identification.

Sofar, no study exists on a comprehensive overview of the accumulation of all the *LEA* proteins simultaneously in relation to the acquisition of the different physiological traits during seed maturation, such as precocious germination, desiccation tolerance, longevity and maturation drying. We previously identified a number of *LEA* proteins by 2D gel electrophoresis in relation to the re-induction of desiccation in germinated tissues (Boudet *et al.*, 2006). Here, we extended this study to a detailed analysis of all *LEA* proteins that accumulate during seed maturation of *M. truncatula* using a completed reference map of heat stable proteins. Out of a total of 38 polypeptides that are encoded by 16 *LEA* genes, the intensity of three polypeptides increased with the acquisition of desiccation tolerance, four correlated with the acquisition of longevity, and the remaining 31 with the final maturation drying step, after longevity had been acquired.

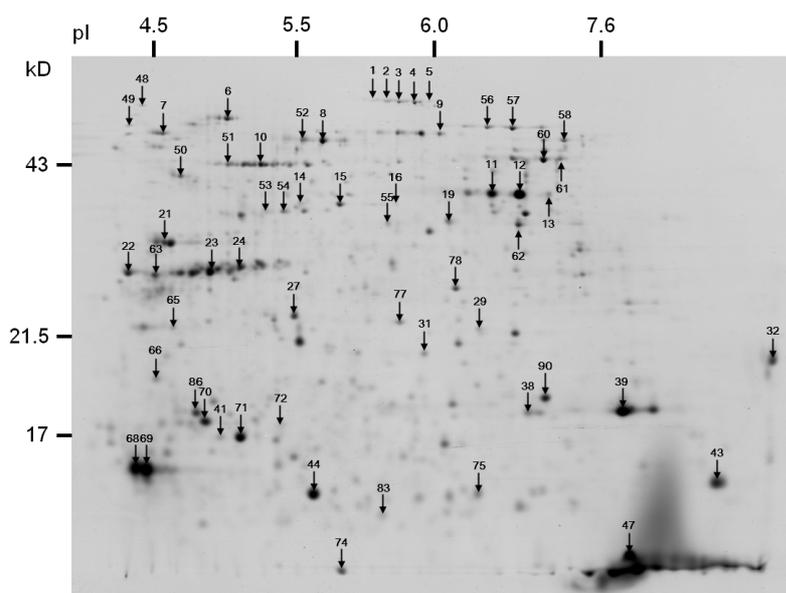
## Results

### Characterization of the heat-stable proteome

*LEA* proteins are classified in different families, the number of which varies according to the type of classification chosen (Tunnacliffe & Wise, 2007). Here, we used the Pfam classification according to Hundertmark & Hinch (2008). An *in silico* investigation of *LEA* genes present in *M. truncatula*, using both the IMGAG Mt3.0 version as well as the MtGI8 database, revealed a total of 34 genes encoding *LEA* proteins that are divided in seven *LEA* families (**Table 3.1**). **Table 1** also presents the putative homologues in *Arabidopsis* to facilitate comparison (Hundertmark & Hinch, 2008). The number of proteins in each families varies, with only two members, EM and EM6 in *LEA\_5* (pfam00477), whereas *LEA\_4* (pfam0287) family is the largest, containing 11 proteins. The *LEA\_3* group (D-95; **Table 3.1**)

and LEA\_2 group (D-74; **Table 3.1**) encode 'atypical' LEA proteins because of their more hydrophobic character.

Considering that only a few LEA proteins could be detected using total protein extracts (Gallardo *et al.*, 2003), a protein fraction was used for the analysis that was enriched in LEA proteins. Using the hydrophilic and unstructured character of LEA proteins, enrichment was obtained by heating the protein extract to 95°C. Those proteins remaining in solution is hereafter identified as the 'heat-stable' protein fraction (Boudet *et al.*, 2006). Since these authors did not identify all the polypeptides present in this fraction, we first investigated which LEA proteins could be identified in mature seeds of *M. truncatula* genotype A17. The heat-stable protein fraction of mature seeds was separated by 2D gel electrophoresis (figure 3.1), and spots were sequenced *de novo* using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (**annexe 1**). Out of the 135 spots detected in this fraction, 84 spots showing a relative high intensity were sequenced and identified based on the Medicago data base (**figure 3.1, annexe 1**). Out of them, a total of 38 spots represented LEA polypeptides, encoded by 16 different LEA genes. For almost all families, spots were identified (**Table 3.1**). Seven LEA proteins were represented by several spots, belonging almost all to the LEA\_4 family, except for a dehydrin (DHN) (**Table 3.1**). This observation extends previous experimental evidence that LEA proteins are submitted to posttranslational modifications such as phosphorylation (Campalans *et al.*, 2000; Riera *et al.*, 2004). Three spots were identified as CAPLEA polypeptides (**Table 3.1**). However, based on the peptide sequences, no distinction could be made between which gene(s) encoded the polypeptides identified. Forty-six spots other than LEA proteins were detected in the heat-stable protein fraction (**annexe 1**), such as seed storage proteins (16 spots) and glycine rich proteins (3 spots), and a number of spots representing stress proteins, such as protein disulfide isomerase, chaperonins, heat shock proteins (HSP) and small HSP (5 spots) and 1-cys-peroxyredoxin (2 spots).



**Figure 3.1.** Reference gel of the heat-stable proteome of mature *M. truncatula* seeds. Two dimensional electrophoresis of the heat-stable protein fraction was separated using 24 cm non linear immobilized pH gradient strips (3-10). pI and molecular mass (in kDa) are noted. Numbers indicate the spots that were identified (see Supplementary table 1).

**Table 3.1.** Identification of LEA proteins in *M. truncatula* and corresponding annotation in the Medicago data base. Proteins were grouped according to the Pfam and Dure (1993) classification. Identified polypeptides by 2D SDS-PAGE and LC-MS:MS and HILIC separation followed by LC-MS/MS are indicated. ND not detected I not identified (or not present) in our gels.

Pfam name	N#	Dure	protein name	TC	MGI8	AGI	e-value	2D spot #	HILIC nb peptides #
dehydrin	PF00257	D11	DHN3	TC144427	NA			11,12,13	5
			PM12	TC145410	Medtr3g162790.1			ND	1
			dehydrin-cognate	TC143705	Medtr3g162880.1	AT1G76180	3.40E-42	ND	ND
			BudCar5	TC153209	Medtr7g103100.1	-		ND	4
			SLTI66	TC151518	NA	AT1G54410	1.60E-27	ND	ND
LEA_5	PF00477	D19	RAB21	TC167838	Medtr4g156230.1	-		ND	ND
			EM6	TC155318	Medtr3g166750.1	AT2G40170	7.70E-35	44	8
LEA_4	PF02987	D7	EM protein	AJ498523	NA			71	7
			SBP65	TC155301	Medtr4g109500.1	AT2G42560	5.20E-23	1-5,56-61	13
LEA_1	PF03760	D113	PM10	TC144319	Medtr8g134020.1	AT2G18340	1.40E-36	8,52	22
			PM18	TC153256	NA	AT2G36640	2.60E-50	14,15,16,84	12
			Maturation polypeptide2	TC153601	Medtr1g073780.1	AT2G36640	1.10E-49	19,55,62	13
			LEAM	TC148561	Medtr2g017540.1	AT5G44310	4.40E-39	21,91	12
			CapLEA.I	TC145382	NA	AT1G52690	1.50E-38	38,39,90	11
			CapLEA.II	TC164048	NA	AT1G52690	1.00E-31	38,39,90	10 common to CapLEA.I
			CapLEA.III	TC147670	NA	AT1G52690	3.00E-19	38,39,90	6 (3 common to CapLEA.I)
			PM1	TC143872	Medtr7g111880.1	AT5G06760	2.10E-34	32	4 (1 common to D-113.I)
			D-113.I	TC153057	Medtr7g111860.1	AT5G06760	4.00E-22	81	4 common to D-1 13.II
			D113.II	TC147896	Medtr7g111870.1	AT5G06760	1.00E-19	43	4 common to D-113.I
SMP	PF04927	D34	PM29	TC152746	Medtr8g102760	AT1G32560	1.00E-17	ND	ND
			D-34.I	TC145904	Medtr1g086190.1	AT3G22500	2.80E-44	21	7
			PM25	TC144171	NA	AT3G22490	8.10E-61	22	8
			D-34.II	TC155112	NA	AT3G22490	7.90E-26	63	8
			D-34.III	TC147852	Medtr2g091990.1	AT3G22490	3.00E-25	40, 65	9 (2 common to D-34.IV)
LEA_2	PF03168	D95	ECP31	TC158571	Medtr3g041210.1	AT1G03120	5.40E-27	ND	ND
			D-34.IV	TC165526	Medtr2g091970	AT3G22490	2.00E-23	ND	ND
			LEA14-like c	BQ124186	NA	At1g01470	5.00E-27	ND	7
			LEA14	TC149078	Medtr7g088940.1	AT1G01470	9.80E-51	ND	ND
			LEA-like a	TC148928	Medtr5g095950.1	AT2G44060	4.80E-74	ND	ND
LEA_3	PF03242	D73	LEA-like b	TC143875	NA	AT2G44060	4.60E-124	ND	ND
			LEA5	TC155627	Medtr8g138590.1	-	-	ND	ND
			LEA-like protein	NP7252631	Medtr8g026440	-	-	ND	ND
			ARG-2	TC145820	NA	-	-	ND	ND
			ARG-2-like	TC157184	Medtr1g108120	-	-	ND	ND

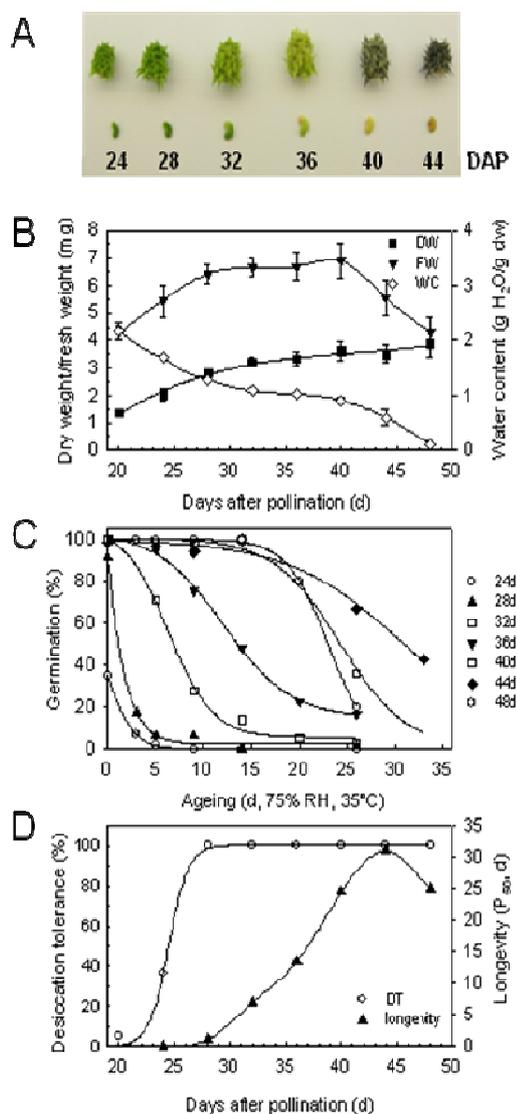
For 17 genes, spots corresponding to the encoded protein were not identified. The main families for which no members were detected are LEA\_2 and LEA\_3 groups, containing both 4 genes. Another group for which only one member of six was detected in the 2D analysis are dehydrins. To investigate whether these proteins were missing in our 2D gel because of an incomplete enrichment by heating the extract, a MS/MS analysis was performed on the total protein fraction of dry mature seeds (**annexe 1**). The protein extract was first submitted to hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in order to decrease the complexity of the spectral analysis by separating the apolar tryptic peptides (Boersema *et al.*, 2008). From the crude extract, a total of 22 LEA polypeptides were detected and identified. All the 17 polypeptides that were identified on the 2D gels were retrieved. The remaining three polypeptides were identified as follows: two corresponded to two dehydrin-like proteins, namely PM12 and Budcar5 (**Table 3.1**). Budcar5 was previously detected in the heat stable proteome from germinated *M. truncatula* radicles that were submitted to an osmotic stress (Boudet *et al.*, 2006). We also found this polypeptide as a faint spot in dry seeds of another genotype, R108 (data not shown). Most likely, it was too faintly present on the 2D gels of this study to be detected. A third polypeptide identified in the total protein extract was a LEA14-like protein, a member of the LEA\_2 (PF03168) family. This family includes proteins that are relatively hydrophobic, structured and not heat-stable. It is therefore expected that they should not be present on our 2-D gel. It is argued that the proteins from this family should no longer be considered as LEA proteins (Tunnacliffe & Wise, 2007). Therefore, we considered that the heat stable proteome gives an accurate representation of the LEA proteome in dry seeds.

### **Acquisition of desiccation tolerance and longevity during maturation of *M. truncatula* seeds**

In order to link the appearance of particular LEA proteins to different processes that take place during the second part of maturation, seeds were harvested between 20 days after pollination (DAP) every four days until seeds were fully mature, and several parameters (dry weight, fresh weight, water content, desiccation tolerance and longevity) were determined at the different time points. Seeds lost their chlorophyll gradually during maturation (**figure 3.2A**). From 24 to 32 DAP, seeds were still green, whereas chlorophyll was completely lost at 44 DAP, which corresponded to the point of pod abscission. Dry weight increased significantly between 20 and 28 days, then levelled off from 32 DAP onwards, indicating the end of seed filling (**figure 3.2B**). Because reserve deposition replaces water molecules, water contents decreased between 20 and 24 DAP and reached a plateau between 32 and 40 DAP. The actual drying occurred from 40 DAP, when pods were still attached to the mother plant and seeds contained  $0.91 \text{ g H}_2\text{O.g dw}^{-1}$  (g/g), to 44 DAP, at the point of abscission with seeds containing 0.59 g/g. Thereafter, seeds dried in the pods and reached equilibrium water content (*i.e.* 0.11 g/g) around 48 DAP.

Seeds that were rapidly dried at 20 DAP were all desiccation sensitive (**figure 3.2D**, open symbols), but had acquired their germination capacity as they germinated for 100% prior to drying (data not shown). Desiccation tolerance was acquired between 24 and 28 days, with germination

percentages after drying of 36 and 91%, respectively (**figure 3.2D**). The effect of aging was determined by storing the rapidly dried seeds over a saturated salt solution of 75% at 35°C and determining the percentage of germination after different intervals of storage (**Figure 3.2C**). Seeds were incubated in a solution of 20  $\mu\text{M}$  fluridone to overcome the effect of dormancy that was acquired during final maturation, which would otherwise complicate the interpretation of the aging data (Bolingue *et al.*, 2010a). Interestingly, fully mature seeds were found to germinate twice as fast as seeds harvested at the point of abscission, despite the presence of fluridone. For example, the time to reach 50% of germinated seeds was 79h for seeds harvested at 44 DAP, at the point of abscission, and dried back rapidly, whereas fully matured and dried seeds took only 43 h to germinate. Apparently, the final maturation drying step (from 0.6 to 0.1 g  $\text{H}_2\text{O}/\text{g}$  dw) regulates germination speed. Survival curves during aging indicated that longevity was progressively acquired during maturation. Determination of the  $P_{50}$  (time to lose 50% viability during storage) shows that longevity increased 30-fold between 28 DAP (1.1 day under the controlled storage conditions) and 44 DAP (31 days). Final drying of the seeds in the abscised pods reduced longevity to 25 days (**figure 3.2D**).



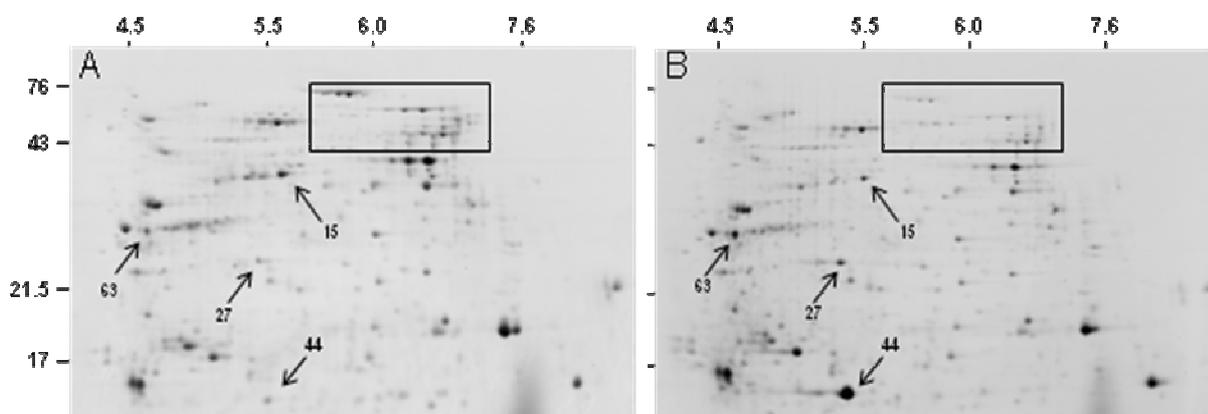
**Figure 3.2.** Characterization of late seed maturation of *M. truncatula*. A) Pods and isolated seeds at the different days of pollination (DAP). B) Accumulation of dry weight and fresh weight per seed and changes in water content (g  $\text{H}_2\text{O}/\text{g}$  dw). C) Survival curves of rapidly dried seeds at different stages of maturation. Percentage of germination was at different time points during storage at 35°C and 75% relative humidity. D) Acquisition of desiccation tolerance and longevity. Desiccation tolerance was determined by counting the percentage of germinated seeds after rapid drying. Longevity was expressed as the  $P_{50}$ , corresponding to the time of storage at which the seed population reached 50% germination.

### Tissue specificity of LEA proteins in *M. truncatula*

Considering that the axes only make up 10% of the total seed dry weight, putative correlations of LEA polypeptides that are preferentially expressed in axes with survival in the dry state might be masked. To test this, the abundance of LEA polypeptides were analyzed in separated cotyledons and embryonic axes by 2D gel electrophoresis to decide whether further analysis should be performed on whole seeds or on separated tissues. Cotyledons contained less soluble proteins per dry weight than embryonic axes, which might be explained by differences in reserve proteins (**Table 3.2**). However, final percentage of heat-stable proteins in the soluble protein fraction was comparable in both tissues (35.0% in cotyledons versus 43.4% in the axes, **Table 3.2**).

**Table 3.2.** Concentrations of different protein fractions in seeds of *M. truncatula* at different stages during development and in separated cotyledons and embryonic axes of mature seeds. Different letters shown next to the parenthesis represent significant differences after multiple comparison of the means ( $P < 0.05$ ).

Protein ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Separated organs		Whole seed during maturation						
	Cotyle dons	Axes	24 DAP	28 DAP	32 DAP	36 DAP	40 DAP	44 DAP	mature
Soluble protein content	56.0 (8.1)	83.1 (8.0)	63.7 (4.0) <sup>a</sup>	72.9 (3.3) <sup>b</sup>	80.8 (5.4) <sup>c</sup>	85.2 (1.1) <sup>cd</sup>	85.9 (0.6) <sup>cd</sup>	91.9 (3.1) <sup>d</sup>	87.5 (3.1) <sup>d</sup>
Heat-stable protein content (HP)	25.7 (7.4)	36.1 (3.6)	25.6 (4.4) <sup>ab</sup>	21.2 (6.9) <sup>b</sup>	24.4 (1.0) <sup>ab</sup>	24.6 (0.9) <sup>ab</sup>	23.7 (2.0) <sup>b</sup>	24.1 (0.5) <sup>ab</sup>	30.0 (0.5) <sup>a</sup>
HP (% Soluble protein)	45.8	43.4	40.2	29.1	30.2	28.9	27.6	26.2	34.3



**Figure 3.3.** Two dimensional electrophoresis of the heat stable proteome of cotyledons (A) and embryonic axes (B) from mature *M. truncatula* seeds using 24 cm non linear immobilized pH gradient strips (3-10). pI and molecular mass (in kDa) are noted. Numbers and the squared box indicate spots that are commented in the text.

Protein profiles of cotyledons and axes are very comparable (**Figure 3.3A and B**). Quantification of the spot abundance was performed after normalization on total density in valid spots (**annexe 2**). Twenty one spots were counted for which intensity is at least two-fold different between axes and cotyledons (**Table 3.3**). The squared box contains spots that are more abundant in the cotyledons, all having been identified as SBP65, a biotinylated LEA protein (Duval *et al.*, 1994). Certain of them have over 15-fold higher intensity in the cotyledons than in the axis (**Table 3.3**). Two

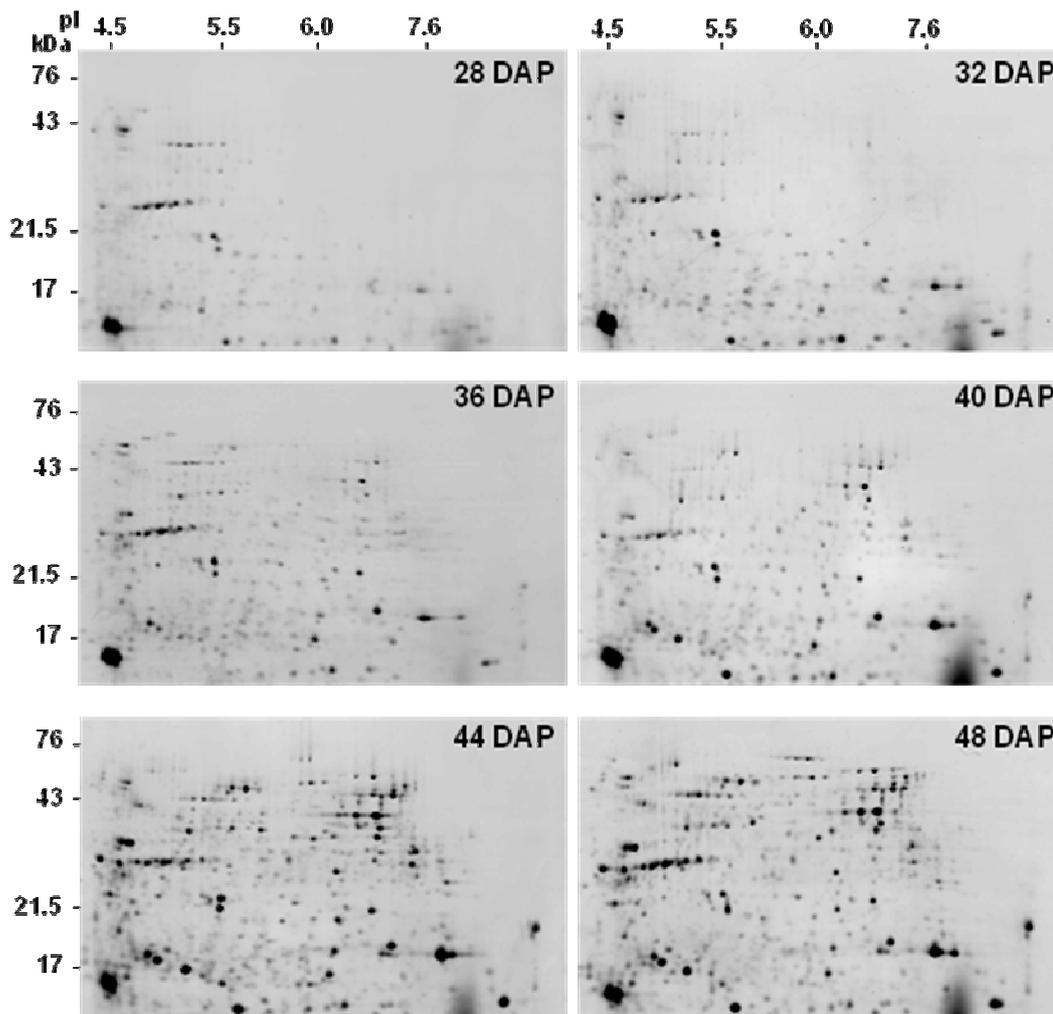
other LEA polypeptides that are more abundant in cotyledons are PM18 (spot 15, **figure 3.3**) and Maturation polypeptide 2 (spot 55, **figure 3.3**), being respectively 3- and 2-fold more abundant in cotyledons compared to axes. Additional spots also corresponding to these two LEA polypeptides are not significantly different. Spots representing heat-stable proteins that are more abundant in embryonic axes than in the cotyledons are EM6 (spot 44, 24-fold), ferritin/1-cys-peroxyredoxin (spot 27 and 29, 2-3-fold) and LEA D-34.II (spot 63, 2.6-fold) (**Table 3.3, annexe 2**).

**Table 3.3.** Identified spots in the heat-stable proteome that are at least two-fold differentially expressed between axes and cotyledons. Differences represent the ratio between cotyledons/axis except for the values in italics which represent the ration axis/cotyledons. The spot number refers to the proteome reference map of **figure 3.1**. SD standard deviation.

Spot #	Identification	Axes		Cotyledons		Fold difference	p-value ( $\times 10^{-3}$ )
		Mean	SD	Mean	SD		
23	Cupin	5007	427	27270	7989	5.5	0.4
15	PM18	8186	1188	26879	6347	3.3	4.7
1	SBP65	139	42	1068	204	7.7	2.0
2	SBP65	267	95	4041	438	15.1	3.4
3	SBP65	552	233	11661	3697	21.1	1.0
4	SBP65	1542	770	20079	1345	13.0	0.7
5	SBP65	448	82	1772	269	4.0	2.9
56	SBP65	593	153	3519	832	5.9	0.8
57	SBP65	1863	444	7620	1302	4.1	1.5
58	SBP65	989	254	3775	328	3.8	0.1
61	SBP65	1505	438	4092	245	2.7	0.4
60	SBP65	4351	709	11712	1184	2.7	0.3
75	Legumin	1459	137	3613	549	2.5	0.8
70	sHSP20	17930	1923	39216	2743	2.2	0.1
55	Maturation polypeptide 2	1080	182	2201	341	2.0	9.9
50	Seed biotin-cont protein	922	177	3874	470	4.2	0.2
44	EM6	242783	4392	9801	2356	24.8	0
63	D-34.II	30849	2081	11591	732	2.5	0
29	1-Cys-Prx	1060	108	374	58	2.8	0.3
27	Ferritin/1-Cys-Prx	186336	1058	7012	1530	2.7	0.1
43	D113.II	93146	6343	31224	4238	3.08	0.02

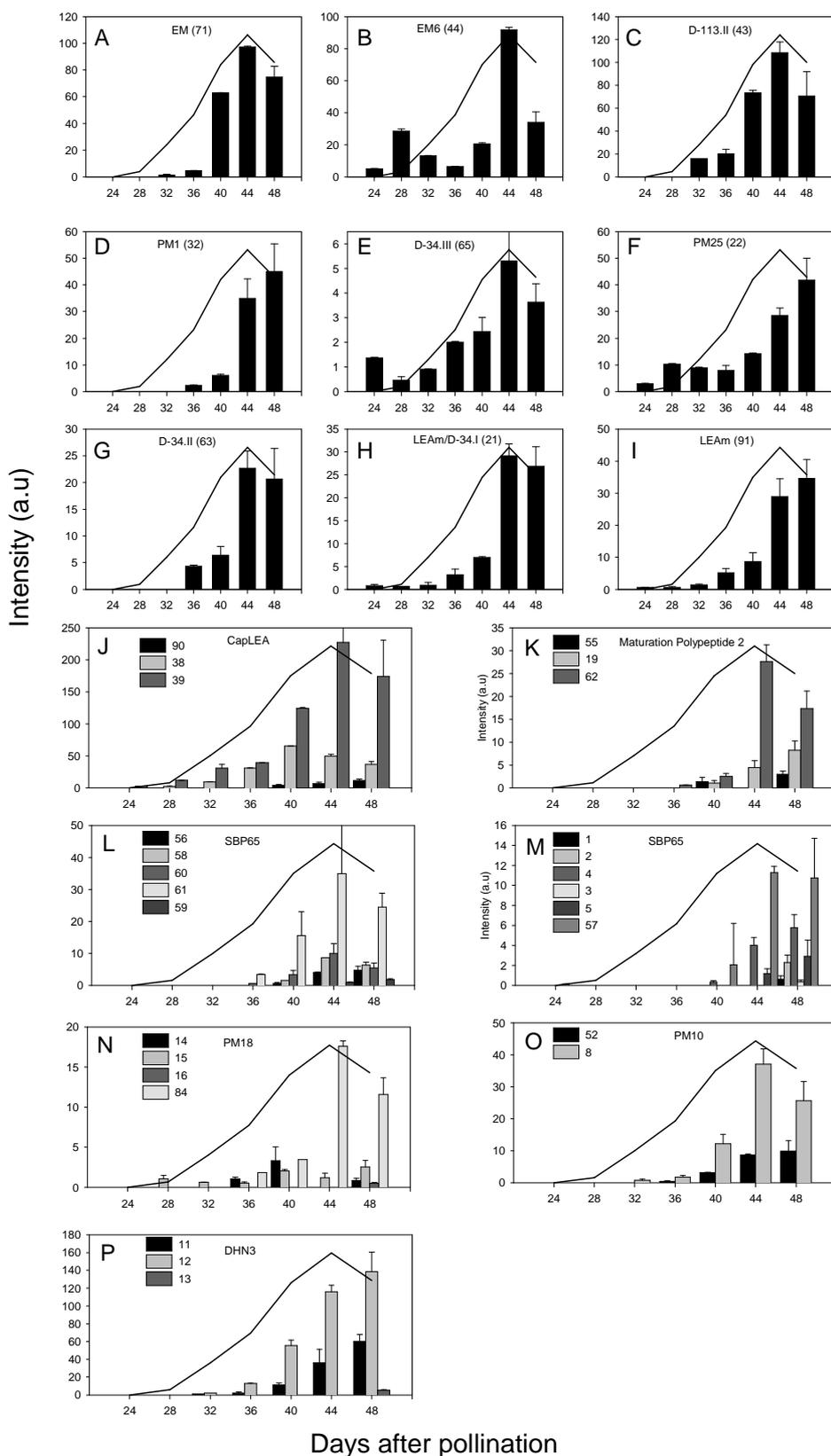
### Analysis of LEA protein abundance during maturation of *M. truncatula* seeds

Considering that only three LEA polypeptides are more abundant in axes compared to cotyledons (**Table 3.3**), the LEA proteome was characterised during seed maturation using whole seeds. The amount of soluble proteins increased slightly during late maturation, mainly between 24 and 32 DAP, but the heat stable protein content did not vary significantly (**Table 3.2**). The heat-stable protein fractions of seven maturation stages were analyzed by 2D gel electrophoresis using a non-linear pI gradient (**figure 3.4**). For each stage, the spots from 6 to 8 replicate gels were detected and compared to each other using the PD Quest software. In total, 134 spots were included in the reference gel. The number of detected spots differed significantly among the stages, ranging from 50 spots at 24 DAP to 134 spots in mature seeds (**figure 3.4, annexe 4**). During maturation, a gradual increase occurred especially above pI 5.5.



**Figure 3.4.** Changes in the heat-stable proteome during seed maturation of *M. truncatula*. Two dimensional electrophoresis was performed using 24 cm non linear immobilized pH gradient strips (3-10). pI and molecular mass (in kDa) are noted. DAP, days after pollination. 44 DAP corresponds to the point of pod abscission, and 48 DAP to dry mature seeds.

The expression profiles of the different LEA polypeptides during maturation are summarised in **figure 3.5**. A number of spots are identified as isoforms encoded by the same *LEA* gene (**figure 3.5 J-P**). The relative abundance measured by the spot intensity differs strongly amongst the spots for the same gene (**figure 3.5**). Spots with the highest intensity are: both members of group LEA\_5, (i.e. EM, **figure 3.5A** and EM6, **figure 3.5B**, **Table 3.1**); one member of LEA\_1 (D113.II, **figure 3.5C**), the dehydrin DHN3 (**figure 3.5P**) and one of the several isoforms of two genes belonging to the large LEA\_4 family (spot 39 of CapLEA (**figure 3.5J**) and spot 61 of SBP65 (**figure 3.5L**)). The abundance of most spots (i.e. 13 out of 16 genes) increased sharply at the final two stages, during abscission (44 DAP) and mature seeds (48 DAP). This increase is concomitant with the sharp drop in water content between 40 DAP (0.91 g H<sub>2</sub>O/ g dw) and 48 DAP (0.11 g H<sub>2</sub>O/ g dw).



**Figure 3.5.** Spot abundance of LEA polypeptides during maturation. Names and spot numbers are indicated. A) EM, 71; B) EM6, 44; C) D113.II, 43; D) PM1, 32; E) D-34.III, 65; F) PM25, 22; G) D-34.II, 63; H) LEAm/D-34.I, 21; I) LEAm (91); J) CapLEA (38, 39, 90); K) Maturation polypeptide 2, 19, 55, 62; L and M) SBP65, 1-5, 56-61; N) PM18, 14-16, 84; O) PM10, 8, 52; P) DHN3, 11-13. Error bars represent standard deviations. The solid line represents the increase in longevity (P50), taken from Figure 3.2D.

A previous transcriptome study on the acquisition of desiccation tolerance identified numerous LEA transcripts that accumulated around 20 DAP (Buitink *et al.*, 2006). To investigate the relation between transcript and protein abundance, we used the *M. truncatula* gene expression atlas (Benedito *et al.*, 2008) to determine the increase in transcripts of LEA genes in developing seeds. The gene atlas contains transcriptome data of embryos between 10 and 24 DAP and an additional time point at 36 DAP (comparable to our time point at 36 DAP (Gallardo *et al.*, 2003)). The fold increase in expression of 15 LEA genes during seed filling (from 10 DAP to 24 DAP) was compared to the increase in gene expression between 24 and 36 DAP (**Table 3.4**). For one gene, EM, no probes were present on the Affymetrix slides. This *in silico* expression demonstrated that gene expression occurred almost completely before 24 DAP (**Table 3.4**) whereas the LEA proteome becomes increasingly complex after 36 DAP. Clearly, the accumulation of LEA proteins is characteristically under the influence of post-transcriptional regulation.

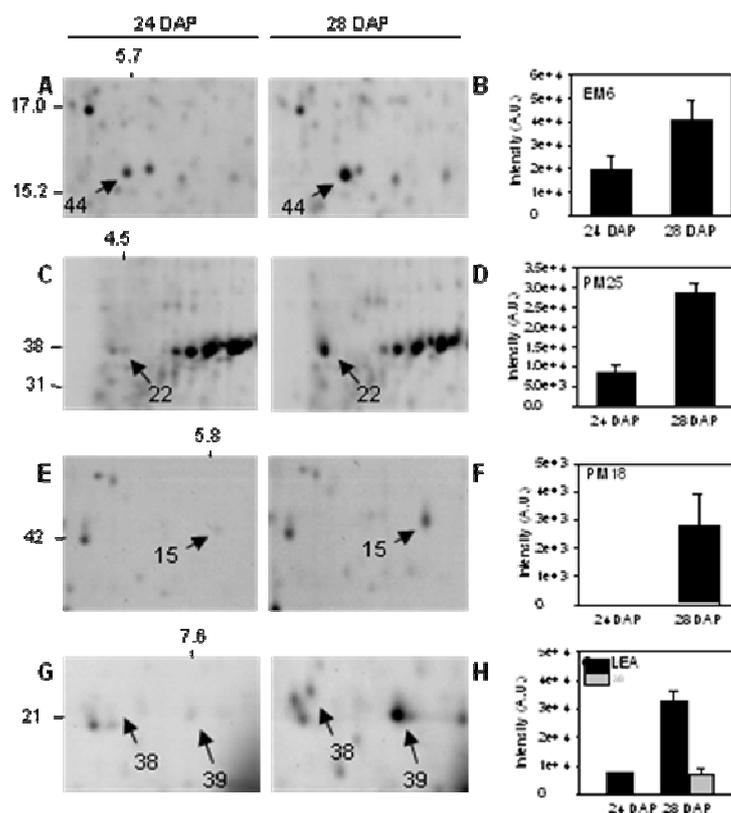
**Table 3.4.** *In silico* expression analysis of LEA genes encoding LEA proteins using the gene expression atlas (<http://mtgea.noble.org/v2/>). The increase in expression between 10 and 24 DAP, and between 24 and 36 DAP were calculated using the probes indicated.

identification	Pfam	probe	fold increase in expression	
			10 to 24 DAP	24 to 36 DAP
EM6	PF00477	Mtr.19482.1.S1_at	430.2	2.1
PM25	PF04927	Mtr.2886.1.S1_at	260.9	1.4
D34.I	PF04927	Mtr.48371.1.S1_at	211.3	3.9
D34.II	PF04927	Mtr.44017.1.S1_at	263.1	4.7
D34.III	PF04927	Mtr.26650.1.S1_at	482.4	2.6
D113.I	PF03760	Mtr.43089.1.S1_at	2.9	12.5
D113.II	PF03760	Mtr.43091.1.S1_s_at	229.7	1.2
PM1	PF03760	Mtr.12942.1.S1_at	296.5	1.1
MP2	PF02987	Mtr.43533.1.S1_at	535.9	1.8
LEAm	PF02987	Mtr.21257.1.S1_at	542.1	2.0
PM10	PF02987	Mtr.23672.1.S1_at	499.3	2.3
PM18	PF02987	Mtr.12875.1.S1_at	1238.1	1.4
CapLEA	PF02987	Mtr.12327.1.S1_s_at	1092.6	1.1
SBP65	PF02987	Mtr.9049.1.S1_at	875.0	1.2
DHN3	PF00257	Mtr.8651.1.S1_at	481.4	1.2

### A small number of LEA polypeptides increase in relation to the acquisition of desiccation tolerance

The majority of the LEA spots started to increase in intensity after 28 DAP, once the acquisition of desiccation tolerance was acquired, (**figure 3.5**). However, some spots represented at least 10% of their total abundance around this stage, such as EM6 (**figure 3.5B**), D-34.III or PM25. A statistical analysis was therefore performed to identify those spots that increased significantly in relation with desiccation tolerance. For this purpose, spot intensity of the heat stable proteome of desiccation-insensitive (24 DAP) and desiccation tolerant (28 DAP) seeds was normalised based on total density in spots and analysed to detect statistically significant spots between the two stages (**annexe 3**). A total of 10 spots became detectable between these two stages, among which two LEA polypeptides:

CapLEA (spot 38) and an isoform of PM18 (spot 15). In addition, nine spots increased significantly in relative abundance, with six spots that were identified (**annexe 3**). The LEA proteins that increased in relation to the acquisition of desiccation tolerance are shown in **figure 3.6**. Two polypeptides, EM6 and PM25, increased 2 and 3.3-fold, respectively (**figure 3.6A-D**). These two proteins were identified previously in relation to the re-induction of desiccation tolerance (Boudet *et al.*, 2006). Three additional LEA polypeptides identified in relation to desiccation tolerance are LEA\_4 members: CAPLEA (spots 32 and 43) and PM18 (spot 15) (**figure 3.6 E-H**).

