HAL
open science

Étude fonctionnelle de trois facteurs de transcription intervenant dans la regulation de la qualité germinative des graines chez les légumineuses : ABI4, ABI5 et HSFA9

Julia Zinsmeister

To cite this version:

Julia Zinsmeister. Étude fonctionnelle de trois facteurs de transcription intervenant dans la regulation de la qualité germinative des graines chez les légumineuses : ABI4, ABI5 et HSFA9. Biologie végétale. Agrocampus Ouest, 2016. Français. NNT : 2016NSARI078 . tel-01661635

HAL Id: tel-01661635

https://theses.hal.science/tel-01661635

Submitted on 12 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

AGRO CAMPUS OUEST

Julia ZINSMEISTER • 22 novembre 2016

Thèse AGROCAMPUS OUEST
sous le label de l'Université Européenne de Bretagne
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'AGROCAMPUS OUEST
Spécialité Biologie et Agronomie

ÉCOLE DOCTORALE • Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer (VENAM)

LABORATOIRE D'ACCUEIL • UMR 1345 INRA-AO Institut de recherche en horticulture et semences (IRHS)

Étude fonctionnelle de trois facteurs de transcription intervenant dans la regulation de la qualité germinative des graines chez les légumineuses : ABI4, ABI5 et HSFA9

Soulaiman SAKR
Professeur Agrocampus Ouest, UMR IRHS /*président*

Françoise CORBINEAU
Professeur, UPMC Paris, UMR 7622 CNRS UPMC Biologie du développement / *rapporteur*

Helen NORTH
Directrice de recherche, Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR 1318 INRA-AgroParisTech / *rapporteur*

Florence COURTOIS
Maître de conférences, Université de Grenoble I, UMR 5168 CNRS-CEA-UJF / *examinatrice*

Olivier LEPRINCE
Professeur, Agrocampus Ouest, UMR IRHS / *directeur de thèse*

Julia BUITINK
Directrice de recherche, INRA Angers, UMR IRHS / *co-directrice de thèse*

Petite ou grosse, je peux être une grande voyageuse.

Capricieuse, je peux vous faire attendre avant de pointer.

Parfois récalcitrante, je vous suis malgré tout indispensable.

Qui suis-je ?

(Une graine)

Remerciements

Les membres du jury et du comité de suivi de thèse

Je tiens en premier lieu à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail, les membres rapporteurs, Pr Corbineau et Dr North, ainsi que les examinateurs, Dr Courtois et Pr Sakr. Un grand merci aux membres du comité de thèse, Pr Marion-Poll, Dr Gallardo et Pr Macherel pour le suivi pertinent et l'appui scientifique réalisé au cours de ces trois années et qui ont grandement contribué à ce travail présenté aujourd'hui.

Le Directeur de mon unité

Je tiens aussi à remercier Dr Renou, pour son accueil au sein de l'UMR IRHS, mais aussi pour son implication dans la vie de l'unité et pour l'écoute qu'il accorde à tous les membres de son UMR, lors notamment des réunions de conseil de service auxquelles j'ai pu participer durant ces trois ans.

Mes financeurs

Je remercie la communauté de communes Angers-Loire-Métropole et l'INRA, sans qui ce travail n'aurait pas été possible, pour le financement de ma bourse de thèse. L'appui local à la recherche est essentiel et j'espère que la réalisation de ce travail argumentera en faveur du maintien de ce type d'aide. Je remercie également les membres d'Agrocampus-Ouest et de l'Académie d'Agriculture de France pour avoir cru en mon travail et permis de le promouvoir.

Mon équipe

Et parce qu'un travail est avant tout le fruit d'une équipe, je souhaite remercier tous les membres de l'équipe CONSERTO, permanents ou de passage, présents et anciens. Tout d'abord, un grand merci à Olivier, mon ancien professeur avant tout, pour m'avoir fait découvrir et donner le goût de la recherche dans ce domaine très diversifié mais encore si méconnu qu'est la graine. Puis, en tant qu'encadrant de thèse, pour avoir été à mon écoute, m'avoir enseigné avec pédagogie les démarches scientifiques, et pour m'avoir toujours soutenue dans la réalisation des projets. En dernier lieu, merci pour ces bons repas mitonnés.

Un grand merci également à ma co-directrice de thèse, Dr Buitink, pour avoir été toujours disponible, à l'écoute et de très bons conseils scientifiques. Grâce à vous, j'ai appris ce qu'est la Recherche. Vous avez toujours été tous deux présents et ces trois années passées avec vous auront été un réel plaisir. En très grande partie grâce à vos enseignements et à vous, je démarre maintenant mon travail de chercheur en gardant à l'esprit le « réseau de graines ».

Merci à David Lalanne, Joseph Ly-Vu et Benoît Ly-Vu pour m'avoir enseigné la biologie moléculaire et les techniques essentielles en soin de Medicago. Merci aussi à Anthoni, pour m'avoir appris le marquage des fleurs d'Arabidopsis et pour tes échanges scientifiques riches sur ce projet, je te souhaite une bonne continuation dans ta passion de la Recherche.

Bon courage à toute l'équipe pour les gros projets en cours et à venir !

Les membres du pôle semences et des autres équipes

Je n'oublie pas les membres des autres équipes, Aurélia Rolland pour ton aide précieuse à l'utilisation du spectrofluorimètre et nos échanges constructifs sur les QPCR, Pascale pour le fonctionnement de l'HPLC DIONEX et Cécile Dubois-Laurent pour votre aide avec les extractions de chlorophylle et le fonctionnement de l'HPLC pendant mon séjour dans l'équipe QUARVEG, pour lequel je tiens aussi à remercier Pr Geoffriau. Merci aussi aux membres du pôle semences pour l'organisation de la fête de la science 2016.

Merci à Mme Molinéro-Valérie et son équipe pour avoir accepté de proposer à l'école doctorale la formation sur l'hygiène et la sécurité au travail. Comme nous avons pu le voir, cette formation est utile et demandée pour et par les doctorants.

Enfin, ils ne sont pas de l'IRHS mais sans eux ce travail n'aurait pas été permis, merci à Katharina Van Dorp et Pr Dörmann pour les dosages des tocophérols, Danke.

Mes moniteurs d'enseignement

Je remercie aussi chaleureusement Dr Macherel et Dr Teulat, pour m'avoir fait confiance et confiées leurs heures d'enseignement à Agrocampus-Ouest, Angers. Merci à Lolly pour ces heures de TP réalisées avec vous. Un grand merci également aux responsables d'Agrocampus-Ouest pour le bon déroulement de ces heures d'enseignement, cela m'aura permis de « passer de l'autre côté ».

Le personnel administratif d'Agrocampus-Ouest et de l'IRHS

Merci à Mme Louage et Mme Guyader pour leur soutien à la réalisation de mes heures d'enseignement à Agrocampus-Ouest et pour avoir créé un espace d'accueil et d'écoute chaleureux pour les doctorants.

Merci à l'équipe PAIGE, et plus particulièrement Mme Cassin, pour votre travail aux commandes de tous ces mutants.

Le personnel encadrant du collège et de l'école doctorale

Merci à M Bertheuil, Mme Lefebvre et Mme Koscielski pour la formation du nouveau chapitre de la thèse, votre soutien professionnel et votre suivi m'auront grandement aidé à trouver mon emploi après ma thèse.

Merci à M Lapied, M Ferrer et Mme Lefebvre pour votre suivi et votre aide dans l'organisation des 3èmes journées scientifiques de l'école doctorale, j'en profite ici pour remercier mes camarades docteurs (ou bientôt) Guillaume, Elodie, Hélène et Carole pour notre travail de groupe à l'organisation de cet évènement, qui nous aura un peu permis de nous « évader » de nos travaux de thèse respectifs.

Sommaire

Liste des abréviations 1

Liste des Figures 3

Liste des Tableaux 9

Introduction 11

1. Chapitre 1 : Synthèse bibliographique 19

1.1 Développement et germination des graines des dicotylédones 19

1.1.1 Les phases du développement 19

1.1.2 Germination 23

1.1.3 Acquisition de la tolérance à la dessiccation 23

1.1.4 Acquisition de la longévité 25

1.1.5 Perte de la chlorophylle 27

1.1.6 Dormance 29

1.2 La régulation transcriptionnelle de la maturation 33

1.2.1 LEC1, L1L, LEC2 et FUSCA3 35

1.2.2 Signalisation par l'ABA 35

1.2.2.1 Le facteur de transcription ABI3 35

1.2.2.2 Le facteur de transcription ABI4 37

1.2.2.3 Le facteur de transcription ABI5 41

1.2.3 Le facteur de transcription HSFA9 45

1.3 Les mécanismes de survie à l'état sec des graines 51

1.3.1 Les oligosaccharides de la famille du raffinose (RFOs) 51

1.3.2 Les protéines Late Embryogenesis Abundant (LEA) 55

1.3.3 Les protéines de choc thermique (HSP) 59

1.3.4 Rôle protecteur des téguments des graines 59

1.3.5 Mécanismes de protection et de détoxification contre les ROS 61

1.3.6 Protection et réparation contre les dommages cellulaires 65

1.4. Mécanismes de la photosynthèse 69
1.4.1 Principes généraux de la photosynthèse 69
1.4.2 Différences entre les feuilles et les graines à activité photosynthétique 71
1.4.3 Les acteurs de la photosynthèse 71
1.4.3.1 Les chlorophylles 71
1.4.3.2 Les caroténoïdes 75
1.4.3.3 Les protéines associées à la photosynthèse 77
1.4.4.4 Les tocophérols 79
1.4.4 Rôles d'ABI3, ABI4 et ABI5 dans la perte de la chlorophylle et le système rétrograde.81
1.4.4.1 ABI3 régule les gènes codant les enzymes de dégradation de la chlorophylle dans les graines 81
1.4.4.2 ABI5 régule directement les gènes codant les enzymes de dégradation de la chlorophylle lors de la sénescence foliaire 81
1.4.4.3 ABI4 participe à la communication chloroplaste-noyau au cours de l'établissement de la plantule 83
1.5 Objectifs de la these 89

2. Chapitre 2: ABI5 is a Regulator of Seed Maturation and Longevity in Legumes **91**

3. Chapitre 3 : MtABI4-like is a regulator of seed chlorophyll loss and longevity in *Medicago truncatula* **153**

3.1 Résumé 153
3.2 Introduction 155
3.3 Results 163
3.3.1 Identification of Medtr5g082950 as putative ortholog of *A. thaliana ABI4* 163
3.3.2 Characterization of homozygous lines of *Tnt1* insertion of Medtr5G082950 163
3.3.3 Mt-*abl* mature seeds display a strongly reduced longevity 165
3.3.4 Mt-*abl* mature seeds display chlorophyll retention and increased level of PHANGs transcripts 167

3.3.5 MtABI5 regulates *MtABL* expression in mature seeds ……..…….. 167
3.3.6 Obtaining double mutants seeds Mt-*abl* and Mt-*abi5* …….…….…... 171
3.3.7 PHANGs expression and chlorophyll contents in double mutant seeds ..…… 173
3.3.8 Sugar contents are affected in Mt-*abl* mutants …….……..…. 173
3.3.9 *MtEM1* expression is up-regulated in Mt-*abl* mutants ..…….…….. 175
3.4 Discussion ……...…… 177
3.4.1 MtABL is a putative ortholog of ABI4 …….. 177
3.4.2 MtABL regulates chlorophyll loss and PHANGs expression …….. 179
3.4.3 MtABL, MtABI5 and *MtEM1* regulation …… 181
3.4.4 Sugar accumulation is deregulated in Mt-*abl* mutants …… 183
3.4.5 Proposed model for MtABL and MtABI5 in *M. truncatula* seed longevity regulation.183

4. Chapitre 4 : Caractérisation fonctionnelle de MtHSFA2.2 dans la qualité germinative de la graine de *Medicago truncatula* 185

4.1 Résumé …….....……. 185
4.2 Introduction …….. 187
4.3 Résultats ……...…….. 193
4.3.1 Identification de *MtHSFA2.2* chez *M. truncatula* comme étant l'orthologue *d'AtHSFA9* …… 193
4.3.2 Phénotypage des mutants Mt-*hsfa2.2* ……..…… 195
4.3.2.1 Obtention de trois lignées indépendantes Mt-hsfa2.2 ……..……. 195
4.3.2.2 Phénotypage physiologique des graines des mutants Mt-hsfa2.2 ….…..….. 197
4.3.2.3 MTHSFA2.2 impacte la dormance ..……...….…….. 197
4.3.3 Réponse de la germination en présence d'hormones des mutants Mt-*hsfa2.2* …… 201
4.3.3.1 Sensibilité de la germination aux acides gibbéréliques et au paclobutrazol des mutants Mt-hsfa2.2 ……..…...….….. 201
4.3.3.2 Sensibilité à l'ABA des mutants Mt-hsfa2.2 …….…… 203
4.3.4 Réponse des graines de mutants Mt-*hsfa2.2* à la germination à la chaleur (30°C) ….. 203
4.3.5 Analyse transcriptomique de racines de *M. truncatula* sur-exprimant de manière ectopique *35S ::MtHSFA2.2,35S ::*GFP comparé au témoin 35S *::GUS,35S ::GFP* ……... 207
4.3.6 Métabolisme des sucres et MtHSFA2.2 …….. 209

4.4 Discussion ……..…….. 211

4.4.1 MtHSFA2.2 présente le plus de similarité de séquence avec HSFA9 alors que MtHSFA2.1 présente le plus de similitudes avec HaHSFA9 ……... 211

4.4.2 MtHSFA2.2 et longévité …….. 211

4.4.3 MtHSFA2.2 et dormance …….…… 215

5. Discussion et perspectives : Apports et perspectives sur l'identification des régulateurs de la qualité germinative des graines de *M. truncatula* ……...…… 219

5.1 Régulation de la dormance des graines de *M. truncatula* par MtHSFA2.2 et MtABI5 ……..…….. 221

5.2 Régulation de l'accumulation des protéines LEA par MtABI5 ……. 225

5.3 L'expression de *MtABL* serait activée par un signal sucre régulé par MtABI5 ..……..…….. 227

5.4 Régulation de l'accumulation du glucose par MtABL et des RFO par MtABI5 ……..…… 227

5.5 Régulation de la dégradation de la chlorophylle des graines chez *M. truncatula* ……..…… 231

5.6 Apports sur la connaissance des mécanismes de régulation de la longévité des graines ……. 231

5.7 Mise en perspective des voies de régulation des facteurs de transcription MtABL, MtABI5 et MtHSFA2.2 …….. 235

6. Matériel et méthodes ……...…….. 239

6.1 Matériel biologique ……. 239

6.1.1 Mutants pour le gène *ABI5* …….….. 239

6.1.2 Mutants pour le gène *MtHSFA2.2* …… 239

6.1.3 Mutants pour le gène *ABL* …… 241

6.1.4 Double mutants Mt-*abi5*/Mt-*abl* …….. 241
6.1.5 Obtention de racines transformées *35S ::MtHSFA2.2,35S ::GFP, 35S ::GUS,35S : :GFP* et *35S ::MtABI5,35S ::GFP* …….. 243
6.1.5.1 Construction des plasmides 35S ::MtHSFA2.2,35S ::GFP et *35S ::MtABI5,35S : :GFP pour la sur-expression de MtHSFA2.2 dans des racines transgéniques de M. truncatula et la sur-expression de MtABI5 dans les feuilles transgéniques de M. truncatula* …… 243
6.1.5.2 Transformation de souches d'Agrobacterium rhizogenes…..……245
6.1.5.3 Transformation de racines de M. truncatula ……..... 245
6.1.6 Obtention de feuilles transformées *35S ::MtABI5,35S ::GFP* et *35S :GUS,35S ::GF* . 247
6.1.6.1 Transformation de souches d'Agrobacterium tumefaciens ……..…….. 247
6.1.6.2 Transformation de feuilles de M. truncatula …….…… 247
6.2 Conditions de culture ……... 247
6.3 Tests de physiologie …… 249
6.3.1 Germination …….…..….. 249
6.3.2 Sensibilité à l'ABA ……..…… 251
6.3.3 Test de longévité …….. 251
6.3.4 Acquisition de la dormance ..…… 251
6.3.5 Détermination de la teneur en eau ..……..…… 253
6.4 Expérience de sénescence ……..…….….. 253
6.5 Dosages des sucres solubles ……...…….…. 253
6.6 Dosages HPLC des chlorophylles et des caroténoïdes …….…….. 255
6.7 Dosages au spectrophotomètre des chlorophylles …….…..… 255
6.8 Extraction d'ADN génomique …… 257
6.9 PCR …….…. 257
6.10 Extraction des ARN totaux …….…….. 257
6.11 RT-QPCR ……..…….. 259
6.12 Analyse transcriptomique …….… 259
6.12.1 Amplification des ARNm et marquage des ADNc avec cy3/cy5 ….……..… 259
6.12.2 Hybridation sur lame …….. 261
6.12.3 Traitement des données ……..… 261

6. 13 Analyses bioinformatiques …….. 261

7. Bibliographie …….. **265**

8. Sitographie …….. **283**

Liste des abréviations

ABA : Acide Abscissique
ABI3 : ABA-insensitive 3
ABI4 : ABA-insensitive 4
ABL : ABA-insensitive 4-like
ABI5 : ABA-insensitive 5
ABRE : ABA Responsive Element
ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
Bp : Base Pairs
bZIP : Basic leucine zipper
DAP : Days after polination
DNase : Désoxyribonucléase
FUS3 : FUSCA3
GAs : Acides Gibbérelliques
GFP : Green fluorescent protein
GNIS : Groupement Interprofessionnel des Semences et plants
GUS : β-glucuronidase
HR : Humidité Relative
HSFA9 : Heat Shock Factor A9
HSF : Heat Shock Factor
HSP: Heat Shock Protein
INRA : Institut National de Recherche Agronomique
IRHS : Institut de Recherche en Horticulture et Semences
ISF : International Seed Federation
JAP : Jours Après Pollinisation
LB : Lysogeny broth
LEA : Late Embryogenesis Abundant
LEC1 : LEAFY COTYLEDON 1
LEC2 : LEAFY COTYLEDON 2
LHC : LIGHT HARVESTING COMPLEX
L1L : LEAFFY COTYLEDON 1 LIKE
MeOH : Méthanol
M : Molaire
NAC : No Amplification Control
NTC : No Template Control
PEG : Polyéthylène glycol
PHANGs : Photosynthesis Associated Nuclear Genes
Pb : Paire de bases
PCR, : Polymerase Chain Reaction, RT-PCR reverse transcriptase-PCR
PS : Post-maturation à sec
PSI, PSII : Photosystem I, II
RFO : Raffinose Family Oligosaccharides
RNase : Ribonucléase
ROS : Reactive Oxygen Species
SnrK : Sucrose non fermenting related protein kinase
SSP : Seed Storage Protein
STR : Streptomycine
SPC : Spectinomycine
TAE : Tris Acétate EDTA
TD : Tolérance à la Dessiccation
TS : Type sauvage
UV : Ultra violet
WT : Wild type
ZEP : Zeaxeanthine epoxydase

Liste des figures

1. Chapitre 1

Figure 1.1 : Les phases du développement de la graine de *M. truncatula* écotype A-17 (A) et d'*A. thaliana* accession Col-0 (B). ……18

Figure 1.2 : Compositions des graines matures d'*A.thaliana* Wassilewskija (A) et de *M. truncatula.* Jemalong (B)..……..18

Figure 1.3 : Structure, voie de biosynthèse et profils d'expression des gènes codant pour les enzymes de synthèse des oligosaccharides de la famille du raffinose (RFO) chez *M. truncatula*……..20

Figure1.4 : Evénements cytologiques et biochimiques intervenant au cours des trois phases de la germination chez les graines endospermiques……22

Figure 1.5 : Acquisition de la longévité au cours du développement de la graine de *M. truncatula* (A17) dans différentes conditions environnementales……24

Figure 1.6 : Modèle de régulation de la dormance par les GAs et l'ABA en réponse à l'environnement, basé sur les données obtenues chez *A. thaliana*..……...30

Figure 1.7 : Profils d'expression des gènes régulateurs majeurs (*LEC1*, *L1L*, *LEC2*, *FUSCA3* et *ABI3*) et des autres facteurs de régulation impliqués dans le développement de la graine (*ABI4*, *ABI5* et *HSFA9*) chez *A. thaliana*……34

Figure 1.8 : Sensibilité à l'ABA des mutants *abi3-1*, *abi4-1* et *abi5-1* d'*A. thaliana*……36

Figure 1.9 : Modèle de reconnaissance des éléments *cis* régulateurs par les facteurs de transcription ABI4 et GBF……...38

Figure 1.10 : Modèle comparant les voies de signalisation de l'ABA dans les graines pendant la maturation et dans les tissus végétatifs soumis à un stress osmotique……42

Figure 1.11 : Régulation post-traductionnelle de l'activité et de la stabilité ABI5 chez *A. thaliana*……44

Figure 1.12 : Composants de la transcription régulés pendant le développement et la germination des graines d'*A. thaliana*……...46

Figure 1.13 : Schéma de la structure des trois classes (A, B, C) de Heat Shock Factor…….46

Figure 1.14 : Mécanismes de protection des protéines (A) et des membranes (F) par les sucres et composés amphiphiles impliqués dans la tolérance à la dessiccation……...52

Figure 1.15 : Modèle de l'activité de « chaperon moléculaire » des sHSPs……58

Figure 1.16 : Les mécanismes de la production de ROS dans le chloroplaste. ……..64

Figure 1.17 : Les mécanismes de détoxification des ROS……64

Figure 1.18 : Mécanismes proposés de la fonction anti oxydante des tocophérols dans la captation du ROS généré lors de la peroxydation des acides gras polyinsaturés……66

Figure 1.19 : Mécanisme de la formation de L-isoaspartyl (résidu anormal) à partir du résidu aspartyl……..66

Figure 1.20 : Schéma des principales protéines des complexes photosynthétiques présentes dans les chloroplastes chez *A. thaliana*……..68

Figure 1.21 : Structure chimique des chlorophylles et spectres d'absorption dans le visible…70

Figure 1.22 : Voie de synthèse et de dégradation de la chlorophylle……72

Figure 1.23 : Spectres d'absorption des caroténoïdes extraits dans le solvant diethyl ether et métabolisme des caroténoïdes……..74

Figure 1.24 : Profils d'expression des gènes codant les deux protéines des Light Harvesting Complex (LHC) étudiées dans cette étude chez *M. truncatula* au cours du développement de la graine..……76

Figure 1.25 : Structure des tocophérols……76

Figure 1.26 : Représentation schématique de la synthèse des tocophérols et des voies métaboliques liées, soit la synthèse des caroténoïdes et la dégradation de la chlorophylle…….78

Figure 1.27 : Modèle proposé pour la régulation de la sénescence foliaire par ABI5……82

Figure 1.28 : Modèle proposé du système rétrograde de la cellule……84

2. Chapitre 2

Figure 1 : QTL analysis of seed longevity……129

Figure 2 : Mt-ABI5 affects seed physiological quality during seed development……130

Figure 3 : Gene regulatory network of deregulated transcripts in Mt-*abi5* mutant seeds during development……131

Figure 4 : Sugar metabolism is affected in *Mt-abi5* seeds……132

Figure 5 : Mt-ABI5 affects LEA polypeptide accumulation……...133

Figure 6 : Chlorophyll and photosystem associated gene expression are affected in *Mt-abi5* seeds…….....134

Figure 7 : Characterization of *abi5* mutant seeds of pea……...135

Figure 8 : Mature *Mt-abi5* seeds are more sensitive to oxygen……136

Figure 9 : Model summarizing the different actions of ABI5 in the regulation of late seed maturation in legumes ……..…….137

Supplemental Figure 1. Germination of *Mtabi5* seeds is insensitive to ABA during imbibition in the dark……..……138

Supplemental Figure 2. Yeast one-hybrid assays of ABI5 to the ABRE in the promoter region of Mt-*SIP1*……...139

Supplemental Figure 3. Two dimensional electrophoresis gels of the heat-stable proteome of *M. truncatula* seeds……..140

Supplemental Figure 4. Chlorophyll contents in developing wild-type and Mt-*abi5* seeds……...……141

Supplemental Figure 5. Expression of genes involved in the PAO degradation pathway in mature seeds of Mt-*abi5*……..……142

Supplemental Figure 6. Dark-induced senescence in young seedlings of wild-type and *Mtabi5*……..…143

Supplemental Figure 7. Photosynthesis-associated gene expression and carotenoid content during seed development of wild-type and *Mtabi5* seeds……..144

Supplemental Figure 8. Longevity of wild-type (Wassilewskija, Ws) and *abi5-1* seeds of Arabidopsis together with sugar content and EM protein levels in dry mature seeds……145

Supplemental Figure 9. Chlorophyll contents in seed coats of mature wild-type and *Psabi5* mature seeds……146

3. Chapitre 3

Figure 3.1 : Multiple sequence alignment of *M. truncatula* AP2/EREBP transcription factors together with *A. thaliana ABI4* (At2g40220), *Zea mays ZmABI4* and *Theobroma cacao TcaABI4*..……...……160

Figure 3.2 : Conservation of the ABI4 specific domain in the *M. truncatula* seed specific AP2 transcription factor present in longevity module and ABI4, ZmABI4 and TcaABI4……..161

Figure 3.3 : Mt-*abl* mutants presentation and ABA sensitivity……...162

Figure 3.4 : Mt-*abl* mature seeds display a strong reduced seed longevity……164

Figure 3.5 : MtABL regulates chlorophyll degradation……..166

Figure 3.6 : Relative expression of indicated photosynthesis-associated nuclear genes in dry mature seeds……168

Figure 3.7 : MtABI5 positively regulates *MtABL* expression in *M. truncatula* seeds……..169

Figure 3.8 : Soluble sugar contents in Mt-*abl*, Mt-*abi5* and digenic Mt-*abi5-2*/Mt-*abl-1* mature seeds……172

Figure 3.9 : Ratio of total RFO contents/Sucrose……..174

Figure 3.10 : Repression and activation of *MtEM1* gene by MtABI4 and MtABI5 in *M. truncatula* mature seeds……...174

Figure 3.11 : Model summarizing the different actions of MtABL and MtABI5 in the regulation of late seed maturation……182

4. Chapitre 4

Figure 4.1 : Identification de l'orthologue putatif d'AtHSFA9 chez *M. truncatula, MtHSFA2.2*…….....190

Figure 4.2 : Comparaison des facteurs de transcription regroupés dans le sous-groupe contenant AtHSFA9 et HaHSFA9……...192

Figure 4.3 : MtHSFA2.1 (Medtr3g104550) est l'expressologue chez *M. truncatula* du gène d'*A. thaliana* HSFA9 (At2g26150) au cours du développement……194

Figure 4.4 : Présentation des mutants *Tnt1* étudiés……194

Figure 4.5 : Les graines des mutants Mt-*hsfa2.2* présentent un poids sec et une longévité identiques à ceux des graines de type sauvage..……..196

Figure 4.6 : Les graines des mutants Mt-*hsfa2.2* sont plus dormantes que les graines de type sauvage……..…..198

Figure 4.7 : L'acquisition de la dormance des graines des mutants Mt-*hsfa2.2* est plus importante que celle des graines de type sauvage en fin de développement……199

Figure 4.8 : Effet des acides gibberéliques (GA_3) et du paclobutrazol (paclo) sur le T_{50} des graines dormantes……200

Figure 4.9 : Sensibilité à l'ABA des graines matures Mt-*hsfa2.2* comparées aux graines de type sauvage……202

Figure 4.10 : Sensibilité à la chaleur (30°C) de la germination des graines des mutants Mt-*hsfa2.2* comparées aux graines de type sauvage……...204

Figure 4.11 : Teneurs en sucres solubles des graines matures des mutants Mt-*hsfa2.2* comparées aux graines de type sauvage..……..208

Figure 4.12 : Schéma hypothétique proposant un rôle de MtHSFA2.2 dans la régulation de la dormance……214

5. Discussion et perspectives

Figure 5.1 : Apports des travaux de thèse à la connaissance des phénotypes graines impliquant MtABL, MtABI5 et MtHSFA2.2……220

Figure 5.2 : Schéma global proposé pour la régulation des évènements de la maturation chez la graine de *M. truncatula* par MtHSFA2.2, MtABL et MtABI5……237

6. Matériel et méthodes

Figure 6.1 : Caractéristiques du vecteur d'entrée pENTR™/D-TOPO®……242

Figure 6.2 : Carte du vecteur de destination pK7WG2D.1 utilisé pour la sur-expression de *MtABI5* et de *MtHSFA2.2*……...…244

Liste des tableaux

2. Chapitre 2

Table I. Summary of detected QTL for aging traits in the *M. truncatula* LR4 population originating from a cross between J6xDZA315.16…….....126

Table II. GO enrichment analysis of maturation modules obtained from gene co-expression analysis……127

Table III. Contents of carotenoids and tocochromanols of mature seeds of *M. truncatula*...128

Supplemental Table 1. Detected polymorphisms between Jemalong J-6 and DZA315.16 in the region of ABI5 (Medtr7g104480) on LG7 (Mt4.0)……..……...…….147

Supplemental table 2. Soluble sugar composition of mature pea cotyledons…….....148

Supplemental Table 3. Comparative analysis of affected phenotypes in seeds of the *abi5* mutants of *Medicago truncatula*, *Pisum sativum* and *Arabidopsis thaliana*……149

3. Chapitre 3

Table 3.1: Amount of seeds (N) obtained in F2 populations segregating for green seeds and double mutants……170

4. Chapitre 4

Tableau 4.1 : Pourcentages d'identité entre les membres présents dans le sous-groupe contenant HaHSFA9, HSFA9, HSFA2, MtHSFA2.1, MtHSFA3, MEDTR4G126070, LjHSFA2.1 et LjHSFA2.2……..191

Tableau 4.2 : Analyse de l'enrichissement des catégories GO surreprésentées au sein de la liste de transcrits plus abondants dans les racines sur-exprimant *MtHSFA2.2*…….....204

Tableau 4.3 : Liste des intensités des sondes correspondant aux gènes MtHSF2.2, HSP20-like, HSP70b, HSP70, HSP17.6II et LEA dehydrine pour les racines transgéniques témoin (GUS.bg) et celles sur-exprimant *MtHSF2.2* (MtHSFA2.2.bg) dans les racines de *M. truncatula*……205

Tableau 4.4 : Gènes impliqués dans le catabolisme de l'ABA, du métabolisme des GAs et des PP2C différentiellement exprimés par sur-expression ectopique de *MtHSF2.2* dans des racines transformées de *M. truncatula*……206

Tableau 4.5 : Gènes impliqués dans la synthèse des RFO différentiellement exprimés par sur-expression ectopique de *MtHSF2.2* dans des racines de *M. truncatula*……206

6. Matériel et méthodes

Tableau 6.1 : Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour les expériences réalisées en PCR (sélection des insertions *Tnt1*)……238

Tableau 6.2 : Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour les PCR DCAPS chez le pois *Pisum sativum*……..238

Tableau 6.3 : Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour le clonage de *MtABI5* dans le vecteur d'entrée pENTR™/D-TOPO®……242

Tableau 6.4 : Composition des milieux de culture LB (Lysogeny Broth) et Fahräeus……244

Tableau 6.5 : Mix PCR et détails des programmes utilisés pour les PCR……256

Tableau 6.6 : Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour les expériences réalisées en RT-QPCR……..258

Tableau 6.7 : Cycles Biorad pour les RT- QPCR……..258

Introduction

La graine est un organe particulier permettant la reproduction et la dissémination de la plante. Elle se place à la base de notre agriculture et l'économie du secteur semencier est en croissance continue. En France, en 2014-2015, ce secteur très structuré représentait près de 3 254 M€ de chiffre d'affaire, avec une croissance en hausse de 1,3 fois sur 5 ans (GNIS [1]). Les exportations de semences et plants constituent une majorité du chiffre d'affaire, avec une balance commerciale nette de 841 M€ (2014-2015). De ce fait, la France était, en 2013, le premier pays exportateur de semences de grande culture, avec 1804 M$ exportés devant les Pays Bas (1583 M$) et les Etats-Unis (1531 M$) (source : ISF [2]), et le troisième exportateur de semences potagères derrière les USA et la Nouvelle-Zélande, avec 404 M$ contre respectivement 1273 M$ et 550 M$. En plus des intérêts économiques liés au commerce des semences, il est possible de conserver la diversité génétique sous forme de graines dans des centres de ressources génétiques à moindre coût (à l'abri de la lumière, de l'humidité et à faible température), comme à la Millenium SeedBank, stockant près de 98% de la flore de Grande Bretagne, ou encore à la banque de Svalbard, permettant la conservation de la biodiversité. L'obtention de graines de haute qualité physiologique représente donc un enjeu économique majeur pour les semenciers. La qualité germinative est définie comme étant l'ensemble des caractéristiques d'un lot de semences lui permettant de germer et d'émerger hors du sol de façon rapide et uniforme, indépendamment des conditions environnementales (la vigueur). Ces caractéristiques sont cruciales pour l'établissement du peuplement végétal, et donc du rendement de la culture. La longévité des graines est quant à elle définie comme étant l'aptitude d'un lot de graine à la conservation à l'état sec sans perdre de sa viabilité, elle est une composante fondamentale de la qualité germinative. En effet, une faible longévité va entraîner une perte rapide de la vigueur des semences.

L'année 2016 a été déclarée « année internationale des légumineuses » par les Nations-Unies, plaçant ainsi les légumineuses fourragères (le trèfle, la luzerne) et les légumineuses cultivées pour leurs graines (le soja, le pois, la féverole) au centre de l'attention de la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture). En effet, l'utilisation des Fabacées est très avantageuse. Les plantes de cette famille, appelée aussi légumineuses ou Papillonacées, sont économes en eau, fixatrices d'azote et sont une solution à la demande mondiale croissante en protéines pour la consommation humaine et animale. Les principaux pays exportateurs sont le Canada, l'Australie, le

Myanmar, les Etats-Unis et la Chine, mais l'Europe reste dépendante des importations pour combler son déficit protéique pour l'alimentation animale, sa production interne et les problèmes de rendement ne permettant pas son autosuffisance. Afin de pallier ce manque, l'initiative gouvernementale française « innovation 2030 » a récompensé une entreprise lauréate en 2015 pour son travail dans le développement de la production d'oléo-protéagineux en France et sur la diversification des volumes de production, soulignant ainsi les efforts politiques dans ce domaine. L'étude de la plante modèle autogame *Medicago truncatula* (luzerne tronquée) permet une approche d'études physiologiques, biochimiques et génétiques en laboratoire dont les connaissances sont transférables aux autres légumineuses cultivées comme le pois et le soja (Choi *et al*., 2004). *M. truncatula* est une espèce annuelle diploïde (2n=16) originaire du pourtour méditérranéen. Le séquençage de son génome a été réalisé en 2003 grâce à un financement de la Samuel Robert Foundation à l'université d'Oklahoma. Ainsi son génome de petite taille, 450 Mb, fait de cette plante un modèle génétique préférentiel (Medicago Handbook, 2006).

La qualité germinative est acquise au cours du développement de la graine sur la plante-mère. Sa régulation est sous le contrôle hormonal, notamment de l'acide abscissique (ABA). Bien que les mécanismes conférant la longévité soient décrits, leur régulation lors du développement des graines reste méconnue. Par une approche d'étude du réseau de co-expression des facteurs de transcription exprimés au cours du développement de la graine et des transcrits des gènes corrélés à la longévité, trois facteurs de transcription en lien putatif avec la régulation de la longévité ont été identifiés chez *M. truncatula* : *M. truncatula* ABSCISIC ACID INSENSTIVE 5 (MtABI5), un facteur de transcription de la famille des AP2/EREBP et MtHSFA2.2, le plus proche orthologue de HEAT SHOCK FACTOR A 9 (HSFA9). L'objectif de cette thèse consiste à caractériser le rôle de ces trois facteurs de transcription dans l'acquisition de la qualité germinative chez *M. truncatula*. Par une étude du rôle du facteur de transcription ABI5 sur le pois cultivé *Pisum sativum var. Caméor*, nous montrons qu'il est possible de transférer les connaissances acquises sur la plante modèle à une espèce cultivée, démontrant la possible application en sélection variétale des résultats obtenus au cours de ce travail.

Les travaux présentés ici sont segmentés en quatre parties : Afin de situer la problématique dans un contexte scientifique, un premier chapitre de synthèse bibliographique permet de rendre compte des connaissances actuelles des évènements de la maturation de la graine et de leur régulation.

Puis, en chapitre 2, les travaux présentés portent sur la caractérisation du rôle de MtABI5 dans la longévité et la perte de la chlorophylle de la graine, par des analyses physiologiques et biochimiques des mutants Mt-*abi5* couplées à des analyses transcriptomiques des graines en développement. Ce travail bénéficie de données antérieures obtenues par l'équipe. En effet, une étude de co-localisation de QTL de longévité et de teneurs en sucres avait révélé *MtABI5* comme un gène candidat dans la régulation de la longévité. Lors de deux thèses de doctorat, Emilie Châtelain (2011) et Emmanuel Terrasson (2013) ont obtenu deux mutants d'insertions *Tnt1* Mt-*abi5* de *M. truncatula* et ont réalisé les expériences de protéome et de transcriptome sur les graines au cours du développement. Les trois mutants EMS Ps-*abi5* de pois que nous avons caractérisé dans la thèse ont été criblés par l'équipe d'A. Bendahmane, Evry dans le cadre du projet ANR QUALITYLEGSEED (2007-2009).

Dans le chapitre 3, nous avons identifié un nouveau régulateur de la longévité et de la perte de la chlorophylle de la graine de *M. truncatula*, à savoir un facteur de transcription de la famille des AP2/EREBP présentant une homologie de séquence avec ABSCISIC ACID INSENSTIVE 4 (ABI4). Ce facteur de transcription est présent dans le module « longévité » de Verdier *et al*., (2013), identifiant les facteurs de transcription spécifiques des graines dont l'expression est co-exprimée à celle des gènes codant des protéines corrélées à la longévité et à la tolérance à la dessiccation. Nos résultats mettent en évidence que ce facteur de transcription AP2/EREBP est un régulateur important de la longévité et de la perte de la chlorophylle de la graine. Il participe, avec MtABI5, à l'inhibition des gènes nucléaires associés à la photosynthèse (PHANGs) en fin de développement. Enfin, nous avons mis en évidence que ce facteur est un régulateur prépondérant de la longévité des graines de *M. truncatula* comparé à MtABI5.

Dans le chapitre 4, les travaux développés ont visé à caractériser le rôle du facteur de transcription MtHSFA2.2 dans la longévité des graines de *M. truncatula*. Ce facteur de transcription, appartenant à la famille des Heat Shock Factor (HSF), est présenté comme un nœud central à l'interface des modules « longévité » et « tolérance à la dessiccation » dans le réseau construit par Verdier *et al*., (2013). Nous avons obtenu et caractérisé des graines de mutants d'insertion *Tnt1* Mt-*hsfa2.2*. Couplées à ces analyses physiologiques, nous avons réalisé une analyse transcriptomique sur les ARN extraits de racines de *M. truncatula* exprimant de manière ectopique *MtHSFA2.2* par comparaison au témoin exprimant le gène *GUS* dans un système de « hairy root ». Nos résultats mettent en évidence le rôle de MtHSFA2.2 dans l'établissement de la dormance des graines de *M. truncatula*.