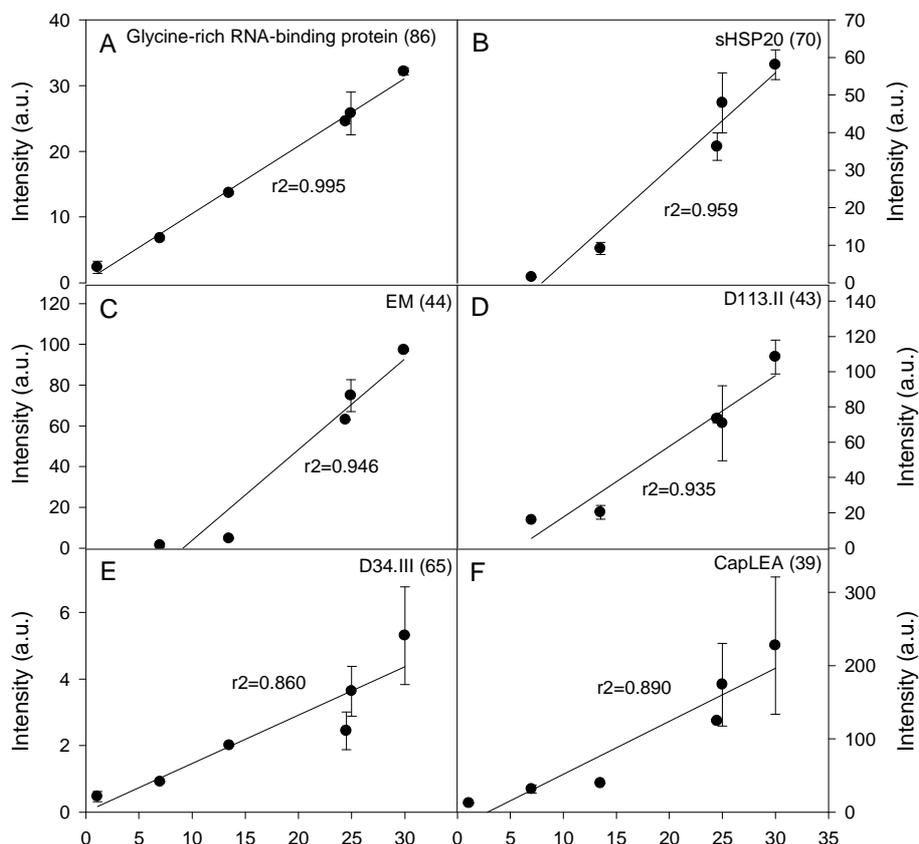


**Figure 3.6.** Changes in LEA polypeptides that accumulate during the acquisition of desiccation tolerance in developing seeds of *M. truncatula*, identified as EM6 (A, B), PM25 (C, D), PM18 (E, F) and two polypeptides of CAPLEA (G, H). Representative 2D gels (A, C, E, G) and relative spot quantities (B, D, F, H) at 24 and 28 DAP. Spot numbers are taken from figure 3.1. pI and molecular mass (in kDa) are indicated on the left gel. The intensities of the spots 22 and 44 were significantly different between 24 and 28 DAP based on multiple comparison of the means ( $P < 0.001$ ).

#### Four LEA polypeptides and a small heat shock protein correlate with the acquisition of longevity

As can be seen from **figure 3.5**, few spots increase in intensity in relation to longevity. A statistical analysis was carried out to identify spots of the heat stable proteome for which the relative intensity was significantly correlated to the increase in  $P_{50}$  (**annexe 3**). Six spots were identified with a significant ( $P < 0.01$ ) Pearson correlation coefficient (two-tailed probability test) using at least five time points (**figure 3.7**). Four spots represented LEA polypeptides: EM (**figure 3.7C**, spot 71,  $r = 0.973$ ,  $P = 0.001084$ ), D113.II (**figure 3.7D**, spot 43,  $r = 0.967$ ,  $P = 0.001616$ ), D-34.III (**figure 3.7E**, spot 65,

$r=0.927$ ,  $P=0.007799$ ), and CAPLEA (**figure 3.7F**, spot 39,  $r=0.943$ ,  $P=0.004781$ ). Although it is impossible to determine the precise amounts of these four LEA polypeptides compared to the total LEA proteome, an estimation of their abundance based on the absolute intensities shows that they are highly abundant, representing 14.4% of the total intensity of the heat-stable protein fraction and 45% of the intensity of the LEA proteome (38 spots).



**Figure 3.7.** Correlation between spot abundance of identified heat-stable proteins and longevity (P50). P50 is taken from Figure 3.2D. The  $r^2$  of the linear regression is indicated. A) sHSP20/D-34.I, spot 40; B) sHSP20, spot 70; C) EM, spot 44; D) D113.II, spot 43; E) D34.III, spot 65) and F) CapLEA, spot 39.

However, the two best correlated spots with longevity were not identified as LEA proteins but corresponded to a Glycine rich RNA-binding protein, with strong homology to the GRP7 of *Arabidopsis* (At2g21660.1) (**figure 3.7A**, spot 40,  $r=0.999$ ,  $P=0.000013$ ) and a small HSP20 (**figure 3.7B**, spot 70,  $r=0.979$ ,  $P=0.000657$ ). Interestingly, the common denominator of these two proteins is their chaperone activity as suggested by their annotation in the gene database.

## Discussion

A detailed characterization of the LEA proteome in maturing seeds of *M. truncatula* identified 38 spots that represent 16 LEA genes. For the majority of the spots, their abundance increased at the final step of drying, at the moment of pod abscission and final maturation desiccation. Rather surprisingly, few LEA polypeptides were linked to the acquisition of desiccation tolerance, and those that showed

increased abundance during the acquisition continued to increase upon further seed maturation (**figure 3.5**). Furthermore, only four LEA polypeptides showed a significant correlation with longevity, albeit that they showed the highest spot abundance. To our knowledge, this is the first comprehensive study characterizing the LEA proteome in developing seed tissues. Previous studies focussed either on heat-stable protein fraction using 1D-SDS PAGE without identification of the polypeptides (Blackman *et al.*, 1991; Sinniah *et al.*, 1998b) or on transcript levels (Galau *et al.*, 1987; Hughes & Galau, 1989). Considering that LEA polypeptides only represent 31% of the total heat-stable protein fraction (based on intensity), it is uncertain whether previously identified spots/bands are LEA proteins. Also, a previous heat stable proteome analysis in *Medicago truncatula* limited the identification to those LEA proteins that were associated with desiccation tolerance and drought tolerance in germinating radicles (Boudet *et al.*, 2006). Studies based on gene expression identified the different LEA genes but did not study transcript abundance in relation to any physiological traits (Galau *et al.*, 1987; Hughes & Galau, 1989; Hughes & Galau, 1991).

Of particular significance towards the understanding of the regulation and function of LEA proteins in developing seeds is the absence of correlation between transcript abundance and protein levels. Besides evidence for posttranscriptional regulation (Bies *et al.*, 1998; Baumbusch *et al.*, 2004), several types of posttranslational modifications have also been detected in LEA proteins such as biotinylation, phosphorylation, deamidation and oxidation (Tolleter *et al.*, 2007; Tunnacliffe & Wise, 2007). Also, phosphorylation appears to confer functionality to acidic dehydrins (references in (Tunnacliffe & Wise, 2007)). These findings, together with our study, suggest that caution should be exerted when extrapolating transcriptome data to establish correlations with physiological traits.

This work shows that studying the heat-stable protein fraction as a mean to enrich in LEA proteins allowed for the identification of almost all LEA proteins present in seeds. This was demonstrated by the HILIC/LC-MS/MS analysis carried out in parallel on the total protein fraction (**Table 3.1**). A proteome analysis based on the total protein fraction during seed development of *M. truncatula* identified only three LEA proteins (Gallardo *et al.*, 2003), indicating that the enrichment step is crucial to study LEA protein abundance. One might argue that the heating step might result in possible artefacts, such as precipitation of LEA proteins that might interact with denatured proteins. Experimental evidence shows that it is not the case for EM6 and PM25 (Boucher *et al.*, 2010). Yet, this could be true for the LEA14-like protein that was not detected in our 2D gels. However, their identification as genuine LEA proteins is currently disputed for this exact reason (Tunnacliffe & Wise, 2007). However, it should be kept in mind that the emphasis of this study is on the profile of LEA protein abundance during maturation, and not on the absolute amounts. It is likely that the relative amount of LEA protein accumulation at the different stages is related to their potential function.

A small number of LEA proteins increased or appeared during the acquisition of desiccation tolerance (**figure 3.5** and **3.6**). These include PM25 (LEA\_1), EM6 (LEA\_5) and an isoform of PM18. Interestingly, these same proteins re-appear upon the re-induction of desiccation tolerance in

germinated radicles (Boudet *et al.*, 2006). The physico-chemical properties of MtEM6 have been well characterized *in vitro* (McCubbin *et al.*, 1985; Soulages *et al.*, 2002; Gilles *et al.*, 2007). For both EM6 and PM25, the removal of water induced a transition from a fairly disordered conformation to the formation of a considerable amount of ordered structures, at a hydration level around 0.2 to 0.3 g/g, corresponding to the onset of the removal of the hydration shell. An *in vitro* study on the function of PM25 demonstrated a strong capacity to bind water, and is capable of dissociating cold and desiccation aggregated proteins (Boucher *et al.*, 2010). The role of both proteins in desiccation tolerance remains however elusive. *Arabidopsis* mutants deficient in Em6 (Manfre *et al.*, 2009) and *Medicago truncatula* mutants deficient in PM25 (Hundertmark *et al.*, personal communication) produced dry viable seeds.

One other LEA polypeptide (CapLEA) that accumulated in relation to desiccation tolerance also correlated with the subsequent increase in longevity (**figure 3.5**), suggesting that its abundance is strongly correlated to a quantitative increase in survival in the dry state. This polypeptide showed the highest abundance, its intensity represented approximately 25% of the total LEA proteome in mature seeds. Overexpression of homologues of this protein was shown to enhance drought tolerance in whole plants, but phenotypes in relation to seed survival in the dry state were not investigated (Xu *et al.*, 1996; Babu *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2006). Considering its high abundance, a broad stabilisation function in the dry state is well plausible. The other three LEA proteins that accumulate in relation with longevity are D-34.III, D113.II and EM. D-34.III is highly similar to PM25 and EM to EM6 (89% and 86%, respectively), both LEA proteins that were detected in relation to desiccation tolerance. Possible, both homologous members have similar functions in the survival of seeds in the dry state. This also suggests that double knock-out plants might be needed to ascertain their function to avoid redundancy, as was suggested in the case of EM (Manfre *et al.*, 2009). The homologue of the MtD113.II LEA protein that is linked to longevity has been functionally characterised in *Arabidopsis* (AtLEA4-5) (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010). Analysis of overexpressing and insertion lines demonstrated a role for AtLEA4-5 in germination efficiency under water deficit and tolerance to severe drought in adult plants (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010). Interestingly, all the four LEA polypeptides whose abundance correlated with the increase in longevity are amongst the most abundant ones, representing 45% of the total LEA proteome, what would be expected if they play a direct role as a protective molecule.

The decrease in longevity after pod abscission is a characteristic found in seeds that are not dispersed from the pods after abscission (Probert *et al.*, 2007) and it has been suggested that the relatively high water content present in the seeds can lead to accelerated ageing. It is unknown what processes will take place during this short maturation period, but it is clear from the LEA proteome that a number of polypeptides are partially degraded, whereas others increase in abundance (**figure 3.5**). Possibly, the decrease in longevity can be linked to different underlying mechanisms that the acquisition during earlier maturation. To identify additional LEA polypeptides linked to the acquisition of longevity (and not to the decrease), we omitted the P50 of the mature seeds from the correlation

analysis. This way, one more polypeptide identified as DNH3 (spot 12, a dehydrin) becomes highly significantly correlated with the P50 ( $r=0.949$ ). We recently discovered that down-regulation of the expression of two dehydrin genes in *Arabidopsis* resulted in a two-fold decrease in seed longevity (Hundertmark *et al.*, 2010), suggesting that this DNH3 polypeptide might be an additional candidate playing a role in seed longevity of *M. truncatula*.

Two additional polypeptides that correlated in a highly significant manner with the increase in longevity were identified as a Glycine rich RNA-binding protein and sHSP20 (**figure 3.6**). Small heat shock proteins have been correlated to desiccation tolerance (Wehmeyer & Vierling, 2000). Recent work demonstrated via the modulation of the expression of a heat shock factor HaHSFA9 that sHSP play a role not only in increased thermostability, but also in enhanced resistance of the seeds against controlled deterioration at high water content (24 and 15%) and high temperature (50°C) conditions (Prieto-Dapena *et al.*, 2006; Tejedor-Cano *et al.*, 2010). The glycine-rich RNA-binding protein shows very strong similarity to CRP7 of *Arabidopsis*. It has been shown that GRP7 helps *E.coli* to grow and survive better during cold shock, and suggested that GRP7 exhibits RNA chaperone activity (Kim *et al.*, 2007).

The most surprising observation was that 31 LEA polypeptides, corresponding to 11 of 16 LEA genes, accumulated after the acquisition of longevity and desiccation tolerance. The physiological role of these polypeptides remains to be determined. Considering that they accumulate during the drying phase, possibly, these proteins could regulate the dehydration rate of seeds after pod abscission to assist in a correctly regulated natural drying. Some LEA proteins are known to be able to bind water and prevent structural collapse (reviewed in Tunnacliffe & Wise, 2007; Boucher *et al.*, 2010). Alternatively, they might play a role during subsequent imbibition to prevent the so-called imbibitional damage and/or facilitate and regulate water absorption.

## Material and Methods

### Plant Material and Treatments

Plants of *M. truncatula* Gaertn. (A17) were grown in a sterile mix of vermiculite and soil in a growth chamber at 21°C/24°C, 16 h photoperiod at 200  $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-2}$ . Flowers were tagged and developing seeds were removed from the pods at different time intervals. Seeds were rapidly dried over an airflow of 42% RH for 3d. Fresh weight and dry weight were determined gravimetrically on 5 replicates of 4 seeds and water content determined after heating the seeds for 48h at 96°C. Seeds were imbibed on wet filter paper at 20°C in the dark after scarification by sand paper. They were considered germinated when the radicle protruded the surrounding envelope. For ageing experiments, seeds were kept over a saturated solution of NaCl (75% RH) at 35°C in hermetically sealed boxes for different time spans, after which the germination percentage was determined after imbibition of 80 seeds in a solution of 20

$\mu$ M fluridone at 20°C in the dark to release dormancy (Bolingue *et al.*, 2010a). For protein extraction, dried seeds were stored at -80°C before use.

### Protein Extraction

*Sample preparation for 2D gel analysis*- Soluble proteins were extracted in triplicate from 50 seeds according to Boudet *et al.* (2006). The resulting supernatant corresponded to the heat-stable fraction. Protein concentrations were assayed according to Bradford (1976). For the 2D electrophoresis, the HS proteins were precipitated with 20% (w/v) trichloroacetic acid on ice then centrifuged at 13,000 g for 10 min at 4°C. The pellet was washed with 400  $\mu$ l of cold acetone, air dried and resuspended in 500  $\mu$ l of rehydration buffer (6 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 20 mM dithiothreitol (DTT), 1% (v/v) biolytes from Bio-Rad (Hercules, CA, USA)).

*Sample preparation for HILIC fractionation*- HILIC fractionation was used to de-complexify total protein extract before LC-MS/MS analysis in order to identify LEA proteins. Total protein extract was prepared from mature seeds of *Medicago truncatula* (R108). A batch of 30 seeds was ground in liquid nitrogen using mortar and pestle. Total proteins were precipitated in 800  $\mu$ l of TCA/acetone solution (10% TCA in acetone plus 0.07% DTT) during one hour at -20°C. Samples were centrifuged at 20,000 g for 30 min at 4°C. Pellets were washed with 1 mL of acetone plus 0.07% DTT and incubated for 30 min on dry ice. Total proteins were centrifuged (20 000g for 30 min) at 4°C and pellets containing proteins were dried for 5 min in rotary evaporator. Total proteins were resuspended in rehydration buffer (6 M Urea, 2 M Thiourea, 4 % CHAPS (w/v), 20 mM DTT, HALT Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific)) at 4°C. After determining protein concentration according to Bradford (1976), 1 mg of total proteins was digested by sequencing grade modified trypsin (Promega, Madison, WI) in 25 mM ammonium carbonate plus 10 % acetonitrile at 37°C. Digests were acidified to 1% TFA, desalted on a 200 mg UPTI-CLEAN SPE COLUMN C18 (Interchim) and lyophilized to dryness.

### 2D Electrophoresis

Twenty-four cm immobilized pH gradient (non linear from 3 to 10) strips (Bio-Rad) containing 100  $\mu$ g of heat soluble proteins were focalized according to (Boudet *et al.*, 2006). Size separation of proteins was performed on vertical polyacrylamide gels (12% (w/v) acrylamide) in a Ettan DaltSix Electrophoresis system (Amersham Biosciences, Orsay, France) according to Boudet *et al.*, (2006). The experiments were set up in a randomized block design where 6 gels corresponding to independent protein extractions from various maturation stages were run in parallel. Six to 8 gels per stage were accumulated independently.

### Gel Staining, Image and Statistical Analysis

Gels were stained and scanned according to Boudet *et al.* (2006) using a GS 800 scanner (Bio-Rad). Digitalized gels were analyzed using the PD-Quest 7.1 software (Bio-Rad). Images were filtered

(mode pepper outlier 7\*7). After optimization of the parameters for background subtraction and spot detection, the spots that were not present in at least 50% of the gels and those exhibiting a quality below the set value of 20% (max. value being 100%) were discarded. Because the heat-stable proteome changed considerably during maturation, data could not be normalised using total spot intensity. A group of 15 spots whose abundance did not vary were taken for normalisation, according to (Gallardo *et al.*, 2003). A nested ANOVA ( $P < 0.05$ ) was performed using the Statgraphics software (StatPoint Inc, Herndon, VA) according to Boudet *et al.* (2006): the normalized spot quantities and the stage were respectively the variable and the factor whereas the extraction and the 2D electrophoresis were nested in the factor. The Bartlett test ( $P < 0.05$ ) was used to confirm the applicability of the ANOVA. A multiple comparison of the means using the Student-Newman-Keuls test ( $P < 0.05$ ) was then performed on the normalized quantities that were found to be significantly different among the stages. Correlation between P50 longevity and spot relative intensity was calculated according to Pearson's and the significance of the correlation coefficient was determined from a two tailed t-test. Experimental molecular masses and pI were determined from digitalized gels using 2-D marker proteins (Bio-Rad) and the calibration method of the PDQuest software (BioRad).

### Hydrophilic interaction chromatography

Preparative chromatographic separations were performed on a Waters 2695 HPLC system using a 4.6 x 250 mm TSK-gelAmide-80 5  $\mu\text{m}$  particle column (Tosoh Biosciences). 1 mg of desalted tryptic digest peptides was loaded in 80% solvent B (98% acetonitrile with 0.1% TFA). Solvent A consisted of 98% water with 0.1% TFA. Peptides were eluted with an inverse gradient of 80% B in 5 min followed by 80% B to 55% B in 45 min and finally a step gradient to 0% B in 5 min at 0.5 mL/min. Ten 2.5 mL fractions were collected throughout the gradient and lyophilized for LC-MS/MS analyses.

### Mass spectrometry and protein identification

*2D gel analysis*- Spots of interest were excised from the 2D gels and subjected to in-gel tryptic digestion. Briefly, gel slices were washed with 100  $\mu\text{L}$  of 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  by incubation for 1h at room temperature, followed by dehydration with 100  $\mu\text{L}$  of 50% (v/v) acetonitrile in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  for 45 min at room temperature. Proteins were reduced and alkylated by incubation for 1h at 57°C in the presence of 10 mM DTT followed by 45 min at room temperature after adding 55 mM iodoacetamide. Gel slices were washed with  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  and dehydrated with 100% acetonitrile as described before. Gel slices were rehydrated with 10  $\mu\text{L}$  of 15 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  trypsin in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (Sequencing grade, Promega, Madison, WI). After an overnight incubation at 37°C, tryptic fragments were finally extracted with 1% formic acid in 70% acetonitrile and measured by LC-ESI-MS/MS. LC-ESI-MS/MS analysis was performed using a nanoscale HPLC (Famos-Switchos-Ultimate system, LC Packings, Dionex, The Netherlands) coupled to a hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF Global, Micromass-Waters, UK) as described in Boudet *et al.* (2006). Mass data were analyzed with the Protein Lynx Global Server software (Micromass-Waters). Protein

identification was performed by comparing the data with the UniProt sequence databank (date of release: August 13, 2010) or with TIGR *Medicago* EST databank (date of release: April 10, 2010).

**HILIC fractionation**- Each fraction was resuspended in 2% acetonitrile/0.04% TFA. Nano-HPLC-MS/MS analysis was performed on an UltiMate 3000 RSLCnano LC system (Dionex). Peptide separation was carried out on a C18 column (Acclaim PepMap C18, 2 cm×100 µm×5 µm, Dionex) at a flow rate of 200 nL/min using a gradient from 2 to 50% of 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile. The HPLC was directly coupled to a LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Mass data were recorded on a mass range 400-200 m/z and MS/MS spectra are acquired by using a TOP5 sequencing mode with CID fragmentation. The LTQ-Orbitrap Velos raw data were converted into mgf files using Proteome Discoverer software (Thermo Scientific). Fragment ion data were interpreted using the Mascot 2.2 program (Matrix Science).

#### Acknowledgments

This work was funded by grants from the Région-des Pays-de-la Loire (program COSAVE (2007-2009), PHOSPHOSAVE (2008-2011) and QUALISEM 2010–2014). EC thanks the CADRES for a Ph.D. fellowship. We thank Dr Françoise MONTRICHARD for help regarding her proteomic approach.

#### References

- Babu RC, Zhang JX, Blum A, Ho THD, Wu R, Nguyen HT. 2004.** HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Science* **166**: 855-862.
- Bahieldin A, Mahfouz HT, Eissa HF, Saleh OM, Ramadan AM, Ahmed IA, Dyer WE, El-Itriby HA, Madkour MA. 2005.** Field evaluation of transgenic wheat plants stably expressing the HVA1 gene for drought tolerance. *Physiologia Plantarum* **123**: 421-427.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias AA. 2008.** The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. *Plant Physiology* **148**: 6-24.
- Baumbusch LO, Hughes DW, Galau GA, Jakobsen KS. 2004.** LEC1, FUS3, ABI3 and Em expression reveals no correlation with dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **55**: 77-87.
- Benedito VA, Torres-Jerez I, Murray JD, Andriankaja A, Allen S, Kakar K, Wandrey M, Verdier J+, Zuber H+, Ott T, Moreau S, Niebel A, Frickey T, Weiller G, He J, Dai X, Zhao PX, Tang Y, Udvardi MK. 2008.** A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* **55**: 504-513.
- Bies N, Aspart L, Carles C, Gallois P, Delseny M. 1998.** Accumulation and degradation of Em proteins in *Arabidopsis thaliana*; evidence for post-transcriptional controls. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1925-1933.
- Black M, Corbineau F, Gee H, Come D. 1999.** Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiology* **120**: 463-471.
- Blackman SA, Wettlaufer SH, Obendorf RL, Leopold AC. 1991.** Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. *Plant Physiology* **96**: 868-874.
- Boersema P, Mohammed S, Heck A. 2008.** Hydrophilic interaction liquid chromatography (hilic) in proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **391**: 151-159.
- Bolingue W, Ly Vu B, Leprince O, Buitink J. 2010a.** Characterization of dormancy behaviour in seeds of the model legume *Medicago truncatula*. *Seed Science Research* **20**: 97-107.
- Boucher V, Buitink J, Lin X, Boudet J, Hoekstra FA, Hundertmark M, Renard D, Leprince O. 2010.** MtPM25 is an atypical hydrophobic late embryogenesis-abundant protein that dissociates cold and desiccation-aggregated proteins. *Plant Cell Environ.* **33**: 418-430.
- Boudet J, Buitink J, Hoekstra FA, Rogniaux H, Larre C, Sator P, Leprince O. 2006.** Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant Physiol* **140**: 1418-1436.
- Buitink J, Leger JJ, Guisle I, Vu BL, Wulleme S, Lamirault G, Le BA, Le MN, Becker A, Kuster H, Leprince O. 2006.** Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes

- occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. *The Plant Journal* **47**: 735-750.
- Duval M, Derose RT, Job C, Faucher D, Douce R, Job D. 1994.** The Major Biotinyl Protein from *Pisum-Sativum* Seeds Covalently Binds Biotin at A Novel Site. *Plant Molecular Biology* **26**: 265-273.
- Ellis RH, Hong TD. 1994.** Desiccation tolerance and potential longevity of developing seeds of rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany* **73**: 501-506.
- Figueras M, Pujal J, Saleh A, Save R, Pages M, Goday A. 2004.** Maize Rab17 overexpression in *Arabidopsis* plants promotes osmotic stress tolerance. *Annals of Applied Biology* **144**: 251-257.
- Galau GA, Bijaisoradat N, Hughes DW. 1987.** Accumulation kinetics of cotton late embryogenesis-abundant mRNAs and storage protein mRNAs: Coordinate regulation during embryogenesis and the role of abscisic acid. *Developmental Biology* **123**: 198-212.
- Galau GA, Hughes DW. 1987.** Coordinate accumulation of homeologous transcripts of seven cotton Lea gene families during embryogenesis and germination. *Developmental Biology* **123**: 213-221.
- Gallardo K, Le Signor C, Vandekerckhove J, Thompson RD, Burstin J. 2003.** Proteomics of *Medicago truncatula* Seed Development Establishes the Time Frame of Diverse Metabolic Processes Related to Reserve Accumulation. *Plant Physiology* **133**: 664-682.
- Gilles GJ, Hines KM, Manfre AJ, Marcotte WR. 2007.** A predicted N-terminal helical domain of a Group 1 LEA protein is required for protection of enzyme activity from drying. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**: 389-399.
- Hong TD, Ellis RH. 1992.** Development of desiccation tolerance in Norway maple (*Acer platanoides* L.) seeds during maturation drying. *Seed Science Research* **2**: 169-172.
- Hughes DW, Galau GA. 1989.** Temporally modular gene expression during cotyledon development. *Genes & Development* **3**: 358-369.
- Hughes DW, Galau GA. 1991.** Developmental and Environmental Induction of Lea and Leaa Messenger-Rnas and the Postabscission Program During Embryo Culture. *THE PLANT CELL* **3**: 605-618.
- Hundertmark M, Buitink J, Leprince O, Hinch DK. 2010.** The reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in *arabidopsis thaliana*. *Seed Science Research*.
- Kim JS, Park SJ, Kwak KJ, Kim YO, Kim JY, Song J, Jang B, Jung CH, Kang H. 2007.** Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote the cold adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* **35**: 506-516.
- Leprince O, Buitink J. 2010.** Desiccation tolerance: From genomics to the field. *Plant Science* **179**: 554-564.
- Mai-Hong T, Hong TD, Hien NT, Ellis RH. 2003.** Onset of germinability, desiccation tolerance and hardseededness in developing seeds of *Peltophorum pterocarpum* (DC) K. Heyne (Caesalpinioideae). *Seed Science Research* **13**: 323-327.
- Mai-Hong T, Hong TD, Hien NT, Hai HH, Tung TD, Le-Tam VT, Ngoc-Tam B, Ellis RH. 2006.** Seed development, maturation and storage behaviour of *Mimusops elengi* L. *New Forests* **32**: 9-19.
- Manfre AJ, LaHatte GA, Climer CR, Marcotte WR. 2009.** Seed Dehydration and the Establishment of Desiccation Tolerance During Seed Maturation is Altered in the *Arabidopsis thaliana* Mutant *atem6-1*. *Plant and Cell Physiology* **50**: 243-253.
- Mccubbin WD, Kay CM, Lane BG. 1985.** Hydrodynamic and Optical-Properties of the Wheat-Germ Em Protein. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* **63**: 803-811.
- Olvera-Carrillo Y, Campos F, Reyes JL, Garcarrubio A, Covarrubias AA. 2010.** Functional Analysis of the Group 4 Late Embryogenesis Abundant Proteins Reveals Their Relevance in the Adaptive Response during Water Deficit in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **154**: 373-390.
- Park BJ, Liu ZC, Kanno A, Kameya T. 2005.** Genetic improvement of Chinese cabbage for salt and drought tolerance by constitutive expression of a *B. napus* LEA gene. *Plant Science* **169**: 553-558.
- Prieto-Dapena P, Castano R, Almoguera C, Jordano J. 2006.** Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. *Plant Physiol.* **142**: 1102-1112.
- Probert R, Adams J, Coneybeer J, Crawford A, Hay F. 2007.** Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. *Australian Journal of Botany* **55**: 326-335.
- Roychoudhury A, Roy C, Sengupta DN. 2007.** Transgenic tobacco plants overexpressing the heterologous lea gene Rab16A from rice during high salt and water deficit display enhanced tolerance to salinity stress. *Plant Cell Reports* **26**: 1839-1859.
- Sanhewe AJ, Ellis RH. 1996a.** Seed development and maturation in *Phaseolus vulgaris* .1. Ability to germinate and to tolerate desiccation. *Journal of Experimental Botany* **47**: 949-958.

- Sanhewe AJ, Ellis RH. 1996b.** Seed development and maturation in *Phaseolus vulgaris* .2. Post-harvest longevity in air-dry storage. *Journal of Experimental Botany* **47**: 959-965.
- Sinniah UR, Ellis RH, John P. 1998a.** Irrigation and seed quality development in rapid-cycling brassica: Seed germination and longevity. *Annals of Botany* **82**: 309-314.
- Sinniah UR, Ellis RH, John P. 1998b.** Irrigation and seed quality development in rapid-cycling brassica: Soluble carbohydrates and heat-stable proteins. *Annals of Botany* **82**: 647-655.
- Soulages JL, Kim K, Walters C, Cushman JC. 2002.** Temperature-induced extended helix/random coil transitions in a group 1 late embryogenesis-abundant protein from soybean. *Plant Physiology* **128**: 822-832.
- Tejedor-Cano J, Prieto-Dapena P, Almoguera C, Carranco R, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Jordano J. 2010.** Loss of function of the *hsfa9* seed longevity program. *Plant, Cell & Environment* **33**: 1408-1417.
- Tolte D, Jaquinod M, Mangavel C, Passirani C, Saulnier P, Manon S, Teyssier E, Payet N, Avelange-Macherel M-H, Macherel D. 2007.** Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. *Plant Cell* **19**: 1580-1589.
- Tunnacliffe A, Wise MJ. 2007.** The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften* **94**: 791-812.
- Wise MJ, Tunnacliffe A. 2004.** POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Science* **9**: 13-17.
- Xiao BZ, Huang YM, Tang N, Xiong LZ. 2007.** Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theoretical and Applied Genetics* **115**: 35-46.
- Xiao H, Siddiqua M, Braybrook S, Nassuth A. 2006.** Three grape CBF/DREB1 genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. *Plant, cell & environment* **29**: 1410-1421.
- Xu DP, Duan XL, Wang BY, Hong BM, Ho THD, Wu R. 1996.** Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology* **110**: 249-257.



## Chapitre 4

# Analyse du rôle du gène *ABI5* dans la maturation des graines de *M. truncatula*

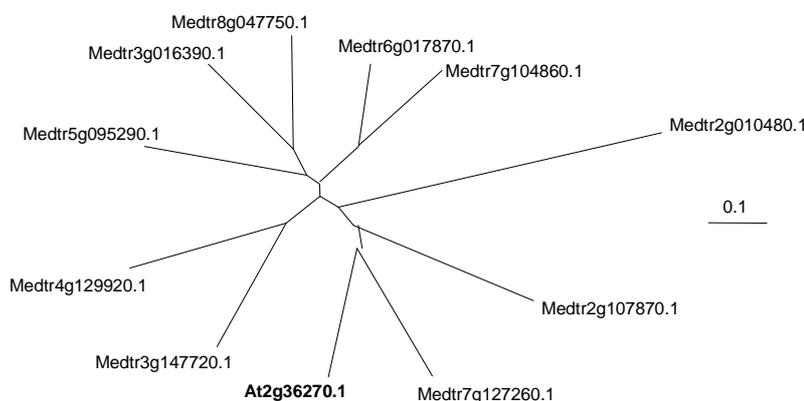


Un des facteurs de transcription connu pour son implication dans la régulation de l'expression des gènes LEA est *ABI5*, facteur de transcription de type bZIP (Finkelstein, 1994). Chez *Arabidopsis*, les gènes *LEA* décrits à ce jour comme étant sous le contrôle de ce facteur de transcription sont deux membres de la famille LEA\_5 : *EM1* et *EM6*, ainsi qu'un membre de la famille SMP : *D-34* (Brocard *et al.*, 2002). A notre connaissance, il n'existe pas de travaux pour tenter de déterminer si *ABI5* est capable de réguler d'autres gènes *LEA*. Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord tenté de répondre à cette question en analysant le protéome stable à la chaleur obtenu à partir de mutants *abi5* de *M. truncatula*. Par ailleurs, étant donné que les protéines LEA sont accumulées pendant la maturation (chapitre 3), nous avons également voulu savoir si *ABI5* participe à la régulation d'autres processus physiologiques tels que la dormance et la longévité. En effet, chez *Arabidopsis*, les phénotypes des mutants *abi5* sont liés à la germination et la dormance (voir chapitre 1). Enfin, nous avons également voulu savoir si les graines du mutant *abi5* de *M. truncatula* présentent des défauts dans l'accumulation des sucres solubles et si cette mutation les rend insensibles à l'ABA.

## RESULTATS

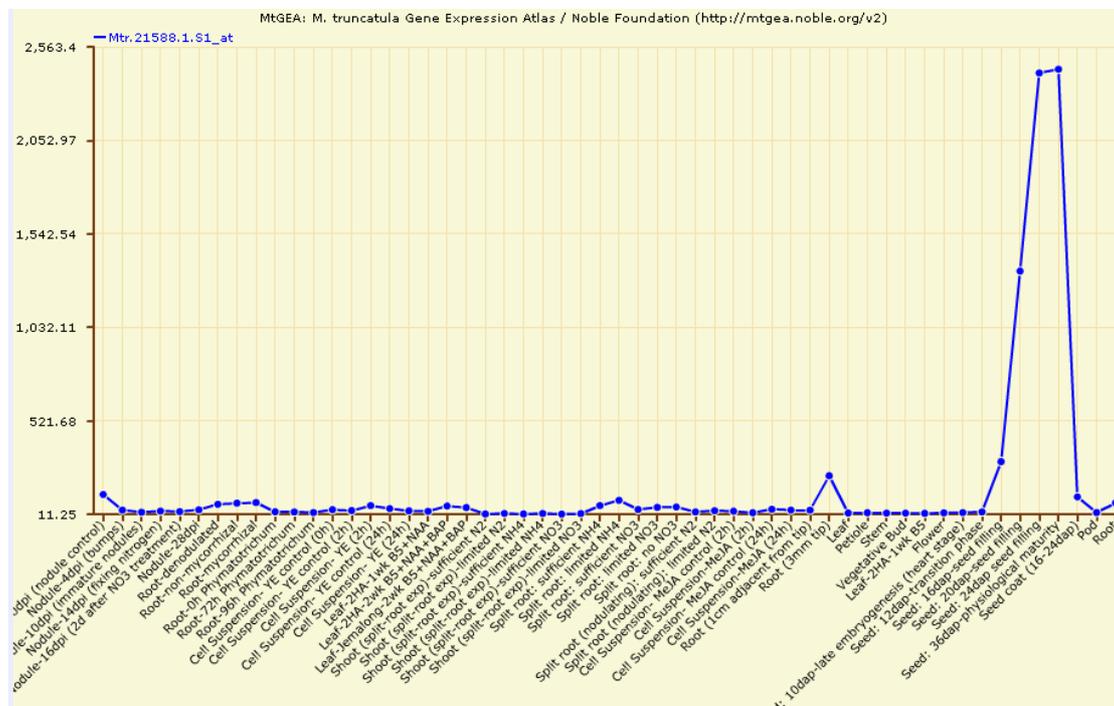
### 4.1 Caractérisation du gène *MtABI5*

Chez *M. truncatula*, la famille des facteurs de transcription de type bZIP comprend 91 gènes (Verdier *et al.*, 2008). Chez *Arabidopsis*, elle est divisée en dix groupes. Le facteur de transcription *ABI5* fait partie du groupe A, dont les membres ont un rôle dans la réponse à l'ABA ou aux stress abiotiques (Jakoby *et al.*, 2002). A partir de la séquence d'*ABI5* d'*Arabidopsis* (At2g36270.1), une recherche d'homologie dans le génome de *M. truncatula* (<http://medicago.org/IMGAG V3.0>) a permis d'identifier dix gènes putatifs. L'arbre phylogénétique issu de l'alignement des séquences montre que le gène Medtr7g127260.1 est le plus proche d'*ABI5* d'*Arabidopsis* (**figure 4.1**).



**Figure 4.1.** Arbre phylogénétique des protéines AtABI5 (en caractère gras), MtABI5 et ABI5-like identifiées dans le génome de *M. truncatula*. Le dendrogramme (unrooted tree) a été construit à partir d'un alignement de séquences avec le programme ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) et présenté au moyen de Treeview (Page, 1996).

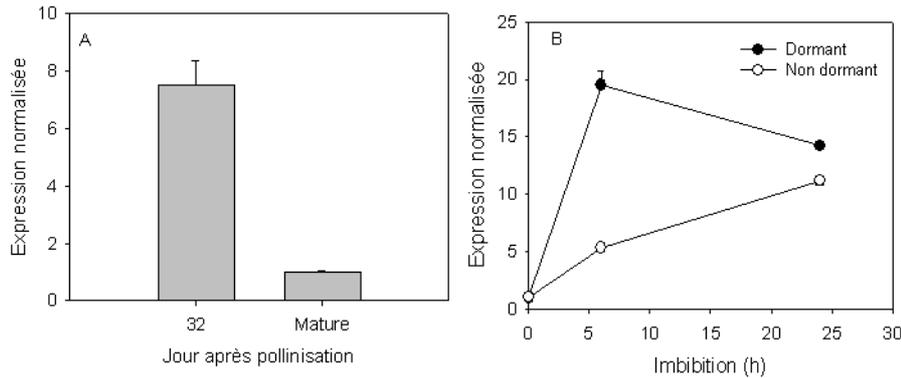
L'étude de l'expression du gène *MtABI5* a été réalisée *in silico* à partir de la base de données « Gene Expression Atlas » (<http://mtgea.noble.org>) en utilisant la sonde *Mtr.21588.1.S1\_at* codant pour *ABI5* (figure 4.2). Le gène *MtABI5* est faiblement exprimé dans les racines et les cellules en suspension (figure 4.2). Cependant, il est fortement exprimé dans les graines. Son expression augmente fortement entre 12 JAP et 36 JAP.



**Figure 4.2.** Profil d'expression d'*ABI5* (*Mtr.21588.1.S1\_at*) dans différents tissus et organes, différentes conditions de croissance et/ou au cours de leur développement chez *M. truncatula*. Les données proviennent de la base de données « Gene expression atlas » rassemblant les expériences de transcriptome et disponibles sur <http://mtgea.noble.org/v2/> (Benedito *et al.*, 2008).

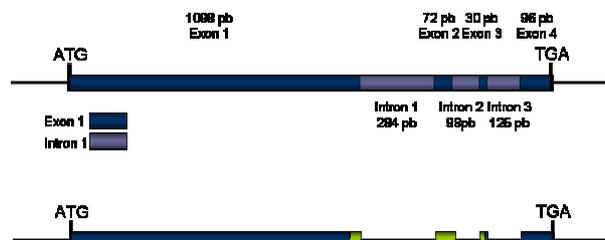
Pour compléter ce profil, nous avons étudié par RT-qPCR l'expression de *MtABI5* dans les graines 32 JAP et les graines matures sèches. La figure 4.3A montre que le niveau d'expression diminue d'un facteur 7 dans les graines matures (teneur en eau de 0,09 g H<sub>2</sub>O/g MS), indiquant que la dessiccation de la graine en fin de maturation entraîne la disparition du transcrite.

Comme l'expression de *MtABI5* au cours de l'imbibition n'est pas connue et non disponible dans les banques d'expression de *Medicago*, l'évolution des quantités du transcrite a été déterminée par RT-qPCR au cours de l'imbibition de graines dormantes (c'est-à-dire fraîchement récoltées) et de graines non-dormantes (obtenues après une post-maturation à sec de 3 mois) (figure 4.3B, (Bolingue *et al.*, 2010a)). Dans les graines non-dormantes, le niveau d'expression augmente de cinq fois entre 0 et 6 heures d'imbibition puis de deux fois entre 6 et 24 h. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus chez *Arabidopsis* (Piskurewicz *et al.*, 2008). Dans les graines dormantes de *M. truncatula*, l'expression d'*ABI5* augmente d'un facteur de 20 entre 0 et 6 heures d'imbibition, puis diminue légèrement après 24 h (figure 4.3B).



**Figure 4.3.** Expression du gène *MtABI5* au cours de la maturation (A) et au cours de l'imbibition à l'obscurité (B) de graines matures dormantes (●) et non-dormantes (○) chez le génotype R108. Les graines non-dormantes imbibées 24 h ont un pourcentage de germination de 14%. Dans ce cas, les ARN ont été extraits uniquement à partir des graines imbibées non germées. La teneur relative des transcrits (moyenne de 3 réplifications (de 50 graines)  $\pm$  écart type) est normalisée en référence au gène constitutif *MSC27* par rapport aux graines matures.

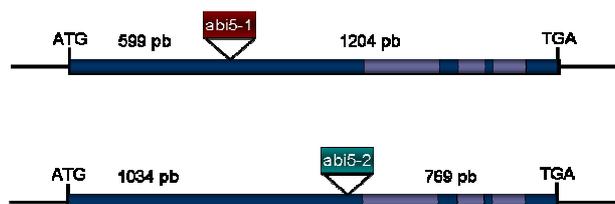
Ces données ont été comparées avec celles obtenues *in silico* chez *Arabidopsis*, à partir des données microarrays disponibles sur <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>. Chez cette espèce, *ABI5* est le plus fortement exprimé dans les graines sèches et n'est pas exprimé en relation avec la dormance. Il semble donc que l'expression d'*ABI5* soit régulée différemment selon les espèces, malgré la forte homologie des séquences peptidiques (*MtABI5* montre 57% de similarité et 78% d'homologie avec *ABI5* d'*A. thaliana*). Le gène *ABI5* chez *M. truncatula* contient 1803 paires de bases et comprend 4 exons et 3 introns, l'ARNm résultant présentant 1299 bases. Le domaine bZIP se situe à la fin de l'exon 1 et dans les exons 2 à 4 (figure 4.4).



**Figure 4.4.** Structure du gène *MtABI5* de 1803 paires de bases et du transcrit de 1299 bases. En bleu est schématisé les 4 exons et en violet les 3 introns. En vert est représenté le site bZIP.

## 4.2 Phénotypage physiologique et biochimique des mutants *abi5*

A l'origine de ce travail, nous disposions de 2 mutants d'insertion *Tnt1* pour le gène Medtr7g127870.1 issus de la banque de mutants *Tnt1* de la Samuel Noble Foundation. Les mutants ont été produit dans le génotype R108 (Tadege *et al.*, 2008). Au cours de ce travail, nous avons effectué un premier rétrocroisement avec un parent sauvage et sélectionné par PCR des mutants homozygotes en vue de leur caractérisation. Nous avons ainsi 2 allèles *abi5* qui ont été nommés *abi5-1* et *abi5-2* dont la position de l'insertion a été confirmée pour les deux mutants par séquençage des bordures gauche et droite (**figure 4.5**). Chez le mutant *abi5-1*, l'insertion du transposon est détectée à 599 bases du codon d'initiation alors que chez le mutant *abi5-2*, elle se trouve à 1034 bases (**figure 4.5**).

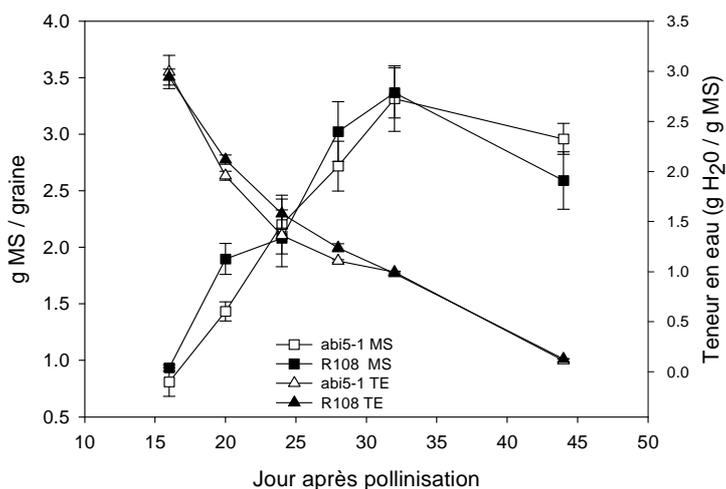


**Figure 4.5.** Structure du gène montrant la position de l'insertion *Tnt1* chez les deux allèles *abi5-1* et *abi5-2*.

La culture des plantes issues de cette sélection a permis afin de produire des graines pour le phénotypage. Nous avons observé que toutes les plantes *abi5-1* ont produit des graines viables alors que chez le mutant *abi5-2*, six des neuf plantes sélectionnées ont produit des fleurs qui ont ensuite toutes avorté. Ce résultat est similaire avec les observations de Zou *et al.* (2008), montrant que la fertilité du riz était affectée par la répression de *OsABI5* (Zou *et al.*, 2008). Néanmoins, une étude sur des plantes issues d'un second rétrocroisement sera nécessaire afin de savoir si ce phénotype de stérilité chez *M. truncatula* est dû à la mutation du gène *ABI5*.

### 4.2.1 Développement des graines

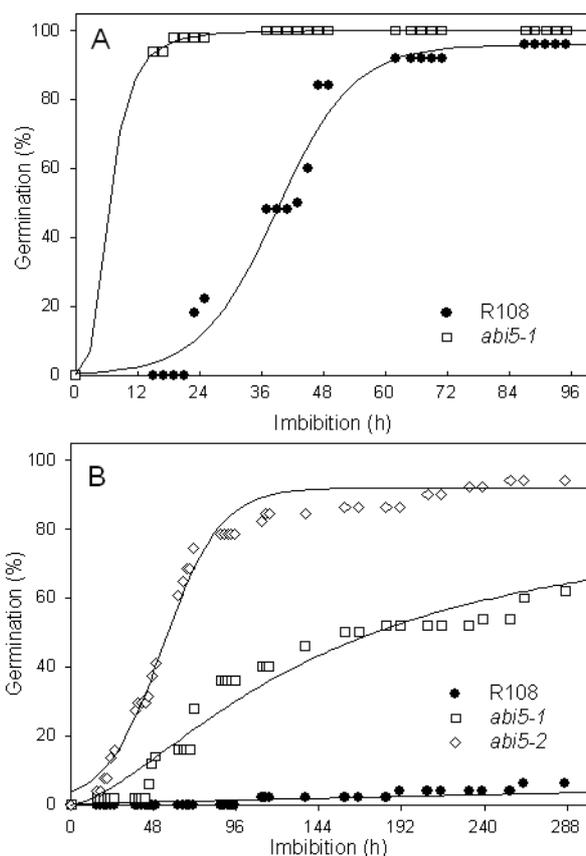
Malgré les précautions prises dans le contrôle des conditions de culture en chambre climatique, nous avons constaté des différences dans l'acquisition de la longévité des graines sauvages selon les cultures successives réalisées (voir chapitre 2). C'est pourquoi nous avons comparé le développement des graines *abi5* avec celui obtenu pour des graines sauvages issues de portegraines cultivés en même temps que les mutants. L'évolution de la teneur en eau, les masses fraîche et sèche des graines au cours du développement ont été déterminées entre 16 JAP et 44 JAP pour chaque génotype (**figure 4.6**). Aucune différence significative n'a été observée entre les graines *abi5* et type sauvage. La maturité de masse dans le fond génétique R108 est acquise aux alentours de 28 JAP.



**Figure 4.6.** Evolution de la teneur en eau (▲, △) et de la masse sèche (■, □) au cours de la maturation des graines du mutant *abi5-1* (△, □) et du type sauvage (▲, ■). Les données représentent la moyenne de 4 répétitions ( $\pm$  écart type) obtenues sur 3 graines. MS, matière sèche ; TE, teneur en eau.

#### 4.2.2 Germination et dormance

Chez *Arabidopsis*, les mutants *abi5* ont été identifiés lors de cribles testant l'insensibilité des graines à l'ABA (Finkelstein, 1994). Pour confirmer cette insensibilité chez les mutants *abi5* de *M. truncatula*, les graines matures de type sauvage et *abi5* ont été équilibrées après récolte à 43% HR puis stockées pendant 1 mois pour lever la dormance. Ensuite, elles ont été imbibées dans 0,01% de méthanol (témoin) ou dans 10  $\mu$ M d'ABA à 20°C (**figure 4.7**). Les graines du type sauvage germent entre 20 et 72h (**figure 4.7A**). Chez R108, la germination des graines pour lesquelles la dormance a été totalement levée commence à partir de 16h (Bolingue *et al.*, 2010a). Nos résultats suggèrent donc que ces graines possèdent encore une légère dormance. Chez le mutant *abi5-1*, les graines ont déjà germées à 94% dès 15 h après imbibition au contact de 0,01% de méthanol (**figure 4.7A**). Cette expérience a été répétée sur un second lot de graines *abi5-1* en se focalisant sur le début de l'imbibition. Elle a révélé que 58% des graines de ce lot avaient germé après 13 h. En fait, cette différence dans la vitesse de germination des mutants avec les graines sauvages avait été observée lors de la multiplication des plantes rétrocroisées, ce qui a grandement facilité et accéléré la sélection des plantes mutantes homozygotes parmi la population en ségrégation.

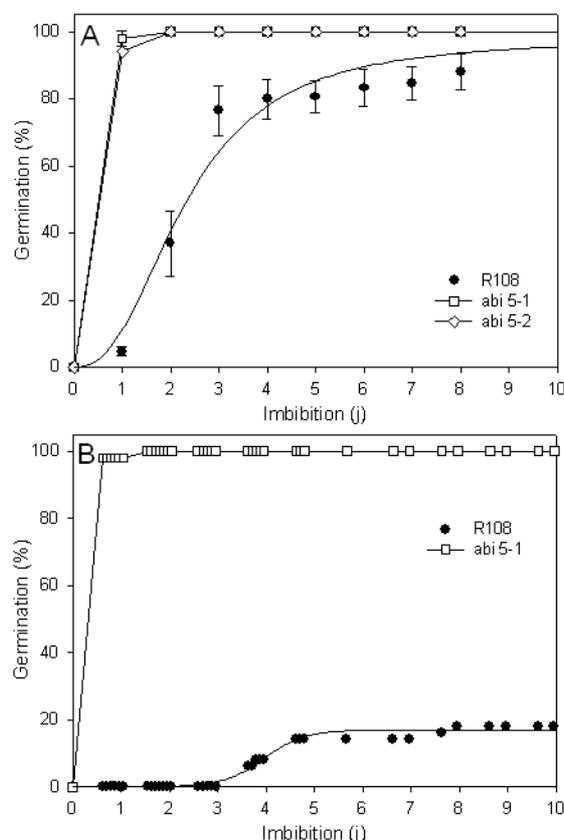


**Figure 4.7.** Etude de la sensibilité à l'ABA des graines non-dormantes obtenues après post maturation chez le type sauvage (●) et deux mutants *abi5* (◇, □). **A**) Expérience témoin montrant la germination des graines imbibées dans 0,01% méthanol. **B**) Germination des graines imbibées dans 10 µM d'ABA. Les données sont significatives lorsqu'elles montrent plus de 22% d'écart (LSD : Least square deviation) ( $\chi^2$ ,  $P=0,05$ ).

La présence de 10 µM d'ABA pendant l'imbibition bloque la germination des graines sauvages (**figure 4.7B**). En effet, après 12 jours, le pourcentage de germination n'atteint pas plus de 5%. En revanche, les graines des mutants *abi5-1* et *abi5-2* germent respectivement à 86 et 100% au bout de la période étudiée, démontrant ainsi leur insensibilité à l'ABA (**figure 4.7B**). De plus, la comparaison des courbes de germination avec celles obtenues dans 0,01% de méthanol montre que l'ABA provoque également une diminution significative de la vitesse de germination chez les graines *abi5*. Chez *Arabidopsis*, Finkelstein (1994) a montré que la sensibilité à l'ABA des graines *abi5* est diminuée d'un facteur trois par rapport au type sauvage.

La différence dans le comportement germinatif des mutants *abi5* par rapport au type sauvage nous a incité à étudier l'effet de la mutation sur la dormance des graines. Chez *M. truncatula*, la levée de dormance par la post-maturation à sec se manifeste par un élargissement de la fenêtre de température permissive pour la germination (Bolingue *et al.*, 2010a). Ceci est particulièrement bien visible à 25°C. Dans ce travail, les graines de type sauvage et mutants *abi5* ayant subi une très courte post-maturation à sec de 3 jours à 20°C et 43% HR ont été imbibées à 20°C (c.-à-d. proche de la température optimale de germination (**figure 4.8A**) et à 25°C (**figure 4.8B**). La comparaison des courbes de germination des graines sauvages des panels A et B confirme que l'expression de la dormance est plus forte à 25°C qu'à 20°C. En effet, la germination des graines imbibées 10 jours est

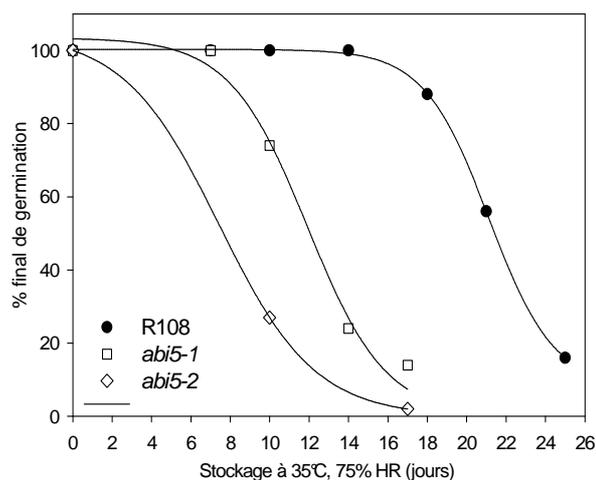
de 22% à 25°C contre 92% à 20°C. En revanche, les g raines *abi5* germent à la même vitesse à 25°C et à 20°C. Ces données montrent que les graines *abi5* ne sont pas dormantes.



**Figure 4.8.** *ABI5* joue un rôle dans la dormance des graines de *M. truncatula*. Courbes de germination de graines ayant subi 3 jours de post-maturation à sec avant imbibition à l'obscurité à 20°C (A) et 25°C (B). Les données sont significatives lorsqu'elles montrent plus de 22% d'écart (LSD : Least square deviation) ( $\chi^2$ , P=0,05).

#### 4.2.3 Longévité

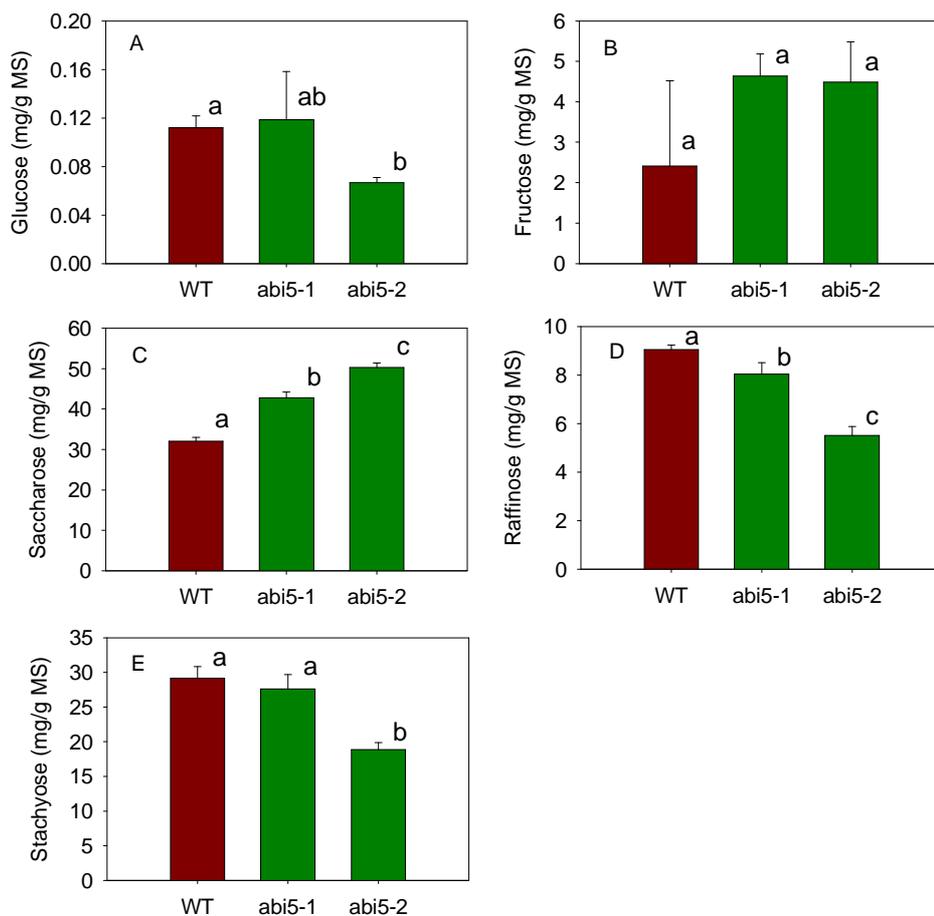
Pour déterminer si *ABI5* joue un rôle dans la longévité, des lots de graines matures du type sauvage et des deux allèles *abi5* ont été mises à vieillir en conditions contrôlées à 35°C et 75% HR. A différents temps de stockage dans ces conditions contrôlées, des échantillons de graines ont été mis à germer et le pourcentage final de germination a été déterminé pour chaque génotype (figure 4.9). Après 14 jours de stockage, les graines sauvages germent encore à 100% alors que les graines des mutants *abi5-1* et *abi5-2* ne germent plus qu'à 14 et 2%, respectivement. L'estimation du P50 est respectivement de 13 et 8 jours pour les graines *abi5-1* et *abi5-2*, et de 21 jours pour les graines du type sauvage.



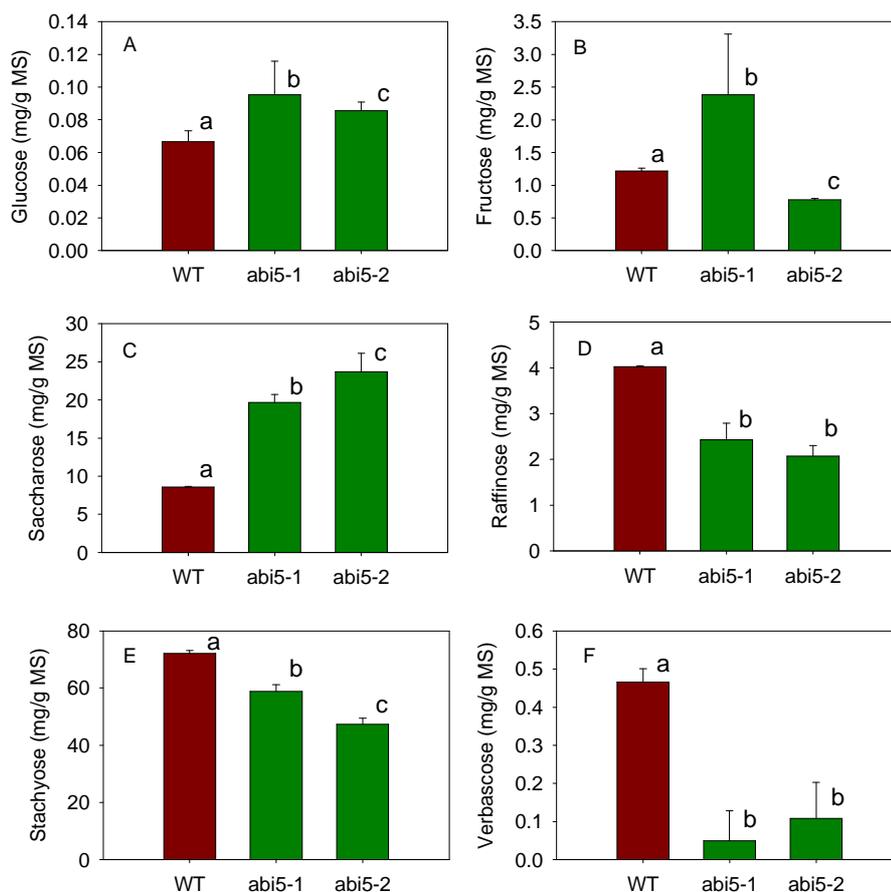
**Figure 4.9.** Perte de la capacité germinative des graines matures de type sauvage (●) et *abi5* (◇, □) au cours du stockage à 35°C et 75% HR. Après stockage, les graines sont imbibées dans l'eau à 20°C et à l'obscurité. Les données sont significatives lorsqu'elles montrent plus de 22% d'écart (LSD : Least square deviation) ( $\chi^2$ , P=0,05).

#### 4.2.4 Evolution de la teneur en sucres solubles pendant le développement

Dans le chapitre 2, nous avons montré que le profil d'évolution de la teneur en saccharose et en stachyose est corrélé à l'acquisition de la longévité. De la même façon, une corrélation entre la longévité et l'accumulation des oligosaccharides avait été observée chez les mutants *snf4b* de *M. truncatula*. SNF4b code pour une sous-unité régulatrice du complexe kinase 'sucrose non-fermenting-related' et est impliquée dans la régulation de l'accumulation des sucres non-réducteurs au cours de la maturation (Rosnoblet *et al.*, 2007). Afin de savoir si ABI5 influence le métabolisme des sucres solubles, leur teneur a été déterminée par HPLC-DIONEX dans les graines de type sauvage et mutantes *abi5-1* et *abi5-2* à 32 JAP et après abscission (graines matures). A 32 JAP, la teneur en saccharose est significativement (P=0,027) plus élevée chez les graines des deux allèles *abi5* par rapport au type sauvage (**figure 4.10**). Inversement, la teneur en stachyose est plus faible dans le mutant *abi5-2* par rapport au type sauvage (**figure 4.10**). En revanche, les hexoses ne semblent pas être affectés par ABI5 (**figure 4.10**).



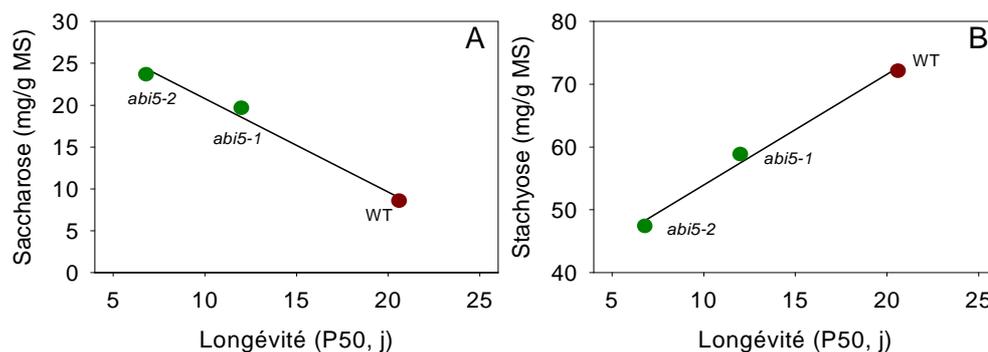
**Figure 4.10.** Teneur en sucres solubles des graines âgées de 32 JAP de type sauvage et mutants *abi5*. Glucose (A), fructose (B), saccharose (C), raffinose (D), stachyose (E). Les données représentent la moyenne et l'écart-type standard de 3 répétitions biologiques. Une analyse ANOVA suivie d'un test des étendues multiples ont été effectués afin de déterminer les niveaux de significativité obtenus : les lettres indiquent les groupes homogènes ( $P < 0.05$ ).



**Figure 4.11.** Teneur en sucres solubles des graines matures de type sauvage et des mutants *abi5*. glucose (A), fructose (B), saccharose (C), raffinose (D), stachyose (E) et verbascose (F). Les données représentent la moyenne et l'écart-type standard de 3 réplifications biologiques. Une analyse ANOVA suivie d'un test des étendues multiples ont été effectués afin de déterminer les niveaux de significativité obtenus : les lettres indiquent les groupes homogènes ( $P < 0.05$ ).

Ces résultats se confirment dans les graines matures (**figure 4.11**). La teneur en saccharose dans les graines *abi5* est 1,3 à 2,8 fois plus élevée que dans les graines sauvages (**figure 4.11C**). Toute la famille des raffinoses est également affectée dans les mutants. En effet, leurs teneurs subissent une diminution de 20 à 80% selon le sucre considéré (**figure 4.11D,E,F**).

Dans le chapitre 2, nous avons observé que l'acquisition de la longévité est corrélée avec la teneur en saccharose et stachyose (**figure 2.9**). Par conséquent, il était intéressant de vérifier si cette corrélation est maintenue dans les mutants *abi5*. D'une manière intéressante, nous confirmons qu'il existe une relation négative entre la longévité exprimée en P50 et la teneur en saccharose d'une part, et une relation positive entre la longévité et la teneur en stachyose d'autre part (**figure 4.12**). Les coefficients de détermination pour ces deux corrélations sont respectivement de 0,985 et 0,990. Il existe également une relation linéaire entre les valeurs de P50 et le ratio massique stachyose/saccharose dont le coefficient de détermination pour la corrélation est de 0,996 (données non montrées).

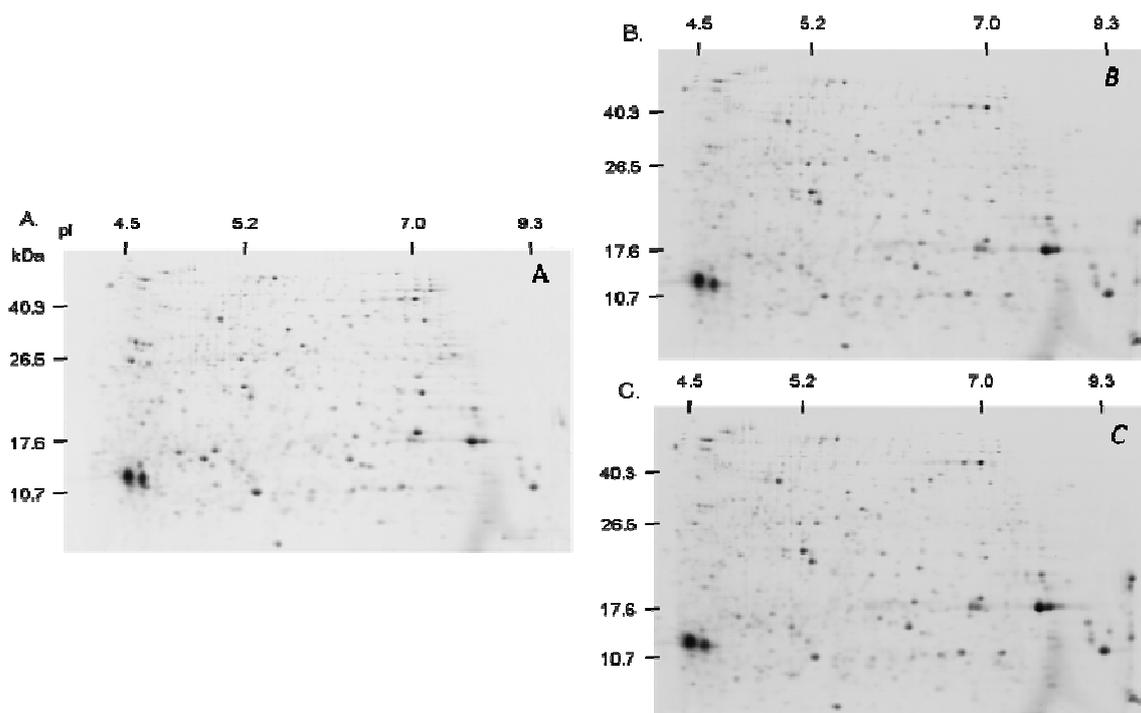


**Figure 4.12.** Corrélation entre la longévité exprimée en temps nécessaire pour obtenir 50% de viabilité (P50) des graines matures (WT) et *abi5* et les teneurs en saccharose (A) et stachyose (B). Les coefficients de détermination sont 0,985 (A) et 0,990 (B).

#### 4.3 Identification des protéines LEA différenciellement régulées dans les mutants *abi5*

Pour déterminer les protéines LEA dont les gènes seraient régulés par ABI5, nous avons comparé le protéome stable à la chaleur extrait des graines matures sauvages et *abi5*. Les profils des gels 2D entre les différents génotypes sont montrés dans la **figure 4.13 (annexes 5 (carte de référence) et 6 (tableau récapitulatif))**. Cependant, l'analyse statistique de l'intensité des 133 spots détectés sur les gels révèle des différences significatives ( $P < 0,01$ ) qui ont permis de classer les polypeptides en 4 catégories. Celles-ci sont représentées dans le tableau de l'**annexe 7** et classées comme suit :

- **1) spots absents dans les mutants *abi5*** : Ce groupe est constitué de 10 polypeptides dont deux correspondent à la protéine LEA SBP65 (pfam LEA\_4) codée par le même gène.
- **2) spots dont l'intensité est moins élevée dans les mutants.** Il est constitué de 30 polypeptides dont 18 ont été identifiés.
- **3) spots dont l'intensité est plus élevée dans les mutants,** soit 39 spots dont 18 ont été identifiés
- **4) spots ne montrant aucune différence entre mutant et type sauvage** : soit 54 spots représentant 42% de la population totale de spots.



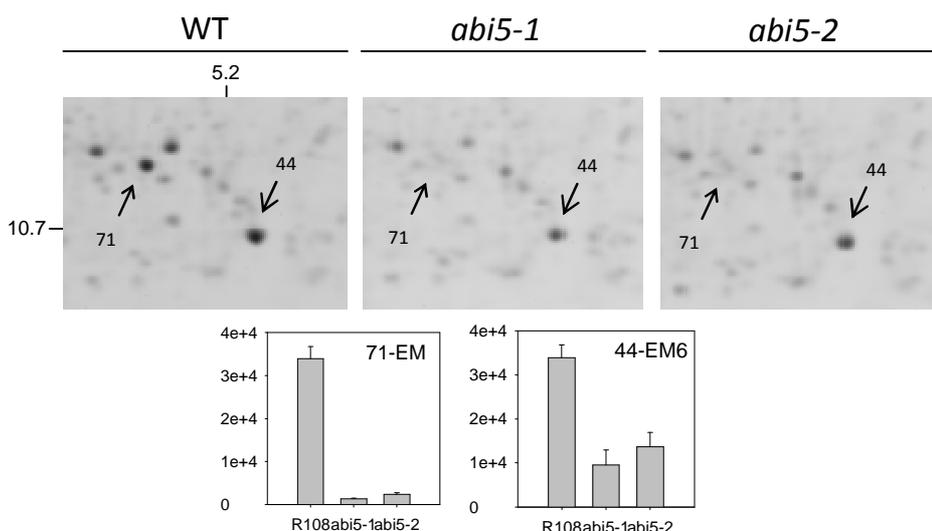
**Figure 4.13.** Comparaison du protéome stable à la chaleur des graines matures sauvages (A) et des mutants *abi5* (B *abi5-1* ; C *abi5-2*). Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE en 2D puis colorées au bleu colloïdal.

Parmi les 28 spots qui appartiennent à la catégorie 2, 18 spots ont été identifiés après séquençage par LC-MS/MS (Tableau, **annexe 7**). Seize spots correspondent à des protéines LEA appartenant aux trois familles suivantes (**tableau 4.1**).

**Tableau 4.1.** Polypeptides LEA sous représentées dans les mutants *abi5-1* et *abi5-2*. La différence en intensité entre type sauvage et *abi5* est également indiquée.

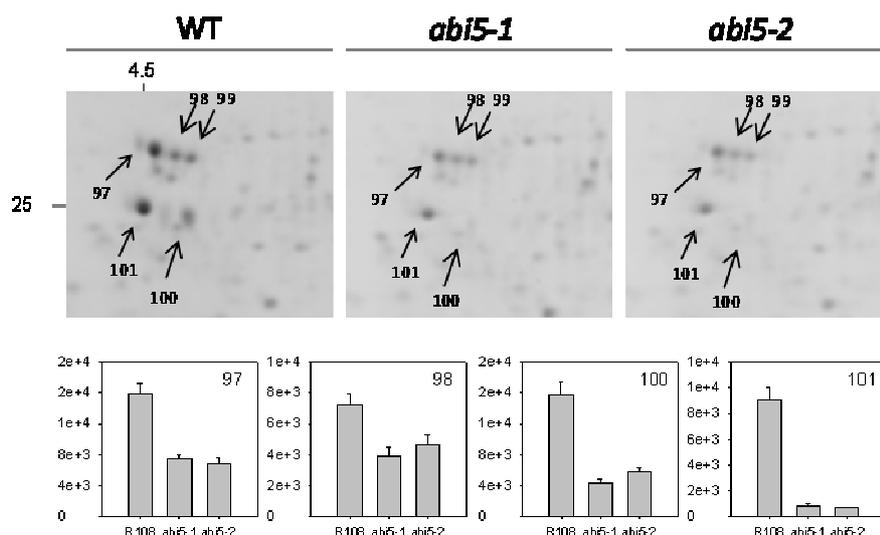
Pfam	Polypeptides	Numéro de spot	diff WT> <i>abi5</i>
LEA_5	EM6	44	2.9x
	EM protein	71	18.3x
LEA_4	SBP65	56-59,95,96,103,106	2-4x
	Maturation polypeptide 2	105,55	1.6x, 2.7x
SMP	LEAm	98	1.7x
	D-34.I	97,98	2.2, 1.7x
	PM25	100, 101	12.3x, 3.1x
	D-34.II	100, 101	12.3x, 3.1x

Deux membres de la famille LEA\_5, à savoir EM (spot 71) et EM6 (spot 44), dont l'intensité des spots est respectivement 18 et 3 fois plus faible dans les graines *abi5* ont été identifiés (**figure 4.14**). Ces observations sont en accord avec ce qui a précédemment été montré chez *Arabidopsis* (Finkelstein, 1994; Finkelstein & Lynch, 2000; Carles *et al.*, 2002), confirmant que les gènes *EM1* et *EM6* sont sous le contrôle d'ABI5. La deuxième famille de protéines LEA sous-exprimées dans les mutants *abi5* est la famille SMP (**figure 4.15**).



**Figure 4.14.** Profils 2D et quantification des spots appartenant à la famille LEA\_5 (PF00477) qui sont différentiellement exprimés dans les graines matures de type sauvage et mutants *abi5*. 44, EM6 ; 71, EM1. Les intensités relatives des spots représentent la moyenne de 3 répétitions ( $\pm$  écart-type).

Trois polypeptides (PM25, D-34.I et D-34.II) ont été identifiés et montrent une diminution de leur intensité de 2 à 12 fois dans les graines *abi5* (Tableau 4.1, figure 4.15). Toutefois, il n'est pas certain que la diminution de l'intensité de ces spots soit due à ces polypeptides, d'autres polypeptides ayant été identifiés pour ces mêmes spots (tableau, annexe 7). Par exemple, le séquençage par LC-MS/MS des peptides issus du spot 100 permet d'identifier la protéine LEA D34-II mais également la protéine LEA PM25, LEAM et 14-3-3-like protein. Par conséquent, la diminution de l'intensité du spot 100 dans les graines *abi5* est due à une sous-expression de D34-II, PM25 ou des deux. Par ailleurs, le séquençage du spot 98 permet l'identification des protéines D-34.I et LEAM. Toutefois, cette dernière est également identifiée par séquençage du spot 99 dont l'abondance relative est identique dans les graines *abi5* et le type sauvage (Tableau annexe 7). La troisième famille de protéines qui est sous-exprimée dans *abi5* est celle des LEA\_4 qui comprend les protéines SBP65 et Maturation polypeptide 2, représentées par 8 et 2 spots respectivement (Tableau 4.1).



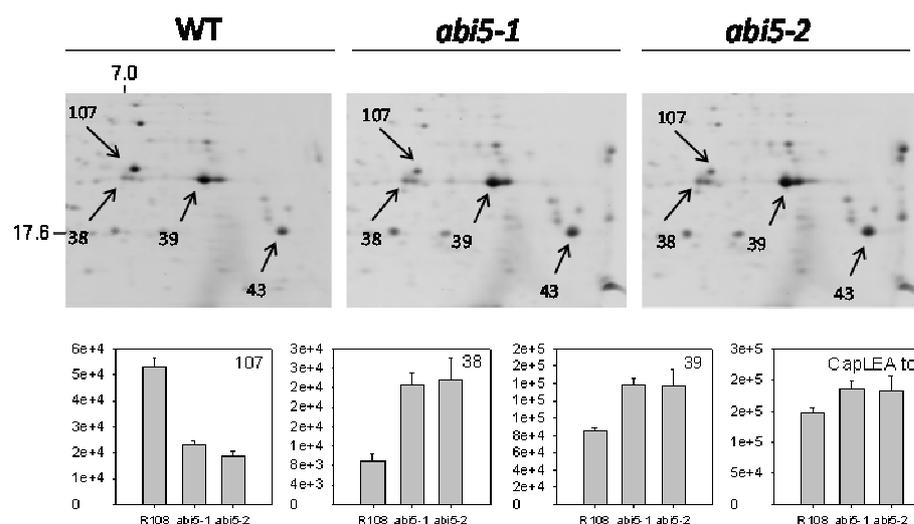
**Figure 4.15.** Profils 2D et quantification des spots appartenant au groupe SMP (PF04927) qui sont différentiellement exprimés dans les graines matures de type sauvage et mutants *abi5*. 97, D-34.I ; 98, D-34.I/LEAm ; 99, LEAm ; 100, PM25/D-34.II ; 101, D-34.II/PM25. Les intensités relatives des spots représentent la moyenne de 3 réplifications ( $\pm$  écart-type).

Les 18 spots de la catégorie 3 (intensité plus élevée dans les mutants) ont été identifiés comme suit (**Tableau 4.2, annexe 7**). Cinq spots correspondent à des protéines LEA, dont une déhydrine (2 spots), une protéine de la famille LEA\_4 (PM10) et les deux membres de la famille LEA\_1/D113 (PM1 et D113.II). Les autres spots identifiés sont des protéines de réserves (légumine, inhibiteur protéinase I25) ou des protéines impliquées dans le repliement des structures tertiaires et quaternaires (protéine disulfide isomérase et GroES). GroES, ou chaperonine 10, est la protéine la plus différentiellement exprimée entre mutant et type sauvage.

**Tableau 4.2.** Polypeptides LEA surexprimés dans les mutants *abi5-1* et *abi5-2*. La différence en intensité entre type sauvage et *abi5* est également indiquée.

Pfam	Polypeptides	Numéro de spot	Diff WT< <i>abi5</i>
Déhydrine	DHN3	92,93	2.2x, 1.6x
LEA_4	PM10	52	2.1x
LEA_1	D-113.II	43	2.3x
	PM1	32	1.7x

CapLEA, une protéine LEA représentée par plusieurs spots, se trouve à la fois dans la catégorie 2 (spot 107) et 3 (spots 38 et 39, **figure 4.16**). Cependant, la somme des intensités de ces 3 spots chez les mutants *abi5* ne montre pas de différence significative avec celle des types sauvages. Il est donc possible que les différences observées au niveau des spots individuels reflètent des modifications post-traductionnelles de CapLEA. En effet, une autre étude en cours dans le laboratoire montre que CapLEA est phosphorylée chez *M. truncatula* (S. Le Gall, communication personnelle).