Pour terminer, nous discuterons des liens mis en évidence au cours de cette thèse entre les trois facteurs de transcription dans la régulation de la longévité et de la dormance des graines pour les légumineuses. Nous verrons comment nos résultats complètent les données scientifiques sur le sujet. Nous discuterons du lien existant entre la longévité et la dégradation de la chlorophylle mis en évidence dans ce travail.

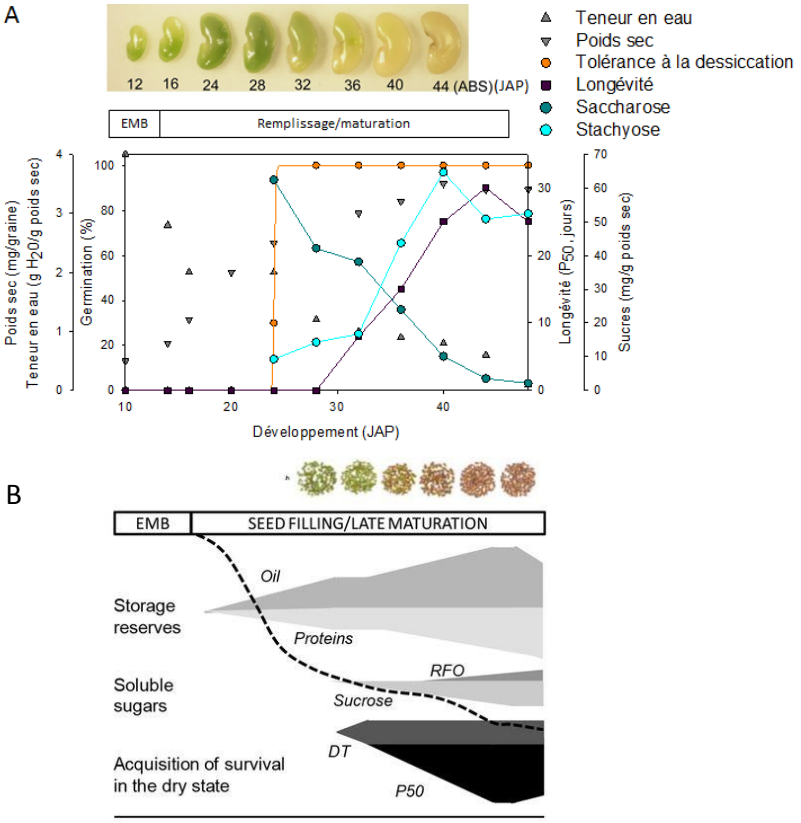


Figure 1.1 : Les phases du développement de la graine de *M. truncatula* écotype A-17 (A) et d'*A. thaliana* accession Col-0 (B). Photographies de graines au cours du développement, évolutions de la teneur en eau (triangle gris), du poids sec (triangle gris inversé), de la tolérance à la dessiccation mesurée par le pourcentage de germination après une dessiccation rapide suivie d'une réhydratation (cercle orange) et de la longévité, mesurée en P_{50}, temps de vieillissement (en jours) nécessaire pour avoir 50% de germination du lot de graine (carré violet); Teneurs en saccharose (cercle bleu cyan foncé) et stachyose (cercle bleu cyan) au cours du temps. Evolution de la teneur en eau (---). D'après Verdier *et al*., (2013); Chatelain, (2012); Righetti *et al*., (2015).

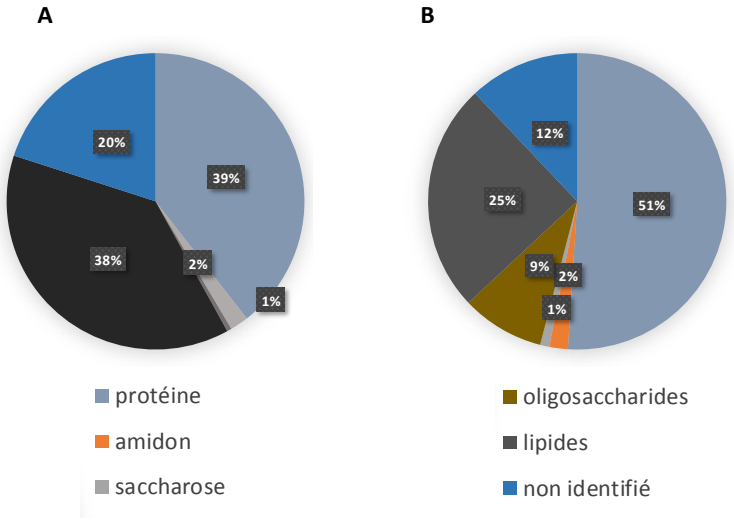


Figure 1.2 : Compositions des graines matures d'*A.thaliana* Wassilewskija (A) et de *M.truncatula*, Jemalong (B). D'après Baud *et al*., (2002); Gallardo *et al*., (2006).

1. Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1.1 Développement et germination des graines des dicotylédones

Le développement des graines des dicotylédones est séparé en plusieurs étapes successives, que nous allons décrire dans cette partie. C'est au cours de celui-ci que la graine acquiert sa qualité germinative, c'est-à-dire l'ensemble des propriétés physiologiques permettant à un lot de graines de germer et de lever de façon uniforme, ainsi que de tolérer la dessiccation et à se conserver dans le temps. Nous verrons également les mécanismes instaurant la dormance et sa levée, ainsi que les principes de la germination. Cette étape de maturation de la graine est cruciale pour sa qualité initiale, permettant par la suite une bonne implantation en champ.

1.1.1 Les phases du développement

Les graines sont issues de la double fécondation du sac embryonnaire maternel par le pollen mâle : le premier noyau mâle du pollen féconde l'oosphère et donne l'embryon (2n), tandis que le second féconde les deux noyaux polaires de la cellule centrale pour donner l'albumen (3n). La graine est entourée par un tissu d'origine maternel (2n), le tégument. Les graines de *M. truncatula* et d'*A. thaliana* sont dites exalbuminées, leur albumen dégénère au cours du développement pour ne laisser qu'une unique couche cellulaire à maturité. Chez ces deux espèces, les réserves protéiques et lipidiques se trouvent dans les cotylédons et dans l'axe embryonnaire. Bien que réduit à une assise cellulaire, l'albumen présente une différenciation fonctionnelle (albumen micropylaire, chalazal et périphérique) importante pour le développement de la graine et la germination.

Le développement de la graine exalbuminée est divisé en deux phases principales: l'embryogénèse et la maturation. L'embryogénèse est caractérisée par une phase de divisions cellulaires après la fécondation. C'est une période d'histo-différenciation au cours de laquelle l'embryon acquière ses plans apex-base et radial, ainsi que ses méristèmes fondamentaux alors que l'albumen augmente en taille.

Le début de la maturation est marqué par la fin des divisions cellulaires et un allongement cellulaire important, participant à l'importante augmentation du poids sec, aux dépends de l'albumen. Chez *M. truncatula*, le poids sec augmente pendant 30 jours après pollinisation environ puis se stabilise (Figure 1.1). Il s'ensuit une longue phase de 24 jours

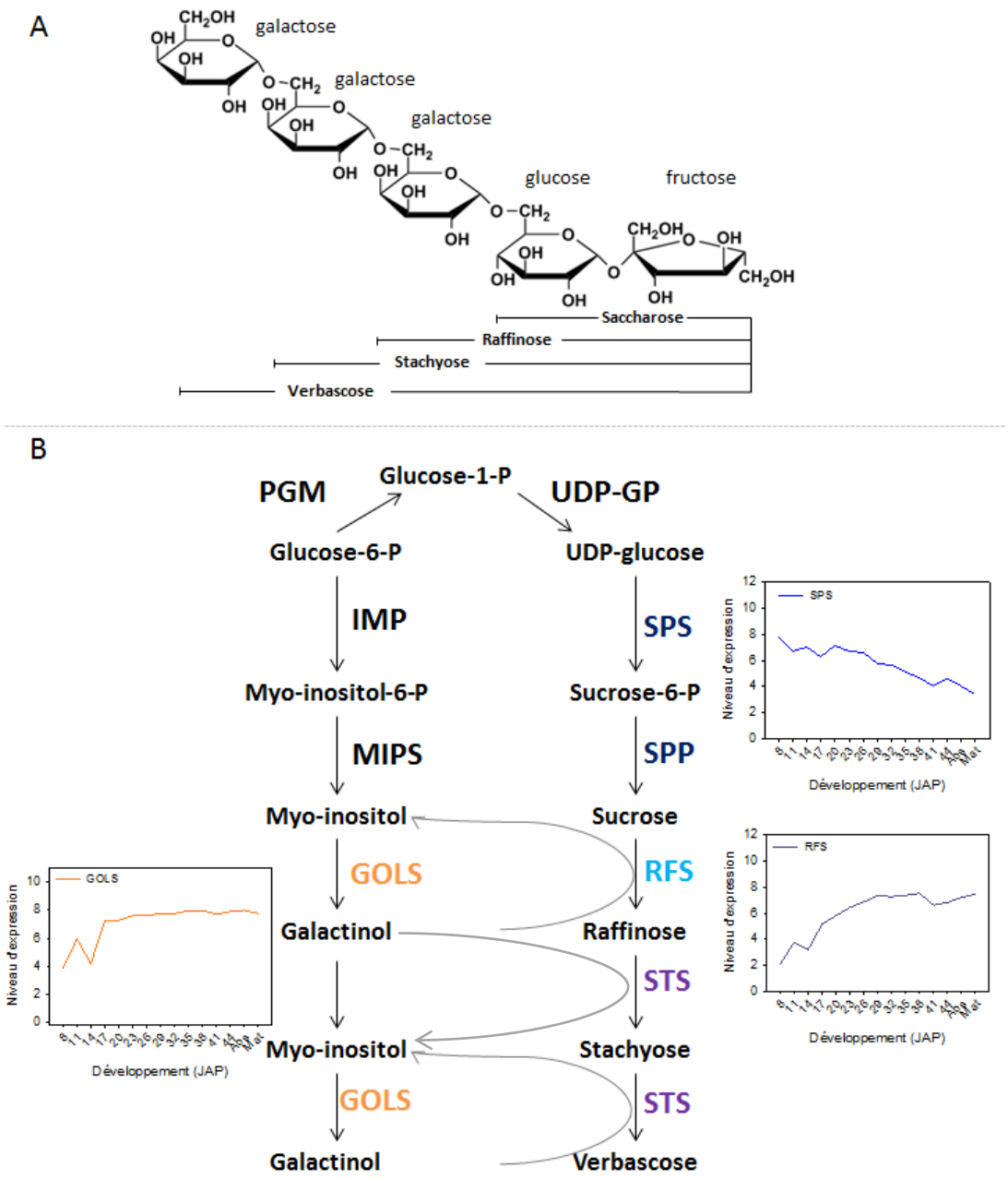


Figure 1.3 : Structure, voie de biosynthèse et profils d'expression des gènes codant les enzymes de synthèse des oligosaccharides de la famille du raffinose (RFO) chez *M. truncatula*. A, structure des RFOs. Ils sont formés par ajout de résidus galactose sur un saccharose. B, Voie de biosynthèse des RFOs. Les profils d'expression représentent le profil d'expression type pour les gènes listés en Annexe codant les enzymes de synthèse des RFOs. PGM = phosphoglucomutase ; UDP-GP = UDP-glucose pyrophosphorylase ; SPS = saccharose phosphate synthase ; SPP = saccharose phosphate phosphorylase ; RFS = raffinose synthase ; STS = stachyose synthase ; IMP =myo-inositol monophosphatase ; MIPS = myo-inositol phosphate synthase ; GOLS = galactinol synthase. D'après Nishizawa et al., (2008); Verdier et al., (2013).

jusqu'à l'abscission pendant laquelle la graine va se dessécher (Figure 1.1). Chez *A. thaliana*, le poids sec augmente pratiquement jusqu'à l'abscission de la graine, correspondant à un dépôt des substances de réserve. Chez *M. truncatula,* elles sont principalement d'origine protéique, sous forme de vicilines, de convicilines et de légumines. Ainsi, une graine mature contient entre 35 et 51% du poids sec de protéines, 10% de lipides, 10% d'oligosaccharides (Djemel *et al*., 2005, Figure 1.2). Par comparaison, une graine mature d'*A. thaliana* est composée en moyenne de 38% de lipides (O'Neill *et al*., 2003), de 40% de protéines de stockage (SSPs, Figure 1.2). Alors que les teneurs des sucres de la famille des raffinoses (RFO) représentent respectivement 8 et 0,5% des teneurs totales dans les graines matures de *M. truncatula* et d'*A. thaliana* (Figure 1.2, Baud *et al*., 2002; Gallardo *et al*., 2006). La structure des RFOs (raffinose, stachyose et verbascose) est présentée en Figure 1.3. Ils sont synthétisés par l'ajout successif d'une unité galactinol au saccharose, formant un triholoside, le raffinose, puis au raffinose, formant le stachyose (tétraholoside), et enfin au stachyose, formant le verbascose. Cet ajout d'unités de galactose est réalisé successivement par la galactinol synthase, raffinose synthase et stachyose synthase (voir pour revue : Peterbauer *et al*., 2001, Figure 1.3). L'analyse transcriptomique du développement de la graine de *M. truncatula* écotype Jemalong montre que la quantité de transcrits des gènes codant les STACHYOSE SYNTHASE (STS) et RAFFINOSE SYNTHASE (RFS) augmente à partir de 14 JAP (Jours Après Pollinisation), jusqu'à l'abscission, alors que les quantités de transcrits codant les SACCHAROSE PHOSPHATE SYNTHASE (SPS) diminuent (Figure 1.3, Verdier *et al*., 2013). Les mécanismes régulant l'acquisition des RFOs dans les graines restent encore méconnus. Il existe une corrélation positive entre l'activité de l'enzyme GOLs et l'accumulation de RFO dans les feuilles, et négative avec les teneurs en saccharose, suggérant que cette enzyme est l'enzyme clef régulant l'accumulation des RFOs (Keller and Pharr, 1996). La fin de la maturation se caractérise également par la dessiccation de la graine qui amène sa teneur en eau à 0.6 g H_2O/g de matière sèche lors de l'abscission. Après l'abscission, la teneur en eau de la graine s'équilibre à environ 0.1 g H_2O/g de matière sèche avec les conditions d'humidité relative (HR) et de température de 60% et de 20-30°C (Chatelain *et al*., 2012).

Sur le plan physiologique, la maturation va permettre à la graine de se doter de mécanismes lui permettant d'achever le cycle de la plante et d'assurer la dissémination de l'espèce. Ainsi, la capacité germinative et la tolérance à la dessiccation sont acquises pendant

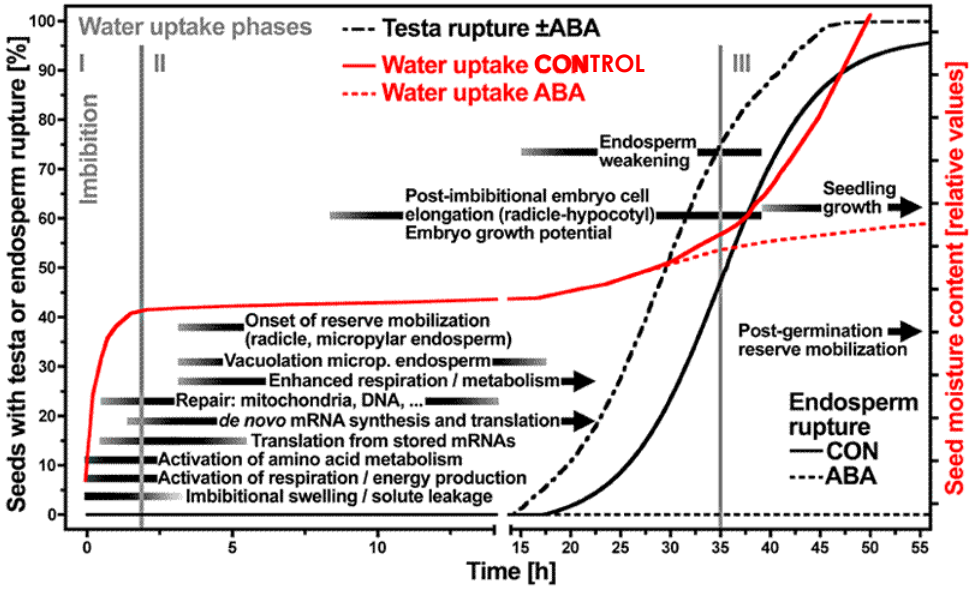


Figure 1.4 : Evénements cytologiques et biochimiques intervenant au cours des trois phases de la germination chez les graines endospermiques. Trois phases caractérisent la germination de la graine. L'imbibition de la graine en phase I est marquée par une prise en eau progressive (ligne rouge). Puis la phase II marque un arrêt de la prise en eau, elle conduit à la percée de la radicule. Enfin, en phase III, les cellules de la radicule s'allongent et la prise en eau reprend. CONTROL, rupture du testa et de l'endosperme sans hormone, ABA, en présence d'ABA. D'après Weitbrecht *et al*., (2011).

la phase de remplissage. La dormance est ensuite mise en place, la graine perd sa chlorophylle et la longévité s'acquière progressivement (Figure 1.1). Ces processus déterminent la qualité physiologique de la graine mature et sont mis en place de façon séquentielle, comme le montre la Figure 1.1. Dans la suite de ce travail, sections 1.1.2 à 1.1.6, nous allons détailler les étapes de la mise en place de ces processus.

1.1.2 Germination

La germination est l'ensemble des processus depuis l'imbibition de la graine conduisant à la percée de la radicule hors des téguments (Bewley, 1997). Chez *M. truncatula*, la capacité germinative est acquise tôt au cours du développement de la graine, à la fin de l'embryogénèse autour de 14 JAP (Buitink *et al*., 2006). Le processus de germination est séparé en trois phases suivant l'absorption de l'eau par la graine (Figure 1.4): La phase I représente l'absorption rapide et passive de l'eau dans les tissus. Cette phase est suivie par une phase de plateau (phase II) au cours de laquelle la teneur en eau reste constante. Elle s'accompagne d'une reprise de la respiration de la graine et du métabolisme de la graine (Bewley, 1997). Chez *A. thaliana*, la germination repose sur la traduction des ARNm synthétisés pendant la maturation et stockés dans la graine sèche (Rajjou *et al*., 2004). La néo-synthèse d'ARNm démarre progressivement en phase II. A la fin de la phase II, la radicule perce les téguments de la graine et la germination *sensus stricto* est terminée, permettant ainsi l'initiation de la croissance des organes en phase III et la captation de l'eau par la plantule.

1.1.3 Acquisition de la tolérance à la dessiccation

La tolérance à la dessiccation est définie comme étant la capacité d'un organisme à survivre à un retrait total de l'eau intracellulaire (Crowe *et al*., 1992). Chez les plantes, cette capacité à tolérer la dessiccation et retrouvée chez les plantes reviviscentes, le pollen, mais aussi la graine. Elle est nécessaire pour permettre le stockage des graines à l'état sec. La tolérance à la dessiccation est mesurée par la capacité de la graine à germer lors de la réhydratation après un séchage rapide à une teneur en eau équivalente à celle des graines matures (8-10%). Chez *M. truncatula* et *A. thaliana*, la tolérance à la dessiccation est rapidement acquise au milieu du développement (Figure 1.1). Elle est réalisée avant la phase

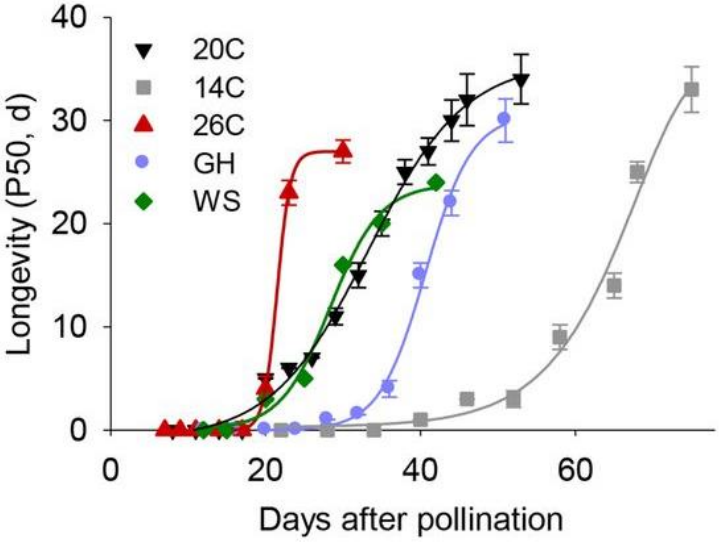


Figure 1.5 : Acquisition de la longévité au cours du développement de la graine de *M. truncatula* (A17) dans différentes conditions environnementales. Températures de culture des plantes-mères : 20C, Conditions standards (20°C/18°C, 16-h photopériode, d'après Verdier *et al.*, (2013)), 26C, Forte température (24°C/26°C, 16-h photopériode), 14C, faibles températures (14°C/11°C, 16-h photopériode), Ws, Stress osmotique (potentiel osmotique de l'eau du sol maintenu à -0,1 MPa) et GH, Plantes cultivées en serre (température de 16 à 30°C, photopériode variable). P_{50}, temps de vieillissement nécessaire à l'obtention d'un taux de germination de 50%. D'après Righetti *et al*., (2015).

de dessiccation et bien avant l'abscission, qui intervient vers 40-44 DAP chez *M. truncatula*.

1.1.4 Acquisition de la longévité

La longévité est définie comme étant l'aptitude d'un lot de graines à être conservé à l'état sec sans perdre leur viabilité ou de leur vigueur germinative. Elle présente des enjeux importants dans la préservation des ressources génétiques dans les banques de graines et pour les entreprises semencières. La longévité est fonction des conditions de stockage, principalement la température, l'humidité relative des graines et la pression partielle oxygène dans l'espace de stockage, ces trois facteurs étant intimement liés (Ellis *et al*., 1988). De manière opérationnelle, la longévité d'un lot de semences est exprimée en P_{50}, correspondant au temps nécessaire pour obtenir 50% de germination du lot après stockage (Ellis, 1991). Etant donné l'extrême longévité des graines orthodoxes à l'état sec, certaines d'entre elles comme celles de lotus retrouvées sur des sites archéologiques datant de plus de 2000 ans étant toujours capables de germer (Shen-Miller *et al*., 1995), des tests appelés « vieillissement accéléré » et « détérioration contrôlée » sont utilisés en laboratoire. Ils consistent à mesurer la perte de viabilité lorsque les graines imbibées sont incubées à une gamme de température supérieures à 40°C (Delouche and Caldwell, 1960). Cependant, il s'avère que ces tests ne sont pas de bons prédicteurs de longévité dans des conditions ambiantes. L'expérience acquise dans notre laboratoire a démontré que le stockage des graines à 35°C, 75% d'humidité relative constitue un bon compromis entre des conditions suffisamment délétères pour mesurer la perte de longévité sur une période de plusieurs semaines et celles correspondant à des conditions ambiantes (20°C/ 45-65% HR) pour lesquelles la perte de longévité s'étale sur plusieurs années.

Outre les conditions de stockage, la longévité dépend de la maturité à la récolte (Ellis *et al*., 1993), de l'espèce (Probert *et al*., 2009) et du génotype (Clerkx, 2004; Sugliani *et al*., 2009, Nguyen *et al*., 2012), suggérant que des facteurs génétiques sont impliqués. Chez *M. truncatula*, la longévité est acquise en fin de maturation de la graine, entre 28 et 44 JAP, c'est-à-dire après le remplissage. Elle est maximale à 40 DAP et diminue légèrement jusqu'à 44 DAP (Chatelain *et al*., 2012 ; Figure 1.1). Chez *A. thaliana*, elle est acquise progressivement pendant le remplissage des graines entre 14 et 20 JAP (Righetti *et al*., 2015; Figure 1.1). Les conditions de culture de la plante mère avant et pendant le développement de la graine influencent également la longévité (Nagel *et al*., 2015). Par exemple, chez *M.*

truncatula, des températures élevées ou un stress hydrique (-1 MPa) pendant le développement de la graine impactent positivement ou négativement le profil d'acquisition de la longévité (Righetti *et al*., 2015). La Figure 1.5 montre que la longévité est acquise plus rapidement et plus tôt pour les graines issues des plantes poussées en conditions de chaleur (26°C) que pour les plantes mères cultivées au froid (14°C).

1.1.5 Perte de la chlorophylle

Chez les graines de légumineuses comme *M. truncatula* et le pois, ainsi que chez les graines d'*A. thaliana*, l'embryon est photosynthétiquement actif pendant le développement. Cette capacité photosynthétique des graines soulève la question de son rôle au cours du développement. La photosynthèse permettrait de fournir l'ATP, le NADPH et l'O_2 qui favorisent la synthèse des réserves (Borisjuk *et al*., 2003). Il a ainsi été montré chez l'orge par analyse des teneurs en amidon et par mesures des gradients d'ATP et d'O_2 que la plus forte accumulation d'amidon est réalisée dans les tissus de la graine les plus actifs (Rolletschek *et al*., 2004). De plus, des analyses biochimiques de graines conduites à la lumière ou à l'obscurité montrent que l'accumulation des acides gras est augmentée dans les graines vertes de colza placées à la lumière (Ruuska *et al*., 2004), et, chez le soja, que l'accumulation de lipides est facilitée pour les graines photosynthétiques (Rolletschek *et al*., 2005), potentiellement sous l'effet de l'augmentation de l'efficacité de l'utilisation du carbone par la Rubisco (Schwender et al., 2004). En plus de fournir l'ATP et l'O_2 pour la synthèse des réserves, la photosynthèse des graines influe sur la qualité germinative. En effet, il a récemment été montré qu'en bloquant la photosynthèse des graines en inhibant le fonctionnement du photosystème II (PSII) par un traitement au DCMU 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea des siliques au cours du développement, les graines matures ont une moins bonne qualité germinative (Allorent *et al*., 2015).

Cette capacité photosynthétique est perdue au cours de la maturation et de la dessiccation (Allorent *et al*., 2015; Chatelain *et al*., 2012). C'est également lors de la perte de l'activité photosynthétique des graines que les chloroplastes se dédifférencient en éoplastes ou en amyloplastes (Borisjuk *et al*., 2005). Les mécanismes permettant cette perte de la chlorophylle restent encore méconnus dans les graines (Teixeira *et al*., 2016). Cependant, les mécanismes de perte de la chlorophylle des feuilles lors de la sénescence sont bien documentés. Afin de pouvoir effectuer un parallèle entre la perte de l'activité photosynhtétique des feuilles et des graines, ceux-ci seront exposés en sections 1.4. La qualité

germinative des graines matures est inversement corrélée aux teneurs en chlorophylles, ainsi la présence de chlorophylle dans les graines entraîne une moins bonne vigueur et longévité. Celle-ci est rapidement mesurée par fluorescence, et cette corrélation est utilisée en production de semences pour évaluer la qualité germinative des lots (Jalink *et al*., 1998). Cependant, la relation entre la longévité et la mesure par fluorescence de la chlorophylle ne s'applique pas à toutes les variétés ni à tous les génotypes, comme illustré chez le riz pour lequel cette relation n'est pas retrouvée parmi les variétés testées (Hay *et al*., 2015). Tandis que les mécanismes liant teneurs en chlorophylle et longévité des graines restent à élucider, l'étude de la régulation de leur accumulation, notamment par l'étude de la voie de l'ABA, pourrait l'expliciter. En effet, l'apport exogène d'ABA dans des embryons photosynthétiques de haricot provoque une perte de chlorophylle (Medford and Sussex, 1989).

1.1.6 Dormance

La dormance est définie comme étant l'inaptitude d'une graine à germer dans des conditions favorables (Bewley and Black, 1997). Cependant, les travaux menés ces 10 dernières années tendent à nuancer cette définition car la dormance ne peut simplement être associée à un blocage temporaire de la germination, voir la revue de Finch-Savage and Leubner-Metzger, (2006). En effet, la dormance des graines se définit également comme un état physiologique de la graine déterminant la fenêtre de conditions environnementales permettant sa germination. Il existe différent types de dormance, classés par Baskin and Baskin (2004), incluant les dormances tégumentaires, physiologiques, morphologiques et morpho-physiologiques. Chez *M. truncatula*, les dormances physiologique et tégumentaire coexistent et sont mises en place lors du développement de la graine, vers 32 JAP (Bolingue *et al*., 2010). La dormance tégumentaire est levée mécaniquement, par scarification, tandis que la dormance physiologique est progressivement levée par une période de post-maturation à sec. Chez *M. truncatula*, la post-maturation dure entre quelques jours à 3 mois selon les génotypes (Bolingue *et al*., 2010). La dormance peut être levée par une période de stratification en incubant les graines à 4°C lors de l'imbibition.

La dormance est sous le contrôle de la balance hormonale en ABA/GA, de l'éthylène (Corbineau *et al*., 1990; Hilhorst and Karssen, 1992; Linkies and Leubner-Metzger, 2011),

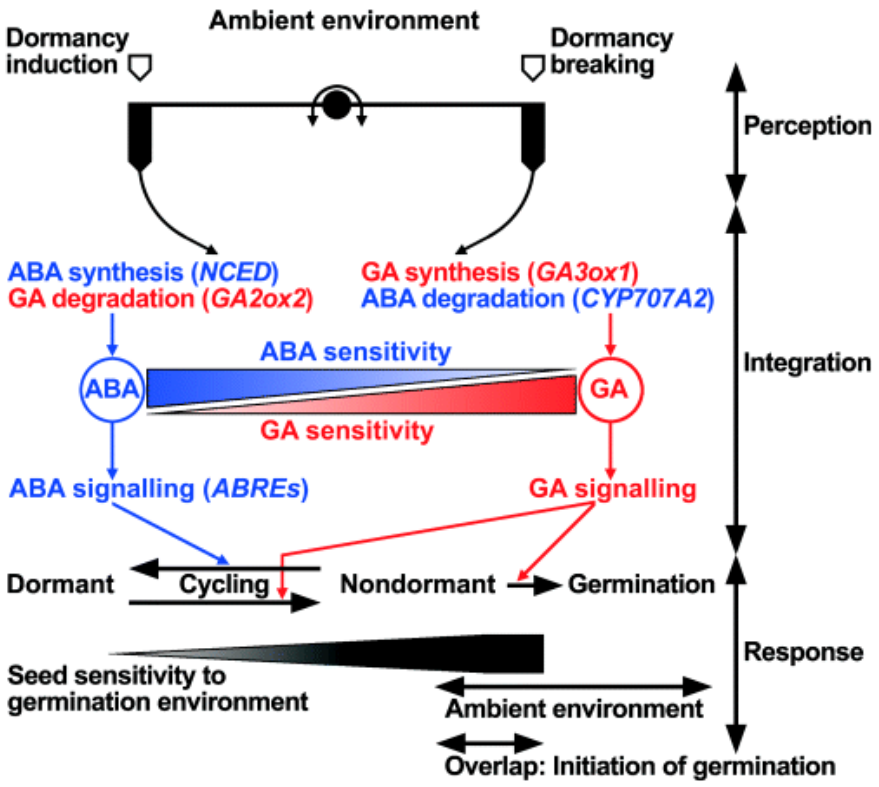


Figure 1.6 : Modèle de régulation de la dormance par les GAs et l'ABA en réponse à l'environnement, basé sur les données obtenues chez *A. thaliana.* Les facteurs de l'environnement contrôlent le ratio GAs/ABA et la sensibilité de la graine à ces hormones. La synthèse et l'activation des voies de signalisation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

des brassinostéroïdes et de l'acide 12-oxo-phytodienoic (OPDA), un précurseur de l'acide jasmonique (Dave *et al*., 2011). Ces régulateurs de croissance contrôlent un réseau de régulation complexe, voir la revue de Kucera *et al*., (2005).

La synthèse de l'ABA joue un rôle majeur dans l'établissement et le maintien de la dormance des graines. Au cours du développement des graines, l'ABA produit par les tissus maternels s'accumule fortement lors de la maturation et active le stockage des réserves, tandis que l'ABA synthétisé plus tardivement par les tissus embryonnaires induit la dormance et la tolérance à la dessiccation. Ce rôle de l'ABA néosynthétisé dans l'induction de la dormance a été mis en évidence par l'étude des gènes 9-cis époxi-caroténoïde dioxygénase (NCED) dont l'expression, à la fois dans l'embryon et l'albumen, contribue à l'induction de la dormance chez *A. thaliana* (Lefebvre *et al*., 2006). Ainsi, l'inhibition de la synthèse de l'ABA par la fluoridone au cours de l'imbibition induit la germination de graines dormantes chez le tabac (Grappin *et al*., 2000). De la même façon, chez *A. thaliana*, les mutants déficients dans les gènes codant la dégradation de l'ABA présentent une dormance plus profonde que les graines sauvages (Nambara and Marion-Poll, 2003; Okamoto *et al*., 2006).

A l'inverse, la synthèse des acides gibbérelliques (GAs) (et par extension la diminution du ratio ABA/GAs), favorise la germination (Cadman *et al*., 2006), en induisant notamment les gènes responsables de l'augmentation du potentiel de croissance de l'embryon et en éliminant les contraintes mécaniques imposées par les structures tégumentaires autour de la pointe radiculaire par la synthèse d'hydrolases pariétales (Groot and Karssen, 1987). Outre les teneurs en ABA et GA, la sensibilité à ces régulateurs de croissance joue également un rôle capital dans la régulation de la dormance (Figure 1.6). La levée de dormance s'accompagne d'une diminution de la sensibilité à l'ABA et d'une augmentation de la sensibilité au GA, revu par Finch-Savage and Leubner-Metzger, (2006). Chez *A. thaliana*, les phénotypes des mutants insensibles à l'ABA démontrent que les acteurs de la signalisation allant d'ABI1 à ABI5 sont impliqués dans la dormance et la germination. En effet, des études transcriptomiques ont montré que le niveau d'expression de ces gènes est associé à l'induction et la levée de dormance chez *A. thaliana*, accession Cvi (Nakabayashi *et al*., 2005; Cadman *et al*., 2006). De plus, le transcriptome des graines dormantes est caractérisé par une sur-représentation d'éléments ABRE (ABA-responsive elements) dans les promoteurs des gènes dont les transcrits sont stockés dans les graines sèches.

1.2 La régulation transcriptionnelle de la maturation

L'isolement et la caractérisation de mutants d'*A. thaliana* n'entrant pas en maturation ou présentant des phénotypes de viviparité et/ou de sensibilité à la dessiccation ont permis de mettre en évidence cinq régulateurs majeurs de la maturation des graines, à savoir LEAFY COTYLEDON1 (LEC1), LEC2, LEC1-LIKE (L1L), FUSCA3 (FUS3) et ABA INSENSITIVE3 (ABI3). LEC1 joue un rôle également dans l'embryogenèse tandis que les autres sont uniquement confinés à la maturation. Leur rôle sera décrit ci-dessous à la lumière de leur implication dans la qualité germinative des graines, en particulier la survie à l'état sec, la dormance ainsi que dans la dégradation de la chlorophylle, un marqueur emblématique de la maturation tardive. Ils sont également impliqués dans le remplissage des graines et dans l'identité des cotylédons mais ces fonctions ne seront pas décrites ici, voir pour revues Gutierrez *et al*., (2007); Santos-Mendoza *et al*., (2008); Agarwal *et al*., (2011).

En marge de ces facteurs de transcription, un certain nombre de régulateurs complémentaires ont été identifiés en lien avec la qualité germinative mais leurs rôles restent mal compris. Il s'agit des acteurs de la voie de signalisation de l'ABA incluant ABI4 (Finkelstein *et al*., 1998; Dekkers *et al*., 2016) et ABI5 (Lopez-Molina and Chua, 2000), des facteurs de transcription de la famille des ABA RESPONSE ELEMENT BINDING FACTOR (AREB) et ABA-RESPONSIVE PROMOTER ELEMENTS BINDING FACTORS (ABFs) (Finkelstein and Lynch, 2000; Jakoby *et al*., 2002; Yoshida *et al*., 2010; Fujita *et al*., 2011; Wang *et al*., 2015), de facteurs de transcription de la famille des Heat Shock Factor (HSF) comme HSFA9 (Prieto-Dapena *et al*., 2008), et des gènes impliqués dans la réponse au stress biotique, tel que WRKY3 (Righetti *et al*., 2015). Chez *M. truncatula*, l'ensemble de ces gènes a été retrouvé comme étant co-exprimé dans le réseau génique régulant la longévité pendant la maturation (Righetti *et al*., 2015). Des études moléculaires et génétiques ont également montré que ces gènes interagissent entre eux de manière redondante, synergétique ou antagoniste. Ces aspects seront abordés brièvement ci-dessous. Enfin, il existe d'autres mécanismes de régulation de la maturation, tels que des processus post-transcriptionnels, post-traductionnels, des phénomènes épigénétiques de remodelage de la chromatine (Liao *et al*., 2016). Ces processus peuvent impacter les régulateurs maîtres en inhibant leur transcription, activant leur dégradation, ou produisant des variants d'épissage (Perruc *et al*., 2007; Suzuki *et al*., 2007; Sugliani *et al*., 2010).

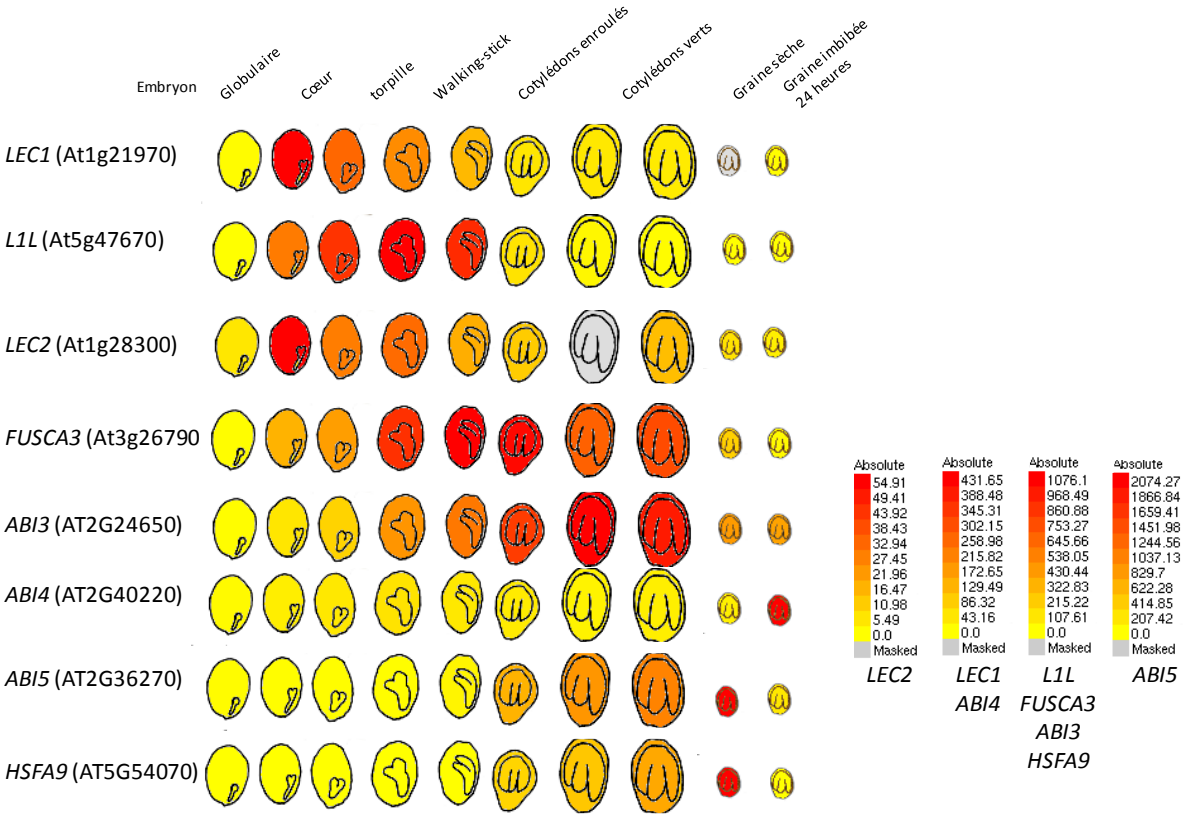


Figure 1.7 : Profils d'expression des gènes régulateurs majeurs (*LEC1, L1L, LEC2, FUSCA3* et *ABI3*) et des autres facteurs de régulation impliqués dans le développement de la graine (*ABI4, ABI5* et *HSFA9*) chez *A. thaliana*. D'après efpbrowser [3].

1.2.1 LEC1, L1L, LEC2 et FUSCA3

LEC1 est exprimé au cours de l'embryogénèse de la graine, et son expression est éteinte lors de la maturation, tandis que *LEC2* et *FUSCA3* sont en plus exprimés lors de la maturation de la graine (Lotan *et al*., 1998; Stone *et al*., 2001; Figure 1.7). Outre leurs rôles dans l'embryogénèse, le maintien de l'identité des cotylédons et le remplissage des graines dont nous ne parlerons pas ici, ces facteurs de transcription interviennent dans la régulation des évènements de la maturation. L'étude des mutants a permis de révéler leur rôle dans l'acquisition de la tolérance à la dessiccation, l'accumulation des anthocyanines, la perte de la chlorophylle et la dormance (Keith *et al*., 1994; Meinke *et al*., 1994; Parcy *et al*., 1994). Les mutants *lec2* d'*A. thaliana* présentent une plus faible accumulation d'anthocyanines et à une légère baisse de la longévité des graines (Meinke *et al*., 1994; Stone *et al*., 2001). Les analyses réalisées sur les triple mutants *lec1 lec2 fusca3* identifient des rôles redondants et synergiques de ces trois protéines selon le stade de développement et le tissu étudié (To *et al*., 2006).

1.2.2 Signalisation par l'ABA

1.2.2.1 Le facteur de transcription ABI3

ABI3 est un facteur de transcription appartenant à la famille des facteurs de transcription au motif de fixation à l'ADN B3 (Giraudat *et al*., 1992). L'analyse des séquences des acides aminés et des études de mutants ont révélé plusieurs domaines fonctionnels à la protéine ABI3 : le motif A1, B1, B2 et B3. Le motif B3 permet la fixation au motif conservé RY/Sph (CATGCA) présent dans le promoteur des gènes cibles (Romanel *et al*., 2009). Ce motif est commun à LEC2 et FUSCA3 (Stone *et al*., 2001; Mönke *et al*., 2004). *ABI3* est préférentiellement exprimé dans les graines. Chez *A. thaliana*, il est exprimé plus fortement à partir du stade torpille lors de l'embryogénèse (Figure 1.7) et est faiblement exprimé à d'autres stades du cycle de la plante, comme dans les racines en développement (Brady *et al*., 2003).

Les orthologues d'*ABI3* d'*A. thaliana* ont été identifiés par clonage chez plusieurs espèces, le cèdre, le peuplier, le maïs et *M. truncatula* (McCarty *et al*., 1989; Rohde *et al*.,

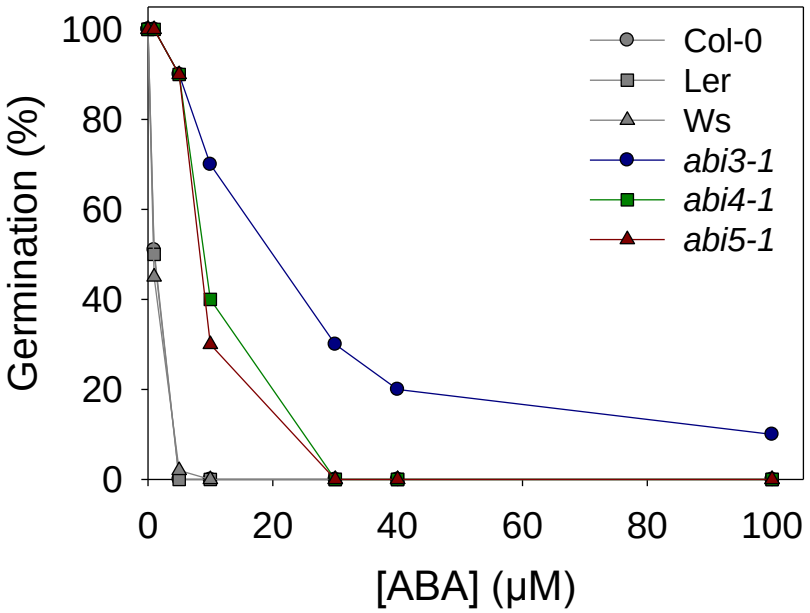


Figure 1.8 : Sensibilité à l'ABA des mutants *abi3-1*, *abi4-1* et *abi5-1* d'*A. thaliana*. Le mutant *abi3-1* est dans le fond génétique Landsberg erecta (Ler), *abi4-1* Col-0 et *abi5-1* Wassilewskija (Ws). D'après Finkelstein *et al*., (1994).

1998; Kurup *et al*., 2000; Lazarova *et al*., 2002; Delahaie *et al*., 2013). L'étude des mutants *abi3* chez *A. thaliana* et *M. truncatula* a permis de caractériser son rôle dans le développement de la graine. Ces études décrivent plusieurs allèles comme étant plus ou moins forts, car les phénotypes sont plus ou moins sévères selon la mutation. Ainsi, le mutant *abi3-5* d'*A. thaliana*, aboutissant à la délétion d'un nucléotide et à la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle (Bies-Etheve *et al*., 1999), est considéré, avec *abi3-3* (Nambara *et al*., 1992) et *abi3-4* (Ooms *et al*., 1993), comme un mutant à phénotype sévère. A l'inverse, le mutant *abi3-1* est décrit comme étant à phénotype faible (Koornneef *et al*., 1984).

L'étude des phénotypes des mutants *abi3* montre que les graines sont fortement insensibles à l'ABA (Figure 1.8), ne sont pas tolérantes à la dessiccation et ne sont pas dormantes. De plus, les graines du mutant *abi3-5* contiennent plus de saccharose et moins de RFO (Nambara *et al*., 1992; Ooms *et al*., 1993). Enfin, les graines des mutants à phénotypes sévères *abi3* accumulent moins de transcrits codant les protéines Seed Storage Protein (SSP) et les Late Embryogenesis Abundant (LEA), notamment EM1 et EM6 (Nambara *et al*., 1992; Parcy *et al*., 1994). Les graines du mutant allélique faible *abi3-1* sont bien insensibles à l'ABA, mais ont une dormance intermédiaire entre les graines de type sauvage et celles des allèles forts *abi3-4* et *abi3-5*. Elles sont aussi brunes à maturité (Bies-Etheve *et al*., 1999).

ABI3 agit seul mais aussi en synergie ou en formant des hétérodimères avec d'autres facteurs de transcription dans la régulation des gènes cibles, il fait partie d'un réseau de régulation complexe de la maturation. En effet, Nakamura *et al*., (2001) ont montré par étude d'interaction de protéines que le domaine B1 interagirait spécifiquement avec ABI5, sans toutefois que l'équipe de Lopez-Molina *et al*., (2002) ne puisse le reproduire. Chez *A. thaliana*, ABI3 régule HSFA9 (Kotak *et al*., 2007). Enfin, chez le tournesol, ABI3 active l'expression du gène codant *HSP17.7* en synergie avec le facteur de transcription HSFA1 (Rojas *et al*., 1999). Pour finir, nous verrons en section 1.4, partie portant sur la photosynthèse, le rôle d'ABI3 dans la régulation de la perte de la chlorophylle des graines d'*A. thaliana*.

1.2.2.2 Le facteur de transcription ABI4

ABI4 appartient au sous-groupe DREBA3 de la grande famille des facteurs de transcription de type APETALA2/EREBP (Finkelstein *et al*., 1998). La famille des facteurs de transcription APETALA2 est formée de 138 gènes chez *A. thaliana*, d'après la base de données TAIR, tandis que cette famille contient respectivement 405 et 113 membres chez

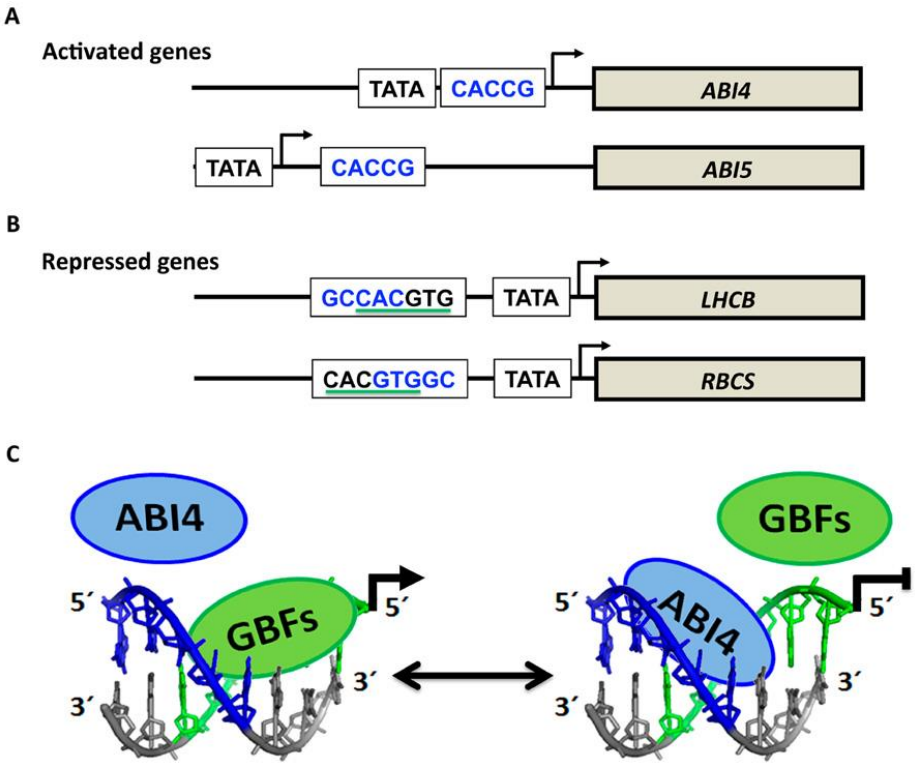


Figure 1.9 : Modèle de reconnaissance des éléments *cis* régulateurs par les facteurs de transcription ABI4 et GBF. A, Les gènes dont l'expression est activée par ABI4 présentent le motif CE1-like CACCG (en bleu) dans leur séquence promotrice. Ici, l'activation de la transcription *d'ABI4* par ABI4. B, A l'inverse, les gènes cibles inhibés par ABI4 présentent le motif CE1-like inversé associé au motif GBOX (bZIP GBOX BINDING FACTOR) (souligné en vert). C, Modèle expliquant la compétition pour les sites de fixation entre ABI4 et des facteurs de transcription de type GBFs. D'après León *et al*., (2013).

le soja et chez *M. truncatula* (d'après la base de données des légumineuses, legume TFD [4]). Les facteurs de transcription appartenant à cette famille participent à la régulation florale, à la maturation de la graine et au développement végétatif (Okamuro *et al*., 1997).

ABI4 a été cloné puis étudié chez *A. thaliana* (Finkelstein, 1994a), puis sur d'autres espèces telles que le maïs (Niu *et al*., 2002) et le sorgho (Cantoro *et al*., 2013). Ce facteur de transcription est conservé parmi les espèces. En effet, il est possible de complémenter le mutant *abi4-1* d'*A. thaliana* par le gène *ZmABI4* du maïs (Niu *et al*., 2002). La sensibilité à l'ABA des mutants *abi4* d'*A. thaliana* a été identifiée (Figure 1.8). Ainsi, le mutant *abi4-1* présente une plus forte insensibilité que le mutant *abi5-1* mais une moins forte insensibilité comparée à *abi3* (Finkelstein *et al*., 1998 ; Figure 1.8).

ABI4 est faiblement exprimé dans les parties végétatives (Shkolnik-Inbar and Bar-Zvi, 2010), au cours de la floraison (Shu *et al*., 2016), mais son expression est plus importante dans la graine sèche (Penfield *et al*., 2006) et lors de la germination (Söderman *et al*., 2000). La LIPID PHOSPHATE PHOSPHATASE (LPP2) régule négativement la transcription de *ABI4* (Katagiri *et al*., 2005). En plus du contrôle transcriptionnel, l'accumulation d'ABI4 est régulée de manière post-transcriptionnelle par des mécanismes encore à déterminer qui impliqueraient la voie de la dégradation des protéasomes (Finkelstein *et al*., 2011).

Deux domaines conservés sont retrouvés dans la séquence protéique d'ABI4. Le domaine AP2 et la séquence LRPLLPRP (Gregorio *et al*., 2014). Le domaine AP2 est composé de deux feuillets β et d'une hélice α (Yamasaki *et al*., 2013) reconnaissant les motifs CE1 (CACC(G)) présents dans les promoteurs des gènes cibles (Niu *et al*., 2002; Bossi *et al*., 2009; Giraud *et al*., 2009; Reeves *et al*., 2011; León *et al*., 2013). La fixation d'ABI4 aux motifs CE1 seuls est à nuancer car d'autres séquences promotrices ont été mises en évidence comme étant des sites de fixation (Reeves *et al*., 2011). Par ailleurs, des expériences de simple hybride ont permis d'établir une hypothèse selon laquelle ABI4, en se fixant au motif CE1, entraînerait le blocage de la fixation d'autres facteurs de transcription comme ABI5 et HY5 au motif G-Box (CACGTG) dans les promoteurs de gènes cibles (Acevedo-Hernández *et al*., 2005; Koussevitzky *et al*., 2007). La Figure 1.9 illustre cette compétition de fixation des facteurs de transcription.

L'identification du rôle d'ABI4 au cours de la maturation de la graine est possible grâce aux études des mutants *abi4*. Tout d'abord, le mutant *abi4-1* d'*A. thaliana* montre que les graines sont moins dormantes, conjointement avec une plus faible teneur en ABA et une plus forte teneur en GA dans les graines sèches (Shu *et al*., 2013). Cette différence en teneur en ABA est liée au fait que les gènes *CYP707A1* et

CYP707A2, codant l'enzyme ABA 8' HYDROXYLASE responsable de la dégradation de l'ABA, sont des cibles directes d'ABI4 (Okamoto, 2006; Shu *et al*., 2013). Une analyse des teneurs en polypeptides EM6 réalisée par Finkelstein *et al.,* (1994b) montre que les teneurs en EM6 sont réduites dans les graines sèches matures *abi4-1*. De plus, dans les plantules de mutants, ABI4 active la transcription de gènes liés à la maturation de la graine et inhibe l'expression des gènes en lien avec la photosynthèse (Reeves *et al*., 2011). La sur-expression d'*ABI4* dans les graines sèches d'*A. thaliana* conduit à une diminution de la teneur en caroténoïdes, notamment en β-carotène, une augmentation en violaxanthines et une modification de l'accumulation des flavonoïdes (Yu *et al*., 2016). Par expériences de simple hybride, il a été démontré qu'ABI4 se lie au promoteur de *DIACYLGLYCEROL ACYL TRANSFERASE* (*DGAT1*) responsable de la formation des triacylglycérols (Yang *et al*., 2011; Kong *et al*., 2013). En parallèle, l'accumulation de l'acide éicosénoique est plus faible dans les embryons des mutants *abi4-1* en présence d'ABA (Penfield *et al*., 2006). Enfin, ABI4 est également connu pour son rôle dans le système rétrograde au cours du verdissement des plantules (Xu *et al*., 2015), rôle que nous détaillerons plus en détail dans la section 1.4.

1.2.2.3 Le facteur de transcription ABI5

Les premières études sur ABI5, à l'instar d'ABI3 et ABI4, portent sur *A. thaliana* (Finkelstein, 1994b). Son étude a été étendue à différentes espèces cultivées comme le riz (Zou *et al*., 2008), le sorgho (Rodríguez *et al*., 2009), le choux (Zhou *et al*., 2013) le maïs (Yan *et al*., 2012), le glaïeul (Wu *et al*., 2015) et la fraise (Li *et al*., 2016). Récemment, elle a été étendue aux légumineuses par la caractérisation de mutants Mt-*abi5* chez *M. truncatula* (Terrasson *et al*., 2013).

ABI5 est un facteur de transcription de la famille des basic leucine zipper (bZIP) de classe A (Finkelstein and Lynch, 2000; Jakoby *et al*., 2002; Fujita *et al*., 2011). Les facteurs de transcription de la famille bZIP se lient aux motifs *cis* ABA RESPONSIVE ELEMENT (ABRE, de motif ACGTGG/TC ; Bensmihen *et al*., 2002) présents dans le promoteur de leurs gènes cibles afin de réguler la réponse à un stress (Lopez-Molina *et al*., 2001; Carles *et al*., 2002; Nakabayashi *et al*., 2005) et à un signal lumineux (Schwarzländer *et al*., 2012; Sakuraba *et al*., 2014). Chez *A. thaliana*, la famille ABI5/ABF/AREB est composée de 13 gènes à rôles redondants selon les différents stades de la plante (Finkelstein *et al*., 2005):

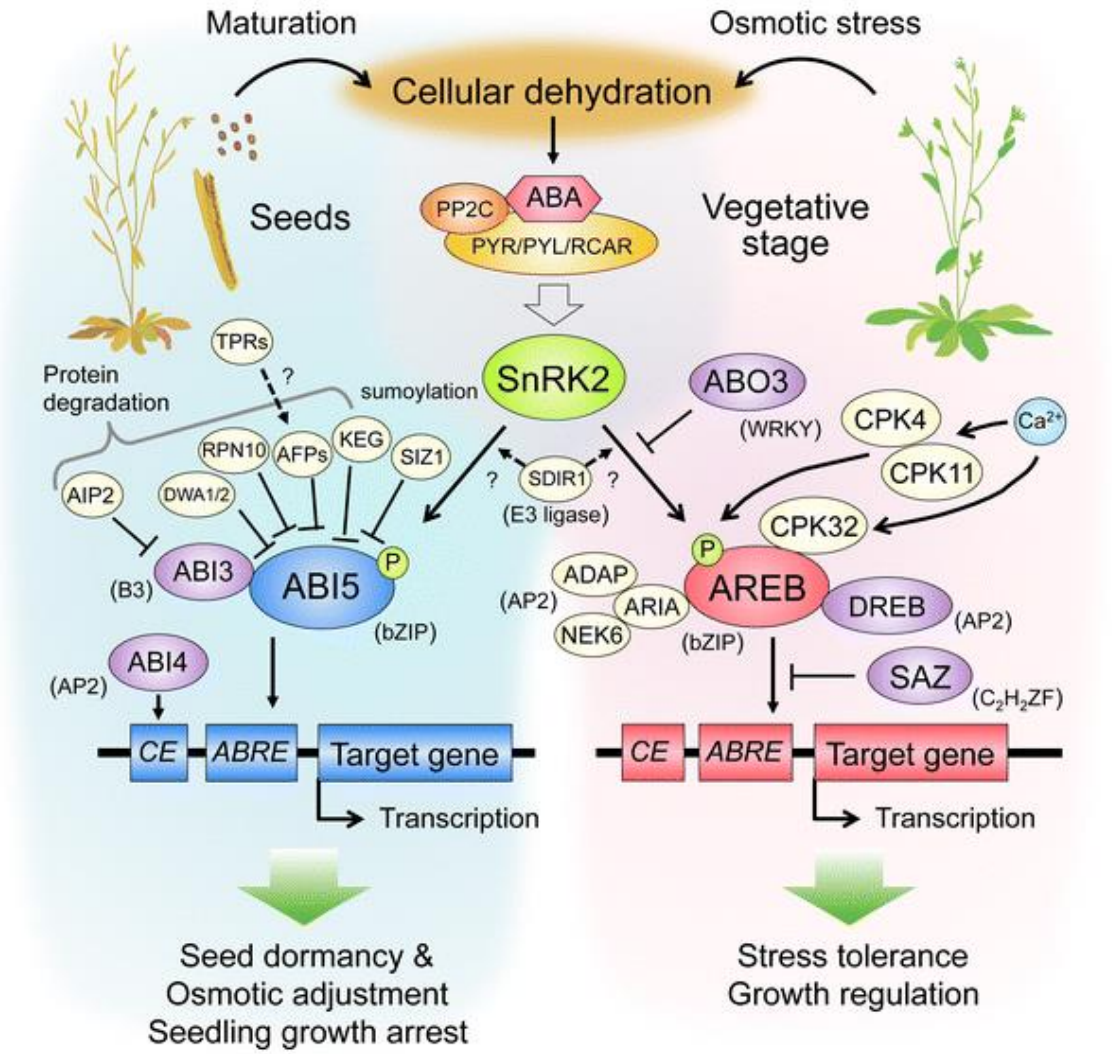


Figure 1.10 : Modèle comparant les voies de signalisation de l'ABA dans les graines pendant la maturation et dans les tissus végétatifs soumis à un stress osmotique. Le complexe formé par l'ABA et le récepteur de l'ABA PYR/PYL/RCAR inhibe l'action des PP2C. La protéine SnRK2 peut alors activer par phosphorylation la protéine ABI5. SnRK2, ABA-activated SNF1-related protein kinases 2. PP2C, 2C protein phosphatases. PYR/PYL, pyrabactin resistance1/PYR1-like, RCAR regulatory components of ABA receptors. D'après Fujita *et al*., (2011).

ABI5, ABF1 (ABRE BINDING FACTOR), ABF2/AREB1 (ABRE BINDING PROTEIN), ABF3, ABF4/AREB2, AREB3 et GBF4 (G-BOX BINDING FACTOR).

Les mutants *abi5* d'*A. thaliana* ont été identifiés selon un crible de germination en présence d'ABA (Finkelstein, 1994b). Cependant, les mutants *abi5* d'*A. thaliana* sont moins insensibles à l'ABA que les mutants *abi3*, et, en moindre mesure, *abi4*, comme présenté en Figure 1.8. Comme pour *abi3*, plusieurs mutants ont été caractérisés. *ABI5* est essentiellement exprimé dans les graines en développement (Figure 1.7, Brocard, 2002), et lors des phases menant à l'installation de la plantule soumise à un stress hydrique (Lopez-Molina *et al*., 2001). Cependant son expression a été également détectée dans les jeunes feuilles, les fleurs et les racines [5]. Chez *M. truncatula*, une étude transcriptomique montre que son expression est également majoritaire dans les graines en fin développement, et en moindre mesure dans les racines (Benedito *et al*., 2008).

ABI5 occupe une place centrale dans la voie de signalisation de l'ABA, comme illustré en Figure 1.10 (Fujita *et al*., 2011). En premier lieu, l'ABA forme un complexe avec les récepteurs PYRABACTIN RESISTANCE (PYR)/PYR1-like (PYL) /REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR (RCAR) qui ensuite inhibe l'action de la protéine PHOSPHATASES 2C (PP2C). Cette inhibition permet l'activation de SNRK2, un complexe kinase permettant la phosphorylation et l'activation d'un certain nombre de facteurs de transcription, dont ABI5. L'activation d'ABI5 est modulée par une régulation post-traductionnelle contrôlant la stabilisation de la protéine, tels qu'exposé en Figure 1.12 (Yu *et al*., 2015). L'implication du complexe protéasome 26S dans la régulation de la quantité de protéines ABI5 a été montrée chez *A. thaliana* en comparant les quantités de protéines ABI5 par western-blot chez des plantules transgéniques sur exprimant *ABI5* en présence ou non d'inhibiteurs du protéasome 26S (Lopez-Molina *et al*., 2001). Comme illustré en Figure 1.11, la protéine ubiquitine ligase KEEP ON GOING (KEG) ubiquitine ABI5, permettant ensuite sa reconnaissance et sa dégradation par le protéasome 26S. KEG a ainsi été identifiée comme étant un régulateur négatif de la voie de signalisation de l'ABA permettant le maintien d'une faible teneur en protéine ABI5 (Stone *et al*., 2006). La stabilisation de la protéine est également régulée par d'autres mécanismes dont la sumoylation (Miura *et al*., 2009) ou la ABI5 BINDING PROTEIN1 (AFP) (Lopez-Molina *et al*., 2003).

Le rôle d'ABI5 dans la graine a également été caractérisé par l'étude de mutants. L'étude transcriptomique réalisée par Nakabayashi *et al*., (2005) sur les graines sèches des mutants *abi5-7* a identifié 500 gènes dont les transcrits sont moins abondants par comparaison aux graines de type sauvage, parmi lesquels sont retrouvés les gènes codants les protéines

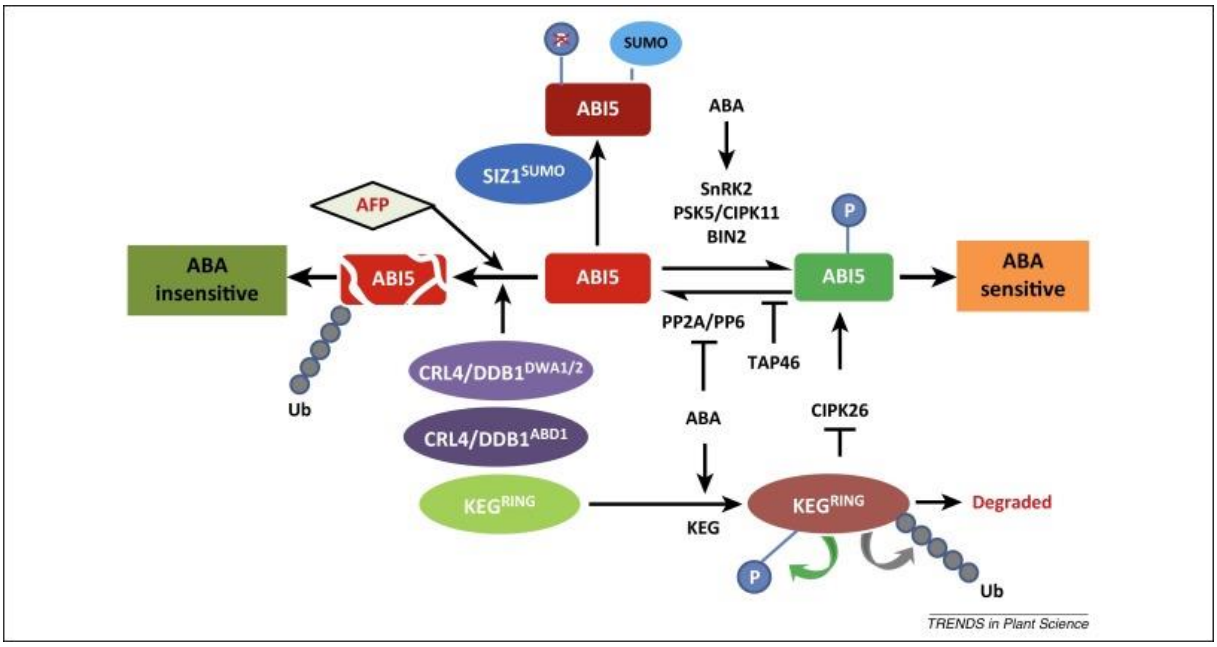


Figure 1.11 : Régulation post-traductionnelle de l'activité et de la stabilité d'ABI5 chez *A. thaliana*. Outre l'activation et la stabilisation de la protéine *via* la protéine KEG, l'homéostasie de la protéine ABI5 est régulée par des processus de sumoylation et la voie des ABI5 BINDING PROTEIN (AFP). ABA, Abscisic acid; ABD1, ABA-hypersensitive DCAF1; ABI5, ABA-insensitive 5; BIN2, brassinosteroid insensitive 2; CIPK26, Calcineurin B-like Interacting Protein Kinase 26; CUL4/DDB1, Cullin4/Damaged DNA Binding Protein 1; DWA1/2, DWD hypersensitive to ABA 1 and 2; KEG, Keep On Going; P, phosphate; PP2A, protein phosphatase 2A; PP6, Ser/Thr Protein Phosphatase 6; PSK5/CIPK11, SOS2-like protein kinase 5, also known as CIPK11 or SnRK3.22; RING, Really Interesting New Gene; SIZ1, SAP (scaffold attachment factor, acinus, protein inhibitor of activated signal transducer, and activator of transcription) et Miz1 (Ms32 interacting zinc finger); SnRK, SNF1-related protein kinases; TAP46, a PP2A-associated protein; Ub, Ubiquitin. D'après la revue de Yu *et al*., (2015).

LEA et HSP. En plus de ces résultats d'analyses transcriptomiques, l'étude des graines sèches des mutants *abi5-5* montre que l'accumulation des transcrits codant les protéines LEA EM1 et EM6 est fortement réduite comparée aux graines de type sauvage (Carles *et al*., 2002). Chez *A. thaliana*, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont permis d'établir une liste de gènes cibles d'ABI5 pendant l'imbibition (Lee *et al*., 2012; De Giorgi *et al*., 2015) comprenant également des gènes codant les LEA et des protéines de réponse aux stress abiotiques, des gènes codants des protéines impliquées dans la synthèse de la cutine et dans la régulation de la germination par les GAs, suggérant un rôle d'ABI5 dans la dormance. De fait, chez *A. thaliana*, ABI5 se trouve dans les voies de régulation de la dormance par la lumière et la température (Chen *et al*., 2008; Xu *et al*., 2014; Dekkers *et al*., 2016). Enfin, chez *A. thaliana* (Maia *et al*., 2014) et *M. truncatula* (Terrasson *et al*., 2013), ABI5 est nécessaire à la ré-induction de la tolérance à la dessiccation dans les radicules germées soumises à un traitement osmotique. Récemment, le rôle d'ABI5 dans la régulation de la sénescence foliaire chez *A. thaliana* a été identifié, ce point sera explicité dans la section 1.4.

ABI5 régule l'expression de ses gènes cibles en formant des homodimères ou des hétérodimères avec d'autres facteurs de transcription, comme illustré en Figure 1.12. Ainsi, ABI3 et ABI5 interagissent ensemble (Nakamura *et al*., 2001), et ABI5 est nécessaire en aval d'ABI3 dans la ré-induction de la tolérance à la dessiccation des radicules (Lopez-Molina *et al*., 2002). L'activation de la transcription de certains gènes cibles communs comme *DGAT1* est augmentée par fixation des deux facteurs de transcription ABI4 et ABI5, montrant une action synergique (Kong *et al*., 2013). Il existe également une compétition entre ABI4 et ABI5 pour la fixation sur les éléments *cis* des promoteurs de certains gènes, tel que le gène *GA2OX3* chez le sorgho (Cantoro *et al*., 2013). Ces résultats supposent donc des régulations différentes, communes, en synergie ou en compétition, des gènes cibles d'ABI3, d'ABI4 et d'ABI5. L'étude de double mutant *abi5-fusca3* et *abi5-lec1* laisse supposer qu'ABI5 interagirait également avec d'autres facteurs de transcription, bien que les interactions de protéines entre ABI5 et ces facteurs de transcription n'aient pas été mis en évidence (Brocard-Gifford, 2003).

1.2.3 Le facteur de transcription HSFA9

Les facteurs de transcription de la famille des Heat Shock Factor (HSF) permettent la transduction du signal de réponse à un stress thermique ou salin (Vierling, 1991), ou encore

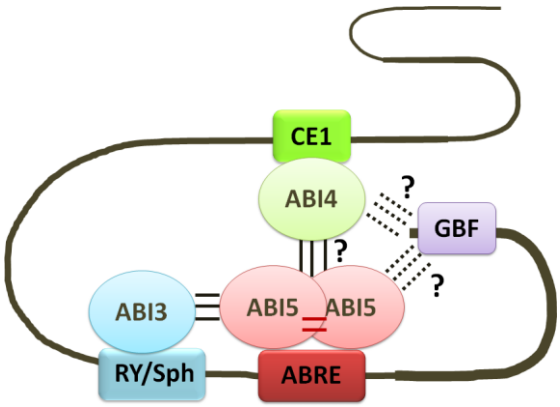


Figure 1.12 : Composants de la transcription régulés pendant le développement et la germination des graines d'*A. thaliana*. ABI3 et ABI4 se lient aux éléments *cis* RY/SPh et CE1 (coupling element 1), respectivement. ABI5 est un membre de la famille des facteurs de transcription de type bZIP qui se lie à la séquence ACGT contenue dans l'élément *cis* ABRE (ABA RESPONSIVE ELEMENT) mais également présent dans des motifs Gbox. Dans ce cas, il peut entrer en compétition avec ABI4 qui reconnait également cet élément. Les interactions entre les facteurs de transcription sont indiquées par des traits noir et la compétition par des traits pointillés. Les points d'interrogation signifient que des validations complémentaires sont nécessaires. D'après les modèles modifiés de Nambara *et al*., (2010); León *et al*., (2013); Gregorio *et al*., (2014).

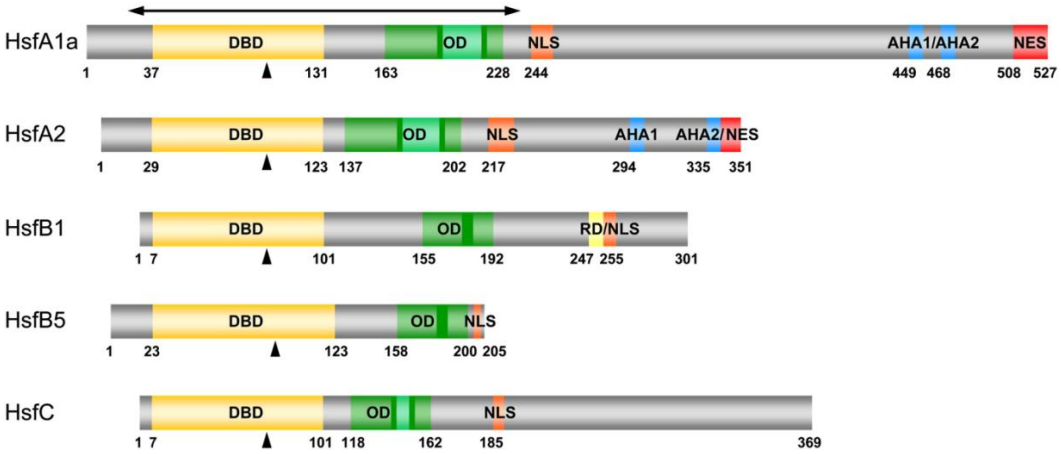


Figure 1.13 : Schéma de la structure des trois classes (A, B, C) de Heat Shock Factor. DBD, DNA binding domain, HR-A/B, HR-C, régions à domaines hydrophobes hepta répétés, NLS, Signal d'adressage nucléaire, OD, domaine d'activation, L1, L2 séquences liantes. D'après Scharf *et al*., (2012).

lors du développement de la graine d'*A. thaliana* (Wehmeyer *et al*., 1996). Pour réaliser ces fonctions, les HSF se lient aux motifs Heat Shock Element (HSE) présents dans le promoteur des gènes *HSP*. Chez *A. thaliana* et le riz, 21 et 23 *HSF* ont été annotés (Nover *et al*., 2001; Kotak *et al*., 2004). Une analyse comparative chez le soja, le lotier et *M. truncatula* a identifié les HSF orthologues d'*A. thaliana* (Soares-Cavalcanti *et al*., 2012). Comparés aux 21 types de HSF retrouvés chez *A. thaliana*, 13 types ont été retrouvés chez le soja et le lotus, et 14 chez *M. truncatula* (Soares-Cavalcanti *et al*., 2012). En revanche, dans cette étude, aucun orthologue de *HSFA9* n'a été retrouvé chez les légumineuses. Comparé à d'autres espèces comme la levure, où un seul gène codant une HSF est présent, la multitude des HSF présents chez les plantes résulte probablement de phénomènes de duplication génique et de néo-fonctionnalisation.

Les HSF présentent une structure similaire, avec un domaine DNA-binding à motif hélice-tour-hélice (DBD), une région hydrophobe hepta-répétée (HR-A/B), un signal d'adressage nucléaire et un domaine d'activation en position C-terminale (CTAD), comme illustré en Figure 1.13. Les HSFs sont capables de reconnaître le motif palindromique 5'-AGAAnnTTCT-3' présent dans le promoteur de leurs gènes cibles et de s'y fixer grâce à leur domaine DBD (Bienz and Pelham, 1987; Schöffl *et al*., 1998). Les HSF des plantes sont classés en 3 catégories selon la présence d'une région spécifique entre le motif DBD et HR-AB et le nombre d'acides aminés résiduels dans cette dernière (Nover *et al*., 2001).

Chez *A. thaliana*, la classe A des HSFs contient 15 membres, dont HSFA9 (Benedito *et al*., 2008). Chez le tournesol et *A. thaliana*, HSFA9 présente la particularité d'être spécifiquement exprimé dans les graines, au cours de l'embryogénèse et la maturation (Almoguera *et al*., 2002; Díaz-Martín *et al*., 2005). La sur-expression de *HaHSFA9* chez le tabac induit l'expression de sHSPs et HSP 101 en l'absence de stress (Prieto-Dapena *et al*., 2006). La sur-expression ectopique de *HaHSFA9* seul ou conjointement avec celle de *HaDREB2* augmente la viabilité des graines de tabac lors de tests de vieillissement accéléré (Prieto-Dapena *et al*., 2006; Almoguera *et al*., 2009). Ceci suggère que HSFA9 régule partiellement la longévité des graines indépendamment d'une réponse à un stress thermique. Il n'est donc pas surprenant de retrouver son homologue chez *M. truncatula* comme formant un nœud de régulation au sein du réseau de co-expression génique associé avec l'acquisition de la tolérance à la dessiccation et la longévité (Verdier *et al*., 2013). Cependant, la totalité des acteurs régulant la longévité et leurs interactions n'a jusqu'alors pas été élucidée (Almoguera *et al*., 2009). Le rôle de HaHSFA9 dans la maturation de la graine fait ainsi intervenir un réseau de régulation contrôlé par les auxines et l'ABA (Carranco *et al*., 2010) ; et

l'homologue de HSFA9 (At5g54070) est sous le contrôle du facteur de transcription ABI3 (Kotak *et al*., 2007). Par expérience de double hybride, HaHSFA9 et HaIAA27, une protéine de type Aux/Iaa (Auxine /Indole Acetic Acid) impliquée dans la répression des facteurs de réponse à l'auxine (ARF), ont été montré comme se fixant toutes deux de manière *in silico* au promoteur de *HaHSP17.6G1* (Carranco *et al*., 2010). Cette fixation est duale, la fixation de HaIAA27 réprimant l'activation transcriptionnelle de *HaHSP17.6G1* par HaHSFA9. Ces résultats permettent de supposer que le programme génétique mis en place par HaHSFA9 dans le contrôle de la longévité des graines fait intervenir un réseau de régulation contrôlé par l'ABA, les auxines, voir d'autres régulateurs, hormonaux ou non.