**Figure 4.16.** Profils 2D et quantification des spots appartenant au groupe LEA\_4 (PF02987) et LEA\_1 (PF03760) qui sont différentiellement exprimés dans les graines matures de type sauvage et mutants *abi5*. 38, 39 et 107, CapLEA I et II ; 43, D113-II. Les intensités relatives des spots représentent la moyenne de 3 réplifications ( $\pm$  écart-type).

## DISCUSSION

Chez *Arabidopsis*, *ABI5* a été découvert sur la base d'un crible de mutants germant en présence d'ABA (Finkelstein, 1994). Ensuite, des analyses génétiques et physiologiques ont montré qu'*ABI5* est un facteur de transcription représentant un nouvel élément de la signalisation par l'ABA impliquant également deux autres loci : *ABI3* et *ABI4* (Brocard *et al.*, 2002; Bossi *et al.*, 2009). *ABI5* semble jouer un rôle dans la maturation et la réponse aux stress pendant la germination. En effet, il est impliqué dans la régulation de quelques gènes LEA (Finkelstein, 1994; Finkelstein, R & Lynch, TJ, 2000) et dans l'arrêt de croissance des jeunes radicules germées en présence d'ABA (Lopez-Molina *et al.*, 2001). *ABI5* a été cloné chez un bon nombre d'espèces, tel que l'orge (Casaretto & Ho, 2003; Casaretto & Ho, 2005) et le riz (Zou *et al.*, 2007). Dernièrement, il a également été identifié chez le blé (Ohnishi *et al.*, 2008), le maïs (Alexandrov *et al.*, 2009) et le sorgho (Rodriguez *et al.*, 2009).

Ce travail a permis d'isoler des mutants homozygotes *abi5* et de caractériser 2 allèles. Tout comme chez *Arabidopsis*, des mutations dans ce gène confèrent aux graines une plus faible sensibilité de la germination à l'ABA. Cette observation devra être affinée par une étude de type dose-réponse. La sélection des mutants de *M. truncatula* a été basée sur l'analyse des transcrits couplée à un crible pour un phénotype de germination très rapide par rapport aux graines sauvages. Toutefois, il reste encore à déterminer si ces mutants sont des KO ou expriment une protéine non fonctionnelle (ou partiellement fonctionnelle). C'est ainsi le cas chez *Arabidopsis* où l'allèle *abi5-1* code pour une protéine tronquée dont le domaine bZIP nécessaire à la dimérisation et l'interaction avec l'ADN est manquant (Finkelstein & Lynch, 2000). Ce point est important car si *ABI5* peut activer des gènes par lui-même, il interagit aussi avec des partenaires tels qu'*ABI3*, impliqué notamment dans la tolérance à la dessiccation chez *Arabidopsis* (Nakamura *et al.*, 2001). Au moyen de la technique de double-

hybride chez la levure, ces auteurs ont montré que des délétions dans la partie N-terminale pouvaient engendrer une perte d'activité d'ABI5 sans toutefois compromettre son interaction avec ABI3 (Nakamura *et al.*, 2001).

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé le rôle d'ABI5 dans les différents processus qui ont lieu pendant la maturation de graines de *M. truncatula*. Ainsi, nous nous sommes concentrés sur la phase de développement pour laquelle les protéines EM et EM6, régulées par ABI5 chez *Arabidopsis*, s'accumulent (de 24 JAP jusqu'aux graines matures). Nos résultats préliminaires chez *M. truncatula* montrent des phénotypes similaires aux mutants *abi5* chez *Arabidopsis*. Comme chez cette espèce, aucun phénotype sévère n'a été observé. Par exemple, nous n'avons pas observé de différences lors de la phase de remplissage (**figure 4.6**), ce qui laisse penser que l'accumulation des réserves n'est pas affectée. Comme chez *Arabidopsis*, les différences les plus importantes sont que les graines *abi5* sont moins sensibles à l'ABA et contiennent moins de protéines EM et EM6 par rapport aux graines sauvages.

Cependant, des différences notables sont observées entre les deux espèces. Par exemple, chez *M. truncatula*, l'expression d'ABI5 augmente pendant les premières heures d'imbibition dans les graines non-dormantes (**figure 4.3**), mais diminue chez *Arabidopsis* (Lopez-Molina *et al.*, 2001; Piskurewicz *et al.*, 2008; Kanai *et al.*, 2010). Il reste à déterminer si l'expression d'ABI5 diminue à un stade plus tardif, après la germination. Pendant l'imbibition, nous avons montré également que l'expression d'ABI5 reste plus élevée dans les graines dormantes (**figure 4.3**). Chez *Arabidopsis*, les données transcriptomiques ne mettent pas en évidence une corrélation entre l'expression d'ABI5 et l'état de dormance des graines (Cadman *et al.*, 2006). Les différences observées entre les deux espèces pendant l'imbibition des graines pourraient avoir un lien avec le phénotype de germination observé à la fois sur les graines dormantes et non-dormantes (**figure 4.8**). En effet, les graines des mutants *abi5* de *Medicago* germent très vite, même par rapport à des graines de type sauvage pour lesquelles la dormance est complètement levée (Bolingue *et al.*, 2010a; Bolingue *et al.*, 2010b). Les résultats présentés en **figure 4.8** montrent que les graines *abi5* n'ont pas de dormance : elles germent aussi lorsqu'elles sont imbibées immédiatement après récolte ou après une période de stockage censée lever la dormance. Dans la littérature, ces phénotypes ne sont pas décrits chez *Arabidopsis*. A ce jour, aucun lien n'est fait entre ABI5 et la dormance des graines chez cette espèce (Finkelstein *et al.*, 2008). Par exemple, Finkelstein (1994) a montré que chez les mutants *abi5* d'*Arabidopsis*, la dormance, mesurée en pourcentage de germination en absence de signaux levant la dormance (lumière ou stratification froide) est égale à celle observée chez les graines de type sauvage dans les mêmes conditions. Nous pouvons donc supposer que la différence entre *Arabidopsis* et *M. truncatula* pourrait s'expliquer par des différences dans les mécanismes régulant l'installation ou le maintien de la dormance en aval d'ABI5. Plusieurs données étayent cette hypothèse. Contrairement à *Arabidopsis*, non seulement la lumière ne lève pas la dormance des graines de *M. truncatula*, mais elle la renforce (Bolingue *et al.*, 2010a). Chez *Arabidopsis* (écotype Cvi), le catabolisme de l'ABA est moins rapide dans les graines dormantes (Ali-Rachedi *et al.*, 2004). Chez *M. truncatula*, il y a peu de

différence dans l'évolution de la teneur en ABA entre les graines dormantes et non-dormantes pendant l'imbibition (Bolingue *et al.*, 2010b). Cette observation est similaire à celle faite chez les graines de sorgho (Benech-Arnold *et al.*, 2003). Chez cette espèce, la dormance est corrélée à une sensibilité accrue à l'ABA, plutôt qu'à un changement dans le métabolisme de l'ABA (Rodriguez *et al.*, 2009). Par ailleurs, les facteurs externes tels que le nitrate et la présence de GA, connus pour lever la dormance chez *Arabidopsis*, n'ont aucun effet sur la dormance des graines de *M. truncatula* (Bolingue *et al.*, 2010a). Chez cette espèce, la présence de GA pendant l'imbibition n'a pas d'effet sur la vitesse de la germination de graines dormantes. Cependant, le paclobutrazol, un inhibiteur de la synthèse des GA, augmente la dormance (Bolingue *et al.*, 2010a). Il est donc possible que le taux de synthèse des GA dans les graines de *M. truncatula* soit déjà au maximum, et que c'est seulement la sensibilité à l'ABA qui détermine la levée de dormance. Il serait ainsi intéressant de tester l'effet des GA sur l'expression d'ABI5 et celui du paclobutrazol chez les mutants *abi5*.

Tout comme chez *Arabidopsis*, ABI5 ne semble pas affecter la tolérance à la dessiccation puisque nous avons obtenu des graines sèches vivantes. Cependant, nous avons montré qu'une mutation dans le gène ABI5 entraîne une diminution de la longévité des graines de *M. truncatula*. Ceci suggère un nouveau rôle pour ce facteur de transcription qui jusqu'à présent n'est pas considéré comme étant impliqué dans la maturation des graines.

Un autre phénotype dans lequel ABI5 est impliqué chez *M. truncatula*, et qui n'est pas retrouvé chez *Arabidopsis*, est celui du métabolisme des sucres solubles au cours de la maturation. Chez les mutants *abi5* de *M. truncatula*, le saccharose reste plus élevé que chez les graines sauvages et les oligosaccharides ne s'accumulent pas complètement pendant la maturation. En revanche, chez *Arabidopsis*, la teneur en saccharose de graines matures *abi5* n'est pas significativement différente de celle des graines sauvages (Brocard-Gifford *et al.*, 2003). La teneur en oligosaccharides dans les graines matures de *M. truncatula* représente entre 7 et 9% de leur poids sec, contrairement aux graines d'*Arabidopsis*, qui contiennent majoritairement du saccharose (2% de la masse sèche) et seulement 0.6% de RFO (Bentsink *et al.*, 2000; Djemel *et al.*, 2005; Rosnoblet *et al.*, 2007). L'effet de la mutation d'ABI5 sur la longévité et les teneurs en sucres solubles non réducteurs ne semble pas être lié à un retardement du développement, puisque l'évolution de la masse sèche et celle de la teneur en eau sont égales entre les graines *abi5* et celles du type sauvage (**figure 4.6**). La question de savoir si la dérégulation du métabolisme du saccharose et du RFO dans les graines mutantes est une cause ou un effet de la perte de longévité reste encore à élucider. A ce titre, il est intéressant de noter que l'extinction du gène *SNF4b* (TC159693 Medtr2g103910.1) induit à la fois une réduction de la teneur en stachyose et de la longévité des graines (Rosnoblet *et al.*, 2007). SNF4b est une sous-unité activatrice de complexe sucrose non-fermenting-related kinase (SNRK1), pour lequel ABI5 est potentiellement une cible. Il serait intéressant de déterminer si SNF4b, par le biais de SNRK1, régule l'activation d'ABI5 ou si ABI5 régule SNF4b.

Un nombre restreint de protéines LEA semblent être sous le contrôle direct ou indirect d'ABI5. L'abondance de trois polypeptides est fortement diminuée dans les graines de mutants *abi5* (**tableau 4.1**). Il s'agit du polypeptide EM (spot 71) et d'un mélange de polypeptides de la famille des D34 : D34-II et PM25 (spot 100). Des données *in vitro* suggèrent que PM25 joue un rôle dans la stabilité de la conformation des protéines pendant et après séchage (Boucher *et al.*, 2010). En revanche GroES, une autre protéine impliquée dans la conformation des protéines et la protection des membranes (Török *et al.*, 1997) voit son abondance augmenter chez les mutants *abi5*. Dès lors, il serait intéressant de vérifier si *ABI5* peut avoir un rôle de régulateur important dans la protection contre la dénaturation des protéines qui survient lors de stress. L'expression du gène *AtEm1* est activée par ABI5 qui se fixe aux éléments *cis* ABRE présents dans le promoteur (Carles *et al.*, 2002; Bensmihen *et al.*, 2004). Cependant, presque tous les promoteurs de gènes LEA contiennent ce type d'élément (Hundertmark & Hinch, 2008). Bien que plusieurs facteurs de transcription participent à la régulation de l'expression des protéines LEA, notamment ABI3, il reste donc à comprendre pourquoi si peu de protéines LEA semblent être régulées par ABI5. Plusieurs raisons, précédemment mises en évidence chez *Arabidopsis* sont plausibles : 1- l'existence d'autres facteurs de transcription qui sont en compétition pour les motifs régulateurs des gènes *LEA* et jouent des rôles antagonistes, tels que la protéine EEL (Bensmihen *et al.*, 2002) ou 2- des phénomènes de redondance impliquant la synthèse d'autres facteurs tels que ABF3 et ABF1 qui compenseraient l'absence d'une protéine ABI5 fonctionnelle (Finkelstein *et al.*, 2005).

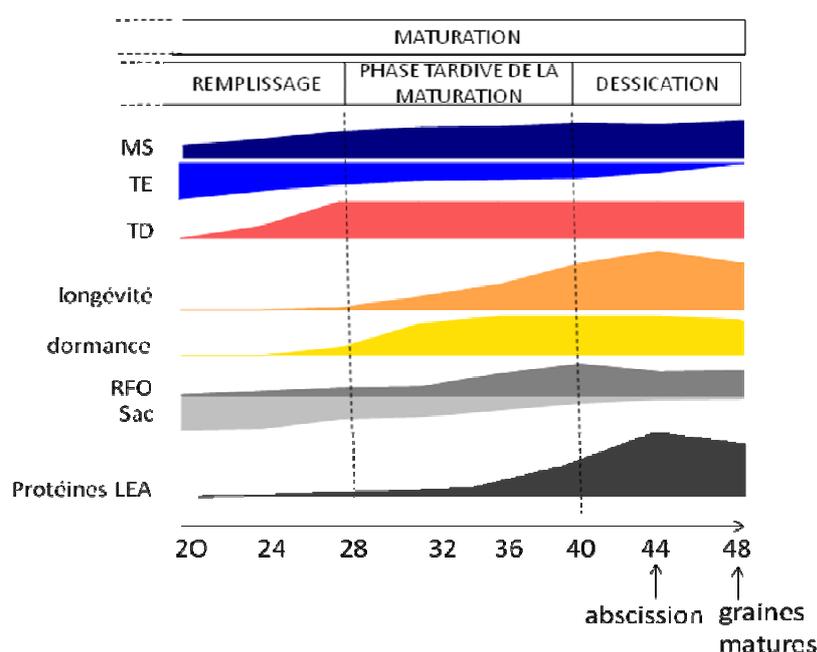
Les spots correspondants à la protéine SBP65 sont soit plus faibles soit absents chez les graines du mutants *abi5* (**Tableau 4.1**). L'expression des gènes *SBP65* est fortement réduite dans les mutants *vp1* où le niveau d'ABA dans la graine est faible lors de son développement (Dehaye *et al.*, 1997). Dans les embryons immatures du pois en culture, l'apport ABA exogène augmente l'expression de SBP65 (Dehaye *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent qu'ABI5 participe à la voie de signalisation par l'ABA qui induit l'expression du gène *SBP65* au cours du développement des graines de *M. truncatula*.

## **Discussion et perspectives**



Les semences en tant que vecteur de dissémination de l'espèce sont à la base de l'agriculture. C'est pourquoi, il est fondamental de comprendre les facteurs moléculaires gouvernant la qualité physiologique des graines. Acquis au cours du développement, elle est sous le contrôle de facteurs polygéniques et son expression est soumise à une forte interaction plante-environnement. L'objectif de cette thèse était de caractériser finement les stades du développement des graines de *Medicago truncatula* pendant lesquels la longévité est acquise, de caractériser la mise en place des mécanismes réputés comme jouant un rôle dans la survie à l'état sec pendant ces stades, et de voir si le facteur de transcription *ABI5* est également impliqué dans la régulation de la maturation, notamment en relation avec la longévité et la régulation des protéines LEA.

Dans ce mémoire, nous avons ainsi établi une carte détaillée des évènements physiologiques et biochimiques se produisant dans la phase tardive de la maturation des graines (**figure D1**).



Nous avons étendu nos observations après l'abscission des gousses, période pendant laquelle la graine se dessèche progressivement jusqu'à formation d'un état vitreux (Buitink & Leprince, 2004; Leprince *et al.*, 2010) entraînant la quiescence des embryons. Cette période est critique car elle aboutit à la maturité physiologique des graines, mais elle est relativement peu étudiée dans la littérature (Probert *et al.*, 2007). Chez *M. truncatula*, la maturité physiologique atteint son maximum au moment de l'abscission de la gousse. A ce stade, la longévité est maximale (**figure D1**) ainsi que les vitesses de germination de graines non dormantes. A notre connaissance, cette phase du développement de la graine n'a pas fait l'objet d'une description détaillée au plan de la génomique fonctionnelle chez *Arabidopsis* et *Medicago*. Généralement, les auteurs comparent les graines entières en fin du remplissage avec les graines sèches (Angelovici *et al.*, 2010; Le *et al.*, 2010). Pour

ce qui concerne *Arabidopsis*, ceci est probablement dû à la rapidité du développement de la graine qui comprime cette phase tardive de la maturation en une cinquantaine d'heures.

Chez *Medicago truncatula*, la durée entre le démarrage de l'acquisition de la longévité et la chute des gousses est de plus de 12-14 jours. Cette espèce constitue donc un bon modèle d'étude pour caractériser la maturité physiologique par des approches de génomique fonctionnelle. L'intérêt du modèle *Medicago* est également mis en évidence par nos données concernant la caractérisation phénotypique des mutants *abi5*. En effet, nous avons montré que les graines d'*abi5* de *M. truncatula* ne sont pas dormantes (chapitre 4), contrairement à celles du mutant *abi5* d'*Arabidopsis* (Finkelstein, 1994).

Nos observations suggèrent qu'il existe au moins deux stades distincts caractérisant la phase tardive de la maturation (**figure D1**). Le premier stade situé entre 28 et 40 JAP se caractérise par l'augmentation de la longévité en corrélation avec la modification de la composition en sucres solubles et l'accumulation d'un nombre réduit de protéines LEA (CAPLEA, EM, D113.III et D34.III). Le deuxième stade se situe entre 40 DAP et graines matures. Au cours de celui-ci, la graine atteint sa maturité physiologique, se dessèche complètement et voit une forte augmentation de la plupart des protéines LEA (**figure 3.5**). Ce stade inclut également l'abscission de la gousse. A ce stade, la teneur en saccharose et le ratio saccharose/oligosaccharides ne rendent pas compte de la perte de longévité après abscission (**figure 2.9**). Il semble qu'*ABI5* soit impliqué dans le premier stade, puisque le métabolisme des sucres et l'accumulation de EM et PM25, deux protéines LEA associée à la longévité est altérée dans les mutants *abi5*. Le deuxième stade correspond probablement au basculement de la maturation vers la préparation de la germination (Kermode *et al.*, 1986; Kermode & Bewley, 1989; Angelovici *et al.*, 2010). Cette hypothèse est soutenue par le fait que la germination de graines matures est plus rapide que celle des graines récoltées au stade abscission (chapitre 3). Par contre, nous n'avons pas de données permettant d'établir si *ABI5* joue un rôle majeur dans le deuxième stade.

Pour comprendre l'acquisition de la longévité, trois groupes de molécules ont ensuite été caractérisés avec des rôles supposés dans la protection contre la dessiccation : les molécules liés au stress oxydant, les sucres solubles non réducteurs (chapitre 1) et les protéines LEA (chapitre 3).

Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle la longévité des graines au cours de la maturation était associée à une augmentation de la capacité antioxydante. Dans les graines séchées, il ne semble pas y avoir une différence flagrante entre le niveau de carbonylation des protéines entre les échantillons de 28 JAP par rapport aux graines matures. Chez *Medicago* comme pour d'autres espèces (Bailly *et al.*, 1996; Bailly *et al.*, 2001; Garnczarska *et al.*, 2009), l'activité enzymatique des systèmes détoxifiant les ROS n'augmente plus de manière significative au cours de cette période. Notre hypothèse n'a donc pas été vérifiée. Cependant, nos observations suggèrent que les graines immatures sont plus sensibles à l'oxydation lors d'un séchage anticipé que les graines matures. Il

serait intéressant de compléter cette étude en dosant les molécules antioxydantes (tocophérol, glutathion) ainsi que les niveaux d'oxydation et de peroxydation des phospholipides.

Cette étude montre une forte corrélation entre d'une part la longévité et d'autre part la teneur en saccharose et stachyose (corrélation négative et positive, respectivement, **figure 2.9**). Cette corrélation a été observée dans les graines sauvages mais également dans celles des mutants *abi5* (**figure 4.12**) pour lesquels la longévité est diminuée. De plus ces corrélations sont indépendantes des conditions d'obtention des graines lors des cultures successives. Ces observations ainsi que les données de Rosnoblet *et al.* (2007) nous confortent dans l'idée que le saccharose et/ou les oligosaccharides participent directement ou indirectement à l'acquisition de l'aptitude à la conservation. La fonction de ces sucres reste à démontrer. Ainsi la conversion du saccharose en stachyose pourrait favoriser la protection des cellules contre la dessiccation. En effet, les données *in vitro* montrent que, comparé au saccharose, les RFO comme le stachyose ou verbascose sont plus efficaces pour stabiliser les liposomes pendant leur lyophilisation et prévenir leur fusion pendant la réhydratation (Hincha *et al.*, 2003). Cet effet est attribué à une température de transition vitreuse plus élevée des RFO par rapport au saccharose (Hincha *et al.*, 2003). Cependant, *in vivo*, une augmentation du ratio saccharose/RFO ne modifie pas la stabilité de l'état vitreux, même si la longévité diminue fortement (Buitink *et al.*, 2000). Des travaux antérieurs (Wolkers *et al.*, 2001; Buitink & Leprince, 2004) ont suggéré que les sucres pouvaient interagir avec les protéines LEA pour former une matrice vitreuse avec une stabilité plus élevée. Notre étude du protéome LEA permet dorénavant d'avancer plus loin et de manière plus pertinente dans cette hypothèse puisque nous avons identifié un nombre limité de candidats LEA à tester. En parallèle à ces études *in vitro*, une étude de la stabilité des états vitreux des mutants *abi5* permettrait également de conforter ou non le rôle des protéines LEA dans la longévité des graines.

Il est également possible que la corrélation entre longévité et composition de sucres soit indirecte (c'est-à-dire sans cause à effet), *via* par exemple un facteur de régulation commun impliqué dans ces deux phénomènes. Cette hypothèse est concordante avec le lien entre la diminution de sucres RFO et la longévité dans les graines des mutants *abi5* (chapitre 4). Un autre facteur de transcription régulant ces deux phénomènes est *ABI3*. En effet, chez *Arabidopsis*, les graines des allèles peu sévères des mutants *abi3* sont tolérants à la dessiccation mais fortement affectés dans leur longévité. Leur teneur en saccharose y est plus élevée et celle en stachyose plus faible (Ooms *et al.*, 1993). De plus, *ABI3* régule *ABI5* (Nakamura *et al.*, 2001; Finkelstein *et al.*, 2005). Cependant, chez *Arabidopsis*, la teneur en saccharose des graines *abi5* est identique à celle des graines sauvage, contrairement aux mutants *abi5* de *M. truncatula* (Brocard-Gifford *et al.*, 2003). Ceci indique que la régulation du métabolisme des sucres au cours de la maturation est différente dans les deux espèces. Une étude comparative du transcriptome et du métabolome au cours de la maturation et de l'imbibition des graines *abi5* de ces deux espèces pourrait aider à comprendre d'où viennent ces différences. Avant tout, il est nécessaire de vérifier si la longévité des graines d'*Arabidopsis* est sous la régulation d'*ABI5* comme nous l'avons montré chez *M. truncatula*.

Une corrélation identique entre longévité et teneur en di- et oligosaccharides est retrouvée non seulement dans les graines *abi5*, mais également dans celles des mutants *snf4b* (Rosnoblet *et al.*, 2007; Bolingue *et al.*, 2010b). SNF4b est une sous-unité activatrice de la sucrose non-fermenting-related kinase (SnRK1). SnRK1 est capable de phosphoryler des facteurs de transcription de type AREBP (ABA response element binding protein), dont *ABI5* fait partie (Zhang *et al.*, 2008). De plus, l'expression de *SNF4b* est régulée en partie par l'ABA (Bolingue *et al.*, 2010b). On peut donc se poser la question de savoir si *ABI5* et *SNF4b* se retrouvent dans la même voie de régulation contrôlant le métabolisme des sucres et la longévité. Il serait intéressant de déterminer l'état de phosphorylation d'*ABI5* dans les graines de mutants *snf4b* par rapport au type sauvage. Par ailleurs, nos données préliminaires (données non montrées) suggèrent que le protéome LEA des mutants *snf4b* est légèrement différent des graines sauvages. Par exemple, les teneurs en CAPLEA et EM6 sont deux fois moins importantes dans les graines matures des mutants RNAi *Snf4b* par rapport au type sauvage. Dès lors, il serait intéressant de déterminer si SNF4b et ABI5 régulent l'expression des mêmes protéines LEA et savoir si ABI5 se trouve en amont ou en aval de SNF4b. Une autre hypothèse serait que ces deux facteurs de régulation font partie de deux voies de régulation distinctes qui sont chacune impliquées dans la régulation des sucres et la longévité. Un croisement entre les deux mutants pourrait aider à répondre à cette hypothèse.

En conclusion, notre travail montre que la fin de la maturation des graines est complexe et est soumise à des phénomènes de régulation impliquant les voies de signalisation par l'ABA. A ce titre, *ABI5* semble jouer un rôle important. Il démontre la nécessité de poursuivre les études sur l'implication du saccharose et des oligosaccharides dans la longévité. Notre étude protéomique suggère que les protéines LEA subissent probablement des modifications post-traductionnelles pendant la maturation. Celles-ci devront être caractérisées car elles ne sont peut-être pas à négliger si on veut en comprendre leurs rôles dans la biologie des graines. Cette étude suggère également que ces protéines de stress jouent probablement un rôle qui va au-delà des mécanismes de protection contre l'état sec tel qu'on l'avait imaginé jusqu'à présent. A cet égard, une piste intéressante serait de voir si elles jouent un rôle dans la régulation de l'imbibition des graines.

## **Matériel et Méthodes**



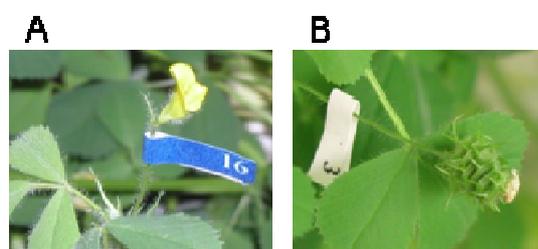
## I. Matériel végétal et conditions de cultures

### I.1. Choix du matériel végétal

Les travaux décrits dans ce rapport ont été réalisés à partir de graines de luzerne tronquée (*Medicago truncatula*, génotype A17, Jemalong). Les mutants *abi5* ont été produits par insertion d'un retrotransposon Tnt 1 sur le fond génétique du génotype R108 (Tadege *et al.*, 2008) et fournis par la Samuel Noble Foundation. Les plantes *abi5* ont ensuite été rétrocroisées avec R108 (BC0), et après sélection, les plantes homozygotes *abi5* BC1 ont été utilisées pour les travaux décrits.

### I.2. Production de graines et tests de germination

Les plantes de *M. truncatula* sont cultivées sur un mélange de vermiculite et de terreau dans une chambre de culture entre 21°C et 24°C, sous lumière ( $200 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-2}$ ), avec une photopériode de 16 h de jour. Les fleurs sont étiquetées le jour d'ouverture des pétales, ce point servant de référence (jour zéro) pour le prélèvement des gousses immatures à différents stades de maturation (jours après pollinisation, JAP) (fig. M1). Les gousses après abscission sont disséquées afin de récupérer les graines matures. Les graines récoltées à différents stades de maturation sont soit immédiatement congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C, soit séchées rapidement à 20°C et 43% d'humidité relative (HR) pendant 3 jours avant leur stockage à 20°C, post-maturées à sec pour l'étude de dormance, ou congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C jusqu'au jour d'utilisation.



**Figure M1:** Photos du marquage des fleurs de *Medicago truncatula* à leur ouverture (0 JAP) (A) et des gousses à 10 JAP (B).

Pour les expériences de germination, les graines sont imbibées avec 4 mL d'eau sur un papier Whatman n°1 dans des boîtes de Pétri à 20°C et à l'obscurité après avoir été scarifiées à l'aide de papier de verre pour lever la dormance physique tégumentaire (Bolingue *et al.*, 2010a). Les graines sont considérées comme germées lorsque la radicule perce le tégument et l'albumen.

Pour tester la tolérance à la dessiccation, les graines récoltées à différents stades de maturation et préalablement séchées après récolte à 20°C et à 43% HR pendant 3 jours sont imbibées à l'obscurité à 20°C. Les graines sont alors remises en conditions de germination et la tolérance à la dessiccation est déterminée par le pourcentage de graines capable de germer.

Les graines sont imbibées à 20°C et à l'obscurité dans 20  $\mu\text{M}$  fluridone (SIGMA) pour lever la dormance (Bolingue *et al.*, 2010a) et le pourcentage de germination final est déterminé.

Pour les tests de sensibilité à l'acide abscissique (ABA) l'imbibition des graines sauvages et *abi5* (R108) est réalisée dans 4 mL d'une solution d'ABA 10  $\mu$ M ou une solution de 0,01 % de méthanol. La solution d'ABA 10  $\mu$ M utilisée est obtenue par dilution dans de l'eau distillée d'une solution de méthanol 0,5% contenant 500  $\mu$ M d'ABA (SIGMA).

### **I.3. Vieillessement artificiel**

Afin d'étudier leur longévité, les graines séchées sont vieillessement artificiellement à 35°C et 75% d'humidité relative (HR) dans une enceinte contenant une solution saturée de NaCl. A différents temps de conservation, les graines sont imbibées à 20°C et à l'obscurité et le pourcentage de germination final a été déterminé en triplicat sur 50 graines au minimum pour les graines du génotype A17 et sur un lot unique de 50 graines pour le génotype R108 de type sauvage et mutant *abi5*. La détermination des paramètres tels que la P50, le Ki et le sigma permettent de déduire la longévité des graines étudiées selon l'équation d'Ellis et Roberts (1980) (chapitre 1). Le P50 correspond au temps de vieillessement nécessaire pour diminuer le taux de germination final à 50 % des graines et converti en probit. Une droite de régression est tracée à partir des P50 obtenues pour les graines récoltées à différents stades de maturation. Le Ki, qui représente la viabilité initiale des graines étudiées, correspond au point d'intersection de l'axe des ordonnées par la droite de régression. Le paramètre sigma correspond à la pente de la droite de régression et représente le temps nécessaire pour diminuer le % de germination d'une valeur d'un écart-type.

## **II. Détermination de la teneur en eau**

La teneur en eau est déterminée à partir de la mesure de la masse fraîche et de la masse sèche des graines en utilisant une balance d'ultra-précision (Perkin-Elmer) sur 3 à 5 graines avec 3-5 répétitions. La masse sèche est obtenue après séchage à 96°C pendant deux jours.

## **III. Détermination de la teneur en sucres**

Après lyophilisation pendant 24 h, la masse sèche des graines est mesurée avant broyage au broyeur à bille (TissueLyser, QUIAGEN) à une fréquence de 30 s<sup>-1</sup> pendant 2 min dans des tubes d'ependorf de 2 mL. Quarante  $\mu$ L d'une solution de mélézitose à 4 g/L, servant de témoin interne, et 1 mL d'une solution de méthanol 80% sont ajoutés au broyat. Les échantillons sont ensuite incubés 15 min à 76°C, puis le méthanol est évaporé au speed-vac (Mi Vac quatre concentrator, GENEVAC) pendant 2 h à 40°C. Le culot est repris dans 1 mL d'eau ultra pure et centrifugé 5 min à 4°C à 13500 g (R5417, Eppendorf). Le surnageant est dilué entre 25 et 50 fois.

Les échantillons sont analysés par chromatographie ionique haute performance en phase liquide, en utilisant le système DIONEX (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA), contenant une pré-colonne AS11 ion exchanger et une colonne Dionex CarboPac PA1 (2 x 250 mm). Les sucres sont détectés par ampérométrie après séparation sur une colonne CarboPac PA1 avec un débit constant à 0.25 mL/min de NaOH 0,1 M. La concentration en sucres des échantillons est déterminée par comparaison avec un échantillon standard dont les quantités de sucres sont connues. La concentration du verbascose est quant à elle calculée sur la base de la surface du pic

chromatographique correspondant au stachyose du à l'absence de standard pur. Les teneurs en sucres sont exprimées en mg de sucre par mg de matière sèche.

#### IV. Détermination de la teneur en acides gras

Les graines (25-30) sont broyées au broyeur à bille (TissueLyser, QUIAGEN) à une fréquence de 30 s<sup>-1</sup> pendant 2 min. Après lyophilisation pendant 24 h, la masse sèche du broyat est mesurée. Les acides gras sont extraits avec 1 à 2 mL de dichlorométhane contenant 50 ppm d'amylène. Dix extractions successives sont réalisées. Les différents extraits sont rassemblés et évaporés. Ce protocole d'extraction, réalisé en collaboration avec Didier Marion (UR Biopolymères, Interaction, Assemblages INRA Nantes), a été effectué afin de permettre l'extraction des protéines totales et solubles sur les poudres restantes après délipidation pour l'étude des carbonylations (voir VII.1).

Aux extraits d'acides gras obtenus sont additionnés 100 µL d'acide margarique à 5mg / mL (MERK) servant d'étalon interne et 500 µL de toluène. L'ensemble est vortexé jusqu'à resolubilisation complète. A 100 µL des acides gras resolubilisés sont ajoutés 500 µL de méthanol boron trifluoride (14%) (SIGMA) et chauffé à 70°C pendant 1h. Les acides gras sont transméthylés par le méthanol boron trifluoride, les rendant ainsi plus volatiles. Les acides gras transméthylés sont mélangés avec 2 mL d'eau et 2 mL d'hexane, ils sont agités part retournement et laissés à décanter. La phase supérieure, contenant les acides gras, est récupérée et évaporée ; à la phase inférieure est ajoutée à nouveau 2 mL d'hexane. Après agitation par retournement, le mélange est laissé à décanter. La phase supérieure est récupérée et additionnée à la première. L'hexane est évaporé et les acides gras sont dissous dans 200 µL de cyclohexane (Carlo Erba).

Les acides gras transméthylés (1µL) sont analysés par chromatographie en phase gazeuse, ils sont séparés sur une colonne DB225-MS (60m x 0,25 mm, film thickness 0,25 µm (Agilent)). En sortie de colonne, les acides gras sont détectés par un détecteur à ionisation à flamme (FID). Les échantillons ont été analysés par spectrométrie de masse afin de déterminer le temps de rétention des acides gras. La concentration en acides gras est déterminée par rapport au standard interne et est exprimée en mg d'acide gras par mg de MS et en % d'acide gras sur les acides gras totaux.

#### V. Détermination *in vitro* des activités enzymatiques à partir de graines de *M. truncatula*

L'extraction protéique et les mesures d'activité des enzymes sur des graines fraîches et sèches au cours de la maturation ont été réalisées suivant le protocole de Bailly et al. (2001).

##### V.1. Préparation des extraits protéiques

Les graines sont broyées dans un mortier avec de l'azote liquide, puis du polyvinylpyrrolidone (PVP) est ajouté au dixième de la masse de l'échantillon. Les protéines sont extraites avec 1,5 mL de tampon d'extraction (Tampon phosphate de potassium 0,1M pH 7,8, DTT 2 mM, EDTA 0,1 mM, PEG 4000 1,25 mM) pour 100 mg de graines. L'extrait est ensuite centrifugé 15 min à 13500 g (R5417, Eppendorf) à 4°C. Les extraits clarifiés sont dessalés sur colonnes PD 10 (Pharmacia) et les protéines sont éluées de la colonne avec du phosphate 0,1 M pH 7,8. Les protéines sont ensuite dosées selon la méthode de Bradford (1976) (BIORAD Protein assay, BIORAD).

### V.2. Détermination in vitro de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) est déterminée à partir de la capacité de cette enzyme à inhiber la réduction du nitrobleu de tétrazolium (NBT) par les radicaux libres superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) générés en milieu de réaction par la photoréduction de la riboflavine en présence de méthionine. Le dosage est colorimétrique par absorbance à 560 nm.

A l'abri de la lumière, le mélange réactionnel est préparé comme suit : tampon phosphate 73 mM pH 7,8 contenant riboflavine D10 13  $\mu$ M, méthionine 13 mM, NBT 63  $\mu$ M supplémenté ou non d'extrait protéique. La densité optique (DO) sans inhibition (100 %) et avec inhibition (avec l'extrait protéique) est la moyenne de la DO de 3 mesures sous une très forte lumière, de préférence homogène, pendant 15 min. Le blanc est effectué avec le même mélange réactionnel mais placé à l'abri de la lumière. La mesure de la réaction est réalisée à 560 nm à 25°C contre le blanc. Une unité enzymatique correspond à la quantité d'extrait susceptible d'induire une inhibition de 50% de la réaction de réduction du NBT par l'anion superoxyde. L'activité enzymatique est exprimée en unité par mg de protéines et est déduite des formules suivantes :

$$\% \text{ d'inhibition de la SOD} = -1 * ((DO_{\text{avec extrait}} * 100 / \text{Moy } DO_{\text{sans inhibition}}) - 100)$$

$$\text{Activité enzymatique de la SOD} = (\% \text{ inh} / 50) / ([\text{Prot}] * V_{\text{extrait}})$$

### V.3. Détermination in vitro de l'activité enzymatique de la catalase dans des extraits protéiques de graines

La catalase catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  en eau. L' $H_2O_2$  possédant un pic d'absorption dans l'UV (entre 230 et 250 nm), l'activité enzymatique de la catalase peut être déduite de la mesure de la cinétique de disparition du peroxyde d'hydrogène.

La réaction se fait sur 3 répétitions dans un tampon phosphate 42,5 mM pH 7,0 additionné de l'extrait à doser, puis d'une solution de  $H_2O_2$  3,1 mM. Le blanc correspond au même mélange réactionnel sans  $H_2O_2$ . La mesure de la DO à 240 nm à 25°C débute dès l'ajout de  $H_2O_2$ . La cinétique de la réaction enzymatique est réalisée sur 1 min. Puis, la tangente à l'origine  $\Delta$ , correspondant à la vitesse maximale de l'enzyme, est utilisée pour calculer l'activité enzymatique de la catalase dans nos extraits. L'activité enzymatique de la catalase (CAT) est exprimée en  $\mu$ mol  $H_2O_2$  par  $\text{min}^{-1}$  par  $\text{mg}^{-1}$  de protéines et est déduite de la formule suivante :

$$AS_{\text{CAT}} = \Delta * V_{\text{final}} / (43,6 * V_{\text{extrait}} * [\text{Prot}])$$

(43.6  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  coefficient d'extinction molaire)

#### **V.4. Détermination *in vitro* de l'activité enzymatique de la glutathione réductase dans des extraits protéiques de graines**

La glutathione réductase (GR) catalyse, en présence de NADPH, la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion (GSH). Le dosage de l'activité enzymatique de la GR est réalisé par mesure de la disparition du NADPH à 340 nm.

La mesure de l'activité de la GR est réalisée dans du tampon phosphate 66 mM pH 7,8 contenant MgCl<sub>2</sub> 2 mM, GSSG 6,7 mM, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) 0,4 mM et additionné de l'extrait protéique. Le blanc correspond au même mélange réactionnel sans NADPH. La mesure de l'activité de la GR débute après avoir ajouté le NADPH. La DO est mesurée à 340 nm à 25°C en prenant les valeurs toutes les 5 min. L'activité enzymatique de la GR est exprimée en nmol de NADPH par min<sup>-1</sup> par mg<sup>-1</sup> de protéines, et elle est déduite de la formule suivante :

$$AS_{GR} = \Delta DO * V_{final} / (6,22 * V_{extrait} * [Prot])$$

(6220 M/min = 6,22 10<sup>-3</sup> nmol/mL/min coefficient d'extinction molaire du NADPH)

Où  $\Delta DO = [DO(t) - DO(t+n)]/n$

où t = 5min correspond à la première mesure et n =10 min correspond à la dernière mesure effectuée.