1.3 Les mécanismes de survie à l'état sec des graines

Les graines dites orthodoxes sont tolérantes à la dessiccation, elles sont capables de rester viables pendant de longue période de temps au cours du stockage. Comme nous l'avons vu précédemment, la graine acquiert cette capacité à tolérer la dessiccation et à se conserver dans le temps lors de son développement et elle est régulée par certains facteurs de transcription spécifiques lors de la maturation. La graine doit pouvoir faire face à la dessiccation, au stockage, et enfin aux évènements intervenant lors de la réhydratation. Cela nécessite donc l'accumulation de molécules protectrices et la mise en place d'un certain nombre de mécanismes que nous allons décrire dans cette partie.

1.3.1 Les oligosaccharides de la famille du raffinose (RFOs)

Les sucres solubles de la famille des RFOs (stachyose, verbascose et raffinose) sont généralement présents dans les graines matures, mais leurs teneurs dépendent de l'espèce (Hoekstra *et al*., 1994). Il a été proposé que les RFOs soient impliqués dans l'acquisition de la tolérance à la dessiccation lors de la maturation des graines (Blackman *et al*., 1992; Brenac *et al*., 1997; Obendorf, 1997). Corbineau *et al*., (2000) émettent l'hypothèse que les RFOs produits au cours du développement de la graine de pois participent à la protection des membranes lors de la réhydratation. Au cours du développement de la graine de haricot, l'accumulation de stachyose et de raffinose est effectuée en parallèle à l'acquisition de la tolérance à la dessiccation (Bailly *et al*., 2001). Par ailleurs, l'accumulation de galactinol, le premier intermédiaire dans la voie de synthèse des RFOs, a récemment été corrélée à la longévité (de Souza Vidigal *et al*., 2016). Cependant, l'étude QTL réalisée par (Bentsink *et al*., 2000) sur *A. thaliana* ne retrouve pas ce lien entre la longévité des graines et les RFOs. Il n'y a également pas de corrélation entre la teneur en RFO et la longévité de graines primées (Gurusinghe and Bradford, 2001). Le rôle des RFOs dans la longévité reste donc à élucider.

Les mécanismes d'action des RFOs dans la tolérance à la dessiccation ont été étudiés. En début de la dessiccation, la perte en eau est favorisée par l'augmentation de la concentration des sucres non réducteurs, diminuant le potentiel hydrique du cytoplasme et permettant à l'eau de se déplacer dans le sens des potentiels hydriques décroissants jusqu'à la teneur critique de 0,3 g d'eau par gramme de matière sèche (Hare *et al*., 1998). Les sucres non réducteurs agiraient dans ce cas comme des osmolytes compatibles en début de dessiccation (Hoesktra *et al.*, 2001).

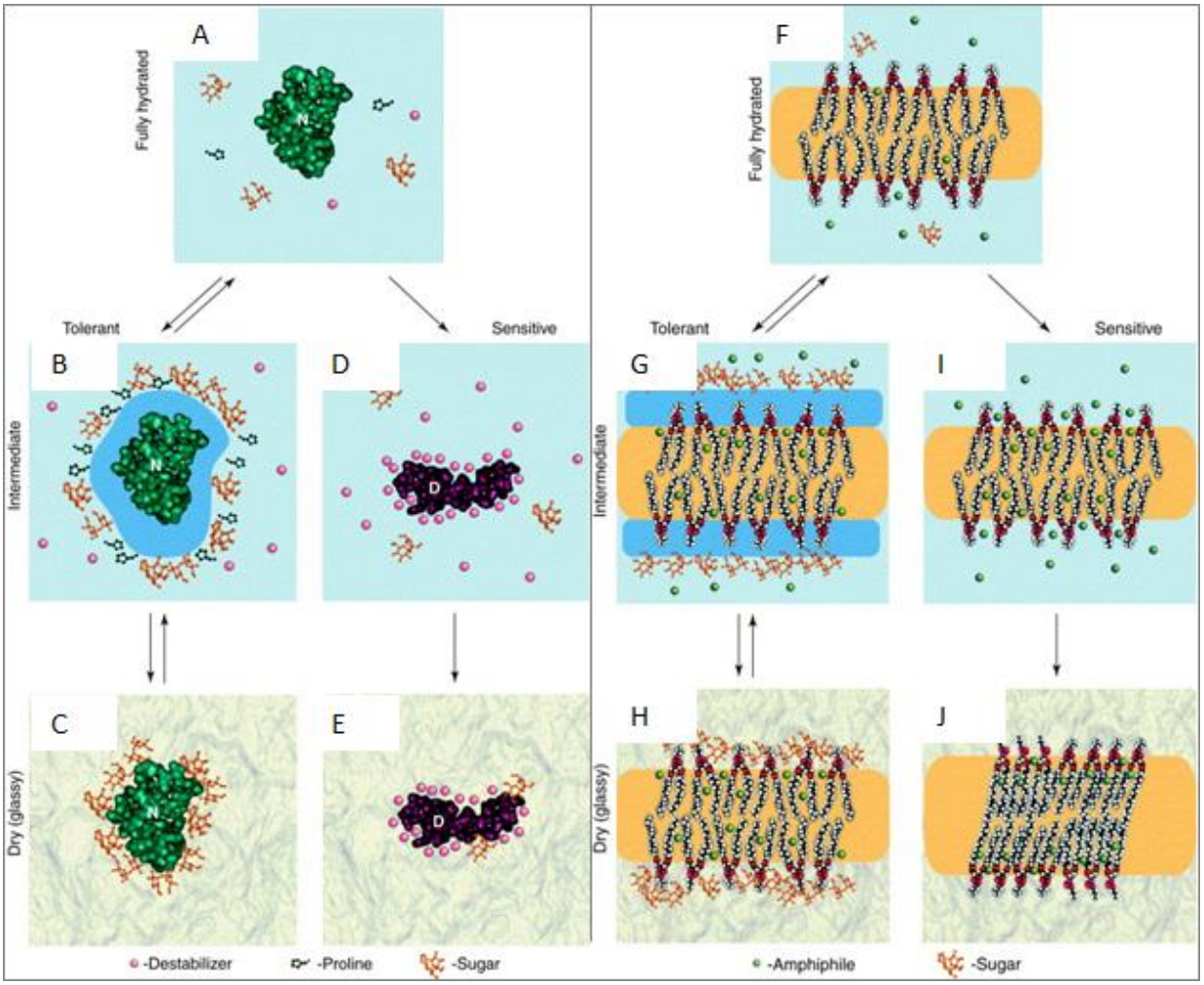


Figure 1.14 : Mécanismes de protection des protéines (A) et des membranes (F) par les sucres et les composés amphiphiles impliqués dans la tolérance à la dessiccation. A l'état hydraté, A, les protéines sont fonctionnelles, ainsi que les phospholipides des membranes, F. Puis, au cours du séchage (jusqu'à 0.3 g H_2O/g de matière sèche), les solutés compatibles maintiennent une couche d'eau autour des protéines, c'est le processus d'hydratation préférentielle dans les tissus tolérants, B et G. En revanche, pour les tissus non tolérants, les protéines sont dénaturées par les osmolytes non compatibles, D, et la membrane est déstabilisée. I. Lors d'une déshydratation sévère, jusqu'à 0.1 g H_2O/g de matière sèche, les sucres non réducteurs remplacent les molécules d'eau en formant des liaisons hydrogène avec les protéines C, ou les têtes polaires des phospholipides, maintenant ainsi le feuillet phospholipidique en phase de liquide cristallin amorphe. G, les structures des protéines ne sont ainsi pas dénaturées. En revanche, dans un tissus sensible, les protéines sont dénaturées E, et les phospholipides entrent en phase de gel rigide, J. D'après Hoekstra *et al*., (2001).

Lorsque la teneur en eau diminue jusque 0,1 g d'eau/ g de matière sèche, deux mécanismes de protection distincts ont été proposés par Hoekstra *et al*., (2001). Il s'agit de: l'hypothèse du remplacement de l'eau et de l'hydratation préférentielle (Figure 1.14, revu par Crowe, (2002)). Il est proposé que les groupements hydroxyles des sucres participent à la stabilisation des membranes et des protéines. Ils maintiendraient la structure et la fonctionnalité des membranes (Hoekstra *et al*., 2001; Figure 1.14) et stabilisent les têtes des phospholipides en maintenant un espace suffisant entre eux (Hincha *et al*., 2003). Les RFOs ont également été proposé comme acteur dans la formation de l'état vitreux. Un état vitreux se définit comme un état liquide métastable dont la viscosité est tellement élevée que les propriétés de ce liquide ressemblent à celle d'un solide. La formation de l'état vitreux lors de la phase de dessiccation a été détectée chez le pollen, les plantes reviviscentes et la graine (Buitink and Leprince, 2008). Cependant, la formation de cet état vitreux seul ne permet pas de conférer la survie à l'état sec. Par exemple, le pollen de maïs, non tolérant à la dessiccation, présente un état vitreux (Buitink *et al*., 1996). La formation de cet état vitreux est expliquée par l'augmentation de la viscosité à des ordres de grandeur ressemblant à ceux d'un solide. Le saccharose et les RFOs seraient impliqués dans la formation de l'état vitreux cytoplasmique du fait de leur aptitude à ne pas cristalliser *in vitro* pendant le séchage (Koster and Leopold, 1988). Cependant, les propriétés physico-chimiques d'un mélange artificiel de sucres ne correspondent pas à celles d'un état vitreux biologique, démontrant ainsi que les sucres ne sont pas à eux seuls responsables de l'état vitreux dans les graines (Buitink and Leprince, 2004). De plus, tous les organismes capables de tolérer la dessiccation n'accumulent pas les sucres, suggérant que d'autres molécules participent à la formation de l'état vitreux selon les espèces (Lapinski and Tunnacliffe, 2003). En plus des rôles des sucres RFOs décrits ci-dessus, il a été proposé que les RFOs interagissent en synergie avec les protéines Late Embryogenesus (LEA) et les Heat Shock Protein (HSP) au cours de la formation de l'état vitreux et protègent les surfaces membranaires des dommages causés par le retrait de l'eau dans les graines (Hoekstra *et al*., 2001).

1.3.2 Les protéines Late Embryogenesis Abundant (LEA)

En fin de maturation, la graine accumule en abondance des transcrits de gènes codant des protéines appelées Late Embryogenesis Abundant (LEA), nommées ainsi car leurs ARNm sont fortement transcrits en fin de maturation. Initialement découvertes dans la graine de coton (Baker *et al*., 1988), elles ont ensuite été retrouvées dans les graines de nombreuses espèces végétales, dans les parties végétatives et dans les organismes anhydrobiotes comme certains nématodes (Browne *et al*., 2002). Leur accumulation a initialement été associée à la tolérance à la dessiccation, puis leur rôle a été étendu aux stress abiotiques comme le stress salin (Upendra *et al*., 2011; Du *et al*., 2016) et au froid (NDong *et al*., 2002). Certaines protéines LEA ont également été retrouvées dans des tissus qui ne sont pas soumis à un stress, comme par exemple dans les apex des plantules en croissance de haricot (Colmenero-Flores *et al*., 1999).

Les protéines LEA sont hydrophiles, elles sont composées de résidus d'acides aminés chargés, comme les résidus glycine, alanine et thréonine (Garay-Arroyo *et al*., 2000). Ces protéines n'ont pas de conformation intrinsèque en solution aqueuse. En revanche, lors de la dessiccation, elles adoptent une structure majoritaire en hélice α (Haaning *et al*., 2008). Chez le haricot, il a été montré par analyse de résonance magnétique nucléaire couplée à des analyses de spectrométrie que certaines LEA forment des dimères en réponse à leur environnement, comme un changement du potentiel osmotique (Rivera-Najera *et al*., 2014).

Les protéines LEA ont été classées en neuf groupes selon la similarité de leurs séquences d'acides aminés (Hundertmark and Hincha, 2008). D'autres classifications, comme la classification POPP (Protein or Oligonucleotide Probability Profile) ont été proposées (Wise and Tunnacliffe, 2004). L'étude des mutants des protéines LEA de la classe 4 révèlent que les LEA des autres classes ne compensent pas leur absence (Olvera-Carrillo *et al*., 2010), mettant ainsi en évidence une spécificité de fonction des LEA appartenant aux différentes classes. En revanche, au sein d'une même classe, les protéines LEA auraient les mêmes fonctions et des redondances existent. En effet, les graines du mutant *em6-1* d'*A. thaliana* acquièrent la tolérance à la dessiccation plus tôt que le type sauvage, alors que le niveau d'expression du gène *EM1* est plus important, suggérant une compensation de l'absence d' *EM6* par *EM1* (Manfre *et al*., 2009). Chez *M. truncatula*, Chatelain *et al*., (2012) ont identifié 35 polypeptides, dont près de la moitié sont exprimés dans les graines, classés en 7 classes selon la classification Pfam en : déhydrines (6 protéines), LEA_5 (2 protéines, EM6 et EM1), LEA_4 (8 protéines, dont SBP65), LEA_1 (4 protéines),

SMP (6 protéines, dont PM25, D-34.I, II et III), LEA_2 (4 protéines) et LEA_3 (4 protéines). Parmi celles-ci, cinq protéines LEA sont positivement corrélées à l'acquisition de la tolérance à la dessiccation de la graine, tandis que quatre autres sont quant à elles positivement corrélées à la longévité. Ces quatre protéines LEA sont la protéine EM, appartenant à la classe LEA_5, D-113.I/II (LEA_1), D-34.III (SMP) et CapLEA.I/II (LEA_4).

Les modes d'action des protéines LEA ont été étudiés grâce aux analyses *in vitro* et de génétique inverse. Un des premiers rôles identifié des protéines LEA est leur rôle protecteur lors de la perte de l'eau. Ainsi, à différents niveaux de déshydratation, les protéines LEA appartenant aux classes 2, 3 et 4, mais aussi 7 (identifiées selon le classement réalisé par Hundertmark and Hincha, (2008)) sont capables d'empêcher l'inactivation des lactate et malate déshydrogénases (Reyes *et al*., 2005; Popova *et al*., 2015). Des études *in vitro* réalisées sur le pois montrent que la LEA mitochondriale de classe 3 est capable de protéger la Fumarase au cours de la déshydratation (Grelet *et al*., 2005). D'autres études *in vitro* suggèrent un rôle des LEA dans la prévention de l'agrégation des protéines (Chakrabortee *et al*., 2007). Ces résultats suggèrent un rôle protecteur des LEA, elles sont qualifiées de « protéine chaperon » (Kovacs *et al*., 2008). Une de leur autre fonction proposée est leur rôle dans la protection des membranes. Au début de la perte en eau, (Hoekstra *et al*., 2001) proposent que les protéines LEA participent à l'hydratation préférentielle en interagissant avec les sucres RFOs. Ces protéines pourraient faciliter le remplacement de l'eau présent à l'interface des membranes. Dans les graines, l'étude de liposomes révèle le rôle de la protéine mitochondriale LEAm dans la protection des membranes par interaction avec les phospholipides membranaires (Tolleter *et al*., 2007). Ce rôle de protection des membranes a par la suite été démontré pour d'autres LEA, comme celles appartenant à la classe des déhydrines (Koag *et al*., 2009). En plus de la protection des protéines et des membranes, certaines LEA agiraient comme antioxydants en chélatant les ions Fe catalysant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Hara *et al*., 2005). Enfin, les LEA ont également été proposées comme intervenant dans l'état vitreux, voir pour revue (Buitink and Leprince, 2008). Les LEA peuvent interagir *via* des liaisons hydrogènes avec leur groupement hydroxyles, formant un état vitreux plus dense que celui mesuré dans une matrice vitreuse composée de sucres seuls (Wolkers *et al*., 2001).

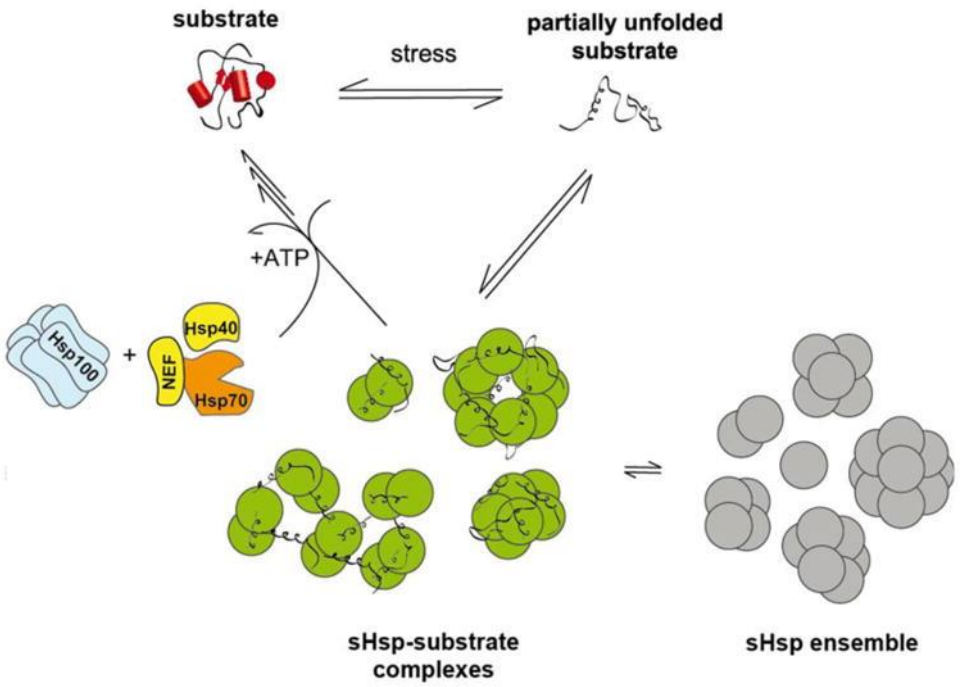


Figure 1.15 : Modèle de l'activité de « chaperon moléculaire » des sHSPs. En conditions de stress les protéines se déstabilisent et commencent à se déplier. Le pool de sHSPs (gris) dormantes s'active et les sHSPs se lient aux protéines non natives, formant des complexes sHSPs/substrats (vert) et les maintiennent dans un état compétent au repliement. Le repliement des protéines dénaturées et associées aux sHSPs se fait par l'entremise ou non du système d'Hsp70/40 ATP dépendant (Hsp70 + Hsp40 et nucléotide exchange factor (NEF)) et parfois avec l'aide de la famille des Hsp100. D'après Haslbeck and Buchner, (2015).

1.3.3 Les protéines de choc thermique (HSP)

Les protéines HSP sont des molécules chaperons découvertes pour leur induction à la chaleur impliquées dans la stabilisation des structures des protéines et dans l'homéostasie cellulaire (Wang *et al*., 2004). Il existe plusieurs familles de HSP, classées selon leur poids moléculaire : HSP100s, HSP90s, HSP70s, HSP60s et sHSP (Trent, 1996). Les sHSP ne nécessitent pas d'ATP pour fonctionner (Waters *et al*., 1996). L'accumulation de HSP intervient lors de la réponse à un stress thermique chez une plante (Sun *et al*., 2002), ou encore en son absence lors de la maturation du pollen (Mascarenhas and Crone, 1996), ou lors de la méiose chez le maïs (Atkinson *et al*., 1993) et de la maturation de la graine d'*A. thaliana* (Wehmeyer *et al*., 1996). Comme nous avons vu précédemment en section 1.2, l'accumulation des sHSP et HSP est induite par une cascade de régulation complexe impliquant des protéines co-chaperons et des HSF lors du développement de la graine.

Les HSP participent au maintien et au rétablissement de l'homéostasie cellulaire (Baniwal *et al*., 2004). Elles protégeraient les protéines en se liant de façon non covalente avec elles, leur évitant par la suite de s'agréger. Les sHSP et HSP70 participent à la formation non covalente de ce complexe protecteur, comme présenté en Figure 1.15. Haslbeck and Buchner, (2015) illustrent le modèle selon lequel les sHSP s'associent aux protéines et empêchent leur repliement.

L'expression de sHSP au cours de la maturation de la graine est positivement corrélée à l'acquisition de la tolérance à la dessiccation. Chez les mutant *abi3* d'*A. thaliana*, la teneur en HSP est nettement plus faible, voire nulle selon les allèles (Wehmeyer and Vierling, 2000). La sur expression ectopique de *HaHSFA9* du tournesol dans les graines de tabac conduit à une accumulation des transcrits de sHSP et HSP101, avec comme conséquence une augmentation de la stabilité des graines lors d'une détérioration contrôlée (Prieto-Dapena *et al*., 2006).

1.3.4 Rôle protecteur des téguments des graines

La testa, d'origine maternelle (2n), joue un rôle important dans la protection de la graine. Il permettrait une protection partielle pour faire face à l'humidité relative et aux teneurs en O_2 lors du stockage. Certaines graines dures de légumineuses présentent ainsi une meilleure longévité (Potts *et al*., 1978), tandis que les téguments limitent l'entrée du O_2 dans la graine de betterave (Coumans *et al*., 1976). En plus de ces expériences démontrant la

meilleure longévité des graines dures et la limitation de l'entrée d'O_2 par les téguments, le rôle protecteur des téguments a directement été mis en évidence par l'étude de mutants présentant des défauts dans leur structure et leur composition. Chez *A. thaliana*, le tégument est composé de cinq couches cellulaires. L'étude de la longévité des graines des mutants *aberrant testa shape* d'*A. thaliana*, dont l'enveloppe de la graine est physiquement altérée (présentant trois couches cellulaires composant le tégument en moins, Leon-Kloosterziel *et al*., 1994), montre qu'elle est diminuée (Clerkx *et al*., 2004).

Il a également été montré un rôle des composants des téguments dans la longévité des graines, et notamment les flavonoïdes. Ainsi, l'étude de mutants d'*A. thaliana* présentant une gamme dans la couleur de leurs téguments montre que ceux-ci sont défectifs dans les gènes codant les enzymes de la voie de synthèse des flavonoïdes, comme le mutant *transparent testa 10* (Pourcel *et al*., 2005). Chez ce mutant, la capacité à se conserver après 45 jours de vieillissement naturel (stockage des graines à l'état sec et à température ambiante) est réduite de plus de moitié comparée au type sauvage, démontrant ainsi que la composition en flavonoïdes des téguments des graines impacte la longévité au cours d'un vieillissement naturel (Debeaujon *et al*., 2000).

1.3.5 Mécanismes de protection et de détoxification contre les ROS

Plusieurs études montrent un lien entre la viabilité des graines au cours du stockage et les processus de détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou des produits peroxydés qu'ils ont engendrés. Par exemple, l'augmentation des stress oxydatifs dans les axes embryonnaires de tournesol est reliée à la perte de la qualité germinative au cours d'une expérience de détérioration contrôlée à 70% HR, 40°C (Morscher *et al*., 2015). Aussi, le vieillissement accéléré de graines de tournesol provoque une accumulation de monodéhydroascorbate et une diminution de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (Bailly *et al*., 1996). Cependant, il est difficile de comparer une expérience de vieillissement accéléré avec le vieillissement naturel des graines, et de conclure quant à une putative implication d'activité enzymatique en lien avec celui-ci. En effet, les conditions de vieillissement artificiel se font en présence d'humidité relative, généralement entre 85 et 100 %, et des températures égales ou supérieures à 40°C, permettant l'imbibition des graines et la reprise partielle des réactions enzymatiques et du métabolisme alors que les conditions de stockage effectives sont comprises entre 5°C et 25°C et une humidité relative inférieure à 50%, si l'on considère les pratiques des entreprises semencières dans les graines traitées

(Bewley *et al*., 2013). Toutefois, une expérience de vieillissement naturel de graines de coton montre également la corrélation entre l'activité des enzymes à rôle antioxydant et la qualité germinative des graines (Goel and Sheoran, 2003).

Outre la corrélation existant entre les évènements intervenant au cours du vieillissement artificiel des graines et l'activité antioxydante, l'accumulation de composés antioxydants est proposée comme étant directement corrélée à la longévité. L'étude des mutants *vte1* et *vte2*, affectés dans les gènes codant les enzymes de synthèse des tocophérols, montre que les graines des mutants ont une longévité moins bonne que celle du type sauvage, reliant la protection de l'oxydation des lipides à la longévité des graines (Sattler, 2004; Mène-Saffrané *et al*., 2010). Cependant, cette relation directe entre la longévité des graines et les teneurs en tocophérols n'a pas été retrouvée suite à une étude menée sur les graines de 175 génotypes de *Hordeum vulgare* (Nagel *et al*., 2015). En plus des tocophérols, les molécules de glutathion réduites (GSH) peuvent être oxydées sous forme disulphide (GSSG). Ces molécules sont présentes majoritairement dans les graines (Colville *et al*., 2015) et l'étude de mutants déficients en GSH montre que ces embryons ne sont pas capables de se développer, la mutation étant létale (Cairns *et al*., 2006). La quantité de GSH a été corrélée à la longévité (Hsu and Sung, 1997) et l'évolution de l'oxydation du GSH, basée sur son potentiel d'oxydo-réduction, pourrait être utilisée comme marqueur de la longévité d'un lot de graines (Kranner *et al*., 2006). Enfin, l'étude de mutants affectés dans l'accumulation de la 12S globuline montre que ces derniers ont une moins bonne longévité (Nguyen *et al*., 2015). L'hypothèse émise en rapport avec ce rôle dans la longévité est que les SSPs seraient préférentiellement oxydées par les ROS, protégeant ainsi de l'oxydation les autres protéines.

Plusieurs molécules sont classées comme étant des ROS : le singulet d'oxygène $^1O_2^*$, le radical superoxyde O_2^-, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2, le radical hydroxyle OH**.**, le radical peroxyle RO2$^-$, le radical alkoxyle RO$^-$ et l'hydroperoxyle HOO**.**. Ils oxydent les protéines, lipides, glucides, les molécules d'ADN et d'ARN. Les ROS se forment principalement dans les chloroplastes et les mitochondries. Dans le chloroplaste, la production de ROS est réalisée à plusieurs niveaux (Asada, 2006; Figure 1.17). Un premier niveau correspond au PSII, avec la formation d'oxygène singulet au niveau des antennes collectrices et des centres réactionnels (Figure 1.16.[1]). Toujours au niveau du PSII, il peut aussi y avoir réduction de l'oxygène par transfert de charge, conduisant à la formation de superoxyde O_2^- (Figure 1.16.[2]). Un deuxième niveau de formation des ROS s'effectue au niveau du PSI, c'est la réaction de Mehler. Lors du transfert d'électron, le PSI transfert l'électron à la ferredoxine, qui peut

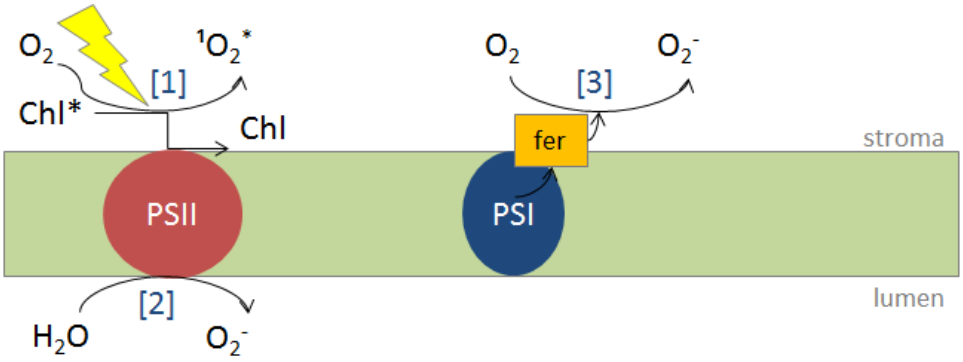


Figure 1.16 : Les mécanismes de la production de ROS dans le chloroplaste. Trois mécanismes peuvent conduire à la production de ROS dans le chloroplaste. [1], la formation de l'oxygène singulet et [2] de superoxyde au niveau du PSII. Au niveau du PSI, [3] la formation de superoxyde. PSI, Photosystem I, PSII, Photosystem II, fer, ferredoxine.

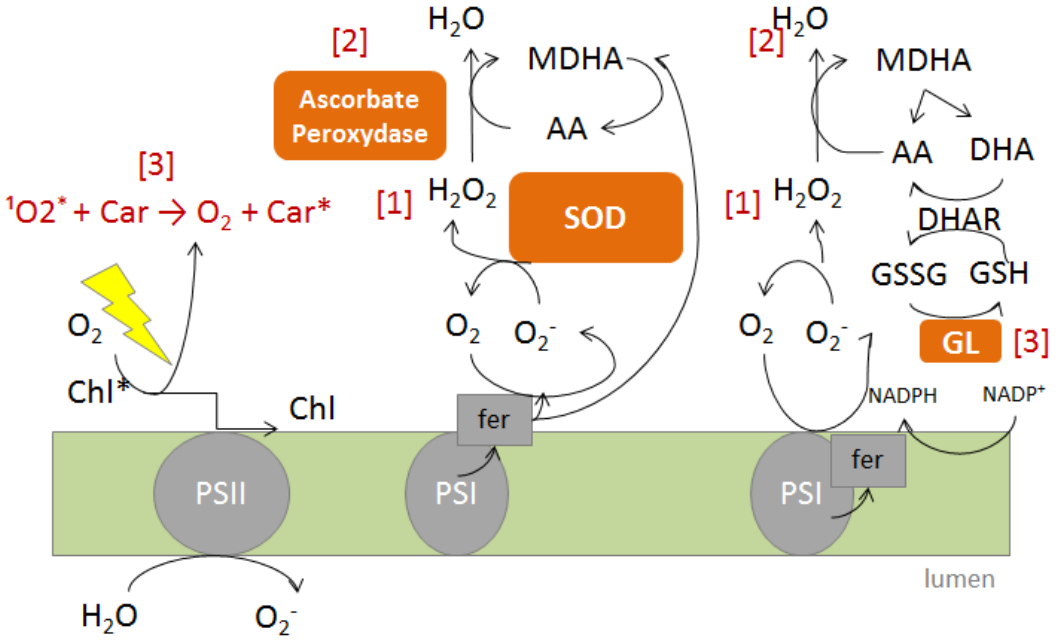


Figure 1.17 : Les mécanismes de détoxification des ROS. [1], Formation de péroxyde d'hydrogène par l'enzyme superoxyde dismutase. [2] L'ascorbate peroxydase réduit le peroxyde d'hydrogène en eau grâce au pouvoir réducteur de la vitamine C, l'ascorbate. [3], La Déhydroascorbate réductase réduit le déhydroascorbate formé spontanément par dismutation du monodéhydroascorbate. SOD, Superoxyse Dismutase; AA, acide ascorbique; MDHA, monodéhydroascorbate. AA, Acide Ascorbique; DHA, Déhydroascorbate; GSSG, Glutathion oxydé; GSH, Glutathion réduit; GL, Glutathion.

réduire l'oxygène présent plutôt que le $NADP^+$ et former le superoxyde O_2^- (Figure 1.16.[3]). L'autre organelle conduisant à la formation de ROS est la mitochondrie. Lors de la phase de photorespiration, l'enzyme Rubisco peut réagir avec l'O_2 au lieu du CO_2 et conduire à la formation de phosphoglycolate, qui est ensuite exporté de la mitochondrie au peroxysome, conduisant à la formation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2.

Pour faire face à ces réactions délétères pour la cellule, des mécanismes de protection et de détoxification sont mis en place. Le premier est la mise en place du Non Photochemical Quenching (NPQ), voir pour revue Müller *et al*., (2001); alors que le second mécanisme implique les molécules antioxydantes comme les caroténoïdes, les tocophérols, le glutathion et les enzymes à rôle antioxydant. Le rôle enzymatique de protection contre l'oxydation générée par les ROS peut être illustré par le rôle de l'enzyme superoxyde dismutase au cours de la réaction de Mehler (Figure 1.17.[1]). Elle réagit avec le superoxyde O_2^- selon la réaction de dismutation ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$) pour former du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui sera alors réduit par l'ascorbate peroxydase en eau. Le monohydroascorbate ainsi formé pourra être réduit par la suite par la ferredoxine en ascorbate. La voie du glutathion, représentée en Figure 1.17, implique la molécule de glutathion et l'enzyme déhydroascorbate afin de réduire le monohydroascorbate en ascorbate. En parallèle à ces réactions empêchant la formation de ROS, les tocophérols et les caroténoïdes sont impliqués dans la protection contre le singulet d'oxygène (Cillard and Cillard, 2006) et dans la limitation de la peroxydation des lipides (DellaPenna and Pogson, 2006; Figure 1.18).

1.3.6 Protection et réparation contre les dommages cellulaires

En plus des mécanismes de protection et de détoxification décrits ci-dessus, la longévité est finalement aussi dépendante de la capacité de la graine, lors de la germination, à réparer les dommages moléculaires intervenus au cours de l'étape de dessiccation et du stockage.

Les dommages moléculaires interviennent sur les acides nucléiques, les protéines et les lipides. Les dommages causés à l'ADN peuvent être classés selon trois sortes : le mauvais appariement de bases sur la matrice double brin de l'ADN, les cassures double-brin et la modification des bases. Ces dommages sont principalement causés par un stress oxydatif induit par les ROS, mais également par les réactions d'hydrolyse ou encore par une exposition aux UV (voir le détail des mécanismes dans la revue de Britt, 1996). Les protéines subissent également des dommages causés par le stress oxydant. En effet, celui-ci induit l'oxydation des

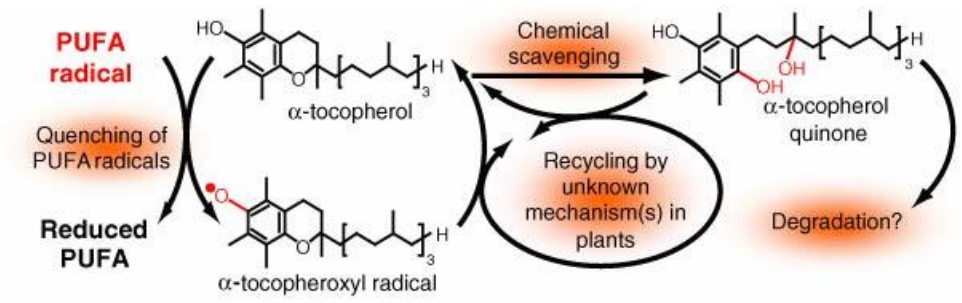


Figure 1.18 : Mécanismes proposés de la fonction anti oxydante des tocophérols dans la captation du ROS généré lors de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (DellaPenna and Pogson, 2006).

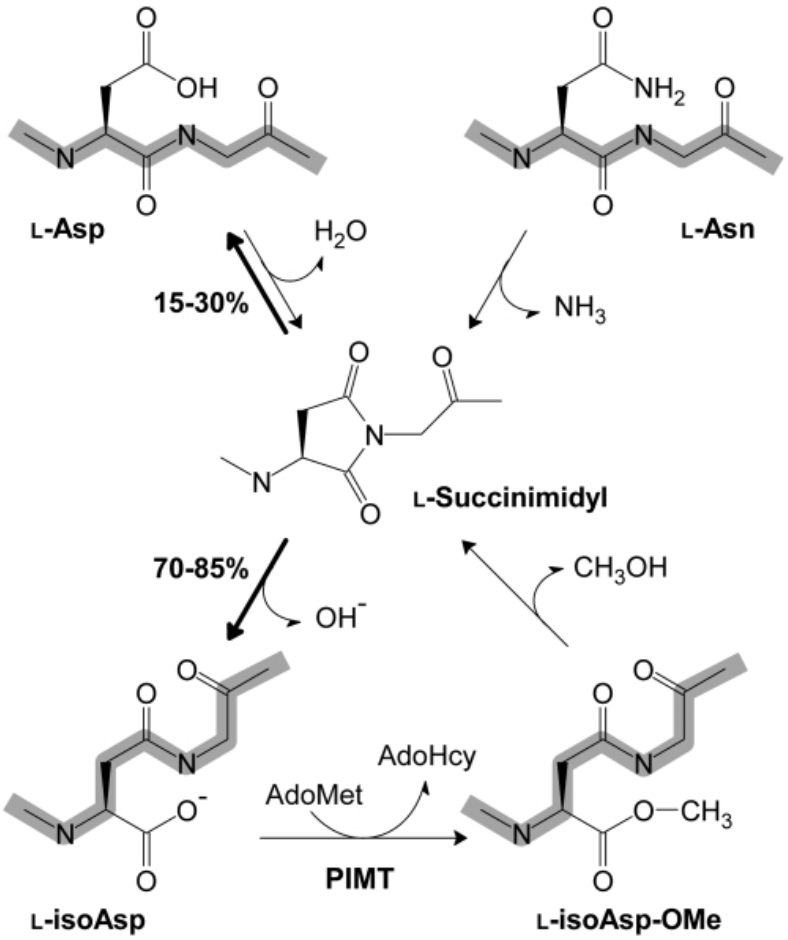


Figure 1.19 : Mécanisme de la formation de L-isoaspartyl (résidu anormal) à partir du résidu aspartyl. L'isomérisation spontanée de l'aspartyl conduit à la molécule L-Succinimidyl, instable, qui est rapidement hydrolysée en aspartyl et en isoaspartyl anormal. L'enzyme PIMT (l-isoaspartyl (d-aspartyl) *O*-methyltransferase) catalyse la première étape de réparation de l'aspartyl. Des enzymes supplémentaires sont nécessaires pour la réparation totale. AdoHcy, *S*-adenosyl homocystein; l-Asp, l-aspartyl; l-Asn, l-asparaginyl; l-isoAsp, l-isoaspartyl; l-isoAsp-OMe, l-isoaspartyl-*O*-methylester. D'après Oge *et al*., (2008).

résidus des acides-aminés comme la lysine, l'arginine et la proline, ce qui altère ou inhibe l'activité de la protéine et la rend vulnérable à la protéolyse (Dunlop *et al*., 2002). Les résidus amines peuvent également réagir avec les groupements hydroxyles réducteurs des sucres (glucose et fructose résiduels) et former des produits glycosylés complexes par la réaction de Maillard. Les résidus aspartyl peuvent être aussi spontanément modifiés en isoapartyl lors du stockage (Figure 1.19), entraînant également une modification de la protéine en résultant.

Ces dommages intervenant sur les molécules au cours du stockage de la graine ont été mis en cause dans la perte de la capacité germinative. Ainsi, Cheah and Osborne, (1978) ont montré que les graines ayant subi des dommages de l'ADN ont une moins bonne longévité. L'intégrité du génome est donc nécessaire à la qualité germinative, comme expliqué en détail dans la revue de Waterworth *et al*., (2015).

Lors de l'imbibition, l'activité cellulaire reprend et les mécanismes de réparation de l'ADN, de l'ARN et des protéines sont activés. Chez *A. thaliana*, la DNA ligase VI, qui répare les dommages causés à l'ADN, est impliquée dans la longévité des graines et la vigueur après stockage (Waterworth *et al*., 2010). Outre les mécanismes de réparation de l'ADN, il existe également des enzymes de réparation des protéines oxydées. La protéine méthionine, oxydée en méthionine-sulfoxyde par les ROS lors du vieillissement des tissus animaux, est convertie en méthionine par les enzymes methionine sulfoxide reductases (MSRs). Le rôle des enzymes MSRs dans la réduction des groupements soufrés oxydés en lien avec la longévité de la graine a été démontré chez *M. truncatula*, où l'activité de la methionine sulfoxide reductases (MSRs) est positivement corrélée à la longévité (Châtelain *et al*., 2013). De même, chez la graine d'*A. thaliana*, la protéine l-isoaspartyl (d-aspartyl) O-methyltransferase (PIMT) participe dans la première étape de la réaction de la correction des modifications covalentes de la L-isoaspartyl (Oge *et al*., 2008; Figure 1.19).