## **VI. Enrichissement en protéines stables à la chaleur**

### **VI.1. Préparation des extraits protéiques**

#### *VI.1.1. Extraction des protéines solubles totales*

Pour l'étude du protéome stable à la chaleur par électrophorèse bidimensionnelle, les protéines stables à la chaleur sont enrichies à partir d'un extrait de protéines solubles totales. Après avoir été lyophilisées pendant 48 h et pesées, les graines sont broyées à l'aide d'un broyeur à bille (TissueLyser, QUIAGEN) à une fréquence de 30 s<sup>-1</sup> pendant 120 s. Les protéines solubles totales sont extraites par ajout de 1 à 2 mL de tampon de lyse (HEPES 50 mM pH 7,6, EDTA 1 mM, Complet Mini 1X (Roche Molecular Biochemicals), DNase 53 U.mL<sup>-1</sup>(SIGMA), RNase 4,9 kU.mL<sup>-1</sup>(SIGMA)) au broyat. L'échantillon est mélangé au vortex pendant 1 min puis incubé dans la glace pendant 30 min. Le lysat est centrifugé pendant 15 min à 4°C à 13500 g (R5417, Eppendorf). Le surnageant est récupéré puis clarifié une seconde fois. La concentration des protéines solubles totales ainsi obtenues est déterminée selon la méthode de Bradford (1976).

#### *VI.1.2. Enrichissement en protéines stable à la chaleur*

La solution de protéines solubles totales est diluée à une concentration finale de 3 µg.µL<sup>-1</sup> dans le tampon d'extraction et incubé à 95°C pendant 15 min à 1100 rpm (Thermomix Comfor, Eppendorf). L'échantillon est incubé sur la glace pendant 15min, puis centrifugé pendant 15 min à 4°C à 13500 g (R5417, Eppendorf) afin de culoter les protéines dénaturées. Le surnageant, enrichi en protéines stables à la chaleur, est récupéré et clarifié une seconde fois. La concentration des protéines stables à la chaleur est déterminée selon la méthode de Bradford (1976).

## VII. Etude des protéines carbonylées

### VII.1. Préparation des extraits protéiques

#### VII.1.1. Extraction des protéines totales

L'extraction des protéines totales est effectuée selon le protocole décrit par Harder *et al.* (1999) sur le broyat délipidé ((IV) dans 1,5mL de tampon de lyse urée/thiourée (Urée 7 M, thiourée 2 M, CHAPS 4% (w/v), Ampholytes pH 3 à 10 1% (v/v) (BIORAD), Tris-HCl 32 mM (SIGMA), Complet Mini 1X (Roche Molecular Biochemicals), DNase I 53 U/mL (Roche Diagnostics), RNase A 4,9 KU/mL (SIGMA) et Triton X-100 0.2% (v/v)). L'ensemble est mélangé au vortex puis incubé 10 min à 4°C. Les protéines extraites sont dénaturées par ajout de dithiothreitol (DTT) à une concentration finale de 14 mM par incubation pendant 20 min dans la glace. L'extrait est à nouveau mélangé au vortex avant d'être centrifugé pendant 10 min à 4°C à 20000 *g* (Eppendorf). Le surnageant, contenant les protéines totales, est clarifié une seconde fois, puis, la concentration en protéines totales est déterminée par dosage selon la méthode de Bradford (1976).

#### VII.1.2. Extraction des protéines solubles totales

Au broyat délipidé ((IV) est ajouté 1 à 2 mL de tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 5mM, PMSF 1mM et acide nordihydroguaiarétique (NDGA) 100  $\mu$ M (FLUKA)). L'extraction en présence de NDGA a été mise au point en collaboration avec Didier Marion (INRA Nantes, ELIPS). Le NDGA est un fort réducteur utilisé pour les extractions des protéines solubles afin d'éviter leur oxydation lors de l'extraction dans un tampon aqueux. L'échantillon est mélangé au vortex pendant 1 min puis incubé dans la glace pendant 30 min. Le lysat est centrifugé pendant 15 min à 4°C à 13500 *g* (R5417, Eppendorf). Le surnageant, contenant les protéines solubles totales, est récupéré puis clarifié une seconde fois. La concentration des protéines solubles totales est déterminée selon la méthode de Bradford (1976).

### VII.2. Marquage des protéines carbonylées

Afin de détecter les protéines carbonylées, une étape préalable de marquage avec du dinitrophényl hydrazine (DNPH) est nécessaire. Le DNPH fixé peut ensuite être dosé par spectrophotométrie (VII.2.1) ou détecté par un anticorps anti-DNPH après séparation des protéines et transfert sur membrane de nitrocellulose (VIII.4). Le marquage au DNPH est effectué soit directement après l'extraction des protéines dans le cas du dosage de la carbonylation des protéines et d'une séparation par électrophorèse monodimensionnelle, soit après la première dimension dans le cas d'une séparation par électrophorèse bidimensionnelle.

#### VII.2.1. Dosage de la carbonylation des protéines solubles

Les protéines carbonylées sont marquées à l'aide du DNPH (Levine *et al.*, 1994; England & Cotter, 2004). Pour ce faire, les protéines solubles extraites (VII.1.1) sont précipitées avec 16% d'acide trichloroacétique (TCA). Au culot protéique est ajoutée une solution de 2,4-dinitrophényl hydrazine 10

mM (DNPH)-HCl 2M (ALDRICH). L'ensemble est mélangé au vortex puis placé à l'obscurité pendant 30 min. Les protéines sont à nouveau précipitées avec du TCA et centrifugées 3 min à 4°C, 13500 g (R5417, Eppendorf). Les culots sont lavés trois fois avec une solution d'éthanol/ acétate d'éthyle (v/v) (1:1), pendant 10 min, puis centrifugés 3 min à 4°C à 13500 g (R5417, Eppendorf) et repris dans du tampon de réhydratation (VIII.2) pendant 35 min sous agitation à 37°C à 1400 rpm.

Pour le dosage de la carbonylation des protéines, le blanc de chaque échantillon est traité comme précédemment, excepté la solution d'HCl 2 M qui ne comprend pas de DNPH (Levine *et al.*, 1994). La DO des échantillons dérivés et des blancs est mesurée par spectrophotométrie à 370 nm. La quantité de protéines carbonylées est exprimée en nmol de DNP par mg de protéines suivant la formule suivante :

$$\begin{aligned}\Delta DO &= DO_{\text{ech}} - DO_{\text{blanc}} \\ \text{DNP} &= (\Delta DO / (\epsilon * C_{\text{Prot}})) * 10^6 \\ \epsilon_{\text{DNP}} &= 22\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \\ C_{\text{Prot}} &\text{ en g.L}^{-1}\end{aligned}$$

#### VII.2.2. Marquage des protéines carbonylées avant SDS-PAGE (1D)

Pour l'analyse de la carbonylation des protéines après séparation SDS-PAGE et transfert sur membrane, les protéines carbonylées sont marquées au DNPH comme sus-décrit (VII.2.1). Les protéines marquées sont ensuite précipitées avec 16% de TCA. Le TCA est éliminé par lavages successifs du culot avec de l'acétone 100% puis de l'acétone 80%. Le culot est séché puis repris dans du tampon de réhydratation (VIII.2). Les protéines sont à nouveau dosées et dix µg de protéines sont ensuite séparés par SDS-PAGE (VIII.1).

#### VII.2.3. Marquage des protéines carbonylées après isofocalisation électrique (2D)

Pour l'analyse de la carbonylation des protéines totales et des protéines solubles après séparation par électrophorèse bidimensionnelle, les protéines carbonylées sont marquées après leur séparation en fonction de leur point isoélectrique (isofocalisation électrique) sur bandelettes de pH 3 à 10 non linéaire (voir VIII.2.1). Les protéines séparées sur bandelettes sont dérivées avec une solution de 2,4-dinitrophényl hydrazine 10 mM (DNPH), HCl 2M pendant 20 min. Afin de neutraliser l'acide chlorhydrique, les bandelettes sont incubés 20 min dans une solution de neutralisation (Tris-HCl 2M, glycérol 30 % (m/v)). La séparation en fonction du masse moléculaire est ensuite effectuée (voir VIII.2.2).

### VII.3. Détection après migration et transfert des protéines carbonylées marquées au DNPH

Pour détecter des protéines carbonylées marquées au DNPH (VII.2.1 et VII.2.2), un anticorps dirigé contre le DNPH (anticorps anti-DNP IgG rabbit A6430, INVITROGEN) est utilisé après transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose (VIII.4). Les sites non spécifiques de couplage de la membrane de nitrocellulose sont saturés par une incubation d'une heure minimum dans du TBS (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 0,15 M) supplémenté en Tween 1,5 %. Après lavage dans une solution de

TBS-Tween 0,5 % (TBS-T), la membrane est ensuite incubée la nuit à 4°C et à l'obscurité dans du TBS-T contenant l'anticorps primaire anti-DNP dilué au 1/10 000. La membrane est ensuite lavée par 2 bains successifs de 5 min dans du tampon TBS-T, puis la membrane est incubée pendant 1 h à l'obscurité et à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-immunoglobuline G de lapin, dirigé contre les premiers anticorps, et conjugué à une peroxydase (HRP) (Anticorps anti-Rabbit IgG-HRP A0545 (SIGMA), dilution 1/20 000). Après lavage dans du TBS-T, la carbonylation des protéines est détectée par une réaction de chemiluminescence en utilisant le kit de révélation BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) (Roche) et visualisée avec le lecteur de gel Chemidoc (BIORAD).

### VIII. Techniques d'étude des protéines

#### VIII.1. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE)

La séparation électrophorétique des protéines est effectuée selon la méthode de Laemmli (1970). Les protéines ont été séparées par migration sur un gel d'acrylamide constitué (1) d'un gel de concentration contenant 4 % [v/v] d'acrylamide et (2) d'un gel de séparation contenant 12 % [v/v] d'acrylamide (Tableau M1).

Pour l'électrophorèse SDS-PAGE, les protéines (protéines carbonylées et stables à la chaleur) à analyser sont dénaturées pendant 5 min à 100°C dans le tampon de dénaturation (Tris-HCl 12 mM pH 6,8, glycérol 10 % [v/v], SDS 0,4 % (m/v), bleu de bromophénol 0,02 % (m/v) et DTT 0,8 mM), avant d'être déposées dans les puits du gel de polyacrylamide. La migration électrophorétique des protéines est réalisée dans un tampon de migration (Tris-HCl 15,6 mM pH 8,0, glycine 120 mM, SDS 0,1 % (m/v)) à voltage constant (200 V). Après l'électrophorèse, les protéines sont colorées directement dans le gel de polyacrylamide (VIII.3) ou transférées sur une membrane de nitrocellulose (VIII.4).

**Tableau M1** : Composition des gels de séparation (A) et de concentration (B) d'acrylamide. Protogel 40% Acrylamide/Bis Solution 37,5:1 (BIORAD), Glycérol 80% (v/v), Ammonium persulfate (APS) 40 % (m/v), Tampon de séparation 4X : 1,5M Tris-HCl pH 8,8, SDS 0.4% (m/v), Tampon de concentration 4X : 0,5M Tris-HCl pH 6,8, SDS 0,4 % (m/v).

	Gel de séparation	Gel de concentration
% acrylamide	12%	4%
Protogel	3 mL	0,48 mL
H <sub>2</sub> O ultrapure	3,25 mL	3,26 mL
Glycérol 80%	1,25 mL	-
Tp séparation 4X	2,50 mL	-
Tp concentration	-	1,25 mL
APS 40%	14 µL	8 µL
TEMED	15 µL	8 µL
Volume final	10 mL	5 mL

### **VIII.2. Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle**

L'électrophorèse bidimensionnelle est une technique qui permet de séparer les protéines selon deux dimensions, en fonction de leur point isoélectrique et de leur masse moléculaire. Avant solubilisation dans le tampon d'isoélectrofocalisation, 700 µg de protéines stables à la chaleur ou protéines carbonylées sont précipitées par ajout d'acide trichloroacétique (TCA) à une concentration finale de 17% pendant 4 h dans la glace puis 3 min à -20°C. A près une étape de centrifugation pendant 5 min à 4°C à 13500 g (R5417, Eppendorf), le TCA résiduel contenu dans le culot protéique est éliminé par deux lavages successifs avec 50 µL d'acétone 100% et 50 µL d'acétone 80%. Puis le culot est séché sous une hotte avant d'être repris une nuit à 4°C dans le tampon d'isoélectrofocalisation ou de réhydratation (Urée 6M, Thiourée 2M, CHAPS 4% (m/v), DTT 20 mM, ampholytes 1% (v/v)).

#### *VIII.2.1. Isoélectrofocalisation (IEF) (1<sup>ère</sup> dimension) :*

La séparation des protéines selon leur point isoélectrique (Isoélectrofocalisation) est réalisée en utilisant des bandelettes de focalisation sur lesquelles est immobilisé un gradient non linéaire de pH de 3 à 10. Les bandelettes de focalisation (IPG strip 24 cm et 11 cm, gradient de pH 3-10 non linéaire, BIORAD) sont placées dans une cuve d'isoélectrofocalisation (Protean IEF Cell, BIORAD) et réhydratées de manière passive pendant 1 h avec 450 µL de tampon réhydratation (Urée 6M, Thiourée 2M, CHAPS 4% (m/v), DTT 20 mM, ampholytes 1% (v/v)) contenant 100 µg de protéines à analyser pour les bandelettes 24 cm (étude LEA protéome) et 50 µg pour les bandelettes 11 cm (étude de carbonylation). Puis, après recouvrement des bandelettes avec de l'huile minérale pour prévenir l'évaporation du tampon, les bandelettes sont réhydratées activement à 50 V pendant 12 h à 20°C (Protean IEF Cell, BIORAD).

Le protocole d'isoélectrophorèse est adapté selon la taille des bandelettes et échantillons. Pour les bandelettes de 24 cm, une première augmentation du voltage est tout d'abord appliquée de 50 à 250 V pendant 3 h, puis l'intensité du voltage augmente progressivement jusqu'à 8000 V pendant 4 h et maintenue à 8000 V jusqu'à atteindre 60 000 Vh accumulés au total. Pour les bandelettes de 11 cm, la première augmentation du voltage est de 50 à 250 V pendant 15 min, puis l'intensité du voltage augmente progressivement jusqu'à 6000V pendant 3 h et maintenue à 8000 V jusqu'à atteindre 30 000 Vh accumulés au total.

#### *VIII.2.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (2<sup>ème</sup> dimension) :*

Une étape préalable d'équilibration des bandelettes est nécessaire pour dénaturer les protéines à analyser avant séparation en fonction de leur masse par SDS-PAGE. Les bandelettes de focalisation sont alors équilibrées par incubation dans une solution contenant du DTT (DTT 130 mM, Urée 8 M, Tris-HCl 375 mM pH 8,8, Glycérol 20% (v/v), SDS 2% (m/v)) pendant 15 min. Le SDS a pour rôle de charger les protéines et le DTT en excès est inactivé par lavage des bandelettes avec une solution d'iodoacétamide pendant 20 min (Iodoacétamide 250 mM, Urée 8 M, Tris-HCl 375 mM pH 8,8, Glycérol 20% (v/v), SDS 2% (m/v)).

La séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire est réalisée sur gel d'acrylamide 12% (m/v) (Tableau M1) dans le système Ettan DALTSix (Amersham Biosciences). Une

solution d'agarose 1% (m/v) contenant du bleu de bromophénol est coulée au dessus de chaque bandelette afin de les maintenir et permettre la visualisation de la migration électrophorétique des protéines. La migration électrophorétique s'effectue dans un tampon de migration (Tris-HCl 15,6 mM, glycine 120 mM pH 8,0, SDS 0,1 % (m/v)) et est réalisée à 10°C pendant 1 h à 25 V puis 20 h à 110 V pour les gels de 24 cm. Pour les gels de 12 cm, la migration est effectuée sur des gels précoulés (Criterion 12 cm Tris-HCl gels 12,5% (BIORAD)) pendant 15 min à 25 V puis pendant 1 h 10 à 200 V. Après électrophorèse, les protéines sont soit colorées au bleu colloïdal (VIII.3) soit transférées sur membrane de nitrocellulose (VIII.4).

### **VIII.3. Coloration des protéines au bleu colloïdal**

Après électrophorèse mono ou bidimensionnelle, les protéines sont fixées dans le gel de polyacrylamide par incubation dans une solution de fixation (acide acétique 5% (v/v), méthanol 25% (v/v)) pendant 1 h sous agitation. Le gel de polyacrylamide est coloré par incubation dans une solution de coloration (Brillant Blue G colloïdal concentré (SIGMA-ALDRICH) 0,08 % (m/v), méthanol 10%) pendant 48 h. Il est ensuite brièvement décoloré dans un mélange acide acétique 5% (v/v), méthanol 25% (v/v), puis plusieurs fois dans une solution de méthanol 25% (v/v).

### **VIII.4. Transfert des protéines sur membrane (western-blot)**

Le transfert des protéines du gel d'électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose (Whatman 0,2µm, PROTRAN) est effectué selon Towbin *et al.*, (1979). Le transfert s'effectue dans du tampon de transfert (tampon de migration électrophorétique (VIII.1) supplémenté de 20 % de méthanol (v/v)) et SDS 0,01% (m/v) en 1 h à 100 V.

## **IX. Techniques d'étude des acides nucléiques**

### **IX.1. Extraction ADN génomique**

L'extraction d'ADN génomique (ADNg) a été réalisée sur les plantes *abi5* BC1T1 afin de pouvoir sélectionner les plantes homozygotes *abi5* après amplification par PCR *in vitro* de fragments d'ADNg.

Les extractions d'ADNg sont réalisées à partir de feuilles de jeunes plantes d'après le protocole de Doyle and Doyle, (1990). Les feuilles sont broyées 20s à une fréquence de 25s<sup>-1</sup> à l'aide d'un broyeur à bille (TissueLyser, QUIAGEN). L'ADNg est extrait avec un tampon de lyse (CTAB 2%, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH8, β-mercaptoéthanol 100 mM ajouté extemporanément) et mélangé au vortex par incubation de 30 min à 60°C. Ensuite, 40 µl de phénol sont ajoutés à l'extrait puis, après mélange au vortex, 40 µL d'une solution de chloroforme / isoamylalcool (24:1) sont également ajoutés. L'extrait est vortexé à nouveau puis centrifugé 10 min à 4°C et à 14000 g (R5417, Eppendorf). La phase supérieure contenant les acides nucléiques est transférée dans un nouvel eppendorf et lavée avec une solution de chloroforme / isoamylalcool (24:1). La phase supérieure est à nouveau récupérée et les acides nucléiques sont précipités avec un volume d'isopropanol. Les acides nucléiques sont culotés en les centrifugeant 20 min à 20000 g (R5417, Eppendorf) à 4°C. Le culot est lavé avec de l'éthanol 70 % puis séché. Enfin, le culot d'ADNg

est dissous dans du tampon Tris-HCl 5 mM pH 8,0. La concentration d'ADN est déterminée en spectrophotométrie à 260 nm (Nanodrop ND-1000 UV-Vis). La pureté de l'ADN extrait est vérifiée par dosage à 260 et 280 nm ( $DO_{260nm} / DO_{280nm} > 2$ ).

### **IX.2. Amplification in vitro de fragments d'ADN (PCR)**

Pour cribler l'insertion Tnt1 des mutants *abi5* de *M. truncatula*, une PCR est effectuée sur 1 µL l'ADNg (300 ng) (IX.1) dans 14 µL tampon de PCR (PROMEGA) contenant 0,05 unité/µL de *Taq* polymérase, 125 µM de chaque dNTP, et 0,5 pmol de chacune des deux amorces (Tableau M2). Toutes les amorces utilisées pour les PCR quantitative ont été dessinées grâce au logiciel AmplifX et ont une température d'hybridation proche de 60°C. Toutes les PCR se déroulent suivant le même programme dans un thermocycler System (BIORAD). Chaque cycle comprend : 30 s de dénaturation à 95°C, 30 s d'hybridation à 55°C puis 90 s d'élongation à 72°C. L'amplification est arrêtée après 35 cycles. Six µL de produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (m/v) dans du TAE 0,5X. Après coloration au Syber green®, les fragments d'intérêt sont visualisés sous UV.

### **IX.3. Extraction d'ARN**

Les graines (25 graines) ont été broyées au mortier par lot d'environ 10 graines dans de l'azote liquide. Au broyat est ajouté 500 µL du phénol et 500 µL tampon de lyse (LiCl 0,1 M ; Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 ; EDTA 10 mM ; SDS 1% (m/v)) préalablement chauffé à 80°C. L'ensemble est mélangé au vortex pendant 30 s, puis 500 µL d'une solution de chloroforme / isoamylalcool (24:1) est ajouté et l'échantillon est à nouveau mélangé au vortex pendant 30 s. L'échantillon est centrifugé pendant 5 min à 13500 g (R5417, Eppendorf) afin de récupérer la phase supérieure aqueuse. Un second lavage au chloroforme / isoamylalcool (24:1) est effectué. Sur la seconde phase aqueuse récupérée, les acides nucléiques sont précipités avec 450 µL de LiCl 4M (v/v) sur la nuit à 4°C. Le précipité est culoté par centrifugation pendant 15 min à 13500 g à 4°C et repris dans 250 µL d'eau DEPC. Les acides nucléiques sont à nouveau précipités avec 1/10 V d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et 2,5 V d'éthanol 100 %. L'ensemble est incubé à -20°C pendant 30 min, puis centrifugé 10 min à 13500 g à 4°C. Le culot est lavé avec 1 mL d'éthanol 70 %, puis avec 25 µL d'éthanol 100 %. Le culot est séché, puis repris dans de l'eau DEPC. La concentration est mesurée à 260 nm par spectrophotométrie (Nanodrop ND-1000 UV-Vis). La pureté en ARN est déterminée à partir du ratio  $DO_{260nm} / DO_{230nm}$  pour évaluer la contamination par les composants phénoliques et à partir du ratio  $DO_{260nm} / DO_{280nm}$  pour évaluer la contamination par les protéines. Un extrait d'ARN est considéré comme pur si ces deux ratios sont supérieurs ou égaux à 2. La quantité exacte d'ARN et sa qualité (taux de dégradation de l'ARN) sont déterminées par le système de puces Experion avec un kit RNA Standard Sens (BIORAD). L'extrait d'ARN est ensuite ajusté à une concentration de 100 ng par µL.

### **IX.4. Retrotranscription**

Les réactions de retrotranscription ont été réalisées avec le kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN). Tout d'abord, l'ADN résiduel est éliminé par digestion à la DNase. L'extrait est ensuite incubé 10 min à 42°C, puis placé immédiatement sur la glace. Après ajout de 1 µL rétrotranscriptase,

4 µL du tampon Quantiscript 5X et 1 µL d'oligo(dT), la rétrotranscription est réalisée par incubations successives à 42°C pendant 20 min puis à 95°C pendant 10 min. La réaction de rétrotranscription est arrêtée en plaçant l'échantillon sur la glace.

### IX.5. PCR Quantitative en temps réel (Q-PCR)

Une PCR quantitative est réalisée en trois réplicats. Cinq µL d'ADNc dilués sont supplémentés de 20 µL d'un mélange contenant du SYBR® Green (1X) (Absolute™ Blue QPCR SYBR® Green Mix, THERMO SCIENTIFIC) et 0,2 µM d'amorces spécifiques (Tableau M2). Les amorces utilisées pour les PCR quantitatives ont été dessinées grâce au logiciel AmplifX et ont une température d'hybridation proche de 60°C. Les PCR quantitatives ont été réalisées sur des appareils Chromo4™ System et CFX96™ Real-Time PCR System de BIORAD. Le programme utilisé est le suivant : 5 min de dénaturation à 94°C, suivi d'un cycle de 15 s à 94°C puis 1 min à 59°C. L'amplification est arrêtée après 35 cycles. La spécificité des amorces a tout d'abord été vérifiée par la visualisation de la courbe d'hybridation avec le logiciel Bio-Rad CFX Manager (BIORAD). Les mesures d'amplification sont réalisées en plaque 96 puits. L'analyse des différences d'expression d'un gène d'intérêt est effectuée par comparaison avec l'expression d'un gène de référence : le gène *Msc27* (Verdier *et al.*, 2008) pour les différents stades étudiés. L'expression relative est calculée avec la formule suivante :

$$ER = 2^{-((CT \text{ du gène au stade étudié} - CT \text{ du gène au stade de référence}) - (CT \text{ Msc27 au stade étudié} - CT \text{ Msc27 au stade de référence}))}$$

Dans cette formule, le nombre de cycles obtenu en Q-PCR correspond à la valeur de CT.

**Tableau M2.** Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour les expériences réalisées en PCR (sélection insertion Tnt1) et Q-PCR (expression *ABI5*). Les amorces ont été dessinées avec l'aide du logiciel AmplifX 1.5.4 (<http://crn2m.univ-mrs.fr/AmplifX>).

	Amorce sens	Amorce anti-sens	Température d'hybridation
PCR :			
abi5	ATGGTGGTAAGAGAAGGTGAGAT	TCTGGCTCTAGATCTTGCTGCT	60°C
Tnt	ACAGTGCTACCTCCTCTGGATG	CACAGGTTCTGCTCGTTCACTG	60°C
	Amorce sens	Amorce anti-sens	Température d'hybridation
Q-PCR :			
abi5-introns_PCRq	GGCAGAGGAGGATGATCAAG	GCTTTCTGAGCTTTGTTGA	60°C
Msc27	GTTGAAGTAGACATTGGTGCTAAC	AGCTGTGTCATCAACACCCTCAT	60°C

## Références





- Alexandrov N, Brover V, Freidin S, Troukhan M, Tatarinova T, Zhang H, Swaller T, Lu Y-P, Bouck J, Flavell R, Feldmann K. 2009. Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing. *Plant Molecular Biology* **69**: 179-194.
- Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner M-H, Bonnet M, Sotta B, Grappin P, Jullien M. 2004. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: Studies with the cape verde islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **219**: 479-488.
- Alkhalifiou F, Renard M, Vensel WH, Wong J, Tanaka CK, Hurkman WJ, Buchanan BB, Montrichard F. 2007. Thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of *Medicago truncatula* seeds. *Plant Physiology* **144**: 1559-1579.
- Allison SD, Chang B, Randolph TW, Carpenter JF. 1999. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **365**: 289-298.
- Almoguera C, Rojas A, Diaz-Martin J, Prieto-Dapena P, Carranco R, Jordano J. 2002. A seed-specific heat-shock transcription factor involved in developmental regulation during embryogenesis in sunflower. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 43866-43872.
- Alsheikh MK, Heyen BJ, Randall SK. 2003. Ion binding properties of the dehydrin erd14 are dependent upon phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 40882-40889.
- Alsheikh MK, Svensson JT, Randall SK. 2005. Phosphorylation regulated ion-binding is a property shared by the acidic subclass dehydrins. *Plant, Cell & Environment* **28**: 1114-1122.
- Amuti KS, Pollard CJ. 1977. Soluble carbohydrates of dry and developing seeds. *Phytochemistry* **16**: 529-532.
- Angelovici R, Galili G, Fernie AR, Fait A. 2010. Seed desiccation: A bridge between maturation and germination. *Trends in Plant Science* **15**: 211-218.
- Argyris J, Dahal P, Hayashi E, Still DW, Bradford KJ. 2008. Genetic variation for lettuce seed thermoinhibition is associated with temperature-sensitive expression of abscisic acid, gibberellin, and ethylene biosynthesis, metabolism, and response genes. *Plant Physiol.* **148**: 926-947.
- Babu CR, Zhang J, Blum A, David Ho TH, Wu R, Nguyen HT. 2004. Hva1, a lea gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Science* **166**: 855-862.
- Bailly C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* **14**: 93-107.
- Bailly C, Audigier C, Ladonne F, Wagner MH, Coste F, Corbineau F, Come D. 2001. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *J. Exp. Bot.* **52**: 701-708.
- Bailly C, Benamar A, Corbineau F, Come D. 1996. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Physiologia Plantarum* **97**: 104-110.
- Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H, Corbineau F. 2008. From intracellular signaling networks to cell death: The dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies* **331**: 806-814.
- Bailly C, Leymarie J, Lehner A, Rousseau S, Come D, Corbineau F. 2004. Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. *Journal of experimental botany* **55**: 475-483.
- Bahieldin A, Mahfouz HT, Eissa HF, Saleh OM, Ramadan AM, Ahmed IA, Dyer WE, El-Itriby HA, Madkour MA. 2005. Field evaluation of transgenic wheat plants stably expressing the hva1 gene for drought tolerance. *Physiologia Plantarum* **123**: 421-427.
- Bartels D, Singh M, Salamini F. 1988. Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. *Planta* **175**: 485-492.
- Baskin JM, Baskin CC. 1998. Germination ecology of seeds with non deep physiological dormancy. In: A. Press ed. *Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. San Diego, 49-86.
- Baskin JM, Baskin CC. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* **14**: 1-16.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias AA. 2008. The enigmatic lea proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol.* **148**: 6-24.
- Battista JR, Park M-J, McLemore AE. 2001. Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes deinococcus radiodurans r1 to desiccation. *Cryobiology* **43**: 133-139.

- Baud S, Boutin J-P, Miquel M, Lepiniec L, Rochat C. 2002.** An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype ws. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 151-160.
- Baumbusch LO, Hughes DW, Galau GA, Jakobsen KS. 2004.** Lec1, fus3, abi3 and em expression reveals no correlation with dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* **55**: 77-87.
- Benech-Arnold R, Sánchez R 2004.** Handbook of seed physiology. Applications to agriculture. In: R. Benech-Arnold R. Sánchez eds. Binghamton: Food Products Press.
- Benech-Arnold RL, Enciso S, Sánchez RA, Rodríguez MV. 2003.** On the hormonal nature of the stimulatory effect of high incubation temperatures on germination of dormant sorghum (s. bicolor) caryopses. *New Phytologist* **160**: 371-377.
- Benedito VA, Torres-Jerez I, Murray JD, Andriankaja A, Allen S, Kakar K, Wandrey M, Verdier J, Zuber H, Ott T, Moreau S, Niebel A, Frickey T, Weiller G, He J, Dai X, Zhao PX, Tang Y, Udvardi MK. 2008.** A gene expression atlas of the model legume *medicago truncatula*. *The Plant Journal* **55**: 504-513.
- Bensmihen S, Rippa S, Lambert G, Jublot D, Pautot V, Granier F, Giraudat J, 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.
- Bensmihen S, To A, Lambert G, Kroj T, Giraudat J, Parcy F. 2004.** Analysis of an activated abi5 allele using a new selection method for transgenic *Arabidopsis* seeds. *FEBS Letters* **561**: 127-131.
- Bentsink L, Alonso-Blanco C, Vreugdenhil D, Tesnier K, Groot SPC, Koornneef M. 2000.** Genetic analysis of seed-soluble oligosaccharides in relation to seed storability of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **124**: 1595-1604.
- Bernacchia G, Salamini F, Bartels D. 1996.** Molecular characterization of the rehydration process in the resurrection plant craterostigma plantagineum. *Plant Physiol.* **111**: 1043-1050.
- Bewley D, Black M 1994.** Seeds development and maturation. In: Bewley DJB. M eds. *Physiology of development and germination*. New York: PLENUM, 35-117.
- Bewley JD. 1979.** Physiological aspects of desiccation tolerance. *Annual Review of Plant Physiology* **30**: 195-238.
- Bewley JD. 1997.** Seed germination and dormancy. *Plant Cell* **9**: 1055-1066.
- Bies N, Aspart L, Carles C, Gallois P, Delseny M. 1998.** Accumulation and degradation of em proteins in *Arabidopsis thaliana*: Evidence for post-transcriptional controls. *Journal of experimental botany* **49**: 1925-1933.
- Black M, Corbineau F, Gee H, Come D. 1999.** Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiology* **120**: 463-471.
- Blackman SA, Wettlaufer SH, Obendorf RL, Leopold AC. 1991.** Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. *Plant Physiol.* **96**: 868-874.
- Blomstedt CK, Neale AD, Gianello RD, Hamill JD, Gaff DF. 1998.** Isolation and characterization of cdnas associated with the onset of desiccation tolerance in the resurrection grass, *sporobolus stapfianus*. *Plant Growth Reg.* **24**: 219-228.
- Boersema P, Mohammed S, Heck A. 2008.** Hydrophilic interaction liquid chromatography (hilic) in proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **391**: 151-159.
- Bolingue W, Ly Vu B, Leprince O, Buitink J. 2010a.** Characterization of dormancy behaviour in seeds of the model legume *Medicago truncatula*. *Seed Science Research* **20**: 97-107.
- Bolingue W, Rosnoblet C, Leprince O, Vu BL, Aubry C, Buitink J. 2010b.** The mtsnf4b subunit of the sucrose non-fermenting-related kinase complex connects after-ripening and constitutive defense responses in seeds of *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* **61**: 792-803.
- Bossi F, Cordoba E, Dupré P, Mendoza MS, Román CS, León P. 2009.** The *Arabidopsis* aba-insensitive (abi) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of abi5 and sbe2.2 genes during sugar signaling. *The Plant Journal* **59**: 359-374.
- Boucher V, Buitink J, Lin X, Boudet J, Hoekstra FA, Hundertmark M, Renard D, Leprince O. 2010.** Mtpm25 is an atypical hydrophobic late embryogenesis-abundant protein that dissociates cold and desiccation-aggregated proteins. *Plant, Cell & Environment* **33**: 418-430.
- Boudet J, Buitink J, Hoekstra FA, Rogniaux H, Larre C, Satour P, Leprince O. 2006.** Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant Physiology* **140**: 1418-1436.

- Bracale M, Levi M, Savini C, Dicorato W, Galli MG. 1997.** Water deficit in pea root tips: Effects on the cell cycle and on the production of dehydrin-like proteins. *Annals of Botany* **79**: 593-600.
- Bradford KJ, Chandler PM. 1992.** Expression of "Dehydrin-like" Proteins in embryos and seedlings of zizania palustris and *Oryza sativa* during dehydration. *Plant Physiol.* **99**: 488-494.
- Bradford KJ, Downie AB, Gee OH, Alvarado V, Yang H, Dahal P. 2003.** Abscisic acid and gibberellin differentially regulate expression of genes of the snf1-related kinase complex in tomato seeds. *Plant Physiol.* **132**: 1560-1576.
- Bray EA 1994.** Alterations in gene expression in response to water deficit. In: B. A.S. ed. *Stress-induced gene expression in plants*. Chur: Harwood Academic Publishers, 1-23.
- Brocard-Gifford IM, Lynch TJ, Finkelstein RR. 2003.** Regulatory networks in seeds integrating developmental, abscisic acid, sugar, and light signaling. *Plant Physiol.* **131**: 78-92.
- Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR. 2002.** Regulation and role of the *Arabidopsis* abscisic acid-insensitive 5 gene in abscisic acid, sugar, and stress response. *Plant Physiol.* **129**: 1533-1543.
- Browne J, Tunnacliffe A, Burnell A. 2002.** Anhydrobiosis - plant desiccation gene found in a nematode. *Nature* **416**: 38-38.
- Bruggink T, van der Toorn P. 1995.** Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. *Seed Science Research* **5**: 1-4.
- Buitink J, Claessens MMAE, Hemminga MA, Hoekstra FA. 1998a.** Influence of water content and temperature on molecular mobility and intracellular glasses in seeds and pollen. *Plant Physiol.* **118**: 531-541.
- Buitink J, Hemminga MA, Hoekstra FA. 2000.** Is there a role for oligosaccharides in seed longevity? An assessment of intracellular glass stability. *Plant Physiology* **122**: 1217-1224.
- Buitink J, Leger JJ, Guisle I, Vu BL, Wuilleme S, Lamirault G, Le Bars A, Le Meur N, Becker A, Kuester H, Leprince O. 2006.** Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. *Plant Journal* **47**: 735-750.
- Buitink J, Leprince O. 2004.** Glass formation in plant anhydrobiotes: Survival in the dry state. *Cryobiology* **48**: 215-228.
- Buitink J, Leprince O, Hemminga MA, Hoekstra FA. 2000a.** Molecular mobility in the cytoplasm: An approach to describe and predict lifespan of dry germplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 2385-2390.
- Buitink J, van den Dries IJ, Hoekstra FA, Alberda M, Hemminga MA. 2000b.** High critical temperature above tg may contribute to the stability of biological systems. *Biophysical Journal* **79**: 1119-1128.
- Buitink J, Vu BL, Satour P, Leprince O. 2003.** The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *medicago truncatula* gaertn. Seeds. *Seed Science Research* **13**: 273-286.
- Buitink J, Walters C, Hoekstra FA, Crane J. 1998b.** Storage behavior of typha latifolia pollen at low water contents: Interpretation on the basis of water activity and glass concepts. *Physiologia Plantarum* **103**: 145-153.
- Cadman CSC, Toorop PE, Hilhorst HWM, Finch-Savage WE. 2006.** Gene expression profiles of *Arabidopsis* cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *The Plant Journal* **46**: 805-822.
- Campalans A, Pagès M, Messeguer R. 2000.** Protein analysis during almond embryo development. Identification and characterization of a late embryogenesis abundant protein. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 449-457.
- Carles C, Bies-Etheve N, Aspart L, Léon-Kloosterziel KM, Koornneef M, Echeverria M, Delseny M. 2002.** Regulation of *arabidopsis thaliana* em genes: Role of abi5. *The Plant Journal* **30**: 373-383.
- Carpenter JF, Crowe JH, Arakawa T. 1990.** Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in the frozen and dried states. *Journal of Dairy Science* **73**: 3627-3636.
- Carpenter JF, Martin B, Crowe LM, Crowe JH. 1987.** Stabilization of phosphofructokinase during air-drying with sugars and sugar/transition metal mixtures. *Cryobiology* **24**: 455-464.
- Casaretto JA, Ho T-hD. 2003.** The transcription factors hvabi5 and hvvp1 are required for the abscisic acid induction of gene expression in barley aleurone cells. *Plant Cell* **15**: 271-284.
- Casaretto JA, Ho T-hD. 2005.** Transcriptional regulation by abscisic acid in barley (*hordeum vulgare* L.) seeds involves autoregulation of the transcription factor hvabi5. *Plant Molecular Biology* **57**: 21-34.