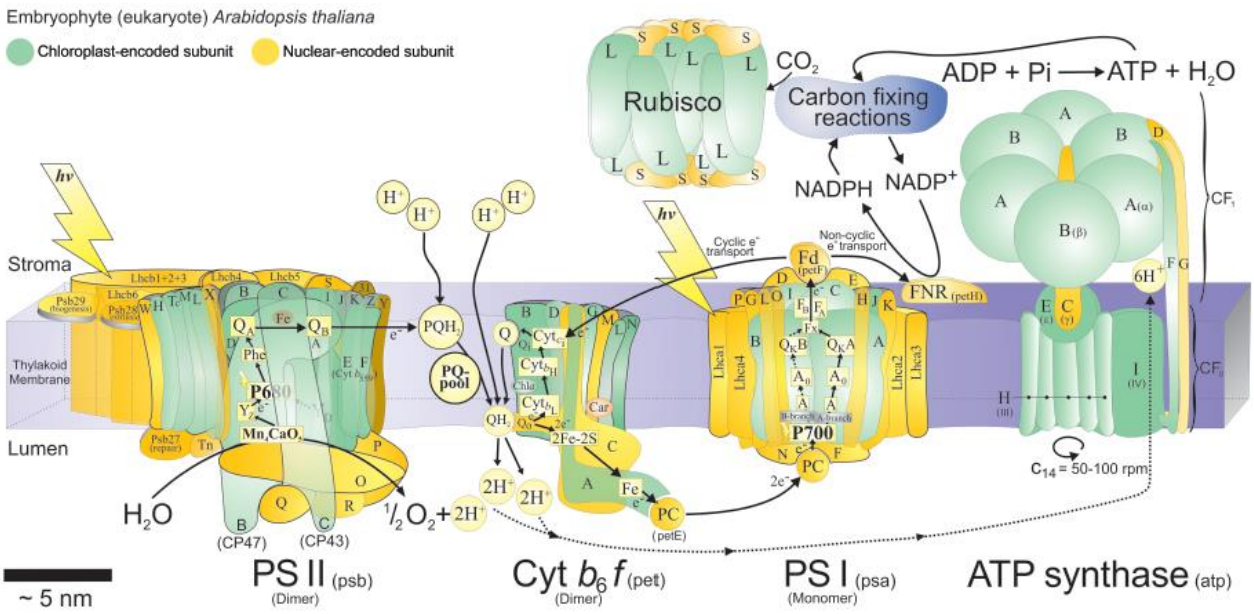


Figure 1.20 : Schéma des principales protéines des complexes photosynthétiques présentes dans les chloroplastes chez *A. thaliana*. Photosystème II (PS II); cytochrome b_6f (Cyt b_6f); photosystème I (PS I); ATP synthase; et Rubisco. Les préfixes des sous-unités des complexes sont : psa (PSI); psb (PSII); pet (photosynthetic electron transport) pour le complexe cytochrome b_6f ; atp pour ATP synthase; et rbc pour Rubisco. Les polypeptides transcrits dans le chloroplaste sont colorés en vert, ceux dans le noyau en jaune. D'après Allen *et al*., (2011).

1.4. Mécanismes de la photosynthèse

Chez les graines, notamment de soja et de colza, la dégradation incomplète de la chlorophylle conduit à des pertes importantes de rendements, l'huile produite étant de moins bonne qualité : c'est le problème dit « de graines vertes » (Mailer *et al*., 2003; Teixeira *et al*., 2016). Cette dégradation incomplète est souvent exacerbée lorsque les graines sont soumises au froid (pour les graines de colza, Jonhson-Flanagan, 1994), ou au stress hydrique (pour les graines de soja, Pádua *et al*., 2009). Comme présenté en partie 1.1, en parallèle à ce problème de qualité de l'huile, les graines vertes à maturité ont également une vigueur et une longévité réduites (Jalink *et al*., 1998), sans toutefois que le lien entre la rétention de chlorophylle et la baisse de la qualité germinative ne soit élucidé. Afin de pouvoir replacer ce lien à la lumière de nos résultats, nous allons présenter dans cette partie d'introduction bibliographique les mécanismes de la photosynthèse sur le modèle feuille. Puis, nous exposerons les différences identifiées entre la photosynthèse de la feuille et de la graine. Par la suite, nous verrons le métabolisme des principaux acteurs de la photosynthèse, c'est-à-dire les chlorophylles, les caroténoïdes et l'assemblage des protéines composant la chaîne photosynthétique. En troisième point, nous verrons les rôles joués par ABI3, ABI4 et ABI5 dans la biologie des chloroplastes et les mécanismes de régulation de perte de la chlorophylle.

1.4.1 Principes généraux de la photosynthèse

La photosynthèse est le mécanisme permettant aux organismes de produire des glucides sous l'action de l'énergie lumineuse. Elle se déroule en deux phases : la phase lumineuse, qui utilise l'énergie de la lumière pour former du NADPH et de l'ATP au niveau des membranes thylakoïdiennes au sein des chloroplastes ; et la phase obscure, où des réactions indépendantes de la lumière utilisent le NADPH et l'ATP pour synthétiser les glucides à partir du CO_2 et de l'H_2O. Au cours de la première phase, la lumière est captée par les chlorophylles et des pigments accessoires présents dans les antennes collectrices. L'énergie est ensuite transférée au centre réactionnel qui permet la conversion de l'énergie lumineuse (sous forme d'excitation de la chlorophylle) en énergie chimique. Les composants permettant la captation et la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique seront décrits plus en détail dans la suite de ce chapitre. La production d'O_2 par la photosynthèse nécessite deux photosystèmes successifs, le PSII et le PSI. Le transfert d'électrons induit par la lumière depuis H_2O jusqu'à

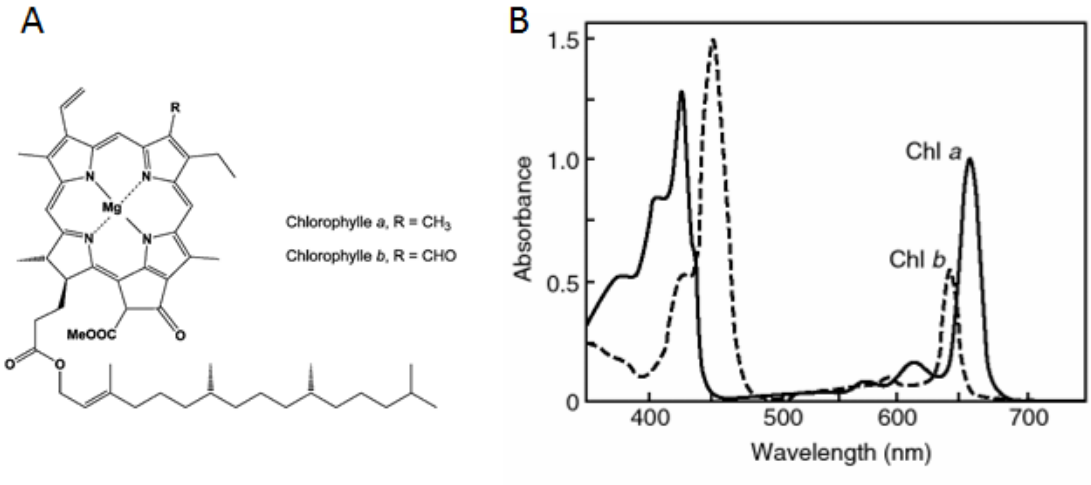


Figure 1.21 : Structure chimique des chlorophylles et spectres d'absorption dans le visible. A, Pour la chlorophylle a, R=CH_3. Pour la chlorophylle b, R=CHO. B, Les spectres d'absorption des chlorophylles montrent deux pics principaux d'absorption, dans les longueurs d'ondes correspondant au bleu (440 nm) et dans les longueurs d'ondes correspondant au rouge, 647 nm pour la chlorophylle b et 664 nm pour la chlorophylle a (Lichtenthaler and Buschmann, 2001).

$NADP^+$ pour former du NADPH provoque la translocation de protons dans la lumière des thylakoïdes (Figure 1.20). Puis, lors de la phase obscure, qui a lieu dans le stroma du chloroplaste, les produits formés par la première phase de la photosynthèse (NADPH et ATP) sont utilisés pour former des glucides à l'issu du cycle de Calvin.

1.4.2 Différences entre les feuilles et les graines à activité photosynthétique

Bien que les entités composant les chloroplastes les graines et les feuilles soient les mêmes, il existe des différences de métabolisme et de morphologie. En effet, au cours du développement, les embryons sont photohétérotrophes, à l'inverse des feuilles qui sont photoautotrophes (Borisjuk *et al*., 2003). La composition en chlorophylles et l'abondance des protéines composant les photosystèmes est différente dans une graine comparée à une feuille. Ainsi, les graines *d'A. thaliana* en début de développement ont un ratio Chla/Chlb plus élevé et une plus grande abondance en protéines du photosystème II. Au niveau de leur métabolisme, les graines assimilent moins de CO_2 que les chloroplastes des feuilles (Asokanthan *et al*., 1997). Une exposition à la lumière rouge lointaine chez *A. thaliana*, correspondant à la lumière perçue par la graine à travers le péricarpe, modifie le flux d'électron dans le PSI, indiquant une différence du fait de la filtration de la lumière par la gousse ou la silique (Allorent *et al*., 2015).

1.4.3 Les acteurs de la photosynthèse

1.4.3.1 Les chlorophylles

Chez les végétaux, il existe deux types de chlorophylle, la a et la b. Ce sont des pigments tétrapyroliques comportant quatre noyaux pentagonaux de formule brute C_4H_5N (noyau pyrrole). Le noyau pyrrole est associé à une molécule de magnésium (Figure 1.21). La voie de synthèse des chlorophylles des feuilles a été décrite en entier par l'équipe de Woodward, (1961). Elle se décompose en deux parties, la première est la synthèse de chlorophylle a, la seconde est appelée « cycle de la chlorophylle », durant lequel la chlorophylle a est convertie en b et inversement (Nakajima *et al*., 2012, Figure 1.22). La molécule précurseur de la chlorophylle a est le geranyl geranyl diphosphate (GGDP), molécule commune avec les caroténoïdes. La voie de synthèse de la chlorophylle est présentée en Figure 1.22. La dernière

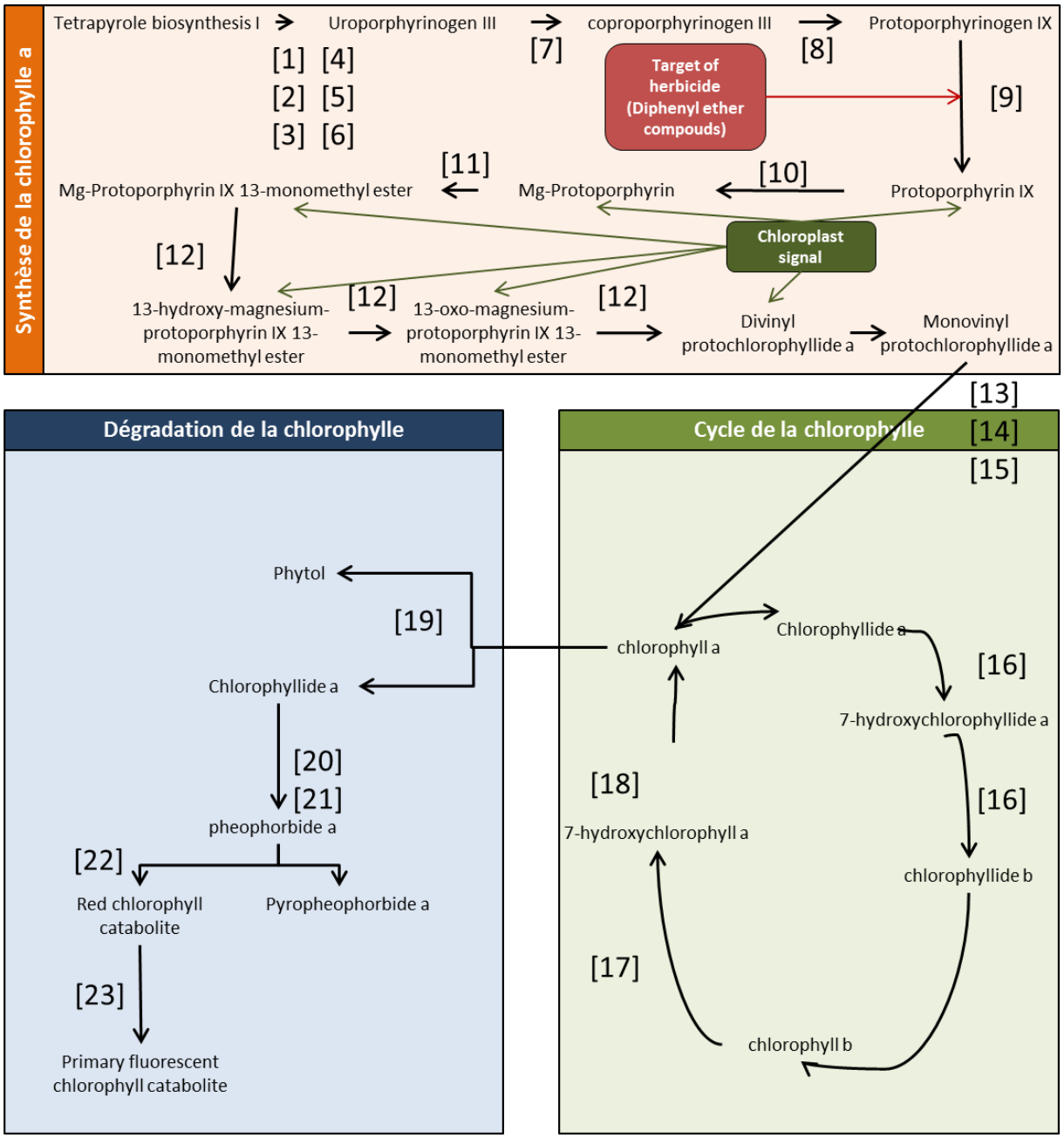


Figure 1.22 : Voie de synthèse et de dégradation de la chlorophylle. (1) Glutamyl-tRNA synthetase, (2) Glutamyl-tRNA reductase, (3) Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, (4) Porphobilinogen synthase, (5) Hydroxymethyl-bilane synthase (porphobilinogen deaminase), (6) Uroporphyrinogen III synthase, (7) Uroporphyrinogen III decarboxylase, (8) Coproporphyrinogen III oxidase, (9) Protoporphyrinogen IX oxidase, (10) Protoporphyrin IX Mg-chelatase, (11) S-adenosyl-L-methionine:Mgprotoporphyrin IX methyltransferase, (12) Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester oxidative cyclase, (13) NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase, (14) Divinyl chlorophyllide a 8-vinyl reductase, (15) Chlorophyll synthase, (16) Chlorophyllide a oxygenase (CAO) (17) Chlorophyll b reductase (NYC) (18) Hydroxymethyl chlorophyll a reductase (HCAR), (19) Chlorophyllase, (20) Mg dechelatase, (21) Pheophytinase. (22) Pheophorbide a oxygenase (PAO), et (23) Red chlorophyll catabolite reductase (RCCR). Adapté de Tanaka and Tanaka, (2006); Hörtensteiner, (2012).

étape est la formation de la chlorophylle a par l'enzyme chlorophyll synthase (Tanaka and Tanaka, 2006). La chlorophylle b est ensuite synthétisée par la chlorophyllide a oxygenase (CAO) par deux réactions d'oxygénation successives (Figure 1.22).

La dégradation de la chlorophylle intervient lors de différents événements et dans différents organes au cours du développement de la plante. En effet, la maturation des fruits, la maturation des graines comme le soja (Teixeira *et al*., 2016), la sénescence foliaire (Matile *et al*., 1996) ou la réponse à un pathogène (Poiatti *et al*., 2009) entraînent la dégradation de la chlorophylle dont les modalités restent encore mal comprises. Dans la feuille, la première étape de dégradation est la conversion de la chlorophylle b en a (Hörtensteiner, 2012; Figure 1.22) par l'enzyme 7-Hydroxymethyl chlorophyll *a* reductase (HCAR). Dans un second temps, l'ion magnésium est retiré par une Mg déchelatase et donne l'intermédiaire Pheophytine a, qui est hydrolysé par l'enzyme en pheophorbide a, puis qui dégénère en red fluorescent catabolite (RCC) sous l'action de la PAO. Enfin, le RCC est réduit en « non-phototoxic primary fluorescent chlorophyll catabolite » (pFCC) par l'enzyme RCCR. Il est notable que l'accumulation de métabolites intermédiaires de dégradation de la chlorophylle est toxique pour la cellule. Ainsi l'accumulation de RCC dans les feuilles de mutants d'*A. thaliana* déficients *rccr* provoque une mort cellulaire dépendante de la lumière due à l'émission d'oxygène singulet (Pružinská *et al*., 2007).

En plus de ces mécanismes de dégradation de la chlorophylle, la régulation de la perte de la chlorophylle fait également intervenir les protéines STAY GREEN (SGR), dont le rôle reste encore méconnu. L'appellation des gènes *SGR* est faite selon l'étude de la persistance de la chlorophylle dans les organes de la plante, notamment lors de la sénescence. Cette appellation regroupe ainsi des protéines dont les fonctions dans la dégradation de la chlorophylle sont encore méconnues. Thomas and Howarth, (2000) les ont classées en cinq groupes. Parmi eux, la classe C contient le mutant du gène *SGR* identifié sur chez le pois sur le locus de Mendel (Armstead *et al*., 2007). Leur identification précise est encore en cours, et des confusions d'annotation existent entre les gènes codant des enzymes directement impliquées dans la dégradation des chlorophylles, dont le phénotype des mutants est une persistance de la chlorophylle, et les mutants appelés *stay green*, à phénotype vert également, mais qui ne seraient pas directement impliqués dans la voie de dégradation de la chlorophylle.

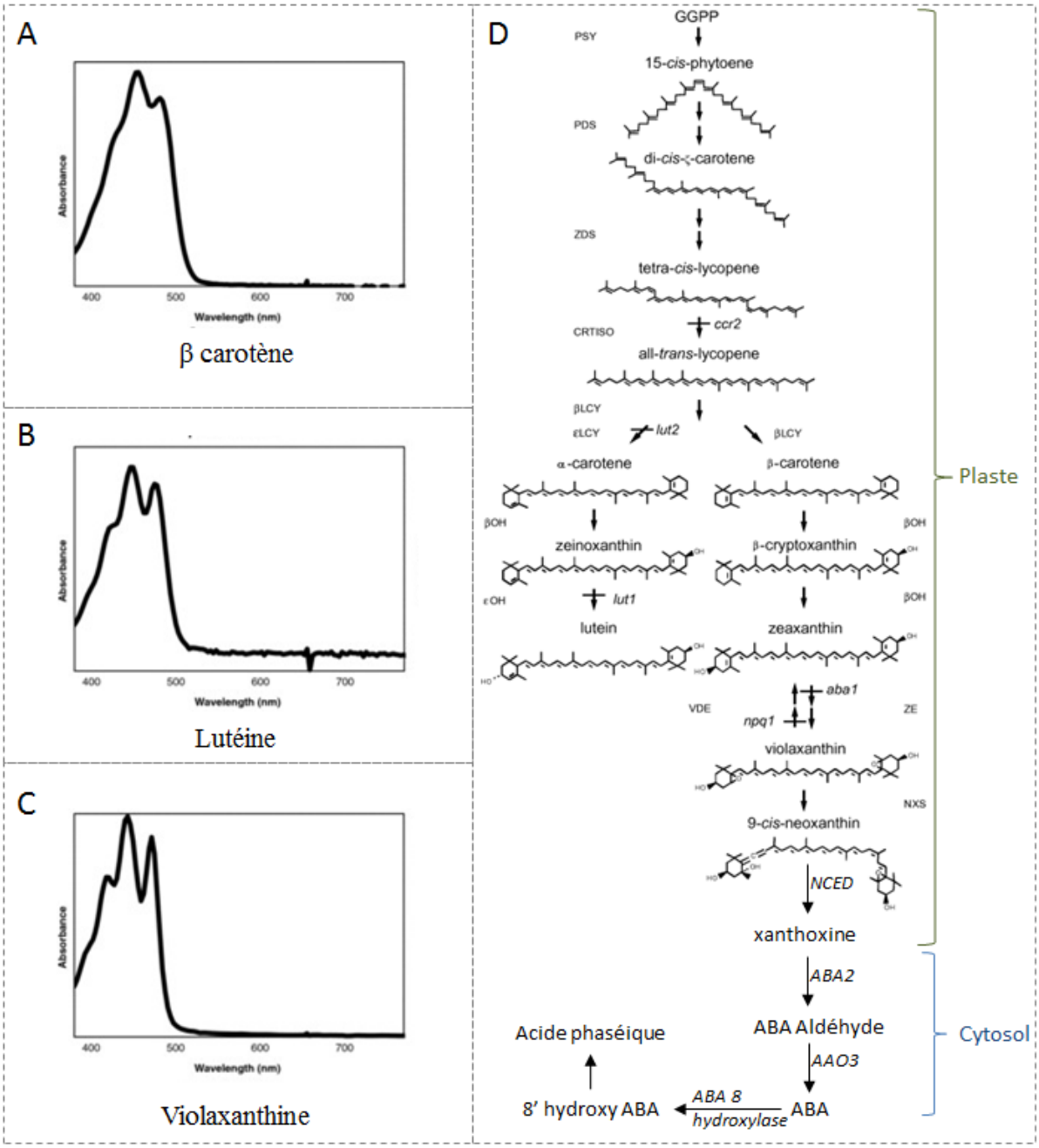


Figure 1.23 : Spectres d'absorption des caroténoïdes extraits dans le solvant diethyl ether, et métabolisme des caroténoïdes. A, B, C Spectre d'absorption des caroténoïdes β carotène, lutéine et violaxanthine. D, Voie de biosynthèse des caroténoïdes et de l'ABA chez les végétaux supérieurs. CRTISO : caroténoïde isomérase, GGPP : geranylgeranyl pyrophosphate, PSY : phytoène synthase, PDS : phytoène desaturase, ZDS : ζ-carotène desaturase, βLCY, β-cyclase; εLCY, ε-cyclase; βOH, β-hydroxylase ;εOH, ε-hydroxylase; ZE, zeaxanthin epoxidase; VDE, violaxanthin deepoxidase; NXS, neoxanthin synthase; NCED, 9-*cis*-epoxycarotenoiddioxygenase; ABA2, Short Chain Alcohol Dehydrogenase, AAO3, abscisic aldehyde oxidase; ABA, abscisic acid. *Arabidopsis* mutations are shown in italics, ABA-deficientmutant; *ccr*, carotenoid and chloroplast regulation mutant; *lut*, lutein-deficient mutant; *npq* nonphotochemical quenching deficient mutant (Lichtenthaler and Buschmann, 2001; Howitt and Pogson, 2006) et la revue de Nambara and Marion-Poll, (2005).

1.4.3.2 Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des isoprénoïdes lipophiles à 40 carbones à chaîne polyène présents dans l'antenne collectrice. Près de 750 différentes structures de caroténoïdes sont connues, ils sont classés en molécules non oxygénées appelées carotènes ou en molécules oxygénées appelées xanthophylles. Leurs maxima d'absorption se situent entre 400 et 500 nm (Lichtenthaler and Buschmann, 2001; Figure 1.23). La lutéine et le beta carotène jouent un rôle de photo-protection (Young, 1991) contre le stress photo-oxydatif conduisant à la formation de radical superoxyde O_2^- puis H_2O_2 ; ainsi que dans la désexcitation de la chlorophylle (voir la section 1.3). Ils sont synthétisés et accumulés dans les membranes thylakoïdiennes des chloroplastes. Le précurseur des caroténoïdes est le geranylgeranyl diphosphate (GGPP), un intermédiaire également précurseur des acides gibbérelliques (GAs), des tocophérols et de la chlorophylle. Le phytoène est synthétisé par la condensation de deux molécules de GGPP par la PSY (Figure 1.23). Cette étape est la première étape clef de la synthèse des caroténoïdes. La deuxième étape, comme présenté en Figure 1.23, est la conversion du phytoène en ζ-carotène, puis en lycopène, un pigment rouge majoritaire chez le fruit de la tomate. Ces deux étapes sont réalisées par deux désaturases chez les végétaux, la Phytoène désaturase (PDS) et la ζ-carotène désaturase (ZDS). L'isomérisation du lycopène en t*rans*-lyopène est effectuée par les enzymes codées par le gène *CAROTENOIDE ISOMERASE* (*CRTISO)* (Isaacson, 2002). La cyclisation du lycopène par des cyclases s'effectue selon deux voies possibles : la voie du β, β et le voie du β, ζ. La première voie conduit à l'α-carotène, la seconde au β-carotène. L'enzyme β-carotene cyclase (LYCβ) permet d'obtenir par double cyclisation le β-carotène. L'α-carotène est obtenue par les enzymes LYCβ et ε-carotene cyclase (LYCε).

Il est pertinent de noter que la voie de dégradation des caroténoïdes est utilisée pour la synthèse de l'ABA. La première étape de la dégradation des caroténoïdes est l'époxydation de la zeaxanthine en violaxanthine par l'enzyme zeaxanthine epoxydase (ZEP) (Figure 1.23). Récemment, il a été montré que cette enzyme est l'enzyme clef de la régulation des teneurs en caroténoïdes dans les graines (Gonzalez-Jorge *et al*., 2016). Puis les xanthophylles sont obtenues par clivage des 9-cis néoxanthine et violaxanthine par les enzymes 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED). Chez *A. thaliana*, NCED 2, 3, 5, 6 et 9 sont plus particulièrement impliqués dans la voie de synthèse de l'ABA. L'abscissique aldéhyde et finalement l'acide abscissique sont formés successivement par les enzymes shortchain dehydrogenase/ reductase 2 (ABA2) et ABA ALDEHYDE OXIDASE 3 (AOO3). Enfin, la

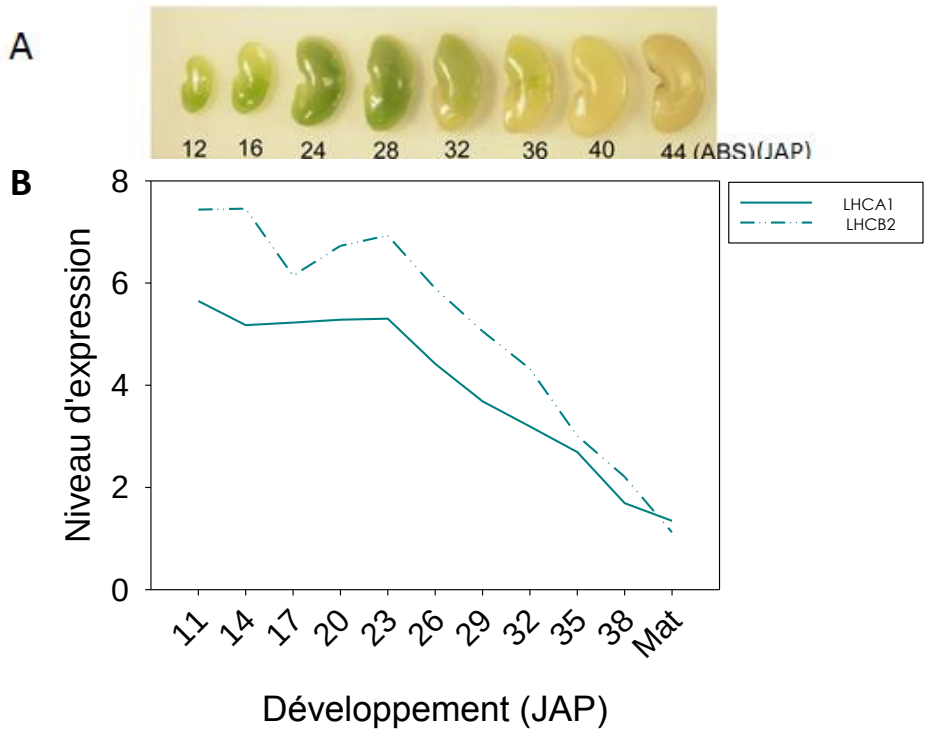
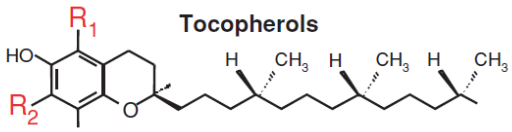


Figure 1.24 : Profils d'expression des gènes codant les deux protéines des Light Harvesting Complex (LHC) étudiées dans cette étude chez *M. truncatula* au cours du développement de la graine. A, Photographies des graines de type sauvage de *M. truncatula* R108 au cours du développement. B, Niveaux d'expression de LHCA1 (MEDTR6G033320) et LHCB2 (MEDTR5G097280) au cours du développement de la graine. D'après Righetti *et al*., (2015).



Tocochromanol type	R_1	R_2
α-tocopherol	CH_3	CH_3
α-tocotrienol	CH_3	CH_3
β-tocopherol	CH_3	H
β-tocotrienol	CH_3	H
γ-tocopherol	H	CH_3
γ-tocotrienol	H	CH_3
δ-tocopherol	H	H
δ-tocotrienol	H	H

Figure 1.25 : Structure des tocophérols. Le tableau indique la position et la nature des résidus methyl ou hydrogène pour le α-, β-, γ- δ-tocophérol (DellaPenna and Pogson, 2006).

dégradation de l'ABA se fait par hydroxylation par l'enzyme ABA 8' hydroxylase, voir la revue de Nambara and Marion-Poll, (2005).

1.4.3.3 Les protéines associées à la photosynthèse

Les protéines photosynthétiques sont composées des protéines des light harvesting complex (LHC), des photosystèmes I et II (PSI et PSII) et du complexe b6/f. Elles sont codées par des gènes nucléaires et chloroplastiques. Chez *M. truncatula*, chacun des LHC est composé de cinq protéines différentes, LHCA1, LHCA2, LHCA3, LHCA4 et LHCA5 composant le complexe appelé light harvesting complex I (LHCI), et LHCB1, LHCB2, LHCB3, LHCB4, LHCB5, LHCB6 et LHCB7 pour le complexe LHCII. Les photosystèmes I et II sont composés respectivement de 14 et de 23 protéines. Au cours du cycle de la plante, les profils d'expression des gènes codant les protéines formant les LHC et les PS varient en fonction du cycle circadien, de la lumière, des hormones, mais aussi en fonction de la teneur en chlorophylle b (Flachmann, 1997; Tanaka and Tanaka, 2011). La Figure 1.24 présente ainsi les profils d'expression de deux gènes codant des LHC, *LHCA1* et *LHCA2* qui seront étudiés dans la suite de ce travail. Au cours du développement de la graine, et de façon concomitante à la perte de la chlorophylle, la quantité de transcrits de ces gènes diminue chez *M. truncatula*, Figure 1.24. Les profils d'expression des autres gènes codant les LHC et PS sont plus variés, mais certains montrent un profil similaire, avec une nette diminution de leur expression en fin de développement de la graine. Chez le tabac, l'expression des gènes codant les LHC et PS ne serait pas directement corrélée aux teneurs en protéines à cause de l'existence d'une régulation traductionnelle (Flachmann and Kühlbrandt, 1995). Une analyse transcriptomique réalisée par Ruuska *et al*. (2004) a démontré qu'au cours du développement de la graine, la quantité de transcrits codant les LHC est faible en début de développement (avant 11 jours avant floraison, JAF), puis augmente de façon importante, et diminue fortement en fin de développement de la graine, corroborant les données transcriptomiques réalisées sur l'expression des gènes codant les LHC chez *M. truncatula*.

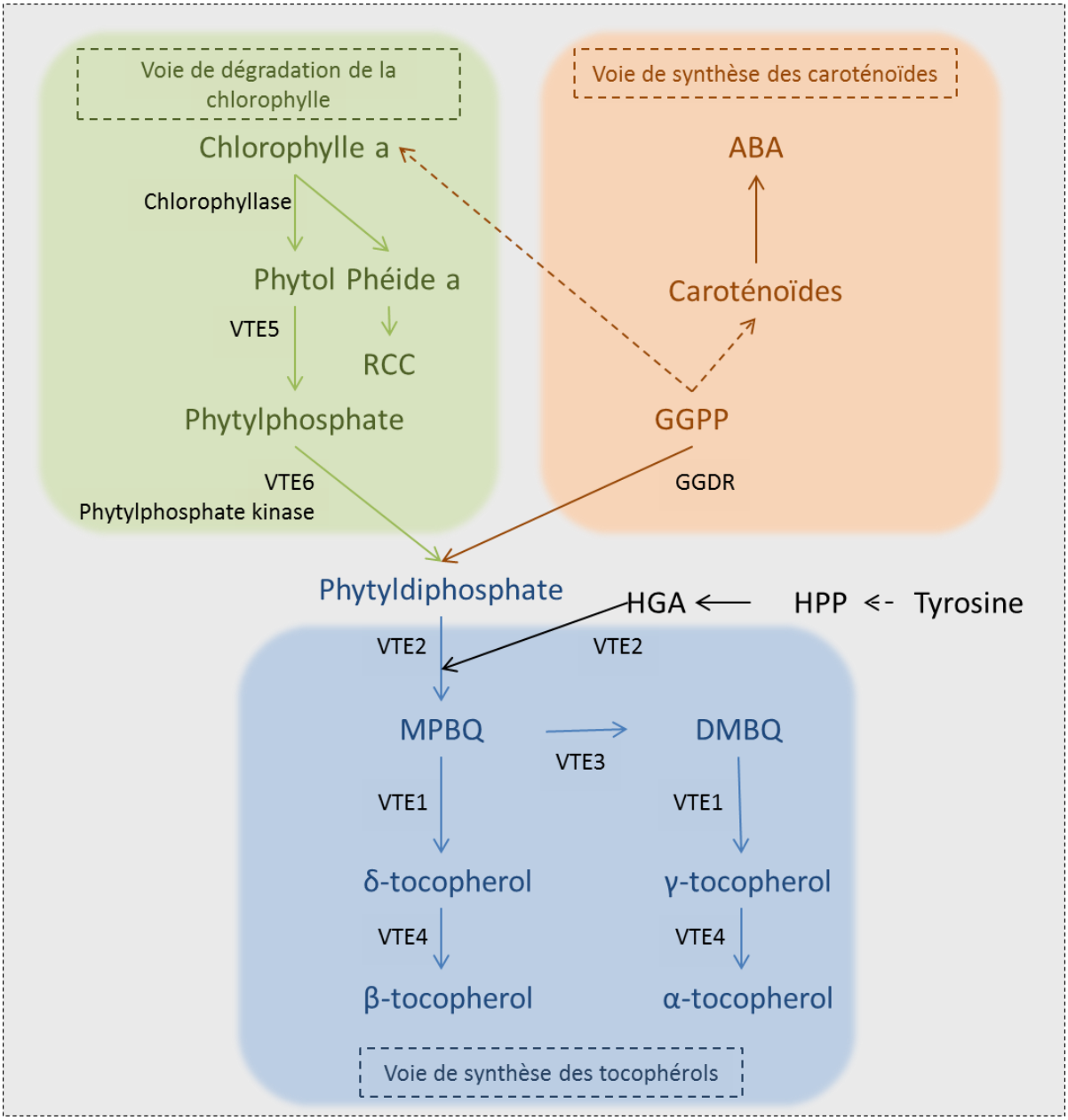


Figure 1.26 : Représentation schématique de la synthèse des tocophérols et des voies métaboliques liées, soit la synthèse des caroténoïdes et la dégradation de la chlorophylle. Les tocophérols sont synthétisés à partir du phytyldiphosphate, une molécule liée à la voie de dégradation de la chlorophylle et à la GGPP. DMPBQ, 2,3-dimethyl-5-phytyl-1, 4-benzoquinone; HPP, p-hydroxyphenylpyruvate ; HGA, homogentisic acid ; MPBQ, 2-methyl-6-geranylgeranylbenzoquinol ; DMBQ, 2,3-dimethyl-6-geranylgeranylbenzoquinol ; VTE1, tocopherol cyclase ; VTE2, homogentisate phytyltransferase ; VTE3, MPBQ methyltransferase ; VTE4, γγ-tocopherol methyltransferase. VTE5, phytol kinase ; GGDR, geranylgeranyl diphosphate reductase. Adapté de vom Dorp *et al.*, (2015); Almeida *et al.*, (2016).

1.4.3.4 Les tocophérols

Les tocophérols sont des molécules amphiphiles constituées d'une queue hydrophobe et d'une tête polaire en groupement aromatique. La position du groupement méthyl sur le noyau aromatique permet la distinction entre α-, β-, γ- δ-tocophérol (Figure 1.25). Ils sont présents dans les membranes thylakoïdales sous forme α et dans les réserves lipides des graines qui en contiennent environ dix à vingt fois plus comparées aux feuilles, sous forme de γ-tocophérol (Grusak and DellaPenna, 1999). Les tocophérols sont synthétisés dans les chloroplastes. Récemment, vom Dorp *et al*., (2015) ont montré qu'il existait une nouvelle voie de synthèse des tocophérols, portant à trois le nombre de voies connues : la voie de l'acide homogentisique (HGA), la voie de la GGPP et la voie des phytols.

Une des premières voie de synthèse des tocophérols a été découverte en 1970 par l'équipe de Whistance and Threlfall, (1970). La première étape de leur synthèse est la formation de l'acide homogentisic (HGA) par la HPPDase, une enzyme clef (Norris *et al*., 1995; Figure 1.26). Cette synthèse se poursuit ensuite avec l'obtention du 2-methyl-6-geranylgeranylbenzoquinol (MBPQ) par prénylation du phytyldiphosphate avec le HGA par l'enzyme homogentisate phytyl transferase (appelée aussi VTE2 de par la caractérisation du mutant *vitamine deficient 2*). Puis l'enzyme tocopherol cyclase, appelée également VTE1 forme ensuite le δ-tocophérol par cyclisation du MPBQ. En parallèle, la méthylation de MPBQ par VTE3 peut également conduire à la formation de 2,3-dimethyl-6-geranylgeranylbenzoquinol (DMBQ), que l'enzyme VTE1 cyclise en γ-tocophérol (Figure 1.26). Enfin, l'enzyme VTE4 méthyle le δ-tocophérol et γ-tocophérol en β-tocophérol et en α-tocophérol, respectivement.

La seconde voie, récemment découverte, connecte la voie de la dégradation de la chlorophylle à la synthèse des tocophérols (vom Dorp *et al*., 2015). Ainsi, chez *A. thaliana*, les feuilles du mutant *vte6* (muté dans le gène codant une phytylphosphate kinase), ont une teneur affectée en tocophérols, tandis ce que la sur-expression de *VTE6* résulte en une augmentation des teneurs en phytyldiphosphate et en tocophérols. La voie de synthèse des tocophérols contrôlée par VTE6 joue donc un rôle prépondérant (vom Dorp *et al*., 2015), en plus de la voie précédemment décrite par Whistance and Threlfall, (1970).

Enfin, la molécule carrefour GGPP, précurseur des caroténoïdes, des chlorophylles, des GAs, est réduite par l'enzyme GGDR pour fournir du phytyldiphosphate (Ischebeck, 2005) dans la troisième voie de synthèse des tocophérols identifiée jusqu'alors (Figure 1.26).