- Ceccardi TL, Meyer NC, Close TJ. 1994.** Purification of a maize dehydrin. *Protein Expression and Purification* **5**: 266-269.
- Chang BS, Beauvais RM, Dong A, Carpenter JF. 1996.** Physical factors affecting the storage stability of freeze-dried interleukin-1 receptor antagonist: Glass transition and protein conformation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **331**: 249-258.
- Cheng Z, Targolli J, Huang X, Wu R. 2002.** Wheat lea genes, pma80 and pma1959, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*oryza sativa* L.). *Molecular Breeding* **10**: 71-82.
- Clerkx EJM, Blankestijn-De Vries H, Ruys GJ, Groot SPC, Koornneef M. 2003.** Characterization of green seed, an enhancer of *abi3-1* in *Arabidopsis* that affects seed longevity. *Plant Physiology* **132**: 1077-1084.
- Clerkx EJM, Blankestijn-De Vries H, Ruys GJ, Groot SPC, Koornneef M. 2004a.** Genetic differences in seed longevity of various *arabidopsis* mutants. *Physiologia Plantarum* **121**: 448-461.
- Clerkx EJM, El-Lithy ME, Vierling E, Ruys GJ, Blankestijn-De Vries H, Groot SPC, Vreugdenhil D, Koornneef M. 2004b.** Analysis of natural allelic variation of *Arabidopsis* seed germination and seed longevity traits between the accessions *landsberg erecta* and *shakdara*, using a new recombinant inbred line population. *Plant Physiology* **135**: 432-443.
- Colmenero-Flores JM, Moreno LP, Smith CE, Covarrubias AA. 1999.** Pvlea-18, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiol.* **120**: 93-104.
- Colville L, Kranner I. 2010.** Desiccation tolerant plants as model systems to study redox regulation of protein thiols. *Plant Growth Regulation* **62**: 241-255.
- Craig EA, Gambill BD, Nelson RJ. 1993.** Heat shock proteins: Molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **57**: 402-414.
- Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. 1992.** Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* **54**: 579-599.
- Crowe JH, Hoekstra FA, Nguyen KHN, Crowe LM. 1996.** Is vitrification involved in depression of the phase transition temperature in dry phospholipids? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1280**: 187-196.
- Crowe JH, Oliver AE, Hoekstra FA, Crowe LM. 1997.** Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: The role of vitrification. *Cryobiology* **35**: 20-30.
- Crowe JH, Spargo BJ, Crowe LM. 1987.** Preservation of dry liposomes does not require retention of residual water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 1537-1540.
- Cuming A 1999.** Lea proteins. In: P.R.ShewryR.Casey eds. *Seed proteins*. Dordrecht: Kluwer academic press, 753-780.
- Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. 2006.** Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **10**: 389-406.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. 2003.** Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* **329**: 23-38.
- De Gara L, de Pinto MC, Moliterni VMC, D'Egidio MG. 2003.** Redox regulation and storage processes during maturation in kernels of *triticum durum*. *J. Exp. Bot.* **54**: 249-258.
- Dehaye L, Duval M, Viguier D, Yaxley J, Job D. 1997.** Cloning and expression of the pea gene encoding *sbp65*, a seed-specific biotinylated protein. *Plant Molecular Biology* **35**: 605-621.
- Demir I, Ellis RH. 1993.** Changes in potential seed longevity and seedling growth during seed development and maturation in marrow. *Seed Science Research* **3**: 247-257.
- Djemel N, Guedon D, Lechevalier A, Salon C, Miquel M, Prospero JM, Rochat C, Boutin JP. 2005.** Development and composition of the seeds of nine genotypes of the *Medicago truncatula* species complex. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 557-566.
- Dure L. 1993.** Structural motifs in lea proteins. In *Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress*: 91 - 103.
- Dure L, Crouch M, Harada J, Ho T-HD, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung ZR. 1989.** Common amino acid sequence domains among the lea proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology* **12**: 475-486.
- Duval M, DeRose RT, Job C, Faucher D, Douce R, Job D. 1994.** The major biotinyl protein from *pisum sativum* seeds covalently binds biotin at a novel site. *Plant Molecular Biology* **26**: 265-273.
- Egerton-Warburton LM, Balsamo RA, Close TJ. 1997.** Temporal accumulation and ultrastructural localization of dehydrins in *Zea mays*. *Physiologia Plantarum* **101**: 545-555.

- Ellis RH, Hong TD. 1994. Desiccation tolerance and potential longevity of developing seeds of rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany* **73**: 501-506.
- Ellis RH, Hong TD, Jackson MT. 1993a. Seed production environment, time of harvest, and the potential longevity of seeds of three cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany* **72**: 583-590.
- Ellis RH, Hong TD, Roberts EH. 1987. The development of desiccation-tolerance and maximum seed quality during seed maturation in six grain legumes. *Annals of Botany* **59**: 23-29.
- Ellis RH, Qi A, Summerfield RJ, Roberts EH. 1993b. Rates of leaf appearance and panicle development in rice (*Oryza sativa* L.): A comparison at three temperatures. *Agricultural and Forest Meteorology* **66**: 129-138.
- Ellis RH, Roberts EH. 1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. *Ann Bot* **45**: 13-30.
- England K, Cotter T. 2004. Identification of carbonylated proteins by maldi-tof mass spectroscopy reveals susceptibility of er. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **320**: 123-130.
- Eom J, Baker WR, Kintanar A, Wurtele ES. 1996. The embryo-specific emb-1 protein of daucus carota is flexible and unstructured in solution. *Plant Science* **115**: 17-24.
- Espindola LS, Noin M, Corbineau F, Côme D. 1994. Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant araucaria angustifolia embryos. *Seed Science Research* **4**: 193-201.
- Fait A, Angelovici R, Less H, Ohad I, Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR, Galili G. 2006. *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiol.* **142**: 839-854.
- Faria JMR, Buitink J, van Lammeren AAM, Hilhorst HWM. 2005. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. *Journal of experimental botany* **56**: 2119-2130.
- Filho CP, Ellis RH. 1991. The development of seed quality in spring barley in four environments. I. Germination and longevity. *Seed Science Research* **1**: 163-177.
- Finch-Savage W, Pramanik S, Bewley J. 1994. The expression of dehydrin proteins in desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of temperate trees. *Planta* **193**: 478-485.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* **171**: 501-523.
- Finkelstein R, Gampala S, Lynch T, Thomas T, Rock C. 2005. Redundant and distinct functions of the aba response loci *aba-insensitive(abi)5* and *abre-binding factor (abf)3*. *Plant Molecular Biology* **59**: 253-267.
- Finkelstein R, Lynch TJ. 2000. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *abi5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* **12**: 599 - 610.
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 387-415.
- Finkelstein RR. 1994. Mutations at two new *arabidopsis* aba response loci are similar to the *abi3* mutations. *The Plant Journal* **5**: 765-771.
- Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14**: S15-45.
- Finkelstein RR, Gibson SI. 2001. ABA and sugar interactions regulating development: Cross-talk or voices in a crowd? *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 26-32.
- Finkelstein RR, Somerville CR. 1990. Three classes of abscisic acid (aba)-insensitive mutations of *Arabidopsis* define genes that control overlapping subsets of aba responses. *Plant Physiol.* **94**: 1172-1179.
- Galau GA, Bijaisoradat N, Hughes DW. 1987. Accumulation kinetics of cotton late embryogenesis-abundant mRNAs and storage protein mRNAs: Coordinate regulation during embryogenesis and the role of abscisic acid. *Developmental Biology* **123**: 198-212.
- Galau GA, Hughes DW. 1987. Coordinate accumulation of homeologous transcripts of seven cotton lea gene families during embryogenesis and germination. *Developmental Biology* **123**: 213-221.
- Gallardo K, Le Signor C, Vandekerckhove J, Thompson RD, Burstin J. 2003. Proteomics of *medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. *Plant Physiology* **133**: 664-682.
- Gallardo K, Lesignor C, Darmency M, Burstin J, Thompson R. 2006. Seed biology of *medicago truncatula*. *Medicago truncatula handbook*.

- Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcarrubio A, Covarrubias AA. 2000.** Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 5668-5674.
- Garnzczarska M, Bednarski W, Jancelewicz M. 2009.** Ability of lupine seeds to germinate and to tolerate desiccation as related to changes in free radical level and antioxidants in freshly harvested seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 56-62.
- Ghezzi P, Bonetto V. 2003.** Redox proteomics: Identification of oxidatively, modified proteins. *Proteomics* **3**: 1145-1153.
- Gibson SI. 2005.** Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 93-102.
- Gilles GJ, Hines KM, Manfre AJ, Marcotte WR. 2007.** A predicted n-terminal helical domain of a group 1 lea protein is required for protection of enzyme activity from drying. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**: 389-399.
- Goday A, Jensen AB, Cullianez-Macia FA, Alba MM, Figueras M, Serratos J, Torrent M, Pages M. 1994.** The maize abscisic acid-responsive protein rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell* **6**: 351-360.
- Godoy JA, Lunar R, Torres-Schumann S, Moreno J, Rodrigo RM, Pintor-Toro JA. 1994.** Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin tas14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Molecular Biology* **26**: 1921-1934.
- Goyal K, Pinelli C, Maslen SL, Rastogi RK, Stephens E, Tunnacliffe A. 2005a.** Dehydration-regulated processing of late embryogenesis abundant protein in a desiccation-tolerant nematode. *FEBS Letters* **579**: 4093-4098.
- Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A. 2005b.** Lea proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal* **388**: 151-157.
- Greggains V, Finch-Savage WE, Atherton NM, Berjak P. 2001.** Viability loss and free radical processes during desiccation of recalcitrant *avicennia marina* seeds. *Seed Science Research* **11**: 235-242.
- Grelet J, Benamar A, Teyssier E, Avelange-Macherel M-H, Grunwald D, Macherel D. 2005.** Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiol.* **137**: 157-167.
- Gurusinghe S, Bradford KJ. 2001.** Galactosyl-sucrose oligosaccharides and potential longevity of primed seeds. *Seed Science Research* **11**: 121-133.
- Haaning S, Radutoiu S, Hoffmann SrV, Dittmer J, Giehm L, Otzen DE, Stougaard J. 2008.** An unusual intrinsically disordered protein from the model legume *lotus japonicus* stabilizes proteins in vitro. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 31142-31152.
- Hand SC, Jones D, Menze MA, Witt TL. 2007.** Life without water: Expression of plant lea genes by an anhydrobiotic arthropod. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **307A**: 62-66.
- Hara M, Fujinaga M, Kuboi T. 2004.** Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 657-662.
- Hara M, Terashima S, Fukaya T, Kuboi T. 2003.** Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta* **217**: 290-298.
- Hara M, Terashima S, Kuboi T. 2001.** Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from citrus unshiu. *Journal of Plant Physiology* **158**: 1333-1339.
- Hare PD, Cress WA, Van Staden J. 1998.** Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell and Environment* **21**: 535-553.
- Hay FR, Probert RJ. 1995.** Seed maturity and the effects of different drying conditions on desiccation tolerance and seed longevity in foxglove (*digitalis purpurea* l.). *Ann Bot* **76**: 639-647.
- Hay FR, Smith RD, Ellis RH, Butler LH. 2010.** Developmental changes in the germinability, desiccation tolerance, hardseededness, and longevity of individual seeds of *trifolium ambiguum*. *Annals of Botany* **105**: 1035-1052.
- Hendrick JP, Hartl F. 1993.** Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual Review of Biochemistry* **62**: 349-384.
- Hendry GAF. 1993.** Oxygen, free radical processes and seed longevity. *Seed Science Research* **3**: 141-153.
- Heyen BJ, Alsheikh MK, Smith EA, Torvik CF, Seals DF, Randall SK. 2002.** The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. *Plant Physiol.* **130**: 675-687.

- Hincha DK, Zuther E, Heyer AG. 2003. The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1612**: 172-177.
- Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* **6**: 431-438.
- Hoekstra FA, Haigh AM, Tetteroo FAA, van Roekel T. 1994. Changes in soluble sugars in relation to desiccation tolerance in cauliflower seeds. *Seed Science Research* **4**: 143-147.
- Hoekstra FA, Wolkers WF, Buitink J, Golovina EA, Crowe JH, Crowe LM. 1997. Membrane stabilization in the dry state. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **117**: 335-341.
- Holdsworth M, Kurup S, Mkibbin R. 1999. Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. *Trends in Plant Science* **4**: 275-280.
- Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJJ. 2008. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist* **179**: 33-54.
- Hong TD, Ellis RH. 1992. Development of desiccation tolerance in norway maple (acer platanoides l.) seeds during maturation drying. *Seed Science Research* **2**: 169-172.
- Horbowicz M, Obendorf RL. 1994. Seed desiccation tolerance and storability: Dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols? Review and survey. *Seed Science Research* **4**: 385-405.
- Houde M, Daniel C, Lachapelle M, Allard F, Laliberté S, Sarhan F. 1995. Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *The Plant Journal* **8**: 583-593.
- Hughes DW, Galau GA. 1989. Temporally modular gene expression during cotyledon development. *Genes & Development* **3**: 358-369.
- Hughes DW, Galau GA. 1991. Developmental and environmental induction of lea and lea mRNAs and the postabscission program during embryo culture. *Plant Cell* **3**: 605-618.
- Huijser C, Kortstee A, Pego J, Weisbeek P, Wisman E, Smeekens S. 2000. The *Arabidopsis* sucrose uncoupled-6 gene is identical to abscisic acid insensitive-4: Involvement of abscisic acid in sugar responses. *The Plant Journal* **23**: 577-585.
- Hundertmark M, Buitink J, Leprince O, Hincha DK. 2010. The reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in *Arabidopsis thaliana*. *Seed Science Research*.
- Hundertmark M, Hincha DK. 2008. Lea (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *Bmc Genomics* **9**.
- Illing N, Denby KJ, Collett H, Shen A, Farrant JM. 2005. The signature of seeds in resurrection plants: A molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. In: San Diego, CA. 771-787.
- Ingle RA, Schmidt UG, Farrant JM, Thomson JA, Mundree SG. 2007. Proteomic analysis of leaf proteins during dehydration of the resurrection plant *xerophyta viscosa*. *Plant Cell and Environment* **30**: 435-446.
- Ingram J, Bartels D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 377-403.
- Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F. 2002. Bzip transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* **7**: 106-111.
- Job C, Rajjou L, Lovigny Y, Belghazi M, Job D. 2005. Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. *Plant Physiology* **138**: 790-802.
- Kanai M, Nishimura M, Hayashi M. 2010. A peroxisomal abc transporter promotes seed germination by inducing pectin degradation under the control of *abi5*. *The Plant Journal* **62**: 936-947.
- Kaye C, Neven L, Hofig A, Li Q-B, Haskell D, Guy C. 1998. Characterization of a gene for spinach cap160 and expression of two spinach cold-acclimation proteins in tobacco. *Plant Physiol.* **116**: 1367-1377.
- Kermode A, Bewley J. 1989. Regulatory processes involved in the switch from seed development to germination: Possible roles for desiccation and aba. *M* **1**: 1.
- Kermode A, Bewley J, Dasgupta J, Misra S. 1986. The transition from seed development to germination: A key role for desiccation? *HortScience* **21**: 1113-1118.
- Kermode AR. 2005. Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation* **24**: 319-344.
- Kibinza S, Vinel D, Come D, Bailly C, Corbineau F. 2006. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. *Physiologia Plantarum* **128**: 496-506.

- Kim JS, Park SJ, Kwak KJ, Kim YO, Kim JY, Song J, Jang B, Jung C-H, Kang H. 2007. Cold shock domain proteins and glycine-rich rna-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote the cold adaptation process in escherichia coli. *Nucleic Acids Research* **35**: 506-516.
- Kirik V, Kölle K, Miséra S, Bäumllein H. 1998a. Two novel myb homologues with changed expression in late embryogenesis-defective *Arabidopsis* mutants. *Plant Molecular Biology* **37**: 819-827.
- Kirik V, Kölle K, Wohlfarth T, Miséra S, Bäumllein H. 1998b. Ectopic expression of a novel myb gene modifies the architecture of the *Arabidopsis* inflorescence. *The Plant Journal* **13**: 729-742.
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H. 2002. Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 33-36.
- Koornneef M, Karssen C 1994. Seed dormancy and germination. In: C. Meyerowitz ed. *Arabidopsis*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 313-334.
- Kranner I, Birtic S, Anderson KM, Pritchard HW. 2006. Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radical Biology and Medicine* **40**: 2155-2165.
- Krüger C, Berkowitz O, Stephan UW, Hell Rd. 2002. A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Pinus communis* L. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 25062-25069.
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* **15**: 281-307.
- Kuo TM, Lowell CA, Smith PT. 1997. Changes in soluble carbohydrates and enzymic activities in maturing soybean seed tissues. *Plant Science* **125**: 1-11.
- Le BH, Cheng C, Bui AQ, Wagmaister JA, Henry KF, Pelletier J, Kwong L, Belmonte M, Kirkbride R, Horvath S, Drews GN, Fischer RL, Okamoto JK, Harada JJ, Goldberg RB. 2010. Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 8063-8070.
- Le Signor C, Gallardo K, Prospero JM, Salon C, Quillien L, Thompson R, Duc G. 2005. Genetic diversity for seed protein composition in *Medicago truncatula*. *Plant Genetic Resources Characterization and Utilization* **3**: 59-71.
- Lehner A, Bailly C, Fleche B, Poels P, Come D, Corbineau F. 2006. Changes in wheat seed germination ability, soluble carbohydrate and antioxidant enzyme activities in the embryo during the desiccation phase of maturation. *Journal of Cereal Science* **43**: 175-182.
- Leopold AC. 1986. *Membranes, metabolism, and dry organisms*. Ithaca, New York.
- Leprince O, Atherton NM, Deltour R, Hendry G. 1994. The involvement of respiration in free radical processes during loss of desiccation tolerance in germinating zea mays L. (an electron paramagnetic resonance study). *Plant Physiol.* **104**: 1333-1339.
- Leprince O, Bronchart R, Deltour R. 1990. Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *brassica campestris* seed. *Plant, Cell & Environment* **13**: 539-546.
- Leprince O, Buitink J. 2010. Desiccation tolerance: From genomics to the field. *Plant Science* **179**: 554-564.
- Leprince O, Buitink J, Hoekstra FA. 1999. Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *castanea sativa* mill. Exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. *Journal of experimental botany* **50**: 1515-1524.
- Leprince O, Harren FJM, Buitink J, Alberda M, Hoekstra FA. 2000. Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. *Plant Physiology* **122**: 597-608.
- Leprince O, Hendry GAF, McKersie BD. 1993. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research* **3**: 231-246.
- Leprince O, Hoekstra FA. 1998. The responses of cytochrome redox state and energy metabolism to dehydration support a role for cytoplasmic viscosity in desiccation tolerance. *Plant Physiology* **118**: 1253-1264.
- Leprince O, Ly Vu B, Lourdin D, Buitink J 2010. Kinetics of after-ripening of *Medicago truncatula* seeds: Interpretation on the basis of the glassy state concept. In. *3<sup>rd</sup> workshop on molecular aspects of germination and dormancy*. York.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman EP, Shacter E, Lester P 1994. [37] carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*: Academic Press, 346-357.

- Lin TP, Huang NH. 1994. The relationship between carbohydrate-composition of some tree seeds and their longevity. *Journal of experimental botany* **45**: 1289-1294.
- Lopez-Molina L, Mongrand S, McLachlin DT, Chait BT, Chua N-H. 2002. Abi5 acts downstream of abi3 to execute an aba-dependent growth arrest during germination. *The Plant Journal* **32**: 317-328.
- Lopez-Molina L, Mongrand Sb, Chua N-H. 2001. A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the abi5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 4782-4787.
- Mai-Hong T, Hong T, Hien N, Hai H, Tung T, Le-Tam V, Ngoc-Tam B, Ellis R. 2006. Seed development, maturation and storage behaviour of *Mimosa elengi* L. *New Forests* **32**: 9-19.
- Mai-Hong T, Hong TD, Hien NT, Ellis RH. 2003. Onset of germinability, desiccation tolerance and hardseededness in developing seeds of *Pterocarpum pterocarpum* (dc) k. Heyne (caesalpinioideae). *Seed Science Research* **13**: 323-327.
- Maisonneuve E, Ducret A, Khoueiry P, Lignon S, Longhi S, Talla E, Dukan S. 2009. Rules governing selective protein carbonylation. *PLoS ONE* **4**: e7269.
- Manfre AJ, LaHatte GA, Climer CR, Marcotte WR. 2009. Seed dehydration and the establishment of desiccation tolerance during seed maturation is altered in the *Arabidopsis thaliana* mutant *atem6-1*. *Plant and Cell Physiology* **50**: 243-253.
- Manfre AJ, Lanni LM, Marcotte WR, Jr. 2006. The *Arabidopsis* group 1 late embryogenesis abundant protein *atem6* is required for normal seed development. *Plant Physiol.* **140**: 140-149.
- Martinelli T. 2008. In situ localization of glucose and sucrose in dehydrating leaves of *Sporobolus stapfianus*. *Journal of Plant Physiology* **165**: 580-587.
- Mattimore V, Battista J. 1996. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: Functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J. Bacteriol.* **178**: 633-637.
- McCubbin WD, Kay CM, Lane BG. 1985. Hydrodynamic and optical properties of the wheat germ em protein. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **63**: 803-811.
- Mead A, Gray D. 1999. Prediction of seed longevity: A modification of the shape of the Ellis and Roberts seed survival curves. *Seed Science Research* **9**: 63-73.
- Meinke DW, Franzmann LH, Nickle TC, Yeung EC. 1994. Leafy cotyledon mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **6**: 1049-1064.
- Méne-Saffrané L, Jones AD, DellaPenna D. 2010. Plastochromanol-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 17815-17820.
- Möller IM, Jensen PE, Hansson A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 459-481.
- Munné-Bosch S. 2005. The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology* **162**: 743-748.
- Murthy UMN, Kumar PP, Sun WQ. 2003. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) wilczek: Lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. *Journal of experimental botany* **54**: 1057-1067.
- Nagel M, Börner A. 2010. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Science Research* **20**: 1-12.
- Nakamura S, Lynch TJ, Finkelstein RR. 2001. Physical interactions between aba response loci of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **26**: 627-635.
- Neven LG, Haskell DW, Hofig A, Li Q-B, Guy CL. 1993. Characterization of a spinach gene responsive to low temperature and water stress. *Plant Molecular Biology* **21**: 291-305.
- Nonogaki H, Chen F, Bradford KJ. 2007. *Mechanisms and genes involved in germination sensu stricto*: Blackwell Publishing Ltd.
- North H, Baud S, Debeaujon I, Dubos C, Dubreucq B, Grappin P, Jullien M, Lepiniec L, Marion-Poll A, Miquel M, Rajjou L, Routaboul J-M, Caboche M. 2010. *Arabidopsis* seed secrets unravelled after a decade of genetic and omics-driven research. *The Plant Journal* **61**: 971-981.
- Nystrom T. 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J* **24**: 1311-1317.
- Obendorf RL. 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research* **7**: 63-74.

- Oge L, Bourdais G, Bove J, Collet B, Godin B, Granier F, Boutin J-P, Job D, Jullien M, Grappin P. 2008. Protein repair l-isoaspartyl methyltransferase1 is involved in both seed longevity and germination vigor in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 3022-3037.
- Ohnishi N, Himi E, Yamasaki Y, Noda K. 2008. Differential expression of three aba-insensitive five binding protein (afp)-like genes in wheat. *Genes & Genetic Systems* **83**: 167-177.
- Oliver M, Bewley J. 1997. Desiccation-tolerance of plant tissues: A mechanistic overview. *Hort Rev* **18**: 171-213.
- Olvera-Carrillo Y, Campos F, Reyes JL, Garcarrubio A, Covarrubias AA. 2010. Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **154**: 373-390.
- Ooms J, Leon-Kloosterziel KM, Bartels D, Koornneef M, Karszen CM. 1993. Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana* (a comparative study using abscisic acid-insensitive *abi3* mutants). *Plant Physiol.* **102**: 1185-1191.
- Oracz K, Bailly C, Gniazdowska A, Come D, Corbineau F, Bogatek R. 2007. Induction of oxidative stress by sunflower phytotoxins in germinating mustard seeds. *Journal of Chemical Ecology* **33**: 251-264.
- Page RDM. 1996. Tree view: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer applications in the biosciences : CABIOS* **12**: 357-358.
- Pammenter NW, Berjak P. 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* **9**: 13-37.
- Parcy F, Valon C, Raynal M, Gaubier-Comella P, Delseny M, Giraudat J. 1994. Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development: Roles of the *abi3* locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell* **6**: 1567-1582.
- Park B-J, Liu Z, Kanno A, Kameya T. 2005. Genetic improvement of chinese cabbage for salt and drought tolerance by constitutive expression of a b. *Napus lea* gene. *Plant Science* **169**: 553-558.
- Pepler S, Gooding MJ, Ellis RH. 2006. Modelling simultaneously water content and dry matter dynamics of wheat grains. *Field Crops Research* **95**: 49-63.
- Peterbauer T, Lahuta LB, Blochl A, Mucha J, Jones DA, Hedley CL, Gorecki RJ, Richter A. 2001. Analysis of the raffinose family oligosaccharide pathway in pea seeds with contrasting carbohydrate composition. *Plant Physiology* **127**: 1764-1772.
- Piskurewicz U, Jikumaru Y, Kinoshita N, Nambara E, Kamiya Y, Lopez-Molina L. 2008. The gibberellic acid signaling repressor *rgl2* inhibits *Arabidopsis* seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and *abi5* activity. *Plant Cell* **20**: 2729-2745.
- Potts M. 1996. The anhydrobiotic cyanobacterial cell. *Physiologia Plantarum* **97**: 788-794.
- Prestrelski SJ, Tedeschi N, Arakawa T, Carpenter JF. 1993. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophysical Journal* **65**: 661-671.
- Prieto-Dapena P, Castano R, Almoguera C, Jordano J. 2006. Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. *Plant Physiol.* **142**: 1102-1112.
- Prieto-Dapena P, Castano R, Almoguera C, Jordano J. 2008. The ectopic overexpression of a seed-specific transcription factor, *hahsfa9*, confers tolerance to severe dehydration in vegetative organs. *Plant Journal* **54**: 1004-1014.
- Probert R, Adams J, Coneybeer J, Crawford A, Hay F. 2007. Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. *Australian Journal of Botany* **55**: 326-335.
- Pukacka S, Ratajczak E. 2006. Antioxidative response of ascorbate-glutathione pathway enzymes and metabolites to desiccation of recalcitrant acer *saccharinum* seeds. *Journal of Plant Physiology* **163**: 1259-1266.
- Radchuk R, Radchuk V, Weschke W, Borisjuk L, Weber H. 2006. Repressing the expression of the sucrose nonfermenting-1-related protein kinase gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. *Plant Physiol.* **140**: 263-278.
- Rajjou L, Lovigny Y, Groot SPC, Belghazi M, Job C, Job D. 2008. Proteome-wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*: A comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiol.* **148**: 620-641.
- Ramanjulu S, Bartels D. 2002. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell and Environment* **25**: 141-151.
- Rao NK, Roberts EH. 1990. The effect of oxygen on seed survival and accumulation of chromosome damage in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Seed science and technology* **18**: 229-238.
- Requena JR, Levine RL, Stadtman ER. 2003. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids* **25**: 221-226.

- Reyes JL, Rodrigo M-J, Colmenero-Flores JM, Gil J-V, Garay-Arroyo A, Campos F, Salamini F, Bartels D, Covarrubias AA. 2005. Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant, Cell & Environment* **28**: 709-718.
- Riera M, Figueras M, Lopez C, Goday A, Pagas M. 2004. Protein kinase ck2 modulates developmental functions of the abscisic acid responsive protein rab17 from maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 9879-9884.
- Roach T, Beckett RP, Minibayeva FV, Colville L, Whitaker C, Chen H, Bailly C, Kranner I. 2010. Extracellular superoxide production, viability and redox poise in response to desiccation in recalcitrant castanea sativa seeds. *Plant, Cell & Environment* **33**: 59-75.
- Roberts JK, DeSimone NA, Lingle WL, Dure III L. 1993. Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two lea proteins in cotton embryos. *Plant Cell* **5**: 769-780.
- Rodriguez MV, Mendiondo GM, Maskin L, Gudesblat GE, Iusem ND, Benech-Arnold RL. 2009. Expression of aba signalling genes and abi5 protein levels in imbibed sorghum bicolor caryopses with contrasting dormancy and at different developmental stages. *Annals of Botany* **104**: 975-985.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 675-709.
- Roos Y. 1995. *Phase transitions in foods*. New York: Academic Press.
- Rosnoblet C, Aubry C, Leprince O, Vu BL, Rogniaux H, Buitink J. 2007. The regulatory gamma subunit snf4b of the sucrose non-fermenting-related kinase complex is involved in longevity and stachyose accumulation during maturation of *Medicago truncatula* seeds. *Plant Journal* **51**: 47-59.
- RoyChoudhury A, Roy C, Sengupta DN. 2007. Transgenic tobacco plants overexpressing the heterologous lea gene rab16a from rice during high salt and water deficit display enhanced tolerance to salinity stress. *Plant Cell Reports* **26**: 1839-1859.
- Sallon, S., Solowey, E., Cohen, Y., Korchinsky, R., Egli, M., Woodhatch, I., Simchoni, O., and Kislev, M. 2008. Germination, Genetics, and Growth of an Ancient Date Seed. *Science* : 320, 1464.
- Sanhew AJ, Ellis RH. 1996b. Seed development and maturation in phaseolus vulgaris .1. Ability to germinate and to tolerate desiccation. *Journal of experimental botany* **47**: 949-958.
- Sanhew AJ, Ellis RH. 1996a. Seed development and maturation in phaseolus vulgaris ii. Post-harvest longevity in air-dry storage. *J. Exp. Bot.* **47**: 959-965.
- Santos-Mendoza M, Dubreucq B, Baud S, Parcy F, Caboche M, Lepiniec L. 2008. Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **54**: 608-620.
- Schneider K, Wells B, Schmelzer E, Salamini F, Bartels D. 1993. Desiccation leads to the rapid accumulation of both cytosolic and chloroplastic proteins in the resurrection plant; *Craterostigma plantagineum*. *Planta* **189**: 120-131.
- Sheen J. 2010. Discover and connect cellular signaling. *Plant Physiol.* **154**: 562-566.
- Shen-Miller J, Mudgett MB, Schopf JW, Clarke S, R. B. 1995. Exceptional seed longevity and robust growth: Ancient sacred lotus from china. *American Journal of Botany* **82**: 1367-1380.
- Sherwin HW, Farrant JM. 1998. Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants craterostigma wilmsii and xerophyta viscosa. *Plant Growth Regulation* **24**: 203-210.
- Shih M-d, Lin S-c, Hsieh J-s, Tsou C-h, Chow T-y, Lin T-p, Hsing Y-iC. 2004. Gene cloning and characterization of a soybean (*glycine max* l.) lea protein, gmpm16. *Plant Molecular Biology* **56**: 689-703.
- Singh J, Kumar D, Ramakrishnan N, Singhal V, Jervis J, Garst JF, Slaughter SM, DeSantis AM, Potts M, Helm RF. 2005a. Transcriptional response of saccharomyces cerevisiae to desiccation and rehydration. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 8752-8763.
- Singh S, Cornilescu CC, Tyler RC, Cornilescu G, Tonelli M, Lee MS, Markley JL. 2005b. Solution structure of a late embryogenesis abundant protein (lea14) from *Arabidopsis thaliana*, a cellular stress-related protein. *Protein Science* **14**: 2601-2609.
- Sinniah UR, Ellis RH, John P. 1998a. Irrigation and seed quality development in rapid-cycling brassica: Seed germination and longevity. *Annals of Botany* **82**: 309-314.
- Sinniah UR, Ellis RH, John P. 1998b. Irrigation and seed quality development in rapid-cycling brassica: Soluble carbohydrates and heat-stable proteins. *Annals of Botany* **82**: 647-655.
- Smeekens S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 49-81.

- Soderman EM, Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR. 2000. Regulation and function of the *Arabidopsis* aba-insensitive4 gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiol.* **124**: 1752-1765.
- Soulages JL, Kim K, Arrese EL, Walters C, Cushman JC. 2003. Conformation of a group 2 late embryogenesis abundant protein from soybean. Evidence of poly (l-proline)-type ii structure. *Plant Physiol.* **131**: 963-975.
- Soulages JL, Kim K, Walters C, Cushman JC. 2002. Temperature-induced extended helix/random coil transitions in a group 1 late embryogenesis-abundant protein from soybean. *Plant Physiol.* **128**: 822-832.
- Stacy RAP, Aalen RB. 1998. Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of group 1 late-embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein gsb of *Bacillus subtilis*. *Planta* **206**: 476-478.
- Sugliani M, Rajjou L, Clercx EJ, Koornneef M, Soppe WJJ. 2009. Natural modifiers of seed longevity in the *Arabidopsis* mutants abscisic acid insensitive3-5 (abi3-5) and leafy cotyledon1-3 (lec1-3). *New Phytologist* **184**: 898-908.
- Tadege M, Wen J, He J, Tu H, Kwak Y, Eschstruth A, Cayrel A, Endre G, Zhao PX, Chabaud M, Ratet P, Mysore KS. 2008. Large-scale insertional mutagenesis using the tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* **54**: 335-347.
- Tang SD, TeKrony DM, Egli DB, Cornelius PL, Rucker M. 1999. Survival characteristics of corn seed during storage: I. Normal distribution of seed survival. *Crop Science* **39**: 1394-1400.
- Taylor G. 1996. Effect of the environment in which seeds are grown and softened on the incidence of autumn seed softening in two species of annual medics. *Australian Journal of Agricultural Research* **47**: 141-159.
- Tejedor-Cano J, Prieto-Dapena P, Almoguera C, Carranco R, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Jordano J. 2010. Loss of function of the hsfA9 seed longevity program. *Plant, Cell & Environment* **33**: 1408-1417.
- Terskikh VV, Zeng Y, Feurtado JA, Giblin M, Abrams SR, Kermode AR. 2008. Deterioration of western redcedar (*Thuja plicata* Donn ex d. Don) seeds: Protein oxidation and in vivo nmr monitoring of storage oils. *Journal of experimental botany* **59**: 765-777.
- Tolletier D, Jaquinod M, Mangavel C, Passirani C, Saulnier P, Manon S, Teyssier E, Payet N, Avelange-Macherel M-H, Macherel D. 2007. Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. *Plant Cell* **19**: 1580-1589.
- Török Z, Horvath I, Goloubinoff P, Kovacs E, Glatz A, Balogh G, Vigh L. 1997. Evidence for a lipochaperonin: Association of active protein folding groesl oligomers with lipids can stabilize membranes under heat shock conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 2192-2197.
- Tunnacliffe A, Hinch D, Leprince O, Macherel D. 2011. Lea proteins: Versatility of form and function. In: L. E ed. *Dormancy and resistance in harsh environments.*, 91-108.
- Tunnacliffe A, Wise M. 2007. The continuing conundrum of the lea proteins. *Naturwissenschaften* **94**: 791-812.
- Van Assche JA, Debucquoy KLA, Rommens WAF. 2003. Seasonal cycles in the germination capacity of buried seeds of some leguminosae (fabaceae). *New Phytologist* **158**: 315-323.
- Verdier J, Kakar K, Gallardo K, Le Signor C, Aubert G, Schlereth A, Town CD, Udvardi MK, Thompson RD. 2008. Gene expression profiling of *m-truncatula* transcription factors identifies putative regulators of grain legume seed filling. *Plant Molecular Biology* **67**: 567-580.
- Vertucci C, Farrant JM. 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: J. Kigel G. Galili eds. *Seed development and germination*. New York, 237-271.
- Vertucci CW, Roos EE, Crane J. 1993. Theoretical basis of protocol for seed storage. 3. Optimum moisture contents for pea-seeds stored at different temperatures. In: Ardingly, England. 531-540.
- Vierling E. 1991. The roles of heat-shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 579-620.
- Walters C, Pammenter NW, Berjak P, Crane J. 2001. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. *Seed Science Research* **11**: 135-148.
- Walters C, Wheeler LM, Grotenhuis JM. 2005. Longevity of seeds stored in a genebank: Species characteristics. *Seed Science Research* **15**: 1-20.
- Waterworth WM, Masnavi G, Bhardwaj RM, Jiang Q, Bray CM, West CE. 2010. A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. *The Plant Journal* **63**: 848-860.

- Weber H, Borisjuk L, Wobus U. 1997. Sugar import and metabolism during seed development. *Trends in Plant Science* **2**: 169-174.
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U. 2005. Molecular physiology of legume seed development. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 253-279.
- Wechsberg GE, Probert RJ, Bray CM. 1994. The relationship between 'dehydrin-like' proteins and seed longevity in *ranunculus sceleratus* L. *Journal of experimental botany* **45**: 1027-1030.
- Wehmeyer N, Hernandez LD, Finkelstein RR, Vierling E. 1996. Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiology* **112**: 747-757.
- Wehmeyer N, Vierling E. 2000. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol.* **122**: 1099-1108.
- West M, Harada JJ. 1993. Embryogenesis in higher plants: An overview. *Plant Cell* **5**: 1361-1369.
- Winger AM, Taylor NL, Heazlewood JL, Day DA, Millar AH. 2007. Identification of intra- and intermolecular disulphide bonding in the plant mitochondrial proteome by diagonal gel electrophoresis. *Proteomics* **7**: 4158-4170.
- Wise M. 2003. Leaping to conclusions: A computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinformatics* **4**: 52.
- Wise MJ, Tunnacliffe A. 2004. Popp the question: What do lea proteins do? *Trends in Plant Science* **9**: 13-17.
- Wolkers WF, McCreedy S, Brandt WF, Lindsey GG, Hoekstra FA. 2001. Isolation and characterization of a d-7 lea protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1544**: 196-206.
- Wolkers WF, Tetteroo FAA, Alberda M, Hoekstra FA. 1999. Changed properties of the cytoplasmic matrix associated with desiccation tolerance of dried carrot somatic embryos. An in situ fourier transform infrared spectroscopic study. *Plant Physiology* **120**: 153-163.
- Wolkers WF, van Kilsdonk MG, Hoekstra FA. 1998. Dehydration-induced conformational changes of poly-lysine as influenced by drying rate and carbohydrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1425**: 127-136.
- Xiao B, Huang Y, Tang N, Xiong L. 2007. Over-expression of a lea gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **115**: 35-46.
- Xiao H, Siddiqua M, Braybrook S, Nassuth A. 2006. Three grape cbf/dreb1 genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. *Plant, Cell & Environment* **29**: 1410-1421.
- Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho T, Wu R. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, hva1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.* **110**: 249-257.
- Zhang Y, Andralojc PJ, Hey SJ, Primavesi LF, Specht M, Koehler J, Parry MAJ, Halford NG. 2008. *Arabidopsis* sucrose non-fermenting-1-related protein kinase-1 and calcium-dependent protein kinase phosphorylate conserved target sites in aba response element binding proteins. *Annals of Applied Biology* **153**: 401-409.
- Zheng G-H, Jing X-M, Tao K-L. 1998. Ultradry seed storage cuts cost of gene bank. *Nature* **393**: 223-224.
- Zou M, Guan Y, Ren H, Zhang F, Chen F. 2007. Characterization of alternative splicing products of bzip transcription factors osabi5. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **360**: 307-313.
- Zou M, Guan Y, Ren H, Zhang F, Chen F. 2008. A bzip transcription factor, osabi5, is involved in rice fertility and stress tolerance. *Plant Molecular Biology* **66**: 675-683.

# Annexes

## Liste des annexes :

**Annexe 1** : Identification du protéome stable à la chaleur en électrophorèse bidimensionnelle à partir de graines matures de *M. truncatula* du génotype A17 et analysé par MS/MS et identification des protéines LEA à partir d'un extrait de protéines totales issu de graines matures du génotype R108 après fractionnement par HILIC et analyse MS/MS.

**Annexe 2** : Abondance relative des spots détectés à partir du protéome stable à la chaleur en électrophorèse bidimensionnelle dans les axes embryonnaires et les cotylédons de graines matures A17 de *M. truncatula*.

**Annexe 3** : Abondance relative des spots détectés à partir du protéome stable à la chaleur en électrophorèse bidimensionnelle durant la maturation des graines de *M. truncatula*.

**Annexe 4** : Abondance relative des spots détectés à partir du protéome stable à la chaleur en électrophorèse bidimensionnelle des graines 24 et 28 JAP de *M. truncatula*.

**Annexe 5** : Carte de référence du protéome stable à la chaleur en électrophorèse bidimensionnelle des graines matures R108.

**Annexe 6** : Identification du protéome stable à la chaleur en électrophorèse bidimensionnelle à partir de graines matures de *M. truncatula* du génotype R108 et analysé par MS/MS et identification des protéines LEA à partir d'un extrait de protéines totales issu de graines matures du génotype R108 après fractionnement par HILIC et analyse MS/MS.

**Annexe 7** : Abondance relative des spots détectés à partir du protéome stable à la chaleur en électrophorèse bidimensionnelle chez les graines matures des mutants *abi5* et de type sauvage R108.





**Annexe 1** : Identification du protéome stable à la chaleur en électrophorèse bidimensionnelle à partir de graines matures de *M. truncatula* du génotype A17 et analysé par MS/MS et identification des protéines LEA à partir d'un extrait de protéines totales issu de graines matures du génotype R108 après fractionnement par HILIC et analyse MS/MS.

2D analysis										HILIC Total extract	
spot #	# identified peptides	protein name	TC Medicago	AGI Mt	on BAC	MW (obs)	pl (obs)	MW (theo)	pl (theo)	# unique peptides	# discriminant peptides
1	3	<b>SBP65</b>	TC155301	Medtr4g109500.1	AC171619.9	77700	5,78	40323	5,12		
2	4	<b>SBP65</b>	TC155301	Medtr4g109500.1	AC171619.9	76700	5,8	40323	5,12		
3	5	<b>SBP65</b>	TC155301	Medtr4g109500.1	AC171619.9	76000	5,8	40323	5,12	13	13
4	5	<b>SBP65</b>	TC155301	Medtr4g109500.1	AC171619.9	75500	5,95	40323	5,12		
5		<b>SBP65</b>				77500	6,01				
6	4	Cupin, RmlC-type	TC142859	Medtr7g089440.1	AC148289.2	75000	5	53152	5,42	26	13
7	11	Protein disulfide isomerase	TC147230	NA	NA	65000	4,5	full length sequ		11	4
	6	Chaperonin Cp60	EST646478		AC233663_8.1			full length sequ		NI	NI
	4	HIP (HSP70 interacting protein)	TC156608	NA	NA			44720	4,92	NI	NI
	7	seed biotin-containing protein	TC142517	Medtr4g109500.1	AC171619.9			40323	5,12	11	11
8	11	<b>PM10</b>	TC144319	Medtr8g134020.1	AC146862.24	65000	5,8	55385	5,75	22	22
9	9	Cupin, RmlC-type	TC142800	Medtr1g084050.1	AC150981.14	72000	6,1	56079	5,99	20	20
10	12	Cupin, RmlC-type	TC142859	Medtr7g089440.1	AC148289.2	52500	5,27	53152	5,42	26	13
11	1	<b>DHN3</b>	TC144427	NA	NA	42500	6,3	31220	6,45		
12	4	<b>DHN3</b>	TC144427	NA	NA	42300	6,54	31220	6,45	5	5
	15	Conviciilin precursor	TC146541	NA	NA	42300	6,54	no full length s		28	15
13	3	<b>DHN3</b>	TC144427	NA	NA	42200	6,79	31220	6,45	5	5
14	6	<b>PM18</b>	TC153256	NA	NA	41100	5,7	no full length s		12	12
15	10	<b>PM18</b>	TC153256	NA	NA	42000	5,8	no full length s		12	12
16	6	<b>PM18</b>	TC153256	NA	NA	40900	5,79	no full length s		12	12
19	10	<b>Maturation polypeptide 2</b>	TC153601	Medtr1g073780.1	AC174301.24	37900	6,25	38411	6,54	13	13
21	13	<b>LEAM</b>	TC148561	Medtr2g017540.1	AC146855.5	37000	4,7	38017	5,28	12	12
	9	<b>LEA protein D-34.I</b>	TC145904	Medtr1g086190.1	AC135317.22			27206	5,09	7	7
22	7	<b>PM25</b>	TC144171	NA	NA	32500	4,5	26523	4,82	8	8
23	13	Cupin, RmlC-type	TC143910	NA	NA	32000	5	no full length s		13	2
24	11	Cupin, RmlC-type	TC143910	NA	NA	32000	5,1	no full length sequence available			
27	7	Rubrerhythrin	TC148039	Medtr7g076070.1	AC146554.5	28000	5,2	28856	6,01	3	3
	4	1-Cys peroxiredoxin	TC146236	NA	NA			24400	6,08	7	7
29	5	1-Cys peroxiredoxin	TC146236	NA	NA	28000	6,1	24400	6,08	7	7
31	4	Glycine-rich protein 2	TC163177	NA	NA	25200	6	12499	5,04		
32	4	<b>PM1</b>	TC143872	Medtr7g111880.1	AC186676.3	26000	>8	18148	9,55	4	3
38	4	<b>CapLEA1</b>	TC145382	NA	NA	21000	6,8	17655	7,84	11	1
39	5	<b>CapLEA1</b>	TC145382	NA	NA	21000	7,6	17655	7,84	11	1
41	4	Cupin, RmlC-type;	TC143046	Medtr7g089460.1	AC148289.2	20000	4,9	54203		26	13
43	3	<b>LEA protein D-113.II</b>	TC153057	Medtr7g111860.1	AC186676.3	15000	7,8	11098	9,3	4	0
44	8	<b>EM6</b>	TC155318	Medtr3g166750.1	AC140721.15	15200	5,71	10741	5,93	8	8
47	2	Conglutin delta	EST5313392	NA	NA	11700	7,54			NI	NI
48	14	Chaperone DnaK	TC155694	Medtr2g005480.1	AC140550.31	80000	4	75756	5,19	4	3
49	5	Methyl-CpG binding protein	TC146880	Medtr8g120690.1	AC166899.21	70000	4	38905	4,66	2	2
50	11	seed biotin-containing protein	TC142517	Medtr4g109500.1	AC171619.9	50000	4,5	40323	5,12		11
51	14	Cupin, RmlC-type	TC142859	Medtr7g089440.1	AC148289.2	60000	5	53152	5,42		
52	21	<b>PM10</b>	TC144319	Medtr8g134020.1	AC146862.24	70000	6	55385	5,75	22	22
53	26	Legumin	TC155530	NA	NA	45000	5,5	no full length a		26	26
54	8	Legumin	TC155530	NA	NA	45000	5,5	no full length available			
55	10	<b>Maturation polypeptide 2</b>	TC153601	Medtr1g073780.1	AC174301.24	40000	7	38411	6,54		13
56	3	<b>SBP65</b>	NF091D06D	NA	NA	70000	8,5			13	13
	1	<b>SBP65</b>	TC155301	Medtr4g109500.1	AC171619.9			40323	5,12		
57	5	<b>SBP65</b>	NF091D06D	NA	NA	70000	8,5			13	13
	1	<b>SBP65</b>	TC155301	Medtr4g109500.1	AC171619.9			40323	5,12		
58	2	<b>SBP65</b>	NF091D06D	NA	NA	65000	9			13	13
59	4	<b>SBP65</b>	NF091D06D	NA	NA	65000	9			13	13
60	2	<b>SBP65</b>	NF091D06D	NA	NA	60000	8,5			13	13
61	1	<b>SBP65</b>	NF091D06D	NA	NA	61000	8,5			13	13
62	21	<b>Maturation polypeptide 2</b>	TC153601	Medtr1g073780.1	AC174301.24	37400	6,6	38411	6,54		13
63	4	<b>LEA protein D-34.II</b>	TC155112	NA	NA	30000	5	24966	5,1	8	8
65	8	<b>LEA protein D-34.III</b>	TC147852	NA	NA	25000	5	22300	5,07	9	1
66	1	Phosphatidylethanolamine-binding protein	TC148321	NA	NA	20000	4	19591	5,01	7	0
68	2	allergen II	TC151236	Medtr2g097090.1	AC146555.5	15000	4	16750	6,82	8	0
69	4	Plant lipid transfer/seed storage/trypsin-alpha amylase inhibitor family protein	TC154654	Medtr2g097130.1	AC146555.5	15000	4	16833	6,22	8	0
70	4	Heat shock protein Hsp20	TC149740	Medtr5g088740.1	AC147434.12	18000	5	17170	5,22	7	7
71	4	<b>EM protein</b>	AJ498523	NA	NA	17000	5,5	no full length s		7	7
72	2	Legumin A	TC172253	Medtr2g097130.1	AC146555.5	18000	6	16833	6,22	10	10
74	5	Polyubiquitin	TC152006	NA	NA	10000	6,5			4	0
75	6	Legumin	TC143083	Medtr1g086740.1	AC158374.1	15000	8	67258	6,47	17	0
77	10	Proteinase inhibitor I25	TC146006	Medtr8g044470.1	AC147430.10	25000	7	27077	5,72	3	3
78	4	<b>PM18</b>	TC153256	NA	NA	27000	7,5	no full length s		12	12
83	3	Legumin	TC156793	Medtr1g086770.1	AC158374.1	15200	5,77	65325	6,12	20	9
86	8	seed biotin-containing protein	TC142517	Medtr4g109500.1		18000	4,5	40,3	5,12		
	5	<b>SBP65</b>	TC155301	NA	NA			NA	NA		
	4	Cupin, RmlC-type	TC142809	Medtr7g089510.1				53,7	5,7		
	5	Legumin A2	TC155530	NA	NA			NA	NA		
	5	RNA-binding region RNP-1	TC163044	Medtr4g095700.1				18	5,3	NI	NI
90	3	<b>CapLEA1</b>	TC145382	NA	NA	22000	6,9	no full length s		11	1

**Annexe 2 :** Abondance relative des spots détectés à partir du protéome stable à la chaleur en électrophorèse bidimensionnelle dans les axes embryonnaires et les cotylédons de graines matures A17 de *M. truncatula*. Normalisation par l'intensité totale des spots avec le logiciel PD-Quest, étude réalisée sur 5 à 6 gels. Analyse statistique par un test de Student (\* : intensité en logarithme (2) ; \*\* : médiane significativement différente).

n° master gel	Identification	SSP	Axes		Cotylédons		Axes/ Cotylédons	p-value	p-value log2
			Mean	SD	Mean	SD			
3	SBP65	5910	551,76	232,85	11660,70	3696,98	0,05	9,56E-04	*
2	SBP65	5911	267,32	95,35	4040,63	438,50	0,07	3,40E-03	**
4	SBP65	6905	1542,42	769,65	20079,37	1344,58	0,08	6,56E-04	**
1	SBP65	5913	138,94	41,64	1068,37	204,17	0,13	1,99E-03	*
56	SBP65a	7902	593,40	152,96	3518,76	832,06	0,17	8,39E-04	*
23	Vicilin	3603	5007,10	427,26	27270,48	7988,69	0,18	4,10E-04	*
50	seed biotin-containing protein	2704	922,10	176,56	3873,64	469,58	0,24	1,84E-04	
59	SBP65a	8902	285,00	60,17	1186,14	230,93	0,24	9,15E-04	*
57	SBP65a	7901	1862,90	444,46	7619,70	1302,49	0,24	1,53E-03	
5	SBP65	6906	448,06	82,28	1772,20	269,18	0,25	2,91E-03	*
58	SBP65a	8903	989,22	253,93	3775,46	327,88	0,26	7,49E-05	
16	PM18	5604	183,94	45,66	688,20	235,44	0,27	2,35E-02	*
25	Vicilin	1409	222,74	68,14	735,72	64,31	0,30	2,96E-04	
15	PM18	5606	8185,62	1187,80	26878,72	6346,70	0,30	4,73E-03	*
61	SBP65a	8814	1505,34	438,33	4092,44	244,62	0,37	3,82E-04	
60	SBP65a	8802	4351,16	708,90	11712,28	1183,51	0,37	3,49E-04	
13	DHN3	8709	883,35	165,34	2304,88	598,61	0,38	8,11E-02	
75	Polyubiquitin	6003	1458,90	136,90	3613,00	549,13	0,40	7,68E-04	*
24	Vicilin	2504	2815,02	610,62	6746,58	1468,01	0,42	1,93E-02	
46	Legumin	7002	942,74	85,69	2140,46	307,68	0,44	1,08E-02	
70	Heat shock protein Hsp20	2205	17930,44	1923,08	39216,26	2743,45	0,46	1,10E-04	
29	I-Cys peroxidoxin	6305	580,34	134,48	1203,64	204,68	0,48	1,94E-02	
38	Cap-LEA	7204	2744,96	519,29	5620,26	1322,95	0,49	2,85E-02	
19	Maturation polypeptide 2	7701	2500,86	299,48	5105,62	947,91	0,49	1,28E-02	*
55	Maturation polypeptide 2	5601	1080,20	182,18	2201,36	340,78	0,49	9,92E-03	
11	DHN3	7712	15381,30	1408,07	29843,10	3745,55	0,52	3,42E-03	
12	Convicilin	7713	53089,34	3018,58	99866,60	4608,56	0,53	1,42E-05	
22	PM25	509	16887,30	2277,58	30239,16	2348,48	0,56	1,76E-03	
62	Maturation polypeptide 2	7616	11277,36	758,10	19804,80	4330,47	0,57	9,19E-01	**
7	Protein disulfure isomerase precursor	2802	2440,32	378,69	4128,34	570,20	0,59	1,95E-02	
52	PM10	4807	3895,56	411,84	5908,80	791,19	0,66	5,40E-02	
21	LEAm, D-34.I	2702	15694,26	1587,92	23655,80	3286,49	0,66	6,07E-02	
39	Cap-LEA	9203	98558,54	3691,58	145907,36	8116,85	0,68	3,60E-04	
8	PM10	5905	15329,62	2321,27	22378,86	2072,43	0,69	5,33E-02	
48	Chaperone DNAK	1901	362,66	41,91	528,48	16,61	0,69	3,12E-03	
32	PM1	9306	7023,68	1652,48	10119,40	2032,48	0,69	2,71E-01	
86	RNA-binding region RNP-1/seed biotin-containing protein/SBP65/Cupin/Legumin A2	3201	7528,16	386,35	10636,68	1708,54	0,71	9,57E-01	*
49	Methyl-CpG binding protein	902	497,84	58,32	552,14	91,05	0,90	6,29E-01	
90	Cap-LEA	8301	12383,96	527,75	12541,16	730,97	0,99	8,66E-01	
77	proteinase inhibitor, cystatin	6401	1756,38	125,77	1763,78	213,49	1,00	9,77E-01	
72	Legumin A2	4102	3980,62	281,28	3172,98	482,92	1,25	1,86E-01	
31	Glycin rich protein	6311	1633,52	237,72	1205,32	328,01	1,36	3,21E-01	
66	PE-binding protein	1301	8238,02	433,75	5025,36	287,79	1,64	1,34E-04	
14	PM18	4701	5829,58	428,35	3306,28	436,79	1,76	1,66E-03	
65	D-34.III	2401	1964,22	198,28	1086,52	220,33	1,81	9,06E-03	
71	EM protein	2106	75179,96	4593,19	37951,72	3404,99	1,98	9,30E-05	
83	Legumin	5008	556,74	56,35	275,92	27,67	2,02	1,04E-03	
27	Ferritin	5501	18633,36	1057,73	7012,48	1530,74	2,66	1,23E-04	
63	D-34.II	1504	30848,88	2081,03	11591,06	732,29	2,66	1,16E-05	
45	Legumin K	5004	1256,40	152,78	469,54	118,57	2,68	1,79E-03	
43	D-113.II	9006	93146,30	6343,68	31224,28	4238,52	2,98	0,00002	
44	EM6	4009	242783,24	4392,86	9801,90	2356,54	24,77	1,08E-10	
		101	2987,62	420,42	2332,74	361,15	1,28	2,71E-01	
		801	3532,02	150,02	460,82	103,48	7,66	7,79E-08	
		1101	2228,86	266,00	2240,12	114,83	0,99	9,70E-01	
		1204	1703,32	312,11	3414,58	424,26	0,50	5,86E-03	
		1302	1077,04	105,69			----		
		1401	6529,02	406,50	6502,94	427,27	1,00	9,66E-01	
		1404	489,60	48,77			----		
		1702	351,50	58,67	93,10	36,73	3,78	1,02E-02	
		1703	621,10	89,79	171,87	10,39	3,61	1,85E-04	*
		1801	285,98	61,40	174,22	29,78	1,64	1,40E-01	
		2101	3870,04	542,94	4815,92	465,35	0,80	2,22E-01	
		2103	1997,43	275,67	1516,16	334,87	1,32	3,21E-01	
		2104	2636,26	383,39			-----		
		2302	706,26	52,55	1651,12	171,59	0,43	3,80E-04	
		2402	789,40	22,84	1358,98	278,95	0,58	9,53E-01	**
		2403	1327,66	125,97	1587,66	169,41	0,84	2,53E-01	
		2407	695,34	135,09	2226,12	259,22	0,31	3,93E-04	
		2408	502,24	49,59	1098,14	126,18	0,46	1,15E-03	
		2603	4828,68	549,95	10129,26	2823,07	0,48	9,57E-01	*

2701	13209,22	897,50	16109,52	1686,63	0,82	1,67E-01	
2703	16350,66	1520,72	25002,40	1455,15	0,65	1,69E-03	
2801	1518,20	77,61	1793,04	231,28	0,85	2,93E-01	
2803	2540,16	501,84	3807,56	213,10	0,67	2,43E-02	
2804	349,60	44,69	169,68	31,21	2,06	5,42E-03	
2807	401,78	127,78	1764,84	277,89	0,23	1,06E-03	
2810	1768,92	447,13	1775,98	292,40	1,00	9,90E-01	
3101	2383,38	180,14	1260,28	184,74	1,89	1,77E-03	
3205	2477,60	710,51	1287,88	104,81	1,92	1,09E-01	**
3301	1777,22	116,47	1083,48	137,00	1,64	2,41E-03	
3302	5648,20	426,45	1934,88	139,45	2,92	1,71E-05	
3304	832,44	121,22	891,66	134,34	0,93	7,52E-01	
3503	1867,88	365,49	11550,40	4024,74	0,16	1,11E-03	*
3601	5255,92	493,60	17609,56	4576,23	0,30	1,80E-03	*
3604	2990,08	334,92	10450,66	2026,71	0,29	4,58E-04	*
3605	563,78	98,79	935,16	114,39	0,60	1,97E-02	
3701	1291,66	164,14	784,20	73,14	1,65	1,12E-02	
3702	1036,64	197,02	408,60	109,48	2,54	1,18E-02	
3803	874,70	199,54	1846,26	641,66	0,47	2,32E-01	*
3807	1445,92	273,36	3644,18	1110,93	0,40	8,25E-02	*
4108	780,48	28,39	308,76	51,46	2,53	2,13E-05	
4118	746,86	166,16	167,52	43,44	4,46	4,81E-04	*
4301	559,30	103,49	829,18	291,29	0,67	4,08E-01	
4303	1827,10	231,65	481,60	153,66	3,79	6,44E-04	
4501	1409,78	127,33	717,14	153,77	1,97	-----	
4502	1701,78	234,94	662,34	156,53	2,57	3,10E-03	
4504	921,18	115,60	459,98	44,79	2,00	2,94E-03	
4505	456,58	64,76	274,42	51,28	1,66	5,85E-02	
4608	543,88	71,51	11234,88	2286,58	0,05	1,05E-06	*
4609	1145,12	280,14	8167,74	1875,65	0,14	2,74E-04	*
4610	1396,14	567,82	12844,66	2409,29	0,11	3,77E-04	*
4611	213,02	21,55	-----	-----	-----	-----	
5003	1258,66	142,02	570,94	195,58	2,20	1,08E-02	
5306	665,24	82,37	428,26	56,51	1,55	2,25E-02	
5401	8141,94	533,57	4735,54	1477,81	1,72	6,20E-02	
5505	940,84	165,24	1174,26	304,48	0,80	5,19E-01	
5704	324,10	49,73	3101,64	720,14	0,10	3,73E-05	*
5705	385,48	39,33	1854,34	451,02	0,21	2,45E-04	*
5802	747,92	90,01	516,30	50,47	1,45	5,50E-02	
5804	1618,78	489,50	3406,78	456,60	0,48	1,42E-02	
5901	2273,08	478,56	3184,18	579,99	0,71	2,60E-01	
6002	1052,86	71,35	1397,20	219,97	0,75	1,75E-01	
6005	200,84	41,37	1494,72	340,74	0,13	1,85E-04	*
6102	1422,46	75,92	1065,12	274,55	1,34	9,53E-02	**
6103	106,36	17,34	1285,54	131,34	0,08	6,17E-07	*
6111	6791,26	344,46	4257,42	601,05	1,60	4,77E-03	
6204	533,68	48,39	269,08	38,80	1,98	1,52E-03	
6301	1848,72	475,35	1720,10	115,11	1,07	6,32E-01	**
6309	503,20	48,83	221,98	57,44	2,27	3,03E-03	
6402	541,00	30,57	427,66	69,70	1,27	1,75E-01	
6702	1983,38	211,96	1898,30	244,48	1,04	7,99E-01	
6706	429,00	115,03	2964,24	447,24	0,14	1,61E-04	*
7201	4019,34	327,10	3599,88	506,12	1,12	5,06E-01	
7301	4112,26	300,84	3676,58	424,37	1,12	-----	
7401	5005,28	257,20	6464,78	271,49	0,77	2,26E-03	
7402	303,50	65,96	666,24	76,93	0,46	3,60E-03	
7501	6767,90	241,75	8528,72	599,60	0,79	1,31E-02	
7502	1059,82	107,81	373,98	58,19	2,83	2,56E-04	
7504	709,06	91,66	873,20	134,05	0,81	3,42E-01	
7615	4243,36	438,80	6012,68	599,28	0,71	2,22E-02	
7801	2711,30	238,93	9079,52	2105,09	0,30	3,35E-03	*
7805	1328,36	263,67	4407,38	945,21	0,30	5,97E-03	*
7809	1100,14	265,07	3663,46	975,99	0,30	9,69E-01	**
7811	309,14	51,63	876,14	230,98	0,35	4,44E-03	*
7812	401,72	72,63	1355,92	457,25	0,30	2,10E-02	*
8003	305,12	27,10	1054,48	128,69	0,29	2,06E-05	*
8102	385,94	119,18	592,98	119,99	0,65	2,56E-01	
8204	1731,04	582,61	4118,10	824,04	0,42	8,88E-02	
8501	2349,28	482,59	1706,38	288,78	1,38	2,86E-01	
8701	5403,66	813,16	3210,80	491,65	1,68	2,49E-02	
8803	1310,26	276,66	4023,78	599,50	0,33	1,70E-03	
8901	303,34	41,02	1395,94	201,17	0,22	1,93E-05	*
8904	348,20	55,98	1385,58	250,70	0,25	4,59E-04	*
8905	275,64	36,84	541,16	95,58	0,51	1,60E-02	

**Annexe 3 :** Abondance relative des spots détectés à partir du protéome stable à la chaleur en électrophorèse bidimensionnelle durant la maturation des graines de *M. truncatula*. Normalisation par l'intensité totale des spots pour la comparaison 24-28 JAP et à partir d'une liste de spots stables pour les gels 28 JAP à graines matures avec le logiciel PD-Quest, étude réalisée sur 5 à 6 gels. Analyse statistique par un test de Student pour la comparaison 24-28 JAP et une analyse ANOVA pour les gels 28 JAP à graines matures (\* : intensité en logarithme (2) ; \*\* : médiane significativement différente).

ref gel	Identification	PFAM LEA	Normalised intensities								Standard deviation								R2 with P50	r with P50
			SSP	24 DAP	28 DAP	32 DAP	36 DAP	40 DAP	44 DAP /ABS	48 DAP /MATUR	24 DAP	28 DAP	32 DAP	36 DAP	40 DAP	44 DAP /ABS	48 DAP /MATUR			
			6808					14945	52363	19882				4887	23668	4891	0,998	0,999222		
	RNA-binding region RNP-1/seed biotin-																			
86	containing protein/SBP65/Cupin/Legumin A2	PF02987	1213		23536	67621	136553	245574	321441	257885			9156	2557	1924	3864	5466	32493	0,995	0,997441
70	Heat shock protein Hsp20		1214			14638	90978	362327	580403	478661				86	16194	362327	39467	79936	0,959	0,979189
			2609	5128	14110	27264	68272	148505	197634	126562		3836	6265	1335	17342	3295	34586	13669	0,955	0,977284
71	EM protein	PF00477	2209			12667	46258	629052	972144	748778				7930	1652	1648	6922	78622	0,946	0,972576
			4206			34409	24032	13528		5821				7123	5167	6332		2346	0,945	-0,971871
			6711			7902	57841	120862	77051					298	1874	19459	11095		0,937	0,968018
43	D-113.II	PF03760	9107			158241	202600	733236	1083564	707295				38495	22513	95354	2121885		0,935	0,966758
			7612				36145	137102	266045	186782				15217	45929	33256	49684		0,934	0,966615
			7304		12988	30690	152245	249067	263782	174132			4416	3690	374	6925	65418	40399	0,906	0,951767
61	SBP65	PF02987	7818				34819	156117	348964	245407				794	74780	179716	42701		0,899	0,948077
			6309		6392	14577	38449	80413	157706	95508			1962	2799	7882	1644	7885	16714	0,890	0,943456
39	CapLEA	PF02987	8210	28256	119921	312707	392020	1242649	2274180	1740073		13	2325	53786	493	13140	939236	565524	0,890	0,943271
			6205		11173	24798	55433	142997	193194	93803				4538	1735	21736	8217	22606	0,877	0,936525
65	D-34.III	PF04927	1310	13673	4634	9032	20030	24393	53008	36315		221	1524	158	284	5684	14683	7517	0,860	0,927354
66	Phosphatidylethanolamine-binding protein		307	9211	10958	20004	37902	46676	101865	71150		2321	214	327	686	11296	34227	9890	0,850	0,92198
			6207		31455	74973	137881	266241	251242	150464					2558	29819	3651	40475	0,833	0,912435
60	SBP65	PF02987	7816				6621	33775	99762	54894					13172	31225	14876		0,828	0,91016
8	PM10	PF02987	4809			7925	17876	121669	370144	256847				3519	4666	29566	47749	59588	0,807	0,898097
			7819				6232	39440	131239	93168					139	56	2274	9130	0,800	0,894415
90	CapLEA	PF02987	7305		25056	93559	313100	654291	496367	368583			5111	3879	1999	873	29782	43493	0,799	0,893957
77	Proteinase inhibitor I25, cystatin		5405	8767	6608	14821	32078	41262	38400	55796		1525	2663	7914	527	8583	7142	8983	0,789	0,888467
			8211		18230	85959	67892	233472	617529	368655				2425	23553	15344	46227	15598	0,781	0,883461
			3111				18851	68138	174912	67576					4562	24325	7871	17367	0,762	0,872812
12	DHN3	PF00257	7708		20546	129142	555111	1157536	1384713						4938	57732	76397	221554	0,753	0,86772
			7507				22382	84850	174121	59694					2126	21722	62683	16416	0,751	0,86641
			1311				7541	16321	53985	34540					829	4145	2676	4041	0,747	0,864485
			5506				6496	13724	17461	9119					163	6958	8364	5799	0,744	0,862828
			508	6685	6755	11983	33081	54900	206901	162106		247	4262	6123	14788	293	19449	60952	0,730	0,854341
21	LEAm / D-34.I	PF02987/P	1604	7431	6481	8773	32093	69695	291338	268951		3285	313	6316	12356	1583	26512	42494	0,691	0,830983
			1309			8091	21469	24013		21097					1642	353	6195	4789	0,677	0,822298
			7405				14647	8712	9176	6694					3633	2657	2826	2919	0,673	-0,820554
78	PM18	PF02987	6408				18278	34474	176110	115756							6517	21068	0,669	0,817752
48	Chaperone DnaK		807				6579	8324	22345	17463					549	994	3964		0,666	0,815932
91	LEAm	PF02987	1516	5773	5732	13220	51707	86101	289304	345689		1166	2884	3173	13185	27897	55836	59458	0,665	0,815496
			8509				10401	28795	165983	68056					4732	5500	67721	13815	0,657	0,810265
52	PM10	PF02987	3806				4325	32157	86792	99469					1847	129	3156	32427	0,651	0,8068
			4109			8954	5286	18506	15518	15999					1737	1337	3757	5586	0,650	0,805983

62 Maturation polypeptide 2	PF02987	7611			6095	25334	276163	173366				189	6536	36454	38661	0,641	0,800662		
58 SBP65	PF02987	7813				16234	86941	64246							8930	0,638	0,799005		
		6503			7933	11201	52394	25641				1897	2979	9169	4949	0,629	0,792826		
63 D-34.II	PF04927	509			43377	64099	226355	206311				1640	16281	32822	57767	0,613	0,782882		
31 Glycine-rich protein 2		5305	24099	17689	12924	32253	40494	38903		995	79	2947	5548	14983	10582	0,594	0,770632		
		2212			5033	21365	74795	87329				1460	487	2888	10392	0,577	0,759521		
		5605			9206	41204	101727	130846							47759	0,574	0,75769		
25		1414	33083	10781	4951	24927	17189	58085	72951	872	29	193	1555	5569	18994	13934	0,566	0,752657	
29 l-Cys peroxiredoxin		6310			13659	33314	38879	37706	26097			78	4797	12558	4336	5924	0,541	0,735343	
64		308	26727	10241	5685	7295	10767	142929	131041	11172	3871	2490	1495	3122	27442	15987	0,538	0,733273	
		7817			5280	10557	72044	76519					1737	3494	25720	21731	0,527	0,725608	
83 legumin		4008			10730	7201	25676	16998	21189			177	958	5469	850	3178	0,522	0,722673	
		8108	32005		43272	23807	23414	15234	29632						4722	14490	0,510	-0,714466	
11 DHN3	PF00257	6710			12001	20243	113366	361303	603204			14130	19386	153192	74194	0,504	0,709854		
22 PM25	PF04927	507	29930	103268	89617	79721	142553	285135	417866	616	1637	1844	18257	1691	27658	81066	0,492	0,70157	
		3113		5619	13569	20676	26339	22209	12549		2281	578	82	1699	578	4191	0,490	0,700342	
		4205			4611	17605	28833	27536	9798				1725	2834	3114	6637	1695	0,483	0,69494
		1412	5145	7606	4310	8259	7634	19561	9886	92	22817	1461	1776	2618	13829	3589	0,475	0,689301	
		7506			20163	48062	43486	23708					4799	1288	18786	4291	0,464	0,680975	
32 PM1	PF03760	9304			23597	60839	348933	448173					329	3845	73625	105321	0,463	0,680316	
		809	119871	185218	47702	26370	25042	41572	46014	31886	41118	14644	13554	13147	23696	8283	0,456	-0,675443	
		5915		1868	4088	5734	11539	66539	122276			235	3154	6323	22557	23355	0,443	0,665782	
54 Legumin		3612	10065	45862	16692	42864	123607	76145	57280	4520	1824	8280	1374	39554	3230	14435	0,438	0,661678	
50 seed biotin-containing protein		1707			5020	8037	52635	67314					182	3319	2633	8010	0,437	0,661196	
7 protein disulfide isomerase		1904	167056	167762	76453	39621	32669	61839	81618	4515	31371	25917	17393	11695	1616	15018	0,418	-0,64638	
9 Cupin, RmlC-type		5914			1193	1142	3318	28265	48482							14448	0,415	0,644532	
57 SBP65	PF02987	6906				20624	112963	107492					41249	6180	39557		0,375	0,612102	
		5916	1367	2278	2029	1916	3235	17017	35410	1271	216	145	719	1198	4629	7011	0,371	0,609238	
		2717	90121	103739			8498		88913			5619			19294		0,367	-0,605549	
		5306	12329	6634	3319	7404	6409		13996	2725	115	1838	240	468	5990		0,366	0,605386	
15 PM18	PF02987	4610		10375	5948	5160	20436	11769	25107			4274	171	1285	1443	5720	0,364	0,602918	
		5307	3018	12908	6403	16924	22084	39128	7201	195	6686	5878	7819	1756	234	2535	0,363	0,6026	
44 EM6	PF00477	3109	50664	285147	130682	64616	205312	918416	339968	373	13883	2386	1500	7627	14972	65274	0,351	0,592061	
		6708			4154	17063	73638	133699						7917	2754	34628	0,331	0,575133	
		808			8328	5139	16255	12184						149	6664	3594	0,314	0,560422	
		4609				28148	9968	121793						2984	3379	32031	0,313	-0,559162	
		5104	14965	29477	57975	56022	96530	65867	40898	543	1256	13914	11148	257	13569	11370	0,294	0,54236	
41 Cupin, RmlC-type		2210	102952	60882	23421	12752	15433	20984	35092	11325	15768	6628	2615	484	11436	7159	0,293	-0,541182	
49 Methyl-CpG binding protein		806	51419	47090	13428	10148	12305	9522	28017	545	899	455	2253	4196	3790	10450	0,292	-0,540761	
		7004			19082	15725	34624	37605	97214					18177	183	20123	0,289	0,53729	
		6107	83345		25768	19808	45415	29228	61070	18836		2886	3387	5268	556	5191	0,284	0,53306	
		4311	10402	8110	13071	23494	17441	14913	19266	2299	2173	5437	2913	1936	417	5876	0,249	0,49859	
		4110	60475	53212	15576	13762	8868	25757	22783	19594	2448	3318	2436	2430	614	5308	0,241	-0,490583	
		5204			16079	20041	17852	13923	8969			2814	4529	3160	579	4404	0,220	-0,468892	
56 SBP65	PF02987	6907				6773	40264	47840						2641	1381	12247	0,175	0,418389	
72 Legumin A2		3206	14074	11898	24806	17746	30692	20297	17637	4574	4711	4590	4544	7366	1236	3721	0,171	0,413993	
24 Cupin, RmlC-type		2515	329483	298080	83408	127195	54976	108683	232429	42174	3668	2435	37395	35734	28692	33237	0,166	-0,407867	
		3207	144122	114542	35190	20465	37430	49200	64666	98	23596	951	1151	9432	41968	9829	0,158	-0,398113	

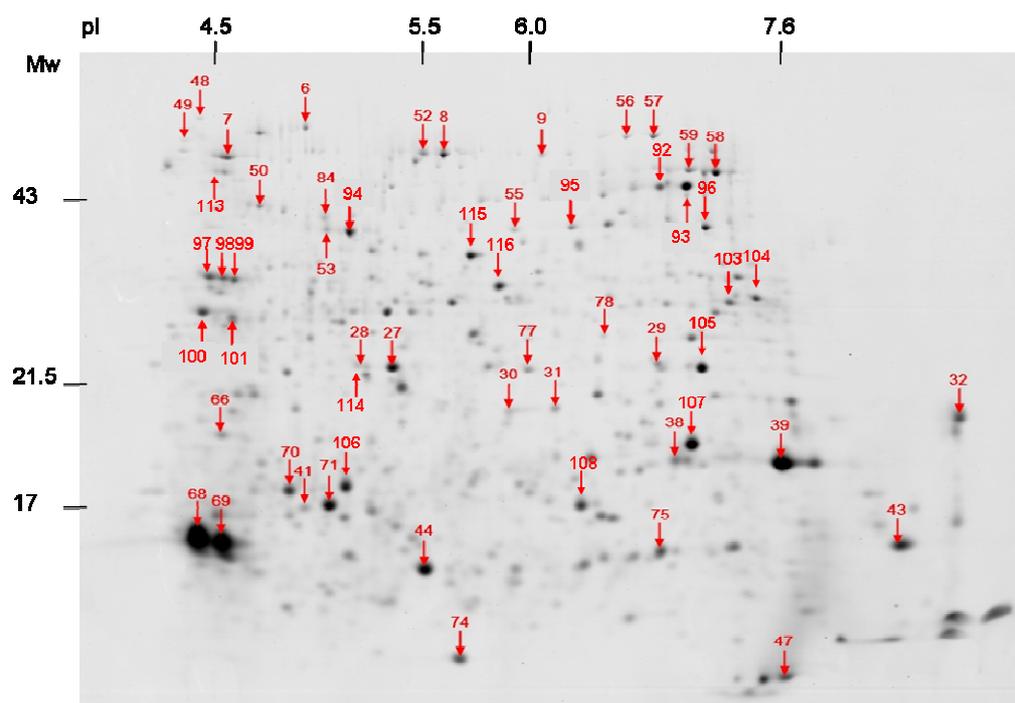
53 Legumin		3615			15633	55048	25000	67840													0,157	0,396813
14 PM18	PF02987	4611			10492	32912		8335													0,156	0,394738
		4208		14173	34222	29469	16896	18749	6927		377	12628	6218	2551	5812	1018					0,155	-0,393387
		4203			9735	13959	16702	3252	5376			230	1522	868	1194						0,151	-0,388239
		810	65778	36335	8686	7962	5268	16969	20628	29469	2166	357	4252	1575	12998	7963					0,146	-0,382317
		4308	9034	28085	7294	5294	4936	15451	12489	215	643	317	593	1145	6613	4221					0,141	-0,375771
		2104					10493	19098	22310					934	782	5020					0,111	0,333395
		2211			14720	12562		21598					4887	720	4860						0,106	0,325354
75 Legumin		6105		149158	330107	202140	252122	152360	121176						47384	32112					0,092	-0,303009
		1805	66937	51168	13380	11416	11458	31087	26709	25436	1336	1767	4418	599	14518	10230					0,086	-0,292593
4 SBP65	PF02987	5910					3469	40196	57809						1481	7598	12891				0,078	0,278902
		3709	19394	28931	20030	14065	9783	20669	86497	8688	1319	9474	7539	4236	748	7093					0,047	0,216162
		2518	147548	182308	75799	134771	80572	100583	188347	38953	47582	24786	57144	46248	22229	10736					0,044	-0,209399
27 Rubrerythin/1-cys-peroxiredoxin		3408	334975	295233	353274	376326	366405	438793	212652	24453	28342	37447	44783	4137	69768	17012					0,042	0,20615
23 Cupin, RmlC-type		2512	706477	559257	223553	263606	188725	282220	579599	7418	69348	44263	33214	5390	16369	82303					0,041	-0,203007
		2516	148119	87442	21762	31481	23662	67584	143732	489	33316	99	9318	13629	21290	36364					0,040	0,199457
10 Cupin, RmlC-type		2716	95474	85646	18294	23286	15022	55621	182373	26733	362	7135	9198	792	24195	48511					0,039	0,197196
		7103		20671	68752	68218	55213	27531	30047			16432	16577	9773	8342	4567					0,027	-0,163685
		2715	114517	104385	23864	37812	15434	46717	112140	26568	34551	6443	18566	964	9857	18952					0,023	-0,151681
		3706	36103	33031	10519	11360	8802	18609	61710	8268	5153	1862	3544	411	827	10367					0,017	0,13044
		7207		16950	30132	67016	39693	17386	13614					1636	2417	2342					0,016	-0,124992
		1513	213451	164012	61418	125481	84530	130651	195817	27963	1841	16153	24469	25697	1844	7637					0,016	0,124506
		1514	326965	323718	147420	187965	117656	174603	394932	46756	28164	2625	22368	44356	17112	16192					0,015	-0,122212
		6206				18972	26514	21506	12376					211	4879	925	2463				0,015	0,122119
		3707	33723	37410	6825	8901	7208		53038	183	1242	1693	3569	262	3660						0,012	0,11021
		3004	8451	11914	16608	37888	17684		6115	3321	5266	4135	25	5199	1437						0,012	-0,109991
		2517	139982	87267	17442	58391	22655		88163	27297	419	9488	22188	1444	35089						0,008	-0,09034
		4405				19084	32497		10468				2844	495	5213						0,007	0,086487
		2519	142595	135560	35712	78436	51551	75833	145294	27378	4271	138	48160	3621	1237	38648					0,005	-0,068527
51 Cupin, RmlC-type		2714	26391	33402	7254	9730	10870	8787	45904	1287	12425	416	4485	97826	3971	6289					0,004	-0,061557
		1410	80699	30213	48136	76820	49169	43637	24226	15171	484	14537	9449	9932	12655	5015					0,003	-0,056972
38 CapLEA	PF02987	7206					39211	68539	116601					12116	19945	20172					0,003	-0,056541
19 Maturation polypeptide 2	PF02987	6606					10874	44964	82520					5633	14749	20300					0,003	0,05434
		4113	15897	30292	36737	28572	65316	25796	15259	422	195	5915	7486	9733	425	2487					0,001	0,029344
		7404				7538	7834	6899	9948				279	988	6899	1333					0,000	0,010032
55 Maturation polypeptide 2	PF02987	5603					13411		29811					9697		7095						
		4810						23884	43354						19179	10231						
3 SBP65	PF02987	5919	1401					12021	29200	68					4628	16002						
		4813						3152	18068						255	5095						
59 SBP65	PF02987	7904						9375	18426						1444	2911						
		6311						18165	23165						5686	6509						
13 DHN3	PF00257	7710							53338							6027						1,1
16 PM18	PF02987	5604							4698							925						1,1
1 SBP65	PF02987	4901							6318							3241						1,1
2 SBP65	PF02987	4905							22912							7446						1,1
5 SBP65	PF02987	5913							3658							1672						1,1
		3305							14882							3706						1,1
		4310							36770							10810						1,1



**Annexe 4** : Abondance relative des spots détectés à partir du protéome stable à la chaleur en électrophorèse bidimensionnelle des graines 24 et 28 JAP de *M. truncatula*. Normalisation avec le logiciel PD-Quest par l'intensité totale des spots pour la comparaison 24-28 JAP, étude réalisée sur 5 à 6 gels. Analyse statistique par un test de Student pour la comparaison 24-28 JAP (\* : intensité en logarithme (2) ; \*\* : médiane significativement différente).

n° master gel	Identification	groupe pfam LEA	SSP	24 DAP		28 DAP		ratio 28/24	p-value	p-value log2
				Mean	SD	Mean	SD			
<b>Apparence</b>										
39 CapLEA1		PF02987	8210			32730	1551			
			4110			14643	523			
			6207			8627	1063			
90 CapLEA1		PF02987	7305			6954	1006			
			1213			6405	974			
			7207			4615	590			
			4208			3913	452			
			7304			3526	257			
15 PM18		PF02987	6205			3055	266			
			4610			2820	452			
			6309			1757	117			
<b>Difference in abundance between 24 and 28 DAP</b>										
<b>24 DAP &lt; 28 DAP</b>										
22 PM25		PF04927	3612	2848	612	12527	2080	4,40	0,0009	*
			507	8421	897	28553	1132	3,39	0,0000	
			4308	2539	308	7692	547	3,03	0,0000	
			2609	1438	498	3839	665	2,67	0,0080	
31 Glycine-rich protein 2			5305	2288	605	5447	886	2,38	0,0074	
44 EM6		PF00477	3109	19764	2131	41111	3174	2,08	0,0001	
75 Legumin			6105	23549	2830	41422	4171	1,76	0,0027	
7 PDI / Cp60/ HIP / SBP65			1904	42248	1348	48158	1083	1,14	0,0033	
<b>24 DAP &lt; 28 DAP</b>										
65 LEA protein D-34.IV		PF04927	1414	9403	1283	2994	285	0,32	0,0001	*
			1310	3832	353	1290	207	0,34	0,0000	
			1413	3396	467	1166	111	0,34	0,0001	*
			1410	22837	2609	8379	657	0,37	0,0000	*
70 Hsp20			5306	3415	326	1840	155	0,54	0,0007	
23 Cupin, RmlC-type			1214	25664	1759	16694	1682	0,65	0,0021	
			2512	208802	12454	160323	8870	0,77	0,0100	
			4309	5190	254	4027	150	0,78	0,0026	
<b>Non-significant</b>										
77 Proteinase inhibitor I25			4113	4456	568	8382	1393	1,88	0,0130	
			5405	2445	223	1812	315	0,74	0,0132	
			308	7494	1539	2881	513	0,38	0,0148	*
			1513	59938	5180	45567	2738	0,76	0,0170	
71 EM protein		PF00477	2209	4066	421	2748	351	0,68	0,0189	
			5307	836	242	3545	830	4,24	0,0195	*
			5104	4195	683	8182	1563	1,95	0,0208	
			7103	3398	655	5693	739	1,68	0,0214	
			3207	40387	2675	31612	2823	0,78	0,0238	
24 Cupin, RmlC-type			1412	1458	173	2055	245	1,41	0,0424	
			2515	92191	4468	82649	3791	0,90	0,1345	
			4311	2913	317	2246	275	0,77	0,1429	
27 Rubrerythrin / 1-Cys peroxiredoxin			3709	5374	998	7857	1447	1,46	0,1882	
			3408	93847	6675	82120	5010	0,88	0,1903	
			2514	45112	2643	39650	3367	0,88	0,2308	
			3004	2342	409	3242	673	1,38	0,2927	
66 Phosphatidylethanolamine-binding protein			307	2610	333	3047	290	1,17	0,3454	
			5916	401	87	599	181	1,50	0,3544	
			8108	7645	973	8872	808	1,16	0,3550	
			2714	7266	1413	9184	1426	1,26	0,3619	
10 Cupin, RmlC-type			806	14409	1033	13034	1025	0,90	0,3670	
			2716	23924	710	22892	1438	0,96	0,5341	
72 Legumin A			3206	3886	569	3342	632	0,86	0,5371	
21 LEAm / D-34.I		PF02987 /PF04927	1604	2071	396	1781	386	0,86	0,6110	
			3706	10077	1095	9380	711	0,93	0,6304	
			5915	382	151	496	182	1,30	0,6403	
			3707	9403	1230	10220	1314	1,09	0,6595	
			2715	31848	3273	30100	4010	0,95	0,7425	
			1514	90348	4521	89419	2280	0,99	0,8594	
			1516	1612	160	1555	324	0,96	0,8768	
			508	1861	294	1894	563	1,02	0,9606	

**Annexe 5** : Carte de référence du protéome stable à la chaleur en électrophorèse bidimensionnelle des graines matures R108.