1.4.4 Rôles d'ABI3, ABI4 et ABI5 dans la perte de la chlorophylle et le système rétrograde

1.4.4.1 ABI3 régule les gènes codant les enzymes de dégradation de la chlorophylle dans les graines

Un des phénotypes les plus notables des graines des mutants *abi3* est qu'elles sont vertes à maturité, la chlorophylle n'est pas dégradée (Delmas *et al.*, 2013, Delahaie *et al* , 2013). Récemment, Delmas *et al*. (2013) ont montré qu'ABI3 régule l'expression des gènes *SGR*, *NYE1* et *NYE2*, impliqués dans la dégradation de la chlorophylle (voir pour revue des gènes *SGR*, Hörtensteiner, 2009). Une analyse *in vitro* par expérience de retard sur gel (EMSA) montre qu'ABI3 reconnaît et se fixe au motif RY/Sph présent dans le promoteur de *NYE2* (Delmas *et al*., 2013). De plus, la complémentation des graines de mutants *abi3-6* par la sur-expression de *NYE2* restaure le phénotype de dégradation de la chlorophylle, mais pas celui de tolérance à la dessiccation ni d'accumulation de Seed Storage Protein (SSP). ABI3 n'agirait pas seul dans le contrôle de la perte de la chlorophylle des graines *via* la régulation des *SGR*. En effet, les graines du double mutant *abi3-1 dog1* (un régulateur de la dormance, étudié par Bentsink *et al*., (2006)), sont vertes et présentent le phénotype du mutant allélique fort *abi3-5*, démontrant qu'ABI3 et DOG1 réguleraient, d'une façon à déterminer, la perte de la chlorophylle des graines chez *A. thaliana* (Dekkers *et al*., 2016). Ces résultats récents montrent que la perte de la chlorophylle des graines est régulée par des mécanismes complexes.

1.4.4.2 ABI5 régule directement les gènes codant les enzymes de dégradation de la chlorophylle lors de la sénescence foliaire

La sénescence foliaire est le processus de vieillissement contrôlé génétiquement intervenant à la fin du développement de la feuille ou en réponse à un pathogène, à un stress lumineux, thermique ou salin. Elle permet la remobilisation des ressources nutritionnelles aux organes puits, notamment l'azote. Ce processus s'accompagne d'une augmentation de l'expression de gènes associés à la sénescence (SAG), du démantèlement des chloroplastes et de la perte de la chlorophylle. Ce processus est sous le contrôle génétique et hormonal, principalement de l'éthylène, de l'ABA et de l'acide jasmonique.

La sénescence foliaire initiée par une obscurité prolongée peut être retardée par des flashs de lumière rouge, indiquant un rôle des phytochromes. Très récemment, ce rôle a été partiellement élucidé, voir la Figure 1.27 (Sakuraba *et al*., 2014). L'obscurité prolongée de

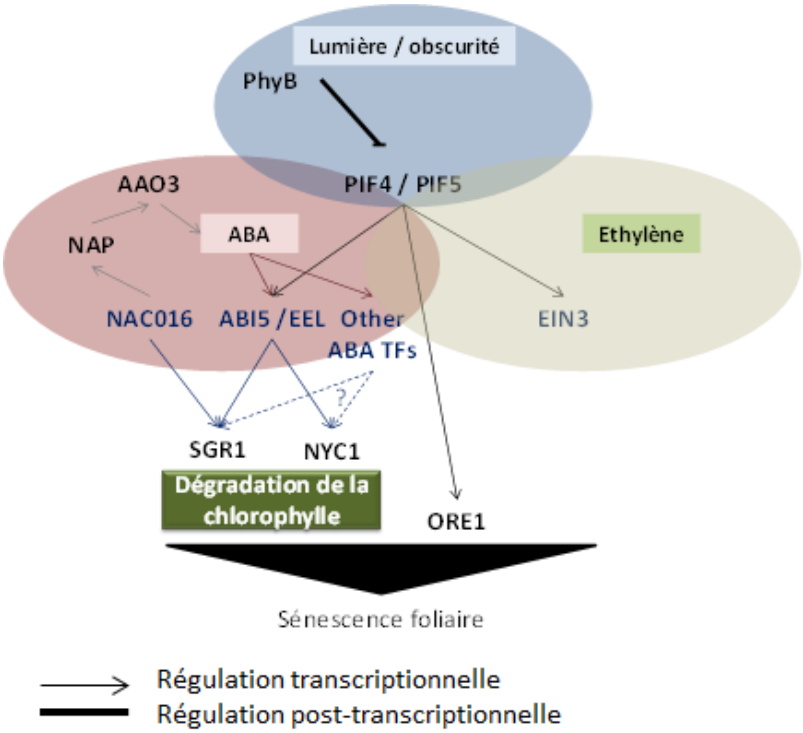


Figure 1.27 : Modèle proposé pour la régulation de la sénescence foliaire par ABI5. PIF4/PIF5 promeut la sénescence induite au noir en activant l'expression des facteurs de transcription *ABI5/EEL*, *EIN3* et *ORE1*, qui sont eux même tous inhibés par PhyB. ABI5, ABA INSENSITIVE 5; EEL, ENHANCED EM LEVEL; ORE1, ORESARA1; SGR1, STAY GREEN1; NYC1, NON YELLOW COLORING 1; NAP, *N*AC-like, activated by *A*PETALA 3/*P*ISTILLATA; AAO3, ARABIDOPSIS ALDEHYDE OXIDASE 3; EIN3, ETHYLENE INSENSITIVE 3; PhyB, PHYTOCHROMME B; PIF4/PIF5, PHYTOCHROMME-INTERACTING TRANSCRIPTION FACTOR. D' après Sakuraba *et al*., (2014, 2016).

jeunes plantules entraîne une augmentation de la teneur en ARNm et protéines codant PIF4 et PIF5 (Phytochrome Interacting bHLH transcription factor), eux-mêmes étant négativement régulés par le phytochrome B. L'accroissement des activités de PIF4 et PIF5 stimule l'expression d'*ORESARA1* (*ORE1*), un facteur de transcription majeur dans l'induction de la sénescence. Cette stimulation est induite directement par PIF4/PIF5 qui se lie au promoteur d'*ORE1*, résultant à une induction massive de plus d'une centaine de gènes *SAG* qui contrôlent la dégradation de la chlorophylle et le démantèlement des thylakoïdes (Sakuraba *et al*., 2014; Figure 1.27). Ces auteurs ont aussi montré que l'expression d'*ORE1* est également activée par ABI5 et EEL, un autre bZip de la famille des AREB, démontrant ainsi le rôle des voies de signalisation de l'ABA dans la sénescence (Sakuraba *et al*., 2014; Figure 1.27). De plus, ABI5 se lie directement aux éléments *cis* ABRE des gènes *SGR1* et *NYC1* impliqués dans la dégradation de la chlorophylle alors que PIF4/PIF5 ne se lient pas au Gbox des promoteurs de ces deux gènes, et les niveaux d'expression de *SGR1* (*STAY GREEN 1*) et *NYC1* sont significativement réprimés dans les feuilles des doubles mutant *abi5/eel-1* (*enhanced EM level 1*). Ces résultats identifient que dans les feuilles, ABI5 régule la transcription des gènes codant des enzymes de dégradation de la chlorophylle.

1.4.4.3 ABI4 participe à la communication chloroplaste-noyau au cours de l'établissement de la plantule

Les chloroplastes possèdent leur propre génome. Un dialogue entre le génome plastidial et le génome nucléaire est mis en place afin de permettre la synchronisation entre le chloroplaste et la cellule. Le système antérograde est ainsi défini comme le dialogue du noyau vers l'organelle, alors que le système rétrograde est le dialogue de l'organelle au noyau. Les différents types de signaux rétrogrades chloroplastiques ont été revus par (Pogson *et al*., 2008). Le premier type inclut les signaux contrôlant la biogenèse et l'assemblage des structures macromoléculaires et le couplage métabolique, notamment ceux permettant la biogénèse du chloroplaste. Lorsque cet assemblage est couplé de manière optimale avec le métabolisme, la synthèse des protéines impliquées dans cette biogenèse est réprimée. Le second type inclut des signaux qui permettent des ajustements rapides du métabolisme en réponse à des contraintes environnementales et de développement perçues par le chloroplaste, voir pour revues Pogson *et al*., (2008) et León *et al*., (2013). Le résultat de la signalisation rétrograde est l'ajustement des niveaux d'expression des gènes nucléaires codant des protéines impliquées dans la photosynthèse, principalement les *LHCB*, les *RIBULOSE*

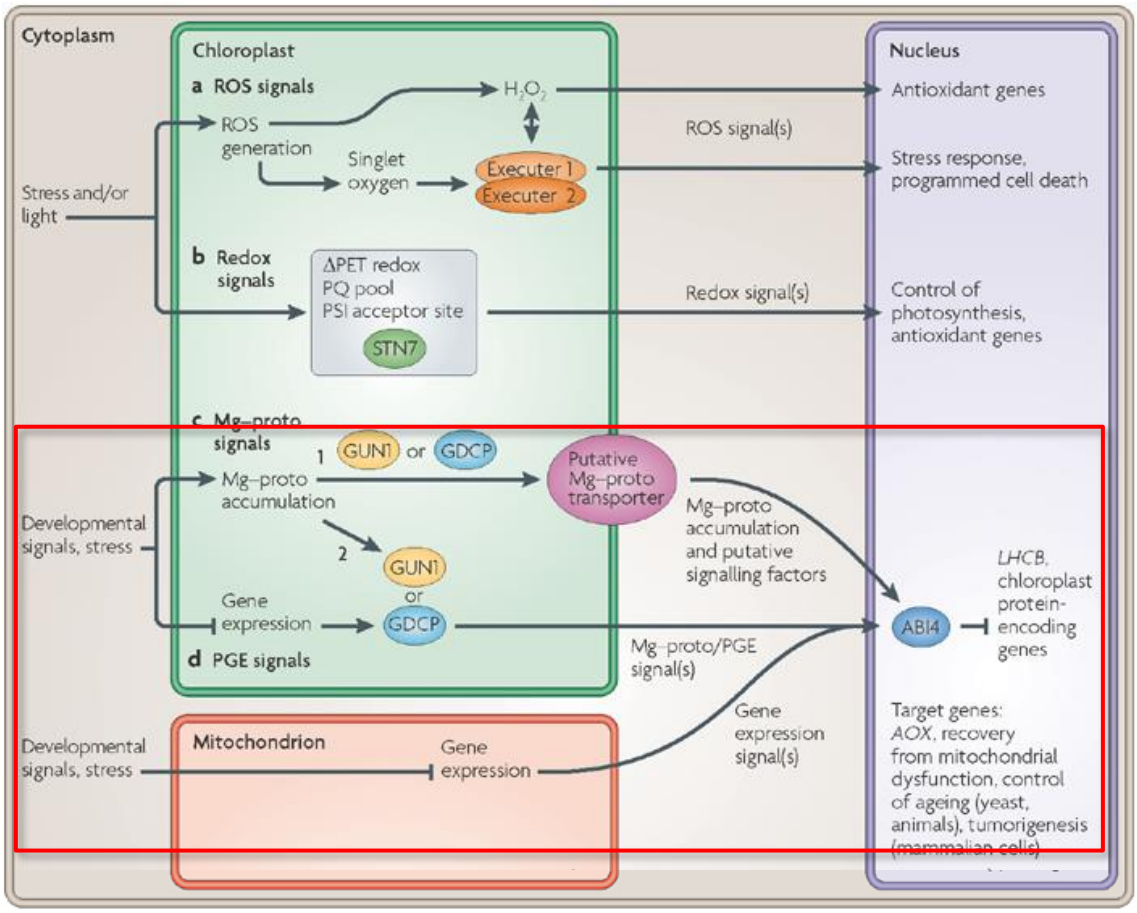


Figure 1.28 : Modèle proposé du système rétrograde de la cellule. a l'induction de la transcription des gènes nucléaires par le signal ROS généré par le chloroplaste. **b** La régulation des gènes nucléaires par l'état redox de la chaîne d'électron photosynthétique. **c** Via l'accumulation de la Mg-protoporphyrin IX et l'activation d'ABI4. **d** Inhibition des gènes plastidiaux. **c** et **d** conduisent à la répression des gènes codant les protéines chloroplastiques. Les voies impliquant le facteur de transcription ABI4 sont encadrées en rouge. D'après Woodson and Chory, (2008).

BISPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN (*RCBS*) et des gènes codant des protéines impliquées dans les systèmes antioxydants.

Dans les plantes, la signalisation rétrograde est mal comprise. D'après Woodson and Chory, (2008), il existe 4 voies principales permettant ce dialogue du chloroplaste au noyau (Figure 1.28) : 1) le signal résultant de l'inhibition des gènes chloroplastiques, 2) l'accumulation de Mg-protoporphyrine, un intermédiaire de la biosynthèse de la chlorophylle, 3) l'existence d'un signal ROS généré par les chloroplastes et 4) le signal redox issu de la chaîne photosynthétique. Cependant, d'autres voies participeraient à la signalisation rétrograde, comme la signalisation par les métabolites secondaires ou les produits d'oxydation des caroténoïdes, pour revue voir Estavillo *et al*. (2013). Lors de l'établissement de la plantule et le passage de la phase hétérotrophe à la phase autotrophe, le signal rétrograde est nécessaire pour induire la synthèse des PHANGs et l'accumulation des Mg-protoporphyrine. Cependant, au cours de la maturation de la graine et de la perte de la chlorophylle, le rôle de la signalisation rétrograde dans le démantèlement des chloroplastes reste à déterminer.

Récemment, GENOME UNCOUPLED1 (GUN1) et ABI4 ont été caractérisés comme des composants communs à plusieurs voies de signalisation du système rétrograde (Figure 1.28). Cette découverte a été permise par le criblage de mutants d'*A. thaliana* résistants au norflurazon, un inhibiteur de la synthèse des caroténoïdes. Le traitement des plantes au norflurazon entraîne une perte de caroténoïdes et provoque une photooxidation importante dans les chloroplastes, ce qui a pour conséquence d'entraîner une réduction de l'expression des gènes nucléaires PHANGs. Par analyse transcriptomique, Koussevitzky *et al*., (2007) ont analysé l'expression des gènes nucléaires chez des plantes sauvages et chez des mutants *gun* en présence du norflurazon et ont identifiés 330 gènes nucléaires sur-exprimés dans les mutants et réprimés dans les plantes sauvages. De manière intéressante, des éléments *cis* liés à la signalisation à l'ABA sont surreprésentés dans les promoteurs de ces gènes, notamment ceux reconnus par ABI4, suggérant son rôle dans le signal rétrograde. Chez les mutants *abi4* et le mutant allélique *sun6*, l'inhibition des PHANGs n'est plus effective en réponse au saccharose démontrant l'implication d'ABI4 dans la répression de l'expression des *PHANGs* (Acevedo-Hernández *et al*., 2005). D'après Koussevitzky *et al*., (2007), ABI4 inhibe l'expression des gènes photosynthétiques induits par la lumière en se liant aux éléments *cis* G-box situés dans leur région promotrice, voir la Figure 1.9 (León *et al*., 2013). Il est fort probable que l'ABA ne soit pas le signal agissant sur le système rétrograde car les mutants *aba1* ne montrent de répression des *PHANGS* (Koussevitzky *et al*., 2007). Outre la

signalisation rétrograde chloroplastique, ABI4 interviendrait également dans le système rétrograde mitochondrial, *via* la régulation du gène *ALTERNATIVE OXYDASE 1* (*AOX1*), codant une protéine de la chaîne respiratoire mitochondriale (Giraud *et al*., 2009).

1.5 Objectifs de la thèse

Ce projet de thèse s'inscrit dans la thématique de l'équipe CONSERTO qui vise à comprendre les mécanismes de la régulation de l'acquisition de la qualité germinative au cours du développement de la graine de *M. truncatula*. Les travaux réalisés par Verdier *et al*., (2013) ont permis d'identifier par construction de réseaux de gènes des facteurs de transcription spécifiques des graines qui sont co-exprimés avec les transcrits des gènes corrélés à la longévité, notamment les orthologues d'ABI4 (ré annoté dans ce travail MtABL), MtABI5 et HSFA9 (ré annoté dans ce travail MtHSFA2.2). Les expériences réalisées au cours de cette thèse ont été menées afin de répondre à la principale question : quel est le rôle de ces trois facteurs de transcription dans la qualité germinative des graines de légumineuses, notamment l'espèce modèle *M. truncatula* et le pois *Pisum sativum var. Caméor* ?

(1) Les premières expériences portent sur l'étude d'ABI5. Nous avons obtenu et caractérisé les graines des mutants d'insertion *Tnt1* Mt-*abi5-3* et EMS de pois, les mutants d'insertion *Tnt1* Mt-*abi5-1* et Mt-*abi5-2* ayant déjà été obtenus précédemment. Par des études physiologiques, biochimiques et protéomiques, nous avons cherché à identifier le rôle d'ABI5 dans la maturation des graines et la longévité en portant une attention particulière sur les sucres RFOs, les protéines LEA et la dégradation de la chlorophylle.

(2) Nous avons obtenu les mutants Mt-*abl-1* et Mt-*abl-2* et caractérisé la biologie de leurs graines. Nous montrons que la longévité et la rétention de la chlorophylle sont affectées, et ce nettement plus que dans les mutants Mt-*abi5*. Connaissant le rôle d'ABI4 dans la signalisation rétrograde et les résultats obtenus sur MtABI5, nous avons ensuite essayé de comprendre la relation entre ces deux facteurs de transcription dans la régulation de la dégradation de la chlorophylle et des marqueurs de longévité par l'obtention de double mutants et la caractérisation de leurs graines.

(3) Enfin, le module de longévité proposé par Verdier *et al*., (2013) présente aussi MtHSFA2.2, l'orthologue putatif d'AtHSFA9. Nous avons obtenu et caractérisé les graines de mutants d'insertion *Tnt1* Mt-*hsfa2.2-1*, Mt-*hsfa2.2-2* et Mt-*hsfa2.2-3*. Nous montrons que les graines mutantes présentent une plus forte dormance alors que la longévité n'est pas affectée. Nous avons ensuite cherché à identifier par des analyses biochimiques et transcriptomiques le rôle de MtHSFA2.2 dans la biologie de la graine.

2. Chapitre 2: ABI5 is a Regulator of Seed Maturation and Longevity in Legumes

2.1 Résumé

La préservation des ressources génétiques et l'obtention de graines de bonne qualité germinative présentent des enjeux importants et impliquent des graines ayant une bonne vigueur et longévité. Dans ce chapitre, une analyse QTL antérieure à la thèse a identifié *M. truncatula* ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 (MtABI5) comme étant en lien avec la longévité des graines. La caractérisation des graines de mutants d'insertion *Tnt1 Mtabi5* a révélé que l'acquisition de la longévité et de la dormance étaient fortement dérégulés chez ces mutants. Par une étude transcriptomique de graines de mutants au cours du développement réalisée en comparaison avec le type sauvage, nos résultats identifient un réseau de co-expression plaçant MtABI5 comme un régulateur de différents modules de gènes liés au métabolisme des RFOs, des protéines LEA (LEA) et des gènes associés à la photosynthèse (PHANGs). Nos résultats identifient que la plus faible accumulation en RFOs est liée à la régulation de *SEED IMBIBITION PROTEIN1* (*MtSIP1*). Une analyse protéomique réalisée par Chatelain *et al.*, (2012) a confirmé que l'accumulation de polypeptides LEA était réduite dans les graines matures des mutants *Mtabi5*. Enfin, nos résultats identifient l'absence d'inhibition des PHANGs en fin de développement de la graine à une accumulation différentielle en chlorophylles et en caroténoïdes, faisant des graines matures des mutants *Mtabi5* des "graines vertes". Nous avons caractérisé ce phénotype de phénotype de réponse à un stress, avec une accumulation plus importante d'alpha tocophérol et une surreprésentation des gènes liés au programme de mort cellulaire. Notre caractérisation des mutants *abi5* chez une seconde légumineuse, le pois, et chez *A. thaliana* confortent le rôle d'ABI5 dans la régulation de la longévité, de la perte de la chlorophylle et de l'accumulation des RFOs dans la maturation de la graine des légumineuses.

Plant Cell Advance Publication. Published on November 15, 2016, doi:10.1105/tpc.16.00470

RESEARCH ARTICLE

ABI5 is a Regulator of Seed Maturation and Longevity in Legumes

Julia Zinsmeister[1], David Lalanne[1], Emmanuel Terrasson[1], Emilie Chatelain[1], Céline Vandecasteele[1], Benoit Ly Vu[1], Cécile Dubois-Laurent[1], Emmanuel Geoffriau[1], Christine le Signor[2], Marion Dalmais[3], Katharina Gutbrod[4], Peter Dörmann[4], Karine Gallardo[2], Abdelhafid Bendahmane[3], Julia Buitink[1*], Olivier Leprince[1*]

[1]IRHS, Agrocampus Ouest, INRA, Université d'Angers, SFR 4207 QUASAV, 49071 Beaucouzé, France
[2] Agroécologie, UMR1347, INRA, BP 86510, F-21000, Dijon, France
[3] Institute of Plant Sciences Paris-Saclay, INRA, CNRS, Université Paris-Sud, Université d'Evry, Université Paris-Diderot, Bâtiment 630, 91405, Orsay, France
[4] Institute of Molecular Physiology and Biotechnology of Plants, University of Bonn, 53115 Bonn, Germany
*equal contribution
Corresponding author: olivier.leprince@agrocampus-ouest.fr

Present addresses:
Emmanuel Terrasson: Illumina UK Ltd., Cambridge, CB21 6GP, UK,
24 Chemin de Borde Rouge – Auzeville, CS 52627, 31326 Castanet-Tolosan, France

Céline Vandecasteele : GEPHYSE, Génétique, Physiologie et Système d'élevage, UMR1388 INRA, 24 Chemin de Borde Rouge – Auzeville, CS 52627, 31326 Castanet-Tolosan

Short Title : ABI5 regulates late seed maturation

One sentence summary:
ABI5 is a prominent regulator of late seed maturation in legumes, coupling seed vigor with raffinose family oligosaccharide and late embryogenesis abundant protein accumulation and degreening.

The author(s) responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) are: O. Leprince (Olivier.leprince@agrocampus-ouest.fr).

Abstract

The preservation of our genetic resources and production of high quality seeds depends on their ability to remain viable and vigorous during storage. In a quantitative trait locus (QTL) analysis on seed longevity in *Medicago truncatula*, we identified the bZIP transcription factor ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 (ABI5). Characterization of Mt-*abi5* insertion mutant seeds revealed that both the acquisition of longevity and dormancy were severely impaired. Using transcriptomes of developing *Mt-abi5* seeds, we created a gene co-expression network and revealed ABI5 as a regulator of gene modules with functions related to raffinose family oligosaccharide RFO metabolism, late embryogenesis abundant (LEA) proteins and photosynthesis-associated nuclear genes (PhANGs). Lower RFO contents in *Mt-abi5* seeds were linked to the regulation of *SEED IMBIBITION PROTEIN1*. Proteomic analysis confirmed that a set of LEA polypeptides were reduced in mature Mt-*abi5* seeds, whereas the absence of repression of *PhANG* in mature Mt-*abi5* seeds was accompanied by chlorophyll and carotenoid

©2016 American Society of Plant Biologists. All Rights Reserved

retention. This resulted in a stress response in Mt-*abi5* seeds, evident from an increase in α-tocopherol and upregulation of genes related to programmed cell death and protein folding. Characterization of *abi5* mutants in a second legume species, *Pisum sativum*, confirmed a role for ABI5 in the regulation of longevity, seed degreening and RFO accumulation, identifying ABI5 as a prominent regulator of late seed maturation in legumes.

INTRODUCTION

Seed longevity, *i.e.* the maintenance of viability during storage, is a crucial factor for the conservation of genetic resources and to ensure proper seedling establishment and crop yield. Longevity is progressively acquired during maturation, after seed filling, until the seed reaches a dry, quiescent state (Probert et al., 2007; Verdier, 2013; Righetti et al., 2015). During this period of seed development, late embryogenesis abundant (LEA) protein and raffinose family oligosaccharides (RFO) accumulate, and chlorophyll is degraded (Rosnoblet et al., 2007; Chatelain et al., 2012; Verdier et al., 2013, Righetti et al., 2015). Seed dispersion or harvest in the case of crops can occur any time during late seed maturation (Probert et al., 2007). Therefore, the content of LEA, RFO and/or chlorophyll in the seeds is indicative of seed maturity and vigor (Jalink et al., 1998; Sinniah et al., 1998; Vandecasteele et al., 2011; de Souza Vigidal et al., 2016). Also, during seed maturation, the progressive loss of water induces the formation of a so-called cytoplasmic glass, an amorphous matrix resembling a solid-like state where the mobility and relaxation rates of molecules are severely slowed down, thereby imposing a state of quiescence and conferring longevity (reviewed in Buitink and Leprince, 2004).

The role of LEA proteins and small heat shock proteins (sHSP) in longevity has been documented (Hundertmark et al., 2011; Chatelain et al., 2012; Prieto-Dapena et al., 2006). Additional protective factors conferring longevity include a set of antioxidants against oxidation occurring during storage, such as glutathione (Kranner et al., 2006), tocochromanols (Mène-Saffrané et al., 2010; vom Dorp et al., 2015) and seed coat components, including flavonoids and cutin (Debeaujon et al., 2000; De Giorgi et al., 2015). Seed longevity has also been shown to be associated with DNA and protein repair systems such as DNA ligase (Waterworth et al., 2010), protein L-isoaspartyl methyltransferase (Oge et al., 2008) and methionine sulfoxide reductases (Chatelain et al., 2013). The role of RFO in seed longevity remains circumstantial. It is based on observations that RFO contents increase concomitantly with the acquisition of longevity (Sinniah et al., 1998; Verdier et al., 2013). In Arabidopsis, seeds of *alpha-galactosidase2* (*agal2)* mutants exhibited reduced longevity (Righetti et al., 2015), and galactinol was found to be a marker for seed longevity in several species (de Souza Vigidal et al., 2016). However, there is no direct evidence for a causal relationship between the protective properties of RFO via a role in the stability of the cytoplasmic glass and longevity (Buitink et al., 2000). Alternative roles for RFOs during establishment of seed longevity include

a possible function in carbon storage to provide energy that can easily be mobilized during germination after ageing, a function in mitigating environmental stress and protection against oxidative damage (Nishizawa et al., 2008).

In most plant species, chlorophyll is degraded during the late stages of seed maturation, before the seed reaches the dry state (Nakajima et al., 2012; Delmas et al., 2013; Teixeira et al., 2016). Chlorophyll retention in dry oily seeds appears to be detrimental to seed longevity. Seeds of the Arabidopsis *green-seeded* (*grs*) mutant contained twice as much chlorophyll as the wild type and exhibited reduced storage stability (Clerkx et al., 2003). Likewise, seeds of the *non-yellow coloring1* (*nyc1)/nyc1-like (nol)* double mutant affected in the conversion of Chl *b* to Chl *a*, the first step of Chl degradation, contained 10-fold more Chl than the wild type and had a strongly reduced longevity (Nakajima et al., 2012). However, the cause-effect relationship between seed longevity and Chl content remains elusive.

Whereas several upstream regulators of desiccation tolerance have been identified, information is scarce on the regulatory network leading to the acquisition of longevity. Arabidopsis loss-of-function mutants of the master regulators *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3* (*ABI3)* and *LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1)* produce seeds that lose their viability during desiccation or during the first few weeks after harvest (Ooms et al., 1993; Nambara et al., 1994; Sugliani et al., 2009; Delahaie et al., 2013). Overexpression of the ABI3-regulated heat shock transcription factor A-9 from *Helianthus annuus* (sunflower; *HaHSFA9*) led to increased stability during accelerated aging in *Nicotiana tabacum* (tobacco) seeds (Prieto-Dapena et al., 2006; Personat et al., 2014). The A-9 transcription factor also interacts with the sunflower drought-responsive factor HaDREB2 (DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN B2) in a seed-specific manner to enhance stability during accelerated aging (Almoguera et al., 2009). Using a trait-based gene significance measure and gene network analysis, a co-expression module related to longevity was found that led to the identification of 11 transcription factors, such as WRKY3 and NUCLEAR FACTOR, X-BOX LIKE1 (NFXL1), whose mutations in Arabidopsis led to reduced longevity (Righetti et al., 2015). Another important regulator of seed maturation is DELAY OF GERMINATION1 (DOG1), originally identified for its role in dormancy, but also shown to play a role in seed storage stability and regulation of many seed maturation genes in interaction with ABI3 (Bentsink et al., 2006; Dekkers et al., 2016).

With the aim of identifying further loci involved in longevity of legume seeds, we performed a quantitative trait loci (QTL) study on a recombinant inbred line (RIL) population of *Medicago truncatula* that we previously used to identify loci for traits related to seed- and

seedling vigor and non-reducing soluble sugar content (Vandecasteele et al., 2011). Here, we identified *M. truncatula* ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 (Mt-ABI5) as a candidate gene involved in longevity through its colocation with a QTL of longevity, and further characterized its function during seed maturation in legume seeds. ABI5 is a member of the basic leucine zipper (bZIP) family referred to as ABA (abscisic acid) response element binding (AREB) or ABA-responsive promoter elements (ABRE) binding factors (ABFs), which mediate cellular responses to ABA in seeds and vegetative tissues (Finkelstein and Lynch, 2000; Jakoby et al., 2002; Fujita et al., 2005; Yoshida et al., 2010; Wang et al., 2015). Acting down-stream and/or synergistically with ABI3, ABI5 functions as homo- or heterodimers that bind to ABRE elements found in the regulatory regions of many stress-related genes (Carles et al., 2002; Lopez-Molina et al., 2001; Nakabayashi et al., 2005; De Giorgi et al., 2015) as well as light-signaling genes (Lee et al., 2012; Sakuraba et al., 2014).

In Arabidopsis, ABI5 regulates seed germination, dormancy and seedling growth. After germination, ABI5 is necessary for ABA-induced growth arrest under unfavorable conditions (Lopez-Molina et al., 2001) and the re-induction of desiccation tolerance in germinated seeds of Arabidopsis (Maia et al., 2014) and *M. truncatula* (Terrasson et al., 2013). ABI5 also integrates light and ABA signals during germination and seedling growth (Lee et al., 2012; Tang et al., 2013). However, little is known about a possible role of ABI5 during seed maturation. In Medicago, Mt-*ABI5* was found to be a hub in the gene network regulating seed survival in the dry state (Verdier et al., 2013), but a role in seed longevity was not investigated.

Using mutants of two legume species, *M. truncatula* and *Pisum sativum*, we here demonstrate a role for Mt-*ABI5* in the acquisition of seed longevity during seed maturation. Further transcriptomic and biochemical analysis demonstrate a role for Mt-ABI5 during seed maturation, regulating the accumulation of LEA proteins, RFO, expression of photosynthetic genes and dismantling of the photosynthetic apparatus. Our results reveal that Mt-ABI5 is an important regulator of late seed maturation in legumes, connecting degreening with the acquisition of seed longevity.

RESULTS

The bZIP transcription factor gene *ABI5* co-locates with QTL for longevity, RFO content, and germination rate of *M. truncatula* seeds

To identify *M. truncatula* populations with genetic variability in seed longevity, we screened the parents of different sets of RIL populations. Thus, a strong genotypic difference in longevity was detected between the *M. truncatula* genotypes Jemalong-6 (A17) and DZA315.16, with seed longevity being 4-fold higher in DZA315.16 (Figure 1A). Based on these parental differences, the variability in longevity was assessed in 171 RILs derived from the cross between J6 and DZA315.16 (*i.e.,* the LR-4 population). Two storage conditions were chosen to assess seed life span: (i) 75% relative humidity (RH) at 35°C, known to induce a fast deterioration (Verdier et al., 2013) and (ii) 60% RH at 35 °C, corresponding to moderate aging. The percentage of final germination and normal seedling morphology was determined after 20 and 159 d of storage under the two conditions, respectively. A large variation was found in these parameters, with germination percentages varying between 10 and 100%, and normal seedling percentages between 0 and 50% (Figure 1B). Ten QTL were detected for seed longevity during accelerated aging, and five during moderate aging, corresponding to six chromosomal regions (Table I). Three regions showed a colocation between QTL for accelerated aging and moderated aging, explaining between 10 and 21% of the variation (Table I).

To identify candidate genes that might be responsible for these QTL, genes encoding transcription factors that were previously identified as being correlated with survival in the dry state (Verdier et al., 2013) were localized on the chromosomes. The Mt-*ABI5* gene, a bZIP transcription factor and the homologue of Arabidopsis *ABI5* (Wang et al., 2015), was located at position 64.9 on LG 7, within the confidence interval of three QTL for longevity both for moderate and accelerated aging with seeds obtained from two different growth locations (Angers and Dijon) (Figure 1C, Table I). This chromosomal region also contained QTL for the composition of soluble sugars Suc, stachyose (Sta) and for the ratio Suc/RFO, and a QTL for germination rate, i.e., T50 (time to reach 50% germination, Figure 1C), that were previously identified by our group (Vandecasteele et al., 2011). The Mt-*ABI5* gene was amplified by PCR from both parental lines. Several polymorphisms were detected in the upstream promotor region and intron regions and one SNP was found in an exon, resulting in a missense variant R177G (Supplemental Table 1). Mapping of the gene confirmed its localization on linkage group 7 (Supplemental Table 1; Figure 1C).

Mt-ABI5 regulates the acquisition of seed longevity and dormancy during seed maturation in *M. truncatula*

The role of Mt-ABI5 in seed longevity in *M. truncatula* was investigated using *Tnt1* insertion mutants. Previously, we reported ABA insensitivity during germination for two Mt-*abi5* alleles (Terrasson et al., 2013), corresponding to Mt-*abi5-1* and Mt-*abi5-2*. Here, we identified a third insertion mutant allele, Mt-*abi5-3*, for which ABA insensitivity during germination was also confirmed (Supplemental Figure 1). The insertions of the *Tnt1* transposons were all located 5' to the bZIP domain (Figure 2A). To assess the impact of the Mt-*abi5* mutation on seed development, physiological indicators of maturation were monitored from seed filling onwards. No differences in the accumulation of dry weight or the loss of water content during maturation were observed between wild-type and mutant seeds (Figure 2B). Total time of maturation until abscission of the pod was also comparable for all lines, being around 44 d after pollination. All genotypes acquired their capacity to germinate at the same time at around 15 d. However, in wild-type seeds, time to germination (as assessed by T50) increased during maturation from 10 d to 18 d, indicative of the establishment of dormancy (Bolingue et al., 2010, Figure 2C). By contrast, time to germination of *Mt-abi5* seeds steadily decreased during maturation, with a T50 of only 12 h for fully mature seeds (Figure 2C, Supplemental Figure 1). This value was considerably lower than that of completely after-ripened wild-type seeds (T50=23 h, Bolingue et al., 2010), indicating that not only dormancy but also germination rate is affected in the Mt-*abi5* mutants.

Seeds of Mt-*abi5* acquired desiccation tolerance at the same developmental stage as wild-type seeds (Figure 2D). Longevity was determined by the construction of survival curves, showing the decrease in germination at the indicated time after storage at 75% RH, 35°C (Figure 2E). Viability of the Mt-*abi5* seeds was lost earlier during storage than that of the wild type. The P50, the time of storage needed to obtain a loss of 50% of germination, was consistently reduced in the Mt-*abi5* seeds to 60-70% of the wild-type values, for different harvests (Figure 2F).

A gene network-based analysis of the Mt-*abi5* transcriptome reveals distinct gene modules with specific biological functions during seed maturation

The reduction of dormancy and longevity in the Mt-*abi5* mutant lines indicates that the late seed maturation is deregulated. To understand the basis for the deregulation, the transcriptomes of wild-type and Mt-*abi5* seeds were analyzed at three stages during seed maturation; 16 DAP (beginning of seed filling); 24 DAP (mid seed-filling, when desiccation tolerance is acquired), and pod abscission, when longevity has been fully established. A total of 2042 and 869 probes were up- and down-regulated respectively in Mt-*abi5* mutants compared to wild-type seeds

(Supplemental Dataset 1). Venn diagrams showed that this differential expression occurred mostly at abscission, with 1868 (91%) and 730 (84%) transcripts exhibiting increased and decreased levels, respectively. (Supplemental Dataset 1). Only a few probes differed between Mt-*abi5* and the wild type at 16 DAP (17 up- and 66 down-regulated) and 24 DAP (28 up- and 57 down-regulated) (see Venn diagram Supplemental Dataset 1). Using the seed maturation transcriptome that we previously generated (Righetti et al., 2015; see efp browser Medicago http://bar.utoronto.ca/efpmedicago/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=medicago_seed), we noticed that differentially expressed probes in developing Mt-*abi5* seeds can be grouped in different sets of expression profiles compared to the wild type. To capture the temporal regulation of these probes during seed development, a co-expression network was constructed using the intensities (transcript levels) of the wild-type and Mt-*abi5* mutant seeds together with those obtained at 15 time points during wild-type seed maturation (Figure 3).

Three main gene modules were detected that regrouped 1147 nodes (probes) with 2409 edges, and that are hereafter referred to as modules I, II and III (Figure 3A). To understand the topology of the network, nodes were colored based on their expression profile. Expression of most of the probes was deregulated (repressed or increased) at final maturation (Figure 3A and B). Module I contained 51 transcripts that were differentially down-regulated at 16 DAP in the Mt-*abi5* seeds compared to wild-type seeds (Figure 3A). This module was significantly enriched with GO terms associated with cell wall organization and pectin esterase activity, with gene products predicted to be localized in the cell wall or apoplast (Table II). Expression profiles of probes in this module in wild-type seeds showed elevated transcripts during late embryogenesis and early seed filling, after which transcript levels decreased (Figure 3B, top).

In module II, three sub-clusters were identified and analyzed separately. Cluster IIa contained genes with both up-and down-regulated transcripts in the Mt-*abi5* seeds compared to wild-type seeds, in which their level increased during the final stages of seed maturation (Figure 3B). Cluster IIb was characterized by overrepresented biological functions related to "embryonic development ending in seed dormancy", "defense response", "response to hormone stimulus and temperature" as well as "secondary processes" and "reproductive structure development" (Table II). A zoom on part of this cluster containing probes with down-regulated transcripts in the Mt-*abi5* seeds compared to the wild type revealed several transcripts encoding LEA proteins including EM1 and several members of the seed maturation protein family (SMP, also referred to as D-34 family (Figure 3C)). This cluster also contained homologues of *γ-GLUTAMYLCYSTEINE SYNTHETASE* (*GSH1*), which catalyzes the first step of glutathione biosynthesis, *NON-PHOTOCHEMICAL QUENCHING 1* (*NPQ1*) involved in the xanthophyll

cycle and *SEED IMBIBITION PROTEIN1* (*SIP1*), a raffinose synthase involved in RFO synthesis. Cluster IIb contained probes with decreased transcript levels in the Mt-*abi5* seeds, whereas they increased from mid seed filling onwards during wild-type seed maturation (Figure 3B). This cluster was overrepresented with GO categories associated with photosynthesis, including nodes representing 14 probes encoding chloroplastic Arabidopsis homologues (Table II). Cluster IIc contained probes with increased transcript levels in the Mt-*abi5* mutants during late maturation compared to wild-type seeds. Most of these probes did not show differential regulation during wild-type seed development and transcript levels were low (Figure 3B). This cluster was overrepresented by genes related to programmed cell death and protein folding, including many small heat shock proteins and chaperonins (Table II), indicating a stress response in developing mutant seeds.

Module III contained 253 probes with transcripts that were higher in the Mt-*abi5* seeds at pod abscission compared to wild-type seeds (Figure 3A). In wild-type seeds, these genes are highly expressed during embryogenesis and seed filling, while expression decreases during late seed maturation (Figure 3B), indicating that this down-regulation is impaired in the Mt-*abi5* mutants. GO enrichment analysis showed a strong overrepresentation in categories associated with photosynthesis and light response (Table II). Figure 3D shows a detail of the module enriched in these genes: many encode subunits or core units of both PSI and PSII: *PHOTOSYSTEM I LIGHT HARVESTING COMPLEX GENE 1* (*LHCA1*), *PHOTOSYSTEM I SUBUNIT D-2 (PsaD-2), PHOTOSYSTEM I SUBUNIT F (PsaF), PHOTOSYSTEM I SUBUNIT K (PsaK), PHOTOSYSTEM I SUBUNIT G (PsaG) and PHOTOSYSTEM I SUBUNIT H-2 (PsaH-2)* for PSI and *LIGHT HARVESTING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II 5 (Lhcb5), PHOTOSYSTEM II SUBUNIT P (PsbP), PHOTOSYSTEM II SUBUNIT Q (PsbQ) and PHOTOSYSTEM II REACTION CENTER W (PsbW)* for PSII. Likewise, a number of genes encoding proteins involved in the Calvin cycle are part of this cluster, as well as a *PROTOCHLOROPHYLLIDE OXIDOREDUCTASE A* (*PORA*), involved in the reduction of protochlorphyllide to chlorophyllide (Figure 3D, Table II).

Mt-ABI5 regulates non-reducing sugar metabolism and accumulation of longevity-associated LEA proteins during late seed maturation

The presence of an Arabidopsis homologue of the raffinose synthase *SIP1* in gene module IIb together with the co-location of RFO and longevity QTL suggests a role of Mt-ABI5 in regulating non-reducing sugar metabolism during seed maturation. To test this hypothesis, soluble sugars were determined in Mt-*abi5* and wild-type seeds at two time points during seed

development; 32 DAP, corresponding to the end of seed filling, beginning of maturation drying and Chl loss, and maturity, being around 44 DAP. In wild-type seeds, Suc content decreased between 32 DAP and mature seeds, whereas Stac, the major RFO in *M. truncatula* and verbascose (Ver) contents increased (Figure 4A-D). At 32 DAP, Mt-*abi5* seeds contained already significantly more Suc (ANOVA, p-value <0.001, Supplemental Dataset 3), and this difference remained detectable in mature seeds (Figure 4A). By contrast, no significant difference was observed in Sta and Ver contents at 32 DAP between Mt-*abi5* and wild-type seeds, whereas a slight difference was detectable for Raf. During further maturation, Sta and Ver accumulation also were compromised in the Mt-*abi5* seeds (Figure 4C and D). Consequently, the ratio of RFO/Suc was lower for seeds of the three Mt-*abi5* mutant alleles, suggesting that the conversion of Suc into RFO is in part under regulation of Mt-ABI5 during maturation drying (Figure 4E). A possible role for this conversion could be through the transcriptional regulation of *SIP1* from gene module IIb (Figure 3C). Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) analysis confirmed that the transcript level of this gene was strongly reduced in mature Mt-*abi5* mutant seeds (Figure 4F). *In silico* analysis of the up-stream promoter sequence of *SIP1* revealed the presence of an ABRE, suggesting a possible binding site for Mt-ABI5. Yeast one-hybrid assays confirmed that a 56-bp promoter fragment of Mt-SIP1 containing the ABRE interacted with the Mt-ABI5 protein, whereas this interaction was abolished when the ABRE was mutated (Supplemental Figure 2).

In addition, module IIa contained several transcripts encoding LEA proteins (Figure 3C). For a number of these genes, we previously reported that their corresponding polypeptide abundance increased in parallel with the acquisition of longevity in *M. truncatula* seeds (Chatelain et al., 2012). Considering the post-transcriptional regulation of these LEA proteins (Verdier et al., 2013), we investigated whether the decrease in LEA transcripts in Mt-*abi5* seeds also resulted in decreased LEA protein accumulation. A protein fraction enriched in LEA polypeptides was isolated, taking advantage of their hydrophilic and unstructured character, which allows them to remain in solution after heating the crude protein extract at 95°C (Boudet et al., 2006). The polypeptides present in this so-called 'heat-stable' fraction were previously identified to establish a reference map for subsequent characterization of the LEA proteome in *M. truncatula* (Chatelain et al., 2012 for A17; Delahaie et al., 2013 for R-108) (Supplemental Figure 3A).

The abundance of seventeen polypeptides was at least two-fold reduced in the Mt-*abi5* seeds compared to the wild type (Supplemental Dataset 2, Supplemental Figure 3B-D). The polypeptide showing the strongest change (18-fold) was the EM1 protein whereas its family

member, EM6, was reduced four-fold (Figure 5A). Both polypeptides together represented 8% of the total spot intensities of the 2D gel (Supplemental Dataset 2). Almost all the polypeptides corresponding to SEED BIOTINYLATED PROTEIN65 (SBP65) were reduced in abundance (Supplemental Dataset 2). Also, the abundance of all the spots corresponding to D-34 proteins or a mix of D-34 with LeaM (spot 100), a mitochondrial LEA protein, was strongly reduced in the Mt-*abi5* seeds (Figure 5B). All of the transcripts of these LEA proteins were down-regulated in the Mt-*abi5* mutants, except for LeaM. This suggests that the reduction of intensity of spot 100 is due to a reduction in D-34 rather than LeaM.

Four highly abundant LEA polypeptides, comprising 13% of the total spot intensity were over two-fold more abundant in the heat-stable proteome of the Mt-*abi5* seeds compared to the wild-type. They corresponded to PM10, a dehydrin (DHN), a member of the D113 family D-113 II, (spot 43) and a CapLEA polypeptide (spot 38) (Figure 5C). These results corroborated the transcriptomic analysis in which a significant up-regulation was found for D-113 II and CapLEA (Supplemental Dataset 1). Next to LEA polypeptides, three polypeptides that showed the highest increase in abundance in the Mt-*abi5* seeds compared to the wild type were identified as GLYCINE-RICH PROTEIN2, PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE, and CHLOROPLAST CHAPERONIN 10 (CPN10), all of which were involved in protein folding upon the stress response (Supplemental Dataset 2).

Chloroplast pigment composition and photosystem-associated gene expression are altered in mature Mt-*abi5* seeds

Considering that co-expression modules affected by Mt-*abi5* were enriched with categories associated with photosynthesis genes (Figure 3, Table II), we investigated whether Chl degradation was also affected (Figure 6A-B). In mature wild-type seeds, only a residual amount of Chl *a* was detected, whereas by contrast, Mt-*abi5* seeds contained 3-10 fold more Chl *a* than wild-type (Figure 6A). The Mt-*abi5* seeds also contained small amounts of Chl *b*, whereas it had completely disappeared from wild-type seeds (Figure 6B). During seed development, a difference in Chl degradation was already evident at 24 and 32 DAP, although the differences were not significant due to high variation between the biological replicates (Supplemental Figure 4).

Chl *b* must be converted to Chl *a* by NYC1 or NOL as a first step towards Chl degradation (Christ and Hörtensteiner, 2014). Therefore, we assessed whether the expression of genes involved in the Chl breakdown pathway was affected in Mt-*abi5* seeds (Supplemental Figure 5). No significant difference in Mt-*NYC1* expression between wild-type and mutant

seeds was detected by RT-qPCR (Supplemental Figure 5B). A closer inspection of the transcriptome data showed that the levels of transcripts encoding enzymes involved in the degradation of Chl were either not significantly different or higher in Mt-*abi5* compared to mature wild-type seeds (NYC1, NYE1, PHEOPHORBIDE *A* OXYGENASE, PAO) (Supplemental Figure 5C; Supplemental Dataset 1).

ABI5 has been shown to be involved in the delay of dark-induced senescence in Arabidopsis seedlings (Sakuraba et al., 2014). In contrast to Arabidopsis, no difference could be observed in dark-induced senescence in leaves from the *M. truncatula* Mt-*abi5* mutant compared to the wild type. Whereas Chl content decreased during senescence, no significant difference was detected between the Mt-*abi5* mutant plants and wild-type lines (Supplemental Figure 6). Therefore, none of these findings support a direct role for Mt-ABI5 in the Chl degradation at the final steps of maturation.

The transcriptome analysis identified numerous transcripts from genes encoding different subunits of PSI and PSII that remained high in the mature Mt-*abi5* seeds, whereas transcripts were completely degraded in wild-type seeds (Figure 3, Supplemental Figure 7A). We confirmed these observations by RT-qPCR analysis on a new harvest of Mt-*abi5* and wild-type seeds (Figure 6C-H, Supplemental Figure 7B). Transcript levels of Mt-*LHCB-2* and Mt-*PSAD-2*, belonging to PSII and PSI, respectively, were already 2-fold higher at 24 DAP in Mt-*abi5* seeds compared to the wild type (Figure 6C and D). During seed maturation, this difference increased progressively for Mt-*LHCB-2*, resulting in relative amounts of transcripts that were 50-fold higher in mature Mt-*abi5* seeds compared to the wild type (Fig 6C), whereas the difference remained stable for Mt-*PSAD-2* (Figure 6D). Transcript levels for several genes increased 6- to 600-fold in mature Mt-*abi5* seeds (Figure 6E-H), with the strongest changes for transcripts of PSII (Figure 6 E, G).

Carotenoids are present in the reaction center and, like Chl, are known to decrease during seed maturation (Gonzalez-Jorge et al., 2013; Monma et al., 1994). Therefore, to support the hypothesis that chloroplasts are not entirely degraded in Mt-*abi5* mutants, we assessed whether the steady-state level of carotenoids was affected in Mt-*abi5* seeds during maturation by HPLC (Table III). The decrease in the carotenoids β-carotene and lutein started between 24 and 32 DAP in both wild-type and Mt-*abi5* plants, but no significant differences were found between the genotypes at these stages (Supplemental Figure 7C). However, in mature Mt-*abi5* seeds, β-carotene and lutein contents were 2 and 5-6 fold higher, respectively (Table III, Supplemental Figure 7C). We also detected two other carotenoids that were significantly more

abundant in mutant seeds, tentatively identified as zeaxanthin and antheraxantin, based on their retention time and absorbance spectra of the peaks (Thayer and Björkman, 1990, Table III).

Analysis of pea Ps-*abi5* mutant seeds confirms a role of ABI5 in longevity and chlorophyll degradation in legume seeds

Longevity is affected in the Mt-*abi5* mutant seeds, whereas, to the best of our knowledge, this phenotype has not been reported for Arabidopsis *abi5* mutant seeds. Therefore, we characterized *abi5-1* seeds of Arabidopsis (Finkelstein et al., 1994). We confirmed the ABA insensitivity and a strong reduction of the LEA EM1 polypeptide in mature seeds of the Arabidopsis *abi5-1* mutant by immunoblotting (Supplemental Figure 8A-B). Soluble sugar contents were affected, with Suc levels accumulating to a lesser extent in *abi5-1* mature seeds, whereas total RFO was slightly higher, shifting the RFO ratio from 4.6 in the wild-type to 3.8 in *abi5-1* (Supplemental Figure 8C-D). Yet, whereas the Raf content was higher, the amounts of longer oligosaccharides Stach and Ver were lower. These data suggest that the conversion from Raf to Stach and Verb is impaired. However, the other phenotypes related to late maturation that are prominent in Mt-*abi5* mutants were less evident in the *abi5-1* seeds of Arabidopsis (Supplemental Table 2). A slight defect in dormancy was observed for *abi5-1* seeds that were harvested at 19 DAP since 93% of these immature seeds germinated whereas 66% of germination was observed for wild-type seeds (Supplemental Figure 8E). Depending on the growth conditions and the maturity stage, longevity was not affected or was slightly increased in the *abi5-1* mutant (Supplemental Figure 8E). In addition, no significant difference was found in Chl content, although a tendency for higher Chl contents was observed for mutant compared to wild-type seeds (Supplemental Figure 8F).

Considering these contrasting results in longevity between *M. truncatula* and Arabidopsis, we investigated whether defects in ABI5 would also affect seed maturation and longevity in pea. Pea EMS mutant alleles of Ps-*abi5* were obtained using a TILLING approach (Dalmais et al., 2008), which allowed the identification of three independent nonsense mutations that were located 5' to the bZip domain (Figure 7A). Mutant plants were backcrossed to the wild-type Cameor line, then cultivated under the same growth conditions before seeds were harvested at maturity. No differences in seed weight or water content were observed between wild-type and mutant seeds. To test their longevity, seeds were stored for increasing periods of time at 45°C and 75% RH and germination was assessed (Figure 7B). Ps-*abi5* seeds exhibited a severe reduction in life span, with a decrease in P50 values of more than 3-fold compared to wild-type (Figure 7B). As in *M. truncatula*, non-reducing sugar contents were also

strongly affected in mature Ps-*abi5* seeds, both in the axis (Figure 7C) and cotyledons (Supplemental Table 2). Suc levels increased by 50% in Ps-*abi5* mutant seeds, whereas the major RFO (Stach and Ver) decreased by 1.5 and 2.8 fold, respectively.

Ps-*abi5* and wild-type seeds appeared green when the seed coat was present (Figure 7D). However, a strong difference in the maturation-induced degreening was found after removing the seed coat. Indeed, mutant seeds were much greener than wild-type seeds, particularly in the periphery of the cotyledons (Figure 7D). HPLC analysis of the seed coats revealed no difference in Chl *a* and *b* between wild-type and Ps-*abi5* (Supplemental Figure 9). Biochemical analysis of uncoated seeds showed that Chl *a* and *b* were more abundant in the mutant seeds, both in the periphery and in the center of the cotyledons, with the strongest difference in the periphery (Fig 7E). β-carotene contents were 2 to 5 fold higher in total seed extracts of mutant seeds compared to the wild type (Fig 7F). Similar differences were found for the tentatively identified carotenoids zeaxanthin and antheraxanthin, whereas lutein content was not affected in Ps-*abi5* seeds. Overall, the phenotype was comparable between Ps-*abi5* and Mt-*abi5* mutants, and even stronger in pea seeds, suggesting that in legumes, ABI5 regulates late seed maturation traits.

Tocopherol content is affected in mature Mt-*abi5* seeds.

During Chl breakdown, the phytol released via hydrolysis is the main source of prenyl moieties for tocopherol biosynthesis (vom Dorp et al., 2015). Seeds accumulate large amounts of tocopherols and other tocochromonanols. When the synthesis of these lipophilic antioxidants is impaired during seed development, longevity is strongly affected, due to an increased lipid peroxidation during storage (Mène-Saffrané et al., 2010; vom Dorp et al., 2015). Therefore, we tested whether the contents of these lipophilic antioxidants were affected in mature seeds of Mt-*abi5* mutants as a result of Chl retention (Table III). α-Tocopherol represented more than 90% of the total tocopherol content in seeds of *M. truncatula*. Unexpectedly, α-tocopherol contents were 20% higher in Mt-*abi5* seeds, whereas other tocochromanols were not significantly affected. Consistent with these observations, *M. truncatula PHEOPHYTIN PHEOPHORBIDE HYDROLASE (*Mt-*PPH)* together with *VITAMIN E DEFECTIVE 3 (*Mt-*VTE3)* and Mt-*VTE4* transcript levels, involved in chlorophyll hydrolysis, the synthesis of γ-tocopherol and its conversion to α-tocopherol, respectively, were higher in mature Mt-*abi5* seeds, but not at 32 DAP (Supplemental Figure 5C, Supplemental Dataset 1). This increase in α-tocopherol contents might be indicative of an oxidative stress response within the chloroplast in order to protect thylakoid membrane lipids from oxidation (Havaux et al., 2005).

Mt-*abi5* seeds exhibit enhanced sensitivity to oxygen

To further investigate whether Mt-*abi5* seeds are more sensitive to oxidative damage, we performed an aging experiment by storing seeds under N_2 to test whether longevity could be restored in the Mt-*abi5* mutants in the absence of oxygen. Seeds were first equilibrated at 75% RH, then stored hermetically for 14 d at 35°C. When stored in air, Mt-*abi5* seeds showed a significant decrease in viability, whereas the percentage of germination of wild-type seeds was 97% (Figure 8A). When stored under a N_2 atmosphere, the germination percentage of Mt-*abi5* seeds increased sharply, and was no longer significantly different compared to wild-type seeds. For those seeds that germinated after storage, we also measured the radicle length after 48 h of imbibition (Figure 8B). Seeds of the three mutant lines did not fully regain their vigor because radicle length remained shorter compared to wild-type seeds, when stored under N_2, suggesting that additional oxygen-independent mechanisms participated in the deterioration of Mt-*abi5* seeds during storage. We also checked whether high light intensity would impair storage stability and germination of Mt-*abi5* seeds. When stored at 75% RH and 580 µmol photons m^{-2} s^{-2} for 14 d, the viability of the Mt-*abi5* mutant seeds was not significantly different from that of the wild type. Furthermore, germination in high light intensity did not affect germination, cotyledon greening or seedling emergence compared to the wild type. Therefore, Mt-*abi5* seeds do not appear to be more susceptible to photo-oxidation than do wild-type seeds.

DISCUSSION

Using a QTL approach in *M. truncatula* by screening seeds under accelerated or moderate aging conditions to identify loci of seed longevity, we revealed Mt-*abi5* as a putative regulator of longevity and RFO content. Until now, ABI5 was known to regulate developmental processes during imbibition and seedling establishment, including germination, dormancy and re-establishment of desiccation tolerance in germinated seedlings (Lopez-Molina et al., 2001; Terrasson et al., 2013; Maia et al., 2014, Supplemental Table 3). Here, the characterization of *M. truncatula* and pea *abi5* mutants revealed that ABI5 governs an array of late maturation-specific events in seeds before reaching the dry state. While seed weight and desiccation tolerance were not affected, both longevity and dormancy, normally acquired during maturation, were severely reduced in Mt-*abi5* and Ps-*abi5* mutants. A network-based approach

on seed transcriptomes collected from Mt-*abi5* mutants during maturation revealed a deregulation of several developmentally regulated gene modules with functions related to RFO metabolism, LEA protein accumulation and regulation of photosynthesis-associated nuclear genes (Figure 9). Mature *abi5* seeds of Medicago and pea retained Chl and carotenoids (Figure 6A-B, Figure 7E-F, Table III). An additional gene module contained stress response genes whose transcripts were increased during late stages of Mt-*abi5* seed development. The gene modules that show different developmental profiles of expression indicate that ABI5 is involved in an intricate network with additional transcription factors that regulate pathways pivotal to the seed dispersal characteristics and seed fitness, but independent from seed filling. It is noteworthy that the total maturation time was not altered between wild-type and mutant seeds. Therefore, *abi5* defects cannot simply be explained by a shorter maturation phase. Transcriptome comparison based on DAP between mutants and the wild type might introduce potential biases due to delayed development. Especially genes that are differential only at one stage based on seed age might be prone to this bias. In our study, only a few probes were differentially expressed between Mt-*abi5* and the wild type at 16 DAP or 24 DAP (see Venn diagram Supplemental Dataset 1). For the majority of these probes, differences were found either only at pod abscission, or maintained until abscission. In our study, pod abscission corresponds to a physiological stage and is not dependent on the age of the seed, thereby removing this bias.

The Chl retention observed in the mature pea and *M. truncatula abi5* seeds could suggest that Chl degradation is under the regulation of ABI5. In Arabidopsis and *Brassica napus* (oilseed rape), Chl retention in mature seeds has been attributed to defects in the first steps of Chl breakdown (Christ and Hörtensteiner 2014), including the conversion of Chl *b* to Chl *a* by NYC1 and NOL (Nakajima et al., 2012) and the oxidation of pheophorbide a by PAO (Chung et al. 2006) and STAY-GREEN (SGR), whose function remains to be secured (Christ and Hörtensteiner 2014). In Arabidopsis seeds, Chl degradation is under the control of ABI3, NAC016 and ABF4 (Nakajima et al., 2012; Delmas et al., 2013), whereas in senescent leaves, it is under the control of ABI5, since ABI5 binds directly to the promoter of *NYC1, NOL* and *SGR* genes (Sakuraba et al., 2014). However, despite the green phenotypes of pea and *M. truncatula abi5* seeds, our RT-qPCR and transcriptome data showed that genes encoding enzymes of the PAO pathway were either not affected or even up-regulated during maturation in the legume *abi5* mutants (Supplemental Figure 5). In addition, Chl breakdown during dark-induced senescence was not affected in Mt-*abi5* seedlings compared to the wild type

(Supplemental Figure 6). Thus, Chl retention is likely to be an indirect consequence of a defect in ABI5 that acts on other regulatory mechanisms still awaiting characterization.

Developing Mt-*abi5* seeds also showed a strong deregulation of a large number of photosynthesis-related nuclear and chloroplastic genes (Figure 6, Supplemental Dataset 1). The concomitant regulation of chloroplast and nuclear genes encoding photosynthesis proteins is crucial for the photosynthetic competence of chloroplasts and disassembly during senescence. One of the functions of ABA is to coordinate the expression of these genes in response to developmental and environmental cues (Cutler et al., 2010; Fujita et al., 2011; Yamburenko et al., 2013). In Mt-*abi5* seeds, this deregulation occurred before the onset of Chl loss since transcript levels of both Mt-*LHCB2* and Mt-*PSAD-2*, encoding subunits of PSII and PSI, respectively, were already 2-fold higher in mutant seeds at 24 DAP (Figure 6C and D). During seed maturation, this difference increased progressively for Mt-*LHCB-2*, resulting in relative amounts of transcripts that were 50-fold higher in mature Mt-*abi5* seeds compared to the wild type (Figure 6C). Consistent with this observation, the Arabidopsis *LHCB2* and *FERREDOXIN C2* (*FDC2* encoding a chloroplastic ferredoxin capable of alternative electron partitioning in PSII) were identified as genes bound by ABI5 *in vivo* in imbibed seeds, suggesting a direct regulation of PSII genes by ABI5 (De Giorgi et al., 2015). Further inspection of the common transcripts up-regulated in mature seeds of both Mt-*abi5* and Arabidopsis *abi5-7* (Nakabayashi et al., 2005) revealed 135 differentially expressed genes out of which 5 genes were related to the photosystems I and II and light harvesting complex.

In oily non-chlorophyllous seeds, the presence of Chl in mature seeds is an undesirable trait leading to poor nutritional quality, reduced longevity and economic losses (Jalink et al., 1998; Clerkx et al., 2003; Chung et al., 2006; Nakajima et al., 2012; Delmas et al., 2013; Teixera et al., 2016). Although the link between Chl retention and poor seed quality has been suggested for a long time, a direct cause-effect relationship with longevity has been established only recently. Arabidopsis seeds of the *nyc1 nol* double mutant affected in the first step of Chl degradation, contained 10-fold more Chl than the wild type and had a strongly reduced longevity (Nakajima et al., 2012). In pea and *M. truncatula abi5* mutant seeds, Chl degradation and longevity were both affected. More Chl was retained in mature dry Ps-*abi5* seeds compared to Mt-*abi5* seeds, and longevity was also much more affected in the Ps-*abi5* seeds (Figure 2E-F, Figure 7B), thus underscoring the detrimental effect of Chl retention in dry seeds. The reasons behind the impaired storage stability observed here but also in seeds of Arabidopsis and oilseed rape, remain elusive. There are several plausible explanations for this cause-effect relationship that are not mutually exclusive.

The first explanation is that the impaired chlorophyll degradation leads to accumulation of phototoxic products and chlorophyll catabolites. To avoid photooxidative damage and cell death during Chl degradation in leaves and fruits, detoxification of photoactive Chl and Chl catabolites must occur (Christ and Hörtensteiner, 2014). Whether phototoxic products resulting from Chl degradation accumulate in seeds during desiccation is unknown. However, in *Glycine max* (soybean) seeds of the stay-green mutants *cytG* and Gd_1d_2 that retain Chl, the catabolites chlorophyllides and phaeophytins were barely detectable (Canfield et al., 1995). In *M. truncatula*, dry, mature *abi5* mutant seeds were not particularly sensitive to high light in comparison to the wild type. Likewise, germination of green seeds from the *grs* and *nyc nol* mutants was not more sensitive to light than darkness (Clerkx et al., 2003; Nakajima et al., 2012). So far, there is no evidence suggesting that phototoxic intermediates accumulate to such an extent that longevity would be impaired.

The second explanation for the link between chlorophyll retention and longevity could be an incomplete regulation of the chloroplast dedifferentiation that leads to oxidative damage and reduced seed fitness. Several lines of evidence from this work show that developing Mt-*abi5* seeds had to cope with oxidative stress within the chloroplasts during late maturation. To scavenge reactive oxygen species (ROS) in the chloroplasts, tocopherols and non-photochemical quenching through the xanthophyll cycle act redundantly, thereby protecting thylakoid membrane lipids from photooxidation (Havaux et al., 2005). In the present study, α-tocopherol contents were increased by 20% in dry mutant seeds and this was accompanied by increased transcript levels of its biosynthetic genes. Furthermore, the operation of the xanthophyll cycle appeared to be disrupted in dry *abi5* mutant seeds from Medicago and pea: the xanthophyll carotenoids zeaxanthin and antheraxanthin exhibited higher amounts, suggesting an increase in de-epoxidation in response to maturation drying (Table III). The partial restoration of the longevity phenotype when Mt-*abi5* seeds were stored under N_2 also points to a deficiency in the oxidative stress response. When developing Arabidopsis seeds were treated with 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU), which disrupts the electron flow at PSII, mature seeds deteriorated faster during accelerated aging (Allorent et al., 2015). In light of these observations, we speculate that ABI5 might participate in the progressive shutdown of photosynthesis by repressing photosynthesis nuclear gene expression prior to reaching the quiescent dry state. In this way, ABI5 in legumes might be implicated in the coordination of shutting down photosynthesis during seed maturation to avoid oxidative stress before reaching the quiescent state. Our transcriptome and proteome study provides further evidence suggesting that Mt-*abi5* seeds responded to stress during late maturation (Figure 3,

cluster IIc). A set of LEA proteins and transcripts of HSP were specifically upregulated, including the chloroplast co-chaperonin 20 (CPN20) as well as other stress responsive bZIP AREB and ABF transcription factors, such as homologs of AREB3/DPBF2 and AREB1/ABF2, a key regulator enhancing drought tolerance and LEA gene expression (Fujita et al. 2005).

In addition to its role in chloroplast dedifferentiation during maturation drying, ABI5 was found to regulate a set of genes involved in the synthesis of protective compounds (Figs. 3-5). Previously, it was demonstrated that ABI5 binds directly to the promoters of the *EM1* and *EM6* genes, and Arabidopsis *abi5* mutants exhibited reduced accumulation of the corresponding proteins during maturation (Finkelstein and Lynch, 2000; Carles et al., 2002). Our transcriptome and proteome studies extend these observations as the abundance of several LEA proteins was lower in mutant seeds. In particular, the EM/EM6 proteins, SBP65 and members of the D-34 family were severely reduced. Their role in seed longevity remains to be established, but *in vitro*, PM25, a member of the D-34 family, and Em6 were found to increase the density of sugar glasses (Tunnacliffe et al., 2010) and act against protein aggregation during rehydration (Boucher et al., 2010). Cytoplasmic glasses severely slow down molecular motion and deleterious reactions, thereby contributing to the stability of the cytoplasm during long-term storage (reviewed in Buitink and Leprince, 2004). Interestingly, the proteome analysis also revealed that several other LEA proteins increased in abundance in the mutants, possibly in an attempt to counteract the absence of the abovementioned LEA proteins. However, this is apparently not sufficient to compensate for the decreased longevity in the Mt-*abi5* mutants.

QTL analysis revealed that three out of five longevity QTL co-located with QTL of RFO composition of seeds from the same harvest (Table 1, Vandecasteele et al., 2011). The discovery that RFO accumulation was affected in the Mt-*abi5* mutants, concomitant with the decrease in longevity, reinforces the genetic link between these two traits. Evidence for a direct link between RFO metabolism and longevity was also recently secured in Arabidopsis by Righetti et al. (2015), who showed that the *agal2* mutant exhibited reduced longevity together with increased Suc and decreased RFO content, as observed in the *abi5* seeds of pea and *M. truncatula*. Consistent with this, the transcript of Mt-*SIP1*, a Raf synthase, was deregulated in the Mt-*abi5* mutant seeds. A direct interaction was demonstrated between Mt-ABI5 and the ABRE in the Mt-*SIP1* promoter (Supplemental Figure 2), suggesting that ABI5 transactivates Mt-*SIP1* expression to regulate the synthesis of RFO. Here we showed that the Raf to Stach/Ver conversion is also impaired in Arabidopsis *abi5-1* mutants (Supplemental Figure 8), likely via the deregulation of *SIP1*. ChIP-Seq analysis identified SIP1 as a direct target of ABI5 in Arabidopsis (De Giorgi et al., 2015). The role of RFO in seed longevity remains elusive. Our

earlier work (Buitink et al., 2000) ruled out a role in the biophysical properties of the cytoplasmic glass state conferring long-term stability to dry seeds. There is evidence that RFO could act as scavenger of ROS, in particular protecting photosynthesis from oxidative stress (Nishishawa et al., 2008). Indeed, Raf, being synthesized in the cytosol, can be imported into the chloroplast by an active membrane bound transporter (Schneider and Keller, 2009). In support of this hypothesis, longevity could be partially restored in Mt-*abi5* seeds by storing them under nitrogen. That RFO metabolism might be coupled to chloroplast dedifferentiation and photosynthesis shutdown during maturation is also evident from the observation that DCMU treatment leading to decreased longevity in Arabidopsis (Allorent et al., 2015) also resulted in a 3-fold decrease in galactinol content, the precursor of RFO. Alternatively, the conversion from Suc to RFO might be related to a sugar signaling pathway as supported by the over-representation of Suc responsive elements in the promoter of genes up-regulated during the acquisition of longevity (Righetti et al., 2015).

Whereas in the two legume species, ABI5 played a major role in late maturation processes, related phenotypes in Arabidopsis were less pronounced (Supplemental Table 3). Dormancy, LEA protein accumulation and RFO metabolism were affected in a similar way but longevity and Chl retention were not significantly different from the wild-type seeds (Supplemental Table 3). This might be due to redundancy and/or compensation mechanisms among the bZIP family factors involved in ABA signaling in Arabidopsis. ABI5, ABF3, and ABF1 were found to have overlapping effects, and the loss of either factor was compensated by increased expression of other family members (Finkelstein et al., 2005; Yoshida et al., 2010). In the double mutant *dog1-1 abi3-1,* exhibiting reduced longevity, redundancy was suggested with ABF4 (Dekkers et al., 2016), which also binds to the *NYC1* promoter (Nakajima et al. 2012). The known ability of bZIP transcription factors such as AREB/ABF for heterodimerization resulting in alternative DNA-binding repertoires associated with ABA signaling (Bensmihen et al., 2002; Finkelstein et al., 2005; Yoshida et al. 2010) would therefore provide a combinatorial control of the different seed maturation processes. Such combinations could vary during the course of evolution. In legumes, similar components are present (Wang et al., 2015) but their molecular wiring appears different from Brassicaceae.

To summarize, Figure 9 unveils ABI5 as a master regulator of late seed maturation in legumes by coordinating the acquisition of seed longevity and dormancy via three modes of action: 1) production of LEA proteins Em/Em6, D-34 and SBP65 that protect proteins from aggregation during desiccation/rehydration; 2) down-regulation of expression of photosynthesis-associated nuclear genes, which is accompanied by Chl and carotenoid

degradation (although probably not directly regulated by ABI5) and leads to chloroplast dedifferentiation, which altogether prevents oxidative stress in the mature seed; 3) induced expression of *SIP1,* thus producing RFO, which might inhibit oxidative stress both inside and outside the chloroplast. Thus, ABI5 appears to be a prominent regulator of late maturation in legumes, and this finding sheds light on the relationship between seed vigor and RFO accumulation (Vandecasteele et al., 2011) and Chl retention (Jalink et al. 1998; Nakajima et al. 2012; Delmas et al. 2013; Teixera et al., 2016). Together with previous studies showing a correlation between longevity and Chl retention in Arabidopsis (Clerkx et al., 2003; Nakajima et al., 2012), our data suggest that degreening cannot be uncoupled from long-term survival in the dry state, an important aspect of seed vigor and seedling establishment. This cross-talk offers new opportunities to tackle the green seed problem as well as anti-nutritional characteristics of RFO in legumes.

METHODS

Plant material

M. truncatula ssp. *tricycla* (R-108) plants were cultivated according to Chatelain et al. (2012). Seeds were harvested upon pod abscission or at the indicated stages of development and stored at -196°C in liquid nitrogen. Three independent *Tnt1* insertion lines in the Mt-*ABI5* gene were used: NF4383, referred to as Mt-*abi5-1*; NF3376, Mt-*abi5-2*, both previously characterized by Terrasson et al. (2013) and NF7680, Mt-*abi5-3* that was characterized in this study. *Tnt1* insertions were verified by PCR using forward and reverse primers listed in Supplemental Table 4. The Mt-*abi5-1* line was back-crossed twice with R-108. Pea mutants and wild-type (var. *Cameor*) were isolated by TILLING according to Dalmais et al. (2008) and grown under greenhouse conditions at 18°C/22°C and a 16 h photoperiod (200 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) in a mixture of vermiculite and soil. Mutants were backcrossed twice and mutations were verified by dCAPS markers (Supplemental Table 4). Seeds were harvested at shedding.

Arabidopsis thaliana ecotype Wassilewskija and *abi5-1* mutants (N8105) (Finkelstein et al., 1994) were obtained from NASC. The *abi5-1* mutation was confirmed by DNA sequencing using primers indicated in Supplemental Table 4). Arabidopsis seeds were multiplied by growing plants in a growth chamber (23°C, 16 h light, 100 $\mu mol \cdot m^{-2} s^{-1}$). Seeds were harvested at 19 days after pollination (Arabidopsis) or at shedding. Seeds from

Arabidopsis and Medicago were dried after harvest for 2 days at 44% relative humidity (RH), 20°C, and pea seeds were dried at 20°C in air (67% RH) for 2 weeks.

Phenotyping and quantitative trait loci (QTL) analysis

The LR4 population consisted of 171 RILs and was derived from a cross between A17 and DZA315.16 (Vandecasteele et al., 2011). Longevity was determined on seed samples pooled from three plants. Before measurements, seeds were stored at 20°C at 60% RH for five months to allow for dormancy release, after which they were stored for an additional seven months at 10°C prior to the longevity experiments. Four repetitions of 40 seeds were scarified, equilibrated for 7 d at 60% RH (moderate aging) or at 75% RH (accelerated aging), sealed in aluminum bags (Barrierfoil, Moore and Buckle, UK) and stored for 159 d and 20 d, respectively, at 35°C. After storage, seeds were imbibed on filter paper and the percentages of final germination (radicle protrusion) and of morphologically normal seedlings were scored after 10 d at 20°C in the dark. Petri dishes were randomized following a complete-block design with four blocks, each containing one biological replicate. All statistical analyses were performed with SAS 8.1 (SAS Institute, 2000) as described in Vandecasteele et al. (2011).

Genetic maps and molecular data for the LR4 population are described in Vandecasteele et al. (2011). QTL mapping was carried out using the MCQTL software (Jourjon et al., 2005) as described in Vandecasteele et al. (2011). For each QTL identified, additive genetic effect, percentage of phenotypic variance explained (R2), F-test value, as well as the confidence interval were determined and equivalent LOD scores calculated (Table I). The map of linkage group 7 was drawn using MapChart software (Voorrips 2002). Primers used for the mapping of Mt-ABI5 are indicated in Supplemental Table 4.

Physiological characterization of *abi5* mutants

For germination assays, 3 replicates of 30–50 scarified seeds of *M. truncatula* or 100-200 Arabidopsis seeds were imbibed on filter paper with 4 and 1 mL respectively of distilled water at 20°C in the dark. For pea, 3 replicates of 30 seeds were imbibed in 100 mL of distilled water with folded filter paper. Seeds were considered as germinated when the radicle protruded from the seed coat. For ABA sensitivity assays, three replicates of 30-50 scarified *M. truncatula* mature seeds were imbibed in the presence or absence of 10 µM of ABA (Sigma, St Louis, MO, USA). For Arabidopsis, 100-200 mature seeds were imbibed on two filter papers in the presence or absence of 1 µM ABA, incubated for 3 d at 4°C in dark followed by 8 d at 20°C with a 16 h photoperiod.

To assess longevity, mature seeds (scarified for *M. truncatula*) were stored in the dark or in the light (580 µmol/m²/s) at 75% RH using hermetically closed containers containing a saturated NaCl solution. Storage temperature was 35°C for Medicago and Arabidopsis and 45°C for pea. At different storage time intervals, seeds were imbibed and final germination percentage was counted after 10 d and 8 d, respectively. For the storage experiment in N_2, replicates of 30 seeds were first equilibrated at 75% RH, 20°C for 4 d, then transferred into an aluminum bag and sealed. Bags were pierced with a needle and N_2 was flushed for 20 s, after which the bag was re-sealed and placed at 35°C. Controls were seeds that received the same pre-equilibration treatment, and were subsequently stored at 75% RH and 35°C for 14 d. Thereafter, germination was counted and radicle measured after 48 h of imbibition.

For the seed coat permeability assay, four replicates of 5-10 scarified mature seeds were incubated at 20°C and 100% RH and weighed from 0 to 8 h. Rates of imbibition were calculated by averaging the rate of water uptake during step increments of 2 h. The leaf senescence experiment was adapted from Sakuraba et al. (2014). Leaves of four-week-old *M. truncatula* plants were detached and incubated in water at 21°C in the dark. After 0, 4, or 8 d of incubation, photographs were taken and leaves were frozen in liquid nitrogen. Between 2-10 mg of lyophilized powder was weighed and Chl was extracted and spectrophotometrically measured as described below.

Tocopherol measurement

Five replicates of 20 mature seeds were frozen in liquid nitrogen and ground to a fine powder (Precellys homogenizer). Tocopherols were isolated from the ground tissue using diethylether and 0.2 M H_3PO_4/1 M KCl. The upper organic phase was dried under air flow and the lipids were dissolved in n-hexane for HPLC analysis (Zbierzak et al., 2010).

Chlorophyll and carotenoid assays

For spectrometry analysis, replicates of 25 Medicago seeds or 5-7 mg of Arabidopsis seeds, or leaf material, were lyophilized overnight, weighed and ground in 300 µL or 600 µl of N,N-dimethylformamide (Sigma), respectively. After overnight incubation at 4°C, samples were vortexed for 30 s and centrifuged for 5 min at 10,000 g. Chl concentrations were measured according to Moran (1982) on a spectrophotometer FluoStar Omega (BMG Labtech, Germany). For HPLC analysis, pigment extraction and quantification were performed as described in Perrin et al. (2016). Briefly, the carotenoid measurements were performed with a Shimadzu HPLC (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) equipped with a thermostated autosampler (SIL-

10ADVP) and a diode array detector (SPD-M10AVP). Carotenoids were identified using standards of lutein and β-carotene.

Sugar determination

Soluble sugar contents were assessed by HPLC (Dionex Corp, Sunnyvale, CA) according to Rosnoblet et al. (2007). Analysis was performed on four replicates of 10 mature seeds of *M. truncatula*, four replicates of 5 mature pea seeds (cotyledons or embryonic axes) and 15 mg of mature Arabidopsis seeds.