**Annexe 6 :** Identification du protéome stable à la chaleur en électrophorèse bidimensionnelle à partir de graines matures de *M. truncatula* du génotype R108 et analysé par MS/MS et identification des protéines LEA à partir d'un extrait de protéines totales issu de graines matures du génotype R108 après fractionnement par HILIC et analyse MS/MS.

2D analysis										HILIC Total extract	
spot #	# identified peptides	protein name	TC Medicago	AGI Mt	on BAC	MW (obs)	pl (obs)	MW (theo)	pl (theo)	# unique peptides	# discriminant peptides
6	4	Cupin, RmlC-type	TC142859	Medtr7g089440.1	AC148289.2	75000	5	53152	5.42	26	13
7	11	Protein disulfide isomerase	TC147230	NA	NA	65000	4,5	full length sequ		11	4
	6	Chaperonin Cp60	EST646478	NA	AC233663_8.1			full length sequ		NI	NI
	4	HIP (HSP70 interacting protein)	TC156608	NA	NA			44720	4.92	NI	NI
	7	seed biotin-containing protein	TC142517	Medtr4g109500.1	AC171619.9			40323	5.12	11	11
8	11	<b>PM10</b>	TC144319	Medtr8g134020.1	AC146862.24	65000	5,8	55385	5.75	22	22
9	9	Cupin, RmlC-type	TC142800	Medtr1g084050.1	AC150981.14	72000	6,1	56079	5.99	20	20
10	12	Cupin, RmlC-type	TC142859	Medtr7g089440.1	AC148289.2	52500	5,27	53152	5.42	26	13
11	1	<b>DHN3</b>	TC144427	NA	NA	42500	6,3	31220	6.45	5	5
12	4	<b>DHN3</b>	TC144427	NA	NA	42300	6,54	31220	6.45		
15	15	Convicilin precursor	TC146541	NA	NA	42300	6,54	no full length s		28	15
13	3	<b>DHN3</b>	TC144427	NA	NA	42200	6,79	31220	6.45	5	5
14	6	<b>PM18</b>	TC153256	NA	NA	41100	5,7	no full length s		12	12
15	10	<b>PM18</b>	TC153256	NA	NA	42000	5,8	no full length s		12	12
16	6	<b>PM18</b>	TC153256	NA	NA	40900	5,79	no full length s		12	12
23	13	Cupin, RmlC-type	TC143910	NA	NA	32000	5	no full length s		13	2
24	11	Cupin, RmlC-type	TC143910	NA	NA	32000	5,1	no full length sequence available			
27	7	Rubrythrin	TC148039	Medtr7g07670.1	AC146554.5	28000	5,2	28856	6.01	3	3
	4	1-Cys peroxiredoxin	TC146236	NA	NA			24400	6.08	7	7
29	5	1-Cys peroxiredoxin	TC146236	NA	NA	28000	6,1	24400	6.08	7	7
28	4	Rubrythrin	TC148039	Medtr7g07670.1	AC146554.5	28000	5,5	28856	6.01		
	4	1-Cys peroxiredoxin	TC146236	NA	NA			24400	6.08		
31	4	Glycine-rich protein 2	TC163177	NA	NA	25200	6	12499	5.04		
32	4	<b>PM1</b>	TC143872	Medtr7g111880.1	AC186676.3	26000	>8	18148	9.55	4	3
38	4	<b>CapLEA1</b>	TC145382	NA	NA	21000	6,8	17655	7.84	11	1
39	5	<b>CapLEA1</b>	TC145382	NA	NA	21000	7,6	17655	7.84	11	1
41	4	Cupin, RmlC-type;	TC143046	Medtr7g089460.1	AC148289.2	20000	4,9	54203		26	13
43	3	<b>LEA protein D-113.II</b>	TC153057	Medtr7g111860.1	AC186676.3	15000	7,8	11098	9.3	4	0
44	8	<b>EM6</b>	TC155318	Medtr3g166750.1	AC140721.15	15200	5,71	10741	5.93	8	8
47	2	Conglutin delta	EST5313392	NA	NA	11700	7,54			NI	NI
48	14	Chaperone DnaK	TC155694	Medtr2g005480.1	AC140550.31	80000	4	75756	5.19	4	3
49	5	Methyl-CpG binding protein	TC146880	Medtr8g120690.1	AC166899.21	70000	4	38905	4.66	2	2
52	21	<b>PM10</b>	TC144319	Medtr8g134020.1	AC146862.24	70000	6	55385	5.75	22	22
53	26	Legumin	TC155530	NA	NA	45000	5,5	no full length a		26	26
55	10	Maturation polypeptide 2	TC153601	Medtr1g073780.1	AC174301.24	40000	7	38411	6.54	13	13
56	3	<b>SBP65</b>	NF091D06DT	NA	NA	70000	8,5			13	13
	1	<b>SBP65</b>	TC155301	Medtr4g109500.1	AC171619.9			40323	5.12		
57	5	<b>SBP65</b>	NF091D06DT	NA	NA	70000	8,5			13	13
	1	<b>SBP65</b>	TC155301	Medtr4g109500.1	AC171619.9			40323	5.12		
58	2	<b>SBP65</b>	NF091D06DT	NA	NA	65000	9			13	13
59	4	<b>SBP65</b>	NF091D06DT	NA	NA	65000	9			13	13
66	1	Phosphatidylethanolamine-binding protein	TC148321	NA	NA	20000	4	19591	5.01	7	0
68	2	allergen II	TC151236	Medtr2g097090.1	AC146555.5	15000	4	16750	6.82	8	0
69		Plant lipid transfer/seed storage/trypsin-alpha	TC154654	Medtr2g097130.1	AC146555.5	15000	4	16833	6.22	8	0
70	4	Heat shock protein Hsp20	TC149740	Medtr5g088740.1	AC147434.12	18000	5	17170	5.22	7	7
71	4	<b>EM protein</b>	AJ498523	NA	NA	17000	5,5	no full length s		7	7
74	5	Polyubiquitin	TC152006	NA	NA	10000	6,5			4	0
75	6	Legumin	TC143083	Medtr1g086740.1	AC158374.1	15000	8	67258	6.47	17	0
77	10	Proteinase inhibitor I25	TC146006	Medtr8g044470.1	AC147430.10	25000	7	27077	5.72	3	3
78	4	<b>PM18</b>	TC153256	NA	NA	27000	7,5	no full length s		12	12
84	2	<b>PM18</b>	TC153256	NA	NA	41600	5,3	no full length sequence available			
92	3	Dehydrin-like protein; n=1; Medicago sativa	TC144427	NA	NA	50000	6,5	NA	NA		
	4	Sbp65a protein	BF636514	NA	NA	50000	6,5	NA	NA		
93	4	Dehydrin-like protein; n=1; Medicago sativa	TC144427	NA	NA	50000	7	NA	NA		
	4	Sbp65a protein	BF636514	NA	NA	50000	7	NA	NA		
94	15	<b>PM10</b>	TC144319	Medtr8g134020.1		45000	5,5	55300	5.8		
	6	Sbp65a protein	TC155301	NA	NA	45000	5,5	NA	NA		
	1	Sbp65a protein	BF636514	NA	NA	45000	5,5	NA	NA		
95	7	Sbp65a protein	BF636514	NA	NA	45000	6	NA	NA		
96	2	Sbp65a protein	TC155301	NA	NA	45000	6,5	NA	NA		
97	5	<b>LEA protein D-34.I</b>	TC145904	Medtr1g086190.1		35000	5	27200	5.1		
	5	protein disulfide isomerase	TC147230	NA	NA	35000	5	NA	NA		
	4	<b>LEAM</b>	TC148561	Medtr2g017540.1		35000	5	38000	5.3		
98	8	<b>LEAM</b>	TC148561	Medtr2g017540.1		35000	5	38000	5.3		
	5	<b>LEA protein D-34.I</b>	TC145904	Medtr1g086190.1		35000	5	27200	5.1		
	3	protein disulfide isomerase	TC147230	NA	NA	35000	5	NA	NA		
99	12	<b>LEAM</b>	TC148561	Medtr2g017540.1		35000	5	38000	5.3		
	3	protein disulfide isomerase	TC147230	NA	NA	35000	5	NA	NA		
	2	<b>LEA protein D-34.I</b>	TC145904	Medtr1g086190.1		35000	5	27200	5.1		
100	8	<b>LEAM</b>	TC148561	Medtr2g017540.1		33000	4,5	38000	5.3		
	7	14-3-3-like protein	TC143370	Medtr3g150430.1		33000	4,5	29400	4.7		
	5	<b>PM25</b>	TC144171	NA	NA	33000	4,5	NA	NA		
	2	14-3-3-like protein	TC143323	Medtr5g073770.1		33000	4,5	29200	4.7		
	6	<b>LEA protein D-34.II</b>	TC155112	NA	NA	33000	4,5	NA	NA		
101	9	<b>LEAM</b>	TC148561	Medtr2g017540.1		33000	5	38000	5.3		
	6	<b>PM25</b>	TC144171	NA	NA	33000	5	NA	NA		
	6	<b>LEA protein D-34.II</b>	TC155112	NA	NA	33000	5	NA	NA		
	4	<b>LEA protein D-34.I</b>	TC145904	Medtr1g086190.1		33000	5	27.2	5.1		
103	4	Cupin, RmlC-type	TC142859	Medtr7g089440.1		33000	7	53200	5.4		
	3	Sbp65a protein	BF636514	NA	NA	33000	7	NA	NA		
104						33000	7,5				
105	3	Maturation polypeptide 2	TC153601	Medtr1g073780.1		25000	7	38400	6.5		
	2	Ribosome recycling factor, chloroplast precursor	TC159473	Medtr1g086330.1		25000	7	29100	9.5		
106	4	Sbp65a protein	TC155301	NA	NA	17000	5,5	NA	NA		
	4	Cupin, RmlC-type	TC143046	Medtr7g089460.1		17000	5,5	54200	5.7		
	3		TC152008	Medtr6g099220.1		17000	5,5	17500	5.6		
	1	Cupin, RmlC-type	TC146002	Medtr7g089490.1		17000	5,5	53200	5.6		
107	3	<b>CapLEA.I</b>	TC145382	NA	NA	22000	7	NA	NA		
108	5	<b>PM18</b>	TC153256	NA	NA	22000	6	NA	NA		
	3	Cupin, RmlC-type	TC146002	Medtr7g089490.1		22000	6	53200	5.6		
	4	Sbp65a protein	TC155301	NA	NA	22000	6	NA	NA		
	1	Sbp65a protein	BF636514	NA	NA	22000	6	NA	NA		
113	9	<b>PDI</b>	TC147230	NA	NA	60000	4,5	NA	NA		
114	4	<b>GroES-like</b>	TC153480	Medtr8g132830.1		28000	5,5	21700	5.8		
	2	<b>PDI</b>	TC147230	NA	NA	28000	5,5	NA	NA		
115	6	Maturation polypeptide 2	TC153601	Medtr1g073780.1		40000	6	38400	6.5		
116	10	Maturation polypeptide 2	TC153601	Medtr1g073780.1		35000	6,5	38400	6.5		

**Annexe 7** : Abondance relative des spots détectés à partir du protéome stable à la chaleur en électrophorèse bidimensionnelle chez les graines matures des mutants *abi5* et de type sauvage R108. Normalisation par l'intensité totale des spots avec le logiciel PD-Quest, étude réalisée sur 5 à 6 gels. Analyse statistique ANOVA pour les gels (\* : intensité en logarithme (2) ; \*\* : médiane significativement différente).

n°master gel	nom polypeptides	SSP	moyenne			SD			%	Ratio			p-value	%intensité
			R108	<i>abi5-1</i>	<i>abi5-2</i>	R108	<i>abi5-1</i>	<i>abi5-2</i>		moy <i>abi5</i> /R108	<i>abi5-1</i> /R108	<i>abi5-2</i> /R108		
56	SBP65	6901	617,15			126,9384				0,000	0,000	0,000	----	0,08
57	SBP66	6902	1896,9833			319,0596				0,000	0,000	0,000	----	0,23
71	EM protein	2204	33955,1	1329,0333	2382,5833	2770,527	158,8743	412,147	0,055	0,055	0,039	0,070	0,00126521 *	4,13
101	LEAm/PM25/LEA protein D-34.I-II	1503	9074,6667	809,78333	667	959,4678	174,2893	62,1461	0,081	0,081	0,089	0,074	0,00332062 *	1,10
106	SBP65/Cupin	2205	25582,25	7024,4167	5519,25	1341,029	359,3368	511,8766	0,245	0,245	0,275	0,216	0,00126521 *	3,11
104	nonidentified	8503	5863,6	1859,6833	1161,0333	668,5152	181,8817	107,4605	0,258	0,258	0,317	0,198	0,00108042 *	0,71
95	SBP65	5706	1771,25	782,83333	314,4	348,6341	82,24343	54,485	0,31	0,310	0,442	0,178	0,00108042 *	0,22
100	LEAm/14-3-3-like protein/PM25/D34.I	503	15686,85	4303,6167	5820,9167	1677,319	538,3231	524,8428	0,323	0,323	0,274	0,371	0,00166419 *	1,91
59	SBP65	7803	3710	1529,4833	1004,45	313,1156	167,614	124,0619	0,342	0,342	0,412	0,271	0,00146439	0,45
44	EM6	3002	33890,9	9579,5333	13631,4	2890,007	3392,469	3314,488	0,342	0,342	0,283	0,402	0,00542697	4,12
58	SBP65	8801	8171,95	3561,6167	2089,4833	558,7517	396,6	110,206	0,346	0,346	0,436	0,256	0,00076069	0,99
105	Maturation polypeptide 2	7403	24169,633	10571,15	7633,7333	1607,468	976,3727	636,6393	0,377	0,377	0,437	0,316	0,00126521	2,94
96	SBP65	7703	8266,0833	3845,3	2445,05	642,2994	295,9748	90,5841	0,38	0,380	0,465	0,296	0,00075507 **	1,01
103	SBP65	8502	4243,7167	2082,9667	1189,3833	422,8331	206,5392	148,178	0,386	0,386	0,491	0,280	0,0011388 *	0,52
107	CapLEA.I	7301	53234,533	23251,85	18589,383	3339,636	1504,087	1741,946	0,393	0,393	0,437	0,349	0,00126521	6,47
97	LEA protein D-34.I/PDI/LEAm	602	15825,5	7493,2	6743,1167	1401,252	502,3821	858,485	0,45	0,450	0,473	0,426	0,00332062	1,92
84	PM18	2705	1057,9667	600,73333	471,76667	167,9464	54,78671	85,42577	0,507	0,507	0,568	0,446	0,0241096 *	0,13
98	LEAm/LEA protein D-34.I/PDI	1602	7232,5333	3928,05	4611,1	716,578	535,1917	667,0596	0,59	0,590	0,543	0,638	0,0277423	0,88
29	1-Cys peroxiredoxin	6401	3534,6167	2316,65	2023,9	347,7763	279,1013	364,3131	0,614	0,614	0,655	0,573	0,0220848	0,43
55	Maturation polypeptide 2	5701	935,36667	696,1	455,68	152,019	87,64094	9,092885	0,616	0,616	0,744	0,487	0,0493336 **	0,11
78	PM18	5402	1049,6	1716,9667	1110,6833	136,54	104,9702	42,98976	1,347	1,347	1,636	1,058	0,00463431	0,13
108	PM18/SBP65/Cupin	5204	17997,517	23999,1	29969,817	1130,562	1350,881	3873,724	1,499	1,499	1,333	1,665	0,00368407 *	2,19
94	PM10/SBP65	2704	11586,567	17943,567	18208,1	877,468	891,4702	1320,388	1,56	1,560	1,549	1,571	0,00332062	1,41
93	DHN	7802	26400,133	39105,333	43695,15	903,8812	2874,692	5126,112	1,568	1,568	1,481	1,655	0,00298358 *	3,21
77	Proteinase inhibitor I25	5401	2427,9	3638,25	4086,5167	230,9785	269,7557	362,2575	1,591	1,591	1,499	1,683	0,007708	0,30
39	CapLEA1	8204	84855,05	138016,3	137664,82	3902,775	7911,914	18855,43	1,624	1,624	1,626	1,622	0,00651941 **	10,32
32	PM1	9302	13023,817	12580,533	31577,5	2788,724	3114,65	7801,434	1,695	1,695	0,966	2,425	0,0403354 *	1,58
74	Polyubiquitin	4001	15353,033	27192,3	28345,967	888,1843	2206,92	4154,718	1,809	1,809	1,771	1,846	0,0033794 *	1,87
52	PM10	4902	2213,75	4718,5	4547,6333	300,2495	537,5664	535,2839	2,093	2,093	2,131	2,054	0,0033794	0,27
27	Rubryerthrin/1-Cys peroxiredoxin	3403	19629,1	44047,55	40184,783	1362,475	1432,596	3818,473	2,146	2,146	2,244	2,047	0,0021167 **	2,39
75	Legumin	6103	13896,75	34658,05	25333,1	867,3698	2538,898	1500,024	2,158	2,158	2,494	1,823	0,00091188	1,69
92	DHN	6805	6417,4667	12884,767	15475,517	265,3287	1043,367	2220,521	2,21	2,210	2,008	2,411	0,0025523 *	0,78
43	LEA protein D-113.II	8102	36437,783	79008,3	85055,783	2754,86	5484,094	9189,613	2,251	2,251	2,168	2,334	0,00293687	4,43
38	CapLEA1	7204	8826,6	24497,583	25733,117	1580,651	2419,88	4388,367	2,845	2,845	2,775	2,915	0,00628132	1,07
53	Legumin	2703	1350,4333	3621,7	4219,7667	329,5442	256,8138	642,3116	2,903	2,903	2,682	3,125	0,00332062	0,16
30	Glycine-rich protein 2	5301	1861,5667	6225,3	6366,4667	464,7469	518,0771	900,8872	3,382	3,382	3,344	3,420	0,0033794	0,23
113	protein disulfide isomerase	1801	950,41667	3181,0667	3275,3	137,0253	483,0027	608,5878	3,397	3,397	3,347	3,446	0,00624469 *	0,12
114	GroES-like	3302	1150,2833	6216,9667	5742,9667	151,5962	192,6088	632,3763	5,199	5,199	5,405	4,993	0,00293687 **	0,14
70	Heat shock protein Hsp20	2202	18204,517	16746,567	12777,25	1455,342	1351,89	1504,722	0,811	0,811	0,920	0,702	0,0600327	2,21
99	LEAm/LEA protein D-34.I/PDI	1603	5510,9333	3200,7	3748,2833	642,9061	506,7346	507,6676	0,63	0,630	0,581	0,680	0,0781045	0,67
115	Maturation polypeptide 2	4603	9478,15	6556,1833	6640,35	1011,586	484,449	529,2169	0,696	0,696	0,692	0,701	0,0981128	1,15
66	Phosphatidylethanolamine-binding protein	1301	5209,9667	5743,8333	4312,85	484,6351	327,7547	701,2299	0,965	0,965	1,102	0,828	0,129907 *	0,63
41	Cupin	2203	3084,3833	2204,6167	2493,6833	160,2584	144,5701	458,4209	0,762	0,762	0,715	0,808	0,165766 **	0,38
116	Maturation polypeptide 2	5601	9018,6	8205,85	7840,8833	1008,338	313,3089	412,4104	0,89	0,890	0,910	0,869	0,253058 **	1,10
7	PDI / Cp60/ HIP / seed biotin-cont. Prot	1902	5507,85	6748,2	7383,2	605,6096	440,2153	575,7815	1,283	1,283	1,225	1,340	0,320736 *	0,67
50	seed biotin-containing protein	1703	1552,5833	1112,8333	1369,2333	243,1826	195,5428	314,4897	0,799	0,799	0,717	0,882	0,522504	0,19
8	PM10	4904	7065,95	8483,35	7674,4333	584,8569	903,811	854,6791	1,143	1,143	1,201	1,086	0,56758 *	0,86
31	Glycine-rich protein 2	5302	3047	1241,35	1581,7	538,5839	13,65433	107,0407	0,463	0,463	0,407	0,519	----	0,37

n°master gel	nom protéines	SSP	moyenne			SD			%	Ratio			p-value	%intensité
			R108	abi5-1	abi5-2	R108	abi5-1	abi5-2		moy abi5 R108	abi5-1 R108	abi5-2 R108		
		1307	2137,0667			191,7107				0,000	0	0,000	----	0,26
		2403	1313,45			162,293				0,000	0	0,000	----	0,16
		5203	1517,7833			63,69686				0,000	0	0,000	----	0,18
		6303	1419,05			81,43906				0,000	0	0,000	----	0,17
		6503	788,63333			118,7137				0,000	0	0,000	----	0,10
		6801	1136,2833			184,613				0,000	0	0,000	----	0,14
		7603	862,48333			142,3453				0,000	0	0,000	----	0,10
		8901	1150,1333			141,91				0,000	0	0,000	----	0,14
		2206	3096,4667	528,68333	378,21667	274,393	75,23325	81,33339	0,146	0,146	0,17074	0,122	0,0025523 **	0,38
		8602	3585,3833	1189,4333	701,66667	485,5321	145,0587	124,3173	0,264	0,264	0,33175	0,196	0,00126521 *	0,44
		2301	2062,8833	552,01667	642,28333	204,4888	53,91167	98,38428	0,289	0,289	0,26759	0,311	0,00335959 *	0,25
		6101	7037,4833	2446,9667	1806,25	627,057	499,779	407,768	0,302	0,302	0,3477	0,257	0,00293687	0,86
		4403	2609,05	1244,95	506,51667	224,8618	194,1012	124,9642	0,336	0,336	0,47717	0,194	0,0011388	0,32
		8802	1556,9333	662,03333	554,15	172,5391	70,14723	81,26471	0,391	0,391	0,42522	0,356	0,00233795 *	0,19
		7702	1808,3333	895,26667	557,01667	129,0209	85,77985	58,68977	0,402	0,402	0,49508	0,308	0,00108042	0,22
		7805	1735,35	928,6	486,56667	261,9848	104,5409	44,6237	0,408	0,408	0,53511	0,280	0,00139615 *	0,21
		5104	3678,45	1805,45	1359,5667	248,4701	260,8242	222,6671	0,43	0,430	0,49082	0,370	0,0025523	0,45
		6302	1729,45	898,65	616,6	88,07629	92,53103	105,9143	0,438	0,438	0,51962	0,357	0,00146439	0,21
		8301	2129,6333	1218,8833	839,76667	222,3412	107,4871	119,528	0,483	0,483	0,57234	0,394	0,00356202	0,26
		5103	6874,75	3487,65	3239,8833	406,2854	247,9261	479,8908	0,489	0,489	0,50731	0,471	0,00309559	0,84
		3501	9840,7	16689,85	12256,517	935,9893	761,4961	979,7931	1,471	1,471	1,696	1,245	0,0049712	1,20
		3102	3043,05	3861,1667	5823,2	83,12071	311,074	805,3574	1,591	1,591	1,26885	1,914	0,00427186 **	0,37
		3402	921,43333	1703,7833	1264,5	88,10542	99,11051	84,00245	1,611	1,611	1,84906	1,372	0,00171486	0,11
		5303	5754,55	8067	10587,817	572,3472	739,8827	1505,754	1,621	1,621	1,40185	1,840	0,00951419	0,70
		1604	750,91667	914,6	1521,6167	59,75569	94,34632	159,2827	1,622	1,622	1,21798	2,026	0,0033401	0,09
		6301	1368,2	2352,3	2188,0833	139,0602	223,5056	125,3275	1,659	1,659	1,71927	1,599	0,00339922	0,17
		3101	3412,9167	7309,4	4776,3167	175,9958	584,3813	769,0272	1,771	1,771	2,14169	1,399	0,00621203 *	0,42
		5205	8830,0167	14648,9	18082,783	512,6102	1138,225	2627,765	1,853	1,853	1,65899	2,048	0,00263885 *	1,07
		6803	1762,0333	3064,25	3954,0333	121,2338	509,2782	603,4299	1,992	1,992	1,73904	2,244	0,00841468 *	0,21
		8101	10368,917	19506	22427,5	1036,976	1263,57	2467,128	2,022	2,022	1,8812	2,163	0,00121167	1,26
		4801	805,55	1748,95	1524,8	148,6391	96,71246	102,7557	2,032	2,032	2,17113	1,893	0,00350008	0,10
		2504	1805,25	4445,0833	3249,2833	185,992	446,4243	312,79	2,131	2,131	2,46231	1,800	0,00270601	0,22
		1302	2214,5	4503,6333	5345,6833	252,0904	435,5774	627,3905	2,224	2,224	2,0337	2,414	0,00362507	0,27
		1802	1631,9333	3399,4667	4203,9167	254,0772	410,1952	374,8205	2,33	2,330	2,08309	2,576	0,00391114	0,20
		3001	2758,5	5611,3667	7570,6167	204,8469	503,5656	1067,782	2,389	2,389	2,03421	2,744	0,00108042 *	0,34
		6102	4106,8667	9773,8667	9998,8333	166,8728	502,1814	1330,277	2,407	2,407	2,37988	2,435	0,0031869 **	0,50
		3803	559,73333	1800,4167	1123,45	104,6535	93,04043	120,1102	2,612	2,612	3,21656	2,007	0,0011388	0,07
		1901	3572,25	8829,8333	10838,483	534,2204	932,5833	1167,067	2,753	2,753	2,47178	3,034	0,0021167	0,43
		3503	2705,9167	7567,4833	8399,7833	166,7447	379,3076	119,5586	2,95	2,950	2,79664	3,104	0,0021167	0,33
		801	2804,75	7462,9333	9531,7667	306,4996	556,3601	938,2018	3,03	3,030	2,66082	3,398	0,00233795 *	0,34
		1704	514,64	2544	3106,3333	65,51172	299,971	425,0515	5,49	5,490	4,94326	6,036	0,00603102 **	0,06
		6202	3203,8167	1790,75	2042,7	233,0976	183,3972	336,7538	0,598	0,598	0,55894	0,638	0,00706066	0,39
		5102	7787,5667	6135,8833	3535,4167	649,8879	454,3841	471,8125	0,621	0,621	0,78791	0,454	0,00309559	0,95
		3201	7351,1833	7699	11203,483	618,395	1027,439	499,4995	1,286	1,286	1,04731	1,524	0,00613609	0,89
		3802	589,96667	1043,1333	996,38333	83,0464	43,77516	127,7683	1,729	1,729	1,76812	1,689	0,0102058	0,07
		7502	1236,3833	772,65	462,96	204,8971	84,51939	54,43872	0,5	0,500	0,62493	0,374	0,0121655 *	0,15
		501	1011,0167	1399,9333	2054,7167	146,261	229,1559	301,1396	1,709	1,709	1,38468	2,032	0,0131237	0,12
		7807	754,65	395,86667	235,2	160,2184	60,5726	32,7221	0,418	0,418	0,52457	0,312	0,0135066 *	0,09
		3703	452,48333	842,11667	699,1	68,96899	84,94147	85,17145	1,703	1,703	1,8611	1,545	0,0137741	0,06
		6702	1112,3167	1871,0333	2074,0667	114,5699	322,828	171,4117	1,773	1,773	1,6821	1,865	0,0186228 *	0,14
		1501	1679,4833	916,96667	1007,1167	223,3295	176,7181	186,6161	0,573	0,573	0,54598	0,600	0,0321097 **	0,20
		6701	4405,2333	5836,4333	6369,0333	176,7758	624,9972	432,6973	1,385	1,385	1,32489	1,446	0,0335307 **	0,54
		4503	4766,7	3256,1833	3275,0667	498,1602	205,6952	256,4258	0,685	0,685	0,68311	0,687	0,0408099	0,58
		5403	445,18333	632,95	705,91667	76,07207	90,51961	70,11859	1,504	1,504	1,42177	1,586	0,0540347	0,05
		5101	3869,25	4887,96	3011,6	290,7178	389,4042	501,5628	1,021	1,021	1,26328	0,778	0,0563701	0,47
		2401	760,16667	1232,4333	991,5	98,26341	93,51969	116,2606	1,463	1,463	1,62127	1,304	0,0589887	0,09
		1303	3340,6333	2227,5667	1972,1	403,3759	347,0633	299,4562	0,629	0,629	0,66681	0,590	0,0647746	0,41
		6804	629,55	423,28333	167,14	223,6413	75,6412	32,5078	0,469	0,469	0,67236	0,265	0,0679564 *	0,08
		4401	5198,8	3849,6167	3813,6667	541,8255	221,3333	158,3608	0,737	0,737	0,74048	0,734	0,0792792 **	0,63
		3702	1635,6	2339,2167	2450,5333	242,9081	196,923	198,3018	1,464	1,464	1,43019	1,498	0,0794868	0,20
		8501	1990,5667	3352,8167	3927,65	333,6439	625,6895	629,8339	1,829	1,829	1,68435	1,973	0,0898731	0,24
		1304	4135,1667	3094,75	3236,9	366,3916	279,1008	312,9639	0,766	0,766	0,7484	0,783	0,0947299	0,50
		1203	1076,3333	682,71667	1067,35	94,70247	103,3717	210,8941	0,813	0,813	0,6343	0,992	0,096972	0,13
		1502	1146,25	622,28333	1017,25	207,3486	123,4094	187,9046	0,715	0,715	0,54289	0,887	0,116928	0,14
		4908	1817,3667	2460,9167	2703,7667	228,9106	229,4438	482,9534	1,421	1,421	1,35411	1,488	0,118997	0,22
		5001	2851,8167	2805,2667	1920,25	165,801	423,8932	533,869	0,829	0,829	0,98368	0,673	0,157559	0,35
		2601	621,8	645,33333	1001,5	95,58446	44,96717	207,8122	1,324	1,324	1,03785	1,611	0,164143 *	0,08
		401	1278,3667	878,65	1151,7	190,033	118,9244	139,4223	0,794	0,794	0,68732	0,901	0,20499	0,16
		4702	272,8	392,5	283,4	55,60013	43,07747	77,65667	1,239	1,239	1,43878	1,039	0,2157 *	0,03
		3701	659,08333	890,21667	850,36667	127,7098	52,84814	82,71195	1,32	1,320	1,35069	1,290	0,240052	0,08
		5704	3653,0167	5113,8667	5174,6167	397,2258	1038,266	577,4163	1,408	1,408	1,3999	1,117	0,24146	0,44
		6501	1069,0167	1501,3667	1248,5833	149,7213	181,0214	214,7383	1,286	1,286	1,40444	1,468	0,2443	0,13
		2402	3018,4333	3426,6333	3972,0833	488,947	197,8605	281,3565	1,226	1,226	1,13524	1,316	0,271418	0,37
		4701	1487,4167	1361,0667	1861,6167	242,298	162,0277	240,5664	1,083	1,083	0,91505	1,252	0,308684	0,18
		5602	899,31667	1188,55	1067,9333	149,292	146,7046	114,5903	1,255	1,255	1,32161	1,187	0,317843	0,11
		1202	2480,2333	2758,6833	2112,9667	211,028	330,7901	345,8195	0,982	0,982	1,11227	0,852	0,346683	0,30
		603	2152,55	1608,										

Contribution à la caractérisation des stades tardifs de la maturation des graines de *Medicago truncatula* : une étude physiologique et biochimique pour comprendre la longévité.

La longévité correspond à la capacité des graines à tolérer la dessiccation et d'être capable de germer sans perte de vigueur après conservation. Elle est acquise au cours de la maturation, après le remplissage des graines et l'acquisition de la tolérance à la dessiccation. Le but de cette thèse est d'analyser les caractéristiques physiologiques, biochimiques et moléculaires lors de la maturation des graines de *Medicago truncatula*, et d'identifier les mécanismes ou molécules qui corrént avec l'acquisition de la longévité. Pendant la maturation, la longévité augmente d'un facteur trente entre 28 et 44 jours après pollinisation. Une analyse de l'acquisition de la longévité des graines sur plusieurs récoltes et des mesures biochimiques (teneur en sucres solubles, activité des systèmes antioxydants) montre une très forte corrélation entre la longévité et la teneur en saccharose ( $R^2=-0.91$ ) et stachyose ( $R^2=0.92$ ). Une étude protéomique a permis de suivre l'abondance de 38 spots qui correspondent à 16 protéines de type 'Late Embryogenesis Abundant' (LEA). Seulement quatre polypeptides corrént avec la longévité (CapLEA, D113.II, D34.III et EM) et représentent 45% de l'intensité totale des protéines LEA. L'abondance de la plupart des polypeptides LEA augmente pendant la dernière phase de séchage de graines. La caractérisation de mutants *abi5*, un facteur de transcription, connu pour sa régulation de gènes LEA, montre que, contrairement à *Arabidopsis*, *ABI5* chez *M. truncatula* joue un rôle clé dans la dormance et l'accumulation d'oligosaccharides. De surcroit, les graines de mutants Tnt1 d'*abi5* ont une longévité deux fois moindre, et présentent une diminution des protéines d'EM et EM6 et ainsi que celle du groupe D34.

Characterisation of the later stages of seed maturation in *Medicago truncatula*: a physiological and biochemical study to understand longevity.

Seed longevity corresponds to the capacity of seeds to survive not only drying, but also to remain viable for extended periods of time in the dry state. Longevity is acquired during late maturation, just after the acquisition of desiccation tolerance. The aim of this thesis is to analyse the physiological, biochemical and molecular events taking place during maturation to identify mechanisms or molecules that correlate with longevity of *Medicago truncatula* seeds. During maturation, longevity increases 30-fold between 28 and 44 days after pollination. Analysis of the acquisition of longevity in seeds of several harvests demonstrates a strong correlation between longevity and the level of sucrose ( $R^2=-0.91$ ) and stachyose ( $R^2=0.92$ ). A proteomic analysis was used to follow the accumulation of 38 'Late Embryogenesis Abundant' (LEA) polypeptides corresponding to 16 *LEA* genes during maturation. Only four polypeptides were identified that correlated with longevity (EM, CapLEA, D113.II and D-34.II), representing 45% of the total intensity of the LEA proteome. The abundance of most of the LEA polypeptides increased at the final step of maturation drying. *ABI5* is a transcription factor expected to drive LEA genes expression. Characterization of *abi5* mutants of *M. truncatula*, shows that in contrast to *Arabidopsis*, *ABI5* in *M. truncatula* plays a role in dormancy and oligosaccharide accumulation. In addition, *abi5* mutants have a reduced longevity and accumulate less EM and EM6 proteins, as well as several proteins of the SMP (D-34) group.

Les mots clés (5 mots clés): *Medicago truncatula*, maturation, longévité, protéines LEA, sucres