RNA extraction, microarray analysis and gene co-expression network

RNA extraction was performed on 3 replicates of 50 seeds at 16 DAP and 24 DAP and at abscission, for genotypes R-108, Mt-*abi5-1* and Mt-*abi5-2*. Seeds were ground in liquid nitrogen. The extraction was performed with the Nucleospin Extract II, Total RNA Purification Kit (Macherey Nagel, Düren, Germany). RNA amplification, labeling and hybridization of Nimblegen Medtr_v1.0 12x135K arrays were performed according to Terrasson et al. (2013). Three biological replicates were analyzed per comparison using the dye-switch method, and statistical analysis on the gene expression data was performed according to Verdier et al. (2013). Genes were considered differentially expressed when the log2 ratio between Mt-*abi5* and WT was >1 or <-1 at a given time point for each of the two mutants, with a p-value <0.01. Nimblegen microarray data were deposited in the NCBI GEO database (accession GSE87313).

The gene co-expression network of the 2911 differentially expressed genes (Supplemental Dataset 1) of the *Mt-abi5* mutants was constructed using the normalized intensities of the wild-type and Mt-*abi5* mutants together with those obtained at 15 time points during seed maturation, derived from Righetti et al. (2015). The network was constructed using Biolayout software (Goldovsky et al., 2005) with a correction value of 0.92, giving rise to a network with 1147 nodes and 2409 edges. Gene interactions were visualized using the open source software Cytoscape (version 3.3.0) with an edge-weighted spring-embedded layout.

Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) analysis

For RT-qPCR, 1 µg total RNA was reverse-transcribed using the Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and qPCR was performed on a CFX96 Real-Time Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) using the manufacturer's instructions with SsoFast Eva Green Supermix (Bio-Rad Laboratories). Reference genes were *MSC27* (Bolingue et al., 2010) and Mt-*ACTIN11*. Forward and reverse primers used for the

different genes in this study are listed in Supplemental Table 4. Relative expression levels were calculated using the comparative 2Δ(Ct) method (Schmittgen et al., 2008). Each data point represents the mean of three biological replicates of 30 seeds.

Yeast one-hybrid assay

Yeast one-hybrid assays were performed using the Matchmaker® Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System (Clontech, http://www.clontech.com/) according to the manufacturer's instructions. Primers used for the construction of the prey and bait are indicated in Supplemental Table 4. Fifty-six base pair oligonucleotides of the promoter region of *Mt-SIP1* (-1348-1298) containing the ABRE consensus sequence or a mutated version were cloned into the pAbAi vector, carrying the AUR1-C gene. The plasmid was linearized and integrated into the genome of yeast (Y1H Gold). Yeast cells were then transformed with pGADT7-AD plasmid containing the coding region of *Mt-ABI5*. DNA–protein interaction was determined based on the ability of the co-transformants to grow on SD/-Leu medium in the presence of 200–500 ng ml^{-1} of aureobasidin A.

Protein Extraction, 2D-PAGE and immunoblotting

Soluble protein extraction, preparation of heat soluble fractions and analysis using 2D-PAGE were performed according to Chatelain et al. (2012). The experiments were set up in a randomized block design where 6 gels corresponding to 3 independent protein extractions of 50 seeds were run in parallel. Polypeptides were identified using the reference gel previously obtained by Chatelain et al. (2012) and Delahaie et al. (2013). Immunoblotting analysis was performed according to Boudet et al. (2006). Briefly, ten micrograms of heat-stable protein extract was separated by SDS–PAGE on a 12% (w/v) polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell Inc., Dassel, Germany). Immunodetection was performed by chemiluminescence using a rabbit polyclonal antibody raised against the recombinant Mt-EM6 protein (dilution 1:10,000, Davids Biotechnologie, Regensburg, Germany), an anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate (dilution 1:50,000, Sigma A0545 Lot 32K4882) and the Amersham ECL Plus Western Blotting Detection reagents (GE Healthcare Life Sciences), following the manufacturer's instructions. Chemiluminescence was monitored by a molecular imager Chemidoc TM XRS system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Accession Numbers

Sequence data in this study can be found under the following accession number Mt-*ABI5,* Medtr7g104480; Mt-*ACTIN11*, Medtr2g008050; Mt-*MSC27* TC85211, Mt-*SIP1*, Medtr3g077280; *Ps-ABI5*, PsCam017634. Transcriptomic data obtained in this study have been deposited in the GEO database as Accession GSE87313.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Table 1. Detected polymorphisms between Jemalong J-6 and DZA315.16 in the region of Mt-*ABI5* (Medtr7g104480) on chromosome 7.

Supplemental Table 2. Contents in soluble sugars of mature pea cotyledons.

Supplemental Table 3. Comparative analysis of affected phenotypes in seeds of the *abi5* mutants of *Medicago truncatula*, *Pisum sativum* and *Arabidopsis thaliana*.

Supplemental Table 4. List of primer combination used for mutant selection and gene expression validation by qRT-PCR**.**

Supplemental Figure 1. Germination of Mt-*abi5* seeds is insensitive to ABA during imbibition in the dark. **Supplemental Figure 2.** Yeast one-hybrid binding assays of Mt-ABI5 to the ABRE in the promoter region of Mt-*SIP1*.

Supplemental Figure 3. Two dimensional electrophoresis gels of the heat stable proteome of *M. truncatula* seeds.

Supplemental Figure 4. Chlorophyll contents in developing wild-type and Mt-*abi5* seeds.

Supplemental Figure 5. Expression of genes involved in the PAO degradation pathway in mature seeds of Mt-*abi5*.

Supplemental Figure 6. Dark-induced senescence in young seedlings of wild-type and Mt-*abi5*.

Supplemental Figure 7. Photosynthesis-associated gene expression and carotenoid content during seed development of wild-type and Mt-*abi5* seeds.

Supplemental Figure 8. Longevity of wild and abi5-1seeds of Arabidopsis together with sugar content and EM protein levels in dry mature seeds.

Supplemental Figure 9. Chlorophyll contents in seed coats of mature wild-type and Psabi5 mature seeds.

Supplemental Dataset 1. Differentially expressed genes between Mt-*abi5-1* and Mt-*abi5-2* and wild-type (R-108) seeds during maturation.

Supplemental Dataset 2. Identification and quantification of polypeptide abundance in mature seeds of Mt-*abi5-1*, Mt-*abi5-2* and wild type (genotype R-108).

Supplemental Dataset 3. Statistical test results showing the level of significance of data shown in the figures.

AUTHORS CONTRIBUTION

OL and JB conceived the project and research plans, supervised the experiments and wrote the article with contributions from all authors. JZ, DL, ET and EC performed most of the experiments and analysed the data with contributions from KVD, PD, CV, EG and KG. BL-V, MD and CD-L provided technical assistance. CLS, KG, MD and AB performed the genetic screenings of mutant pea and provided the Ps-*ABI5* mutant lines.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded in part by the Génoplante 2010 QualityLegSeed project GPLA06036G and a grant from the Region des Pays de la Loire, France (QUALISEM 2009-2013). We acknowledge Sandra Pelletier and the ANAN platform of the SFR Quasav, Angers, France for the assistance with the microarray analysis and access to hybridization facilities and INEM for the greenhouse facilities (IRHS, Angers, France). We thank Séverine Gagné for help with the HPLC analysis of carotenoids. The TILLING Platform is funded by Initiative d'Excellence Paris-Saclay (Lidex-3P, ANR-11-IDEX-0003-02) and the European Research Council (ERC-SEXYPARTH).

REFERENCES

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

Almoguera C, Prieto-Dapena P, Díaz-Martín J, Espinosa JM, Carranco R, Jordano J (2009) The HaDREB2 transcription factor enhances basal thermotolerance and longevity of seeds through functional interaction with HaHSFA9. BMC Plant Biol 9: 75

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

Bentsink L, Jowett J, Hanhart CJ, Koornneef M (2006) Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci 103: 17042–17047

Bolingue W, Ly Vu B, Leprince O, Buitink J (2010) Characterization of dormancy behaviour in seeds of the model legume *Medicago truncatula*. Seed Sci Res 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, Larré C, Satour P, Leprince O (2006) Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. Plant Physiol 140: 1418–1436

Buitink J, Hemminga MA, Hoekstra FA (2000) Is there a role for oligosaccharides in seed longevity? An assessment of intracellular glass stability. Plant Physiol 122: 1217–1224

Buitink J, Leprince O (2004) Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. Cryobiology 48: 215–228

Canfield MR, Guiamét JJ, Noodén LD (1995) Alteration of soybean seedling development in darkness and light by the stay-green mutation *cytG* and *Gd1d2*. Ann Bot 75: 143–150

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. Plant J 30: 373–383

Chatelain E, Hundertmark M, Leprince O, Gall SL, Satour P, Deligny-Penninck S, Rogniaux H, Buitink J (2012) Temporal profiling of the heat-stable proteome during late maturation of *Medicago truncatula* seeds identifies a restricted subset of late embryogenesis abundant proteins associated with longevity. Plant Cell Environ 35: 1440–1455

Chatelain E, Satour P, Laugier E, Vu BL, Payet N, Rey P, Montrichard F (2013) Evidence for participation of the methionine sulfoxide reductase repair system in plant seed longevity. Proc Natl Acad Sci 110: 3633–3638

Christ B, Hörtensteiner S (2014) Mechanism and significance of chlorophyll breakdown. J Plant Growth Regul 33: 4–20

Chung DW, Pružinská A, Hörtensteiner S, Ort DR (2006) The role of pheophorbide *a* oxygenase expression and activity in the canola green seed problem. Plant Physiol 142: 88–97

Clerkx EJM, Blankestijn-De Vries H, Ruys GR, Groot SPC, Koornneef M (2003) Characterization of *green seed*, an enhancer of *abi3-1* in Arabidopsis that affects seed longevity. Plant Physiol 132: 1077–1084

Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. Annu Rev Plant Biol 61: 651–679

Dalmais M, Schmidt J, Le Signor C, Moussy F, Burstin J, Savois V, Aubert G, Brunaud V, de Oliveira Y, Guichard C, Thompson R, Bendahmane A (2008) UTILLdb, a Pisum sativum in silico forward and reverse genetics tool. Genome Biol. 9: R43

De Giorgi J, Piskurewicz U, Loubery S, Utz-Pugin A, Bailly C, Mène-Saffrané L, Lopez-Molina L (2015) An endosperm-associated cuticle is required for Arabidopsis seed viability, dormancy and early control of germination. PLOS Genet 11: e1005708

Debeaujon I, Léon-Kloosterziel KM, Koornneef M (2000) Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. Plant Physiol 122: 403–414

Dekkers BJW, He H, Hanson J, Willems LAJ, Jamar DCL, Cueff G, Rajjou L, Hilhorst HWM, Bentsink L (2016) The Arabidopsis *DELAY OF GERMINATION 1* gene affects *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 (ABI5)* expression and genetically interacts with *ABI3* during Arabidopsis seed development. Plant J 85: 451–465

Delahaie J, Hundertmark M, Bove J, Leprince O, Rogniaux H, Buitink J (2013) LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance. J Exp Bot 64: 4559–4573

Delmas F, Sankaranarayanan S, Deb S, Widdup E, Bournonville C, Bollier N, Northey JGB, McCourt P, Samuel MA (2013) ABI3 controls embryo degreening through Mendel's I locus. Proc Natl Acad Sci 110: E3888–E3894

de Souza Vidigal D, Willems L, van Arkel J, Dekkers BJ, Hilhorst HW, Bentsink L (2016) Galactinol as marker for seed longevity. Plant Sci 246: 112–118

Finkelstein RR (1994) Maternal effects govern variable dominance of two abscisic acid response mutations in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol 105: 1203–1208

Finkelstein R, Gampala SSL, Lynch TJ, Thomas TL, Rock CD (2005) Redundant and distinct functions of the ABA response loci *ABA-INSENSITIVE(ABI)5* and *ABRE-BINDING FACTOR (ABF)3*. Plant Mol Biol 59: 253–267

Finkelstein RR, Lynch TJ (2000) The Arabidopsis abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. Plant Cell 12: 599–609

Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2005) AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. Plant Cell 17: 3470–3488

Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. J Plant Res 124: 509–525

Goldovsky L, Cases I, Enright AJ, Ouzounis CA (2005) BioLayoutJava. Appl Bioinformatics 4: 71–74

Gonzalez-Jorge S, Ha S-H, Magallanes-Lundback M, Gilliland LU, Zhou A, Lipka AE, Nguyen Y-N, Angelovici R, Lin H, Cepela J (2013) Carotenoid cleavage dioxygenase4 is a negative regulator of β-carotene content in Arabidopsis seeds. Plant Cell 25: 4812–4826

Havaux M, Eymery F, Porfirova S, Rey P, Dörmann P (2005) Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 17: 3451–3469

Hundertmark M, Buitink J, Leprince O, Hincha DK (2011) The reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in *Arabidopsis thaliana*. Seed Sci Res 21: 165–173

Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* 7: 106–111

Jalink H, van der Schoor R, Frandas A, van Pijlen JG, Bino RJ (1998) Chlorophyll fluorescence of *Brassica oleracea* seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance. Seed Sci Res 8: 437–443

Jourjon M-F, Jasson S, Marcel J, Ngom B, Mangin B (2005) MCQTL: multi-allelic QTL mapping in multi-cross design. Bioinformatics 21: 128–130

Kranner I, Birtić S, Anderson KM, Pritchard HW (2006) Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death? Free Radic Biol Med 40: 2155–2165

Lee KP, Piskurewicz U, Tureckova V, Carat S, Chappuis R, Strnad M, Fankhauser C, Lopez-Molina L (2012) Spatially and genetically distinct control of seed germination by phytochromes A and B. Genes Dev 26: 1984–1996

Lopez-Molina L, Mongrand S, Chua N-H (2001) A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci 98: 4782–4787

Maia J, Dekkers BJW, Dolle MJ, Ligterink W, Hilhorst HWM (2014) Abscisic acid (ABA) sensitivity regulates desiccation tolerance in germinated Arabidopsis seeds. New Phytol 203: 81–93

Mène-Saffrané L, Jones AD, DellaPenna D (2010) Plastochromanol-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci 107: 17815–17820

Monma M, Ito M, Saito M, Chikuni K (1994) Carotenoid components in soybean seeds varying with seed color and maturation stage. Biosci Biotechnol Biochem 58: 926–930

Moran R (1982) Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N, N-dimethylformamide. Plant Physiol 69: 1376–1381

Nakabayashi K, Okamoto M, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E (2005) Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed: Molecular profiling in Arabidopsis seed. Plant J 41: 697–709

Nakajima S, Ito H, Tanaka R, Tanaka A (2012) Chlorophyll *b* reductase plays an essential role in maturation and storability of Arabidopsis seeds. Plant Physiol 160: 261–273

Nambara E, Keith K, McCourt P, Naito S (1994) Isolation of an internal deletion mutant of the Arabidopsis thaliana ABI3 gene. Plant Cell Physiol 35: 509-513

Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. Plant Physiol 147: 1251–1263

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

Ooms JJ, Leon-Kloosterziel KM, Bartels D, Koornneef M, Karssen CM (1993) Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana* (a comparative study using abscisic acid-insensitive *abi3* mutants). Plant Physiol 102: 1185–1191

Perrin F, Brahem M, Dubois-Laurent C, Huet S, Jourdan M, Geoffriau E, Peltier D, Gagné S (2016) Differential pigment accumulation in carrot leaves and roots during two growing periods. J Agric Food Chem 64: 906-912

Personat J-M, Tejedor-Cano J, Prieto-Dapena P, Almoguera C, Jordano J (2014) Co-overexpression of two Heat Shock Factors results in enhanced seed longevity and in synergistic effects on seedling tolerance to severe dehydration and oxidative stress. BMC Plant Biol 14: 56

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. Aust J Bot 55: 326–335

Righetti K, Vu JL, Pelletier S, Vu BL, Glaab E, Lalanne D, Pasha A, Patel RV, Provart NJ, Verdier J, Leprince O, Buitink J (2015) Inference of longevity-related genes from a robust

co-expression network of seed maturation identifies regulators linking seed storability to biotic defense-related pathways. Plant Cell 27: 2692-2708

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 J 51: 47–59

Sakuraba Y, Jeong J, Kang M-Y, Kim J, Paek N-C, Choi G (2014) Phytochrome-interacting transcription factors PIF4 and PIF5 induce leaf senescence in Arabidopsis. Nat Commun 5: 4636

Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat Protoc 3: 1101–1108

Schneider T, Keller F (2009) Raffinose in chloroplasts is synthesized in the cytosol and transported across the chloroplast envelope. Plant Cell Physiol 50: 2174-2182

Sinniah UR, Ellis RH, John P (1998) Irrigation and seed quality development in rapid-cycling Brassica: soluble carbohydrates and heat-stable proteins. Ann Bot 82: 647–655

Sugliani M, Rajjou L, Clerkx EJM, 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 Phytol 184: 898–908

Tang W, Ji Q, Huang Y, Jiang Z, Bao M, Wang H, Lin R (2013) FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL3 and FAR-RED IMPAIRED RESPONSE1 transcription factors integrate light and abscisic acid signaling in Arabidopsis. Plant Physiol 163: 857–866

Teixeira RN, Ligterink W, França-Neto J de B, Hilhorst HWM, da Silva EAA (2016) Gene expression profiling of the green seed problem in soybean. BMC Plant Biol 16: 1

Terrasson E, Buitink J, Righetti K, Ly Vu B, Pelletier S, Zinsmeister J, Lalanne D, Leprince O (2013) An emerging picture of the seed desiccome: confirmed regulators and newcomers identified using transcriptome comparison. Front Plant Sci 4: 497-497

Thayer SS, Björkman O (1990) Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. Photosynth Res 23: 331–343

Tunnacliffe A, Hincha DK, Leprince O, Macherel D (2010) LEA proteins: versatility of form and function. Dormancy Resist. Harsh Environ. Springer, pp 91–108

Vandecasteele C, Teulat-Merah B, MorèRe-Le Paven M-C, Leprince O, Ly Vu B, Viau L, Ledroit L, Pelletier S, Payet N, Satour P, Lebras C, Gallardo K, Huguet T, Limami AM, Prosperi JM, Buitink J (2011) Quantitative trait loci analysis reveals a correlation between

the ratio of sucrose/raffinose family oligosaccharides and seed vigour in *Medicago truncatula*. Plant Cell Environ 34: 1473–1487

Verdier J, Lalanne D, Pelletier S, Torres-Jerez I, Righetti K, Bandyopadhyay K, Leprince O, Chatelain E, Ly-Vu B, Gouzy J, Gamas P, Udvardi MK, Buitink J (2013) A regulatory network-based approach dissects late maturation processes related to the acquisition of desiccation tolerance and longevity of *Medicago truncatula* seeds. Plant Physiol 163: 757–774

Vom Dorp K, Hölzl G, Plohmann C, Eisenhut M, Abraham M, Weber APM, Hanson AD, Dörmann P (2015) Remobilization of phytol from chlorophyll degradation is essential for tocopherol synthesis and growth of Arabidopsis. Plant Cell 27: 2846-2859

Voorrips RE (2002) MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. J Hered 93: 77-78

Wang Z, Cheng K, Wan L, Yan L, Jiang H, Liu S, Lei Y, Liao B (2015) Genome-wide analysis of the basic leucine zipper (bZIP) transcription factor gene family in six legume genomes. BMC Genomics 16: 1053

Waterworth WM, Masnavi G, Bhardwaj RM, Jiang Q, Bray CM, West CE (2010) A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity: Characterization of Arabidopsis DNA ligase 6. Plant J 63: 848–860

Yamburenko MV, Zubo YO, Vanková R, Kusnetsov VV, Kulaeva ON, Börner T (2013) Abscisic acid represses the transcription of chloroplast genes. J Exp Bot 64: 4491-4502

Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. Plant J 61: 672–685

Zbierzak AM, Kanwischer M, Wille C, Vidi P-A, Giavalisco P, Lohmann A, Briesen I, Porfirova S, Bréhélin C, Kessler F (2010) Intersection of the tocopherol and plastoquinol metabolic pathways at the plastoglobule. Biochem J, 425: 389-399

TABLES

Table I. Summary of detected QTL for aging traits in the *M. truncatula* LR4 population originating from a cross between J6 x DZA315.16.

Aging assays were performed at two relative humidities (RH, 60% and 75%) and 35°C. Percentages of final germination (% FG) and of normal seedlings (%NS) were determined at the indicated days of storage. Position in cM from the LR4 map are described in Vandecasteele et al. (2011).

Trait	LG	Peak position (cM)	Confidence interval (cM)	LOD	R^2 (%)	Additive effect J6 (%)
20 d aging 75% RH on %FG	1	67.8	62.8-81.5	5.2	13.2	6.9
159 d aging 60% RH on %NS	1	86.3	45-68.3	3.1	9.7	2.8
20 d aging 75% RH on %FG	3	59.3	53.6-62.2	5.4	13.7	-9.4
20 d aging 75% RH on %NS	3	59.3	51.2-62.2	3.7	10.2	-9.4
159 d aging 60% RH on %FG	3	63.5	61.2-66.4	6.2	17.4	-9.8
14 d aging 75% RH on %FG	3	65.5	55.5-66.4	3.6	12.8	-9.1
159 d aging 60% RH on %NS	3	65.5	41.9-66.4	3.5	10.3	-4.1
159 d aging 60% RH on %FG	6	15.1	0-35.6	4.0	12.1	6.6
20 d aging 75% RH on %NS	7	47.3	39.0-66.4	4.0	10.7	-2.1
20d aging 75% RH on %NS Dijon	7	54.2	47.4-66.6	5.3	13.2	-8.9
159 d aging 60% RH on %NS	7	58.2	52.2-66.4	4.8	14.1	-3.8
20 d aging 75% RH on %NS	8	48.3	40.8-54.6	6.0	15.7	-8.3
14 d aging 75% RH on %FG	8	49.7	43.1-56.1	6.6	21.1	-9.2
14 d aging 75% RH on %NS	8	49.7	41.7-74.7	3.3	11.8	-6.1
20 d aging 75% RH on %FG	8	50.3	41.2-66	5.1	13.0	-6.7

LG, linkage group; LOD, logarithm of the odds; R^2, percentage of phenotypic variance explained.

Table II. GO enrichment analysis of maturation modules obtained from gene co-expression analysis.

Analysis was performed using AgriGO applying a Chi square test with the Yekutieli multi-test adjustment method. #BG/ref, number of genes annotated in GO term in background, FDR, false discovery rate. P, biological process, F, molecular function, C, cellular component

GO term	Ontology	Description	Number in input list	#BG/Ref	FDR
MODULE I					
GO:0042545	P	cell wall modification	4	386	0.0081
GO:0030599	F	pectin esterase activity	4	148	1.60E-11
GO:0005618	C	cell wall	10	618	7.90E-20
GO:0048046	C	apoplast	5	406	1.70E-06
MODULE II - Cluster a					
GO:0009793	P	embryonic development ending in seed dormancy	6	465	0.00014
GO:0048316	P	seed development	6	530	0.00046
GO:0006952	P	defense response	7	766	0.00082
GO:0009725	P	response to hormone stimulus	8	982	0.00091
GO:0009628	P	response to abiotic stimulus	10	1471	0.0012
GO:0009266	P	response to temperature stimulus	5	485	0.0036
GO:0019748	P	secondary metabolic process	5	489	0.0036
GO:0048608	P	reproductive structure development	7	978	0.0076
MODULE II - Cluster b					
GO:0015979	P	photosynthesis	7	162	5.00E-19
GO:0006091	P	generation of precursor metabolites and energy	5	285	0.00028
GO:0006952	P	defense response	7	766	0.023
MODULE II - Cluster c					
GO:0006915	P	apoptosis	4	159	2.80E-07
GO:0012501	P	programmed cell death	4	244	0.00035
GO:0006457	P	protein folding	4	275	0.00083
GO:0009408	P	response to heat	3	161	0.0011
GO:0006952	P	defense response	6	766	0.0088
GO:0009743	P	response to carbohydrate stimulus	3	240	0.036
Module III					
GO:0015979	P	photosynthesis	13	162	5.30E-26
GO:0010218	P	response to far red light	5	57	3.70E-09
GO:0009637	P	response to blue light	5	69	2.40E-07
GO:0006066	P	alcohol metabolic process	9	270	2.10E-05
GO:0006629	P	lipid metabolic process	16	841	0.00043
GO:0009416	P	response to light stimulus	12	596	0.0024
GO:0006461	P	protein complex assembly	5	134	0.0031
GO:0009314	P	response to radiation	12	613	0.0031
GO:0009409	P	response to cold	8	328	0.0047
GO:0009699	P	phenylpropanoid biosynthetic process	5	141	0.0047
GO:0006952	P	defense response	12	766	0.04

Table III. Contents of carotenoids and tocochromanols of mature seeds of *M. truncatula*. For tocopherols, data are the means (±SE) of 5 replicates using 20 seeds from a pool of 20 plants. For carotenoids, data are the means (±SE) of 3 replicates of 100 seeds from a pool of 20 plants. Values for antheraxanthin and zeaxanthins are expressed in β-carotene equivalents. When significantly different (assessed by ANOVA, Supplemental Dataset 3), values were ranked into groups as indicated by the respective letter using a Newmans-Keuls test. ND not determined; PC-8: plastochromanol-8.

	Genotype			
Compound	WT	Mt-*abi5-1*	Mt-*abi5-2*	Mt-*abi5-3*
Carotenoids (µg g DW^{-1})				
Lutein	1.2 ± 0.1 (a)	9.6 ± 0.6 (b)	6.9 ± 1.2 (b)	7.1 ± 0.7 (bc)
β-Carotene	1.2 ± 0.9 (a)	5.0 ± 0.8 (b)	3.8 ± 0.3 (c)	2.3 ±0.7 (d)
Antheraxanthin	0.2 ± 0.2 (a)	3.6 ± 0.2 (b)	2.8 ± 0.1 (c)	1.8 ± 0.2 (d)
Zeaxanthin	1.8 ± 0.3 (a)	10.2 ± 1.0 (b)	10.0 ± 0.1 (b)	9.0 ± 0.6
Tocochromanol (nmol g DW^{-1})				
α-tocopherol	752 ± 17 (a)	931 ± 25 (b)	934 ± 17 (b)	ND
β-tocopherol	8.8 ±1.7	10.5 ± 0.7	9.5 ± 0.5	ND
ɣ -tocopherol	34.0 ±0.8	35.3 ±2.9	39.9 ± 2.9	ND
PC-8	3.0 ±1.9 (ab)	0.8 ±0.5 (a)	5.8 ± 1.4(b)	ND

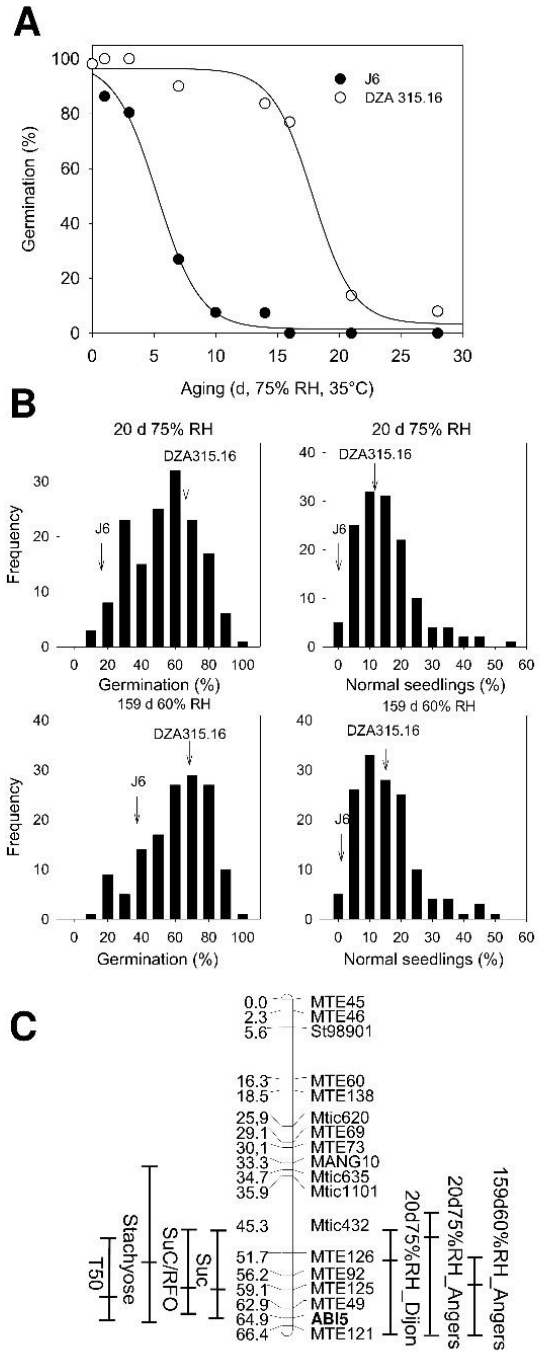


Figure 1. QTL analysis of seed longevity.
A) Loss of viability during storage at 75% relative humidity (RH), 35°C of both parents (J6 and DZA 315.16) using triplicates of 30-50 seeds obtained from 3-5 plants. Data (means ±SE) were fitted with sigmoidal curves. B) Frequency distribution of percentages of germination and normal seedlings after storage obtained from the LR4 RILs. Time and conditions of storage are indicated together with the value obtained from the respective parents. C) Genetic map of linkage group 7 showing the QTL mapping for time to 50% germination (T50), sugar content and viability after indicated storage times and conditions from seeds produced in Angers and Dijon (France). The lines indicate the confidence intervals and the peak positions.

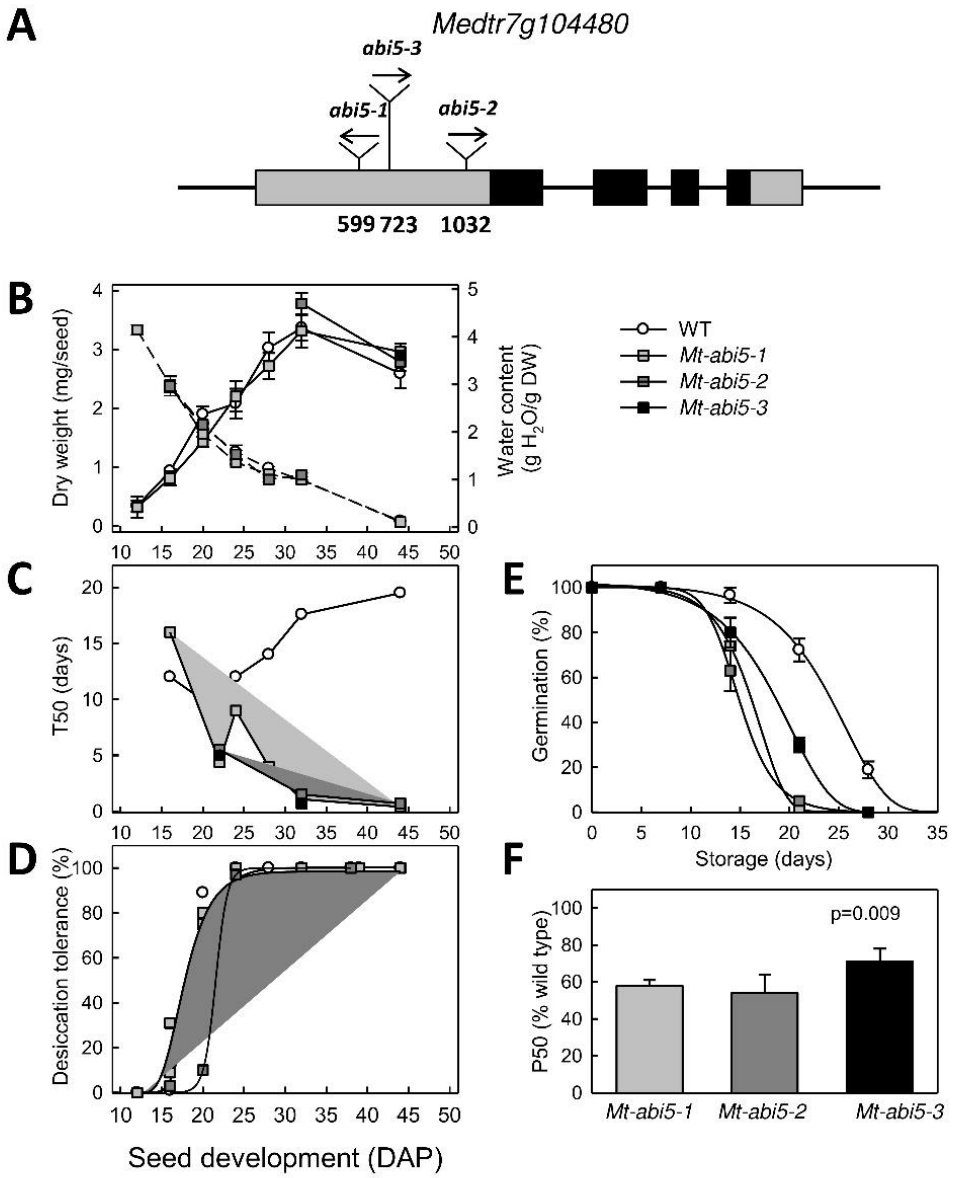


Figure 2. Mt-ABI5 affects seed physiological quality during seed development.
A) Gene structure of Medtr7g104480 showing the *Tnt1* insertions in the three *Mt-abi5* alleles. Boxes and lines indicate exons and introns, respectively. The grey boxes indicate the open reading frame and the black boxes indicate the bZip domain. B) Changes in seed dry weight and water content during maturation. Data are the means (±SE) of 4 replicates of 5 seeds for immature seeds and 60 seeds for mature seeds. C) Changes in dormancy evaluated as the time necessary to obtain 50% germination. Data from two independent cultures are shown and were obtained from 50 seeds for each time point. D) Acquisition of desiccation tolerance evaluated after fast drying and imbibition using 30-50 seeds from a pool of 20 plants. E) Representative loss of viability during storage at 75% relative humidity (RH), 35°C using triplicates of 30-50 seeds from a pool of 20 plants. Data (means ±SE) were fitted with sigmoidal curves to estimate the P50 (time necessary to obtain a loss of viability of 50% during storage). F) Longevity of *Mt-abi5* seeds as assessed by calculating P50 during storage of seeds obtained from 2-4 independent cultures and storage experiments. Data (means ±SE) are expressed as percentage of wild-type seeds from plants grown concomitantly with mutants. The level of significance (p) between mutants and wild-type using an ANOVA test (see Supplemental dataset 3) is indicated. (DAP, days after pollination)

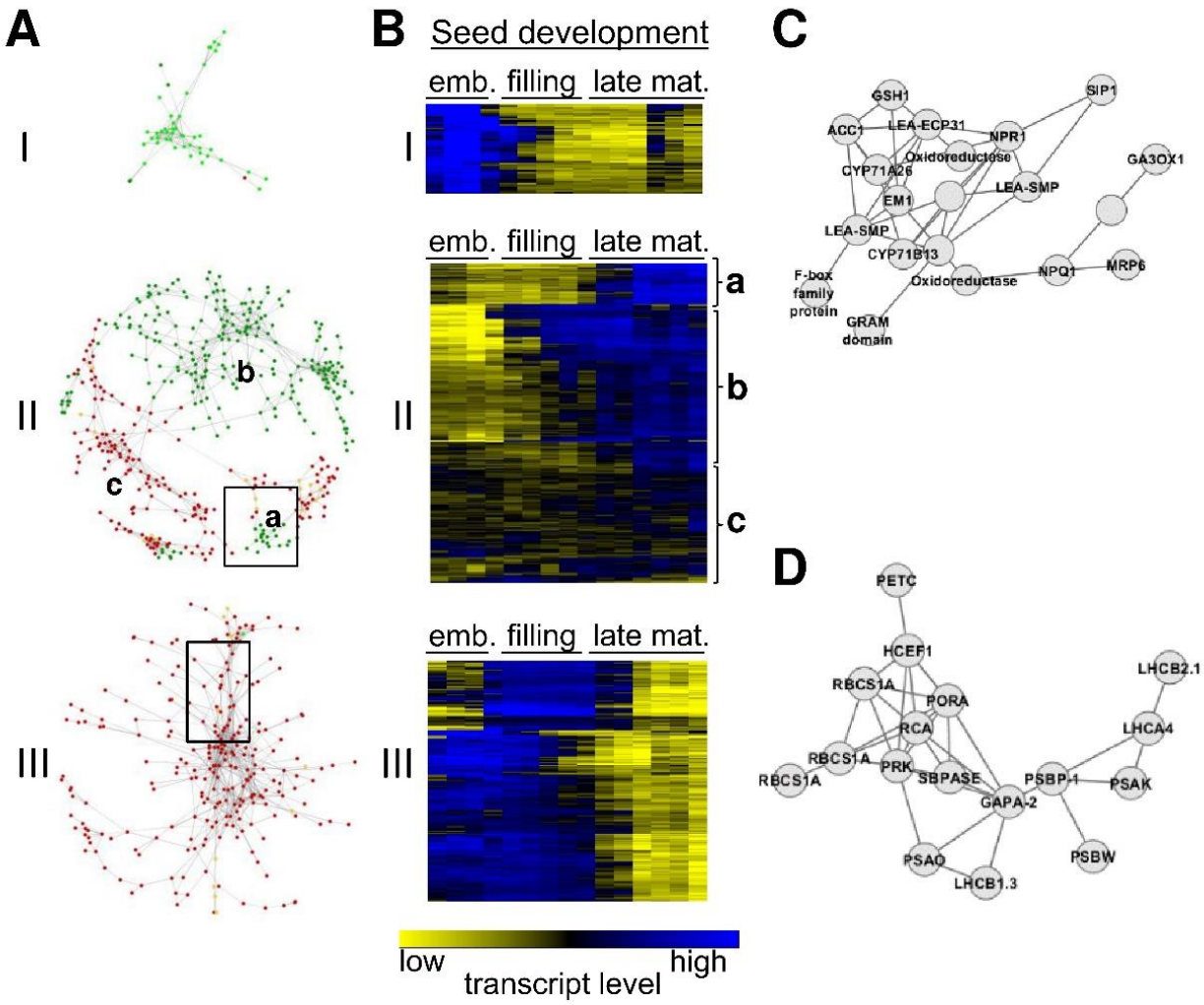


Figure 3. Gene co-expression network of deregulated transcripts in Mt-*abi5* mutant seeds during development.

A) Gene co-expression modules (I-III) during development of Mt-*abi5* seeds. Temporal analysis of nodes is depicted by coloring genes according to their specific expression in comparison with wild-type seeds. Light green nodes represent down-regulated transcripts in Mt-*abi5* seeds at 16d after pollination (DAP). Dark yellow nodes represent up-regulated transcripts in Mt-*abi5* seeds at 24 DAP. Dark green and dark red nodes correspond to down- and up-regulated transcripts, respectively, in Mt-*abi5* at 40 DAP (mature seeds). Gene interactions were visualized using Cytoscape using an edge-weighted spring-embedded layout. B) Expression profiles of the nodes shown in panel A during seed development in wild-type seeds. Data are derived from Righetti et al. (2015). The color scale corresponding to transcript level is indicated. Emb, embryogenesis; late mat., late maturation. C) Focus on the regulation of genes involved in protection against desiccation (box shown in Module IIa). D) Focus on the regulation of genes involved in photosynthesis (box shown in module III).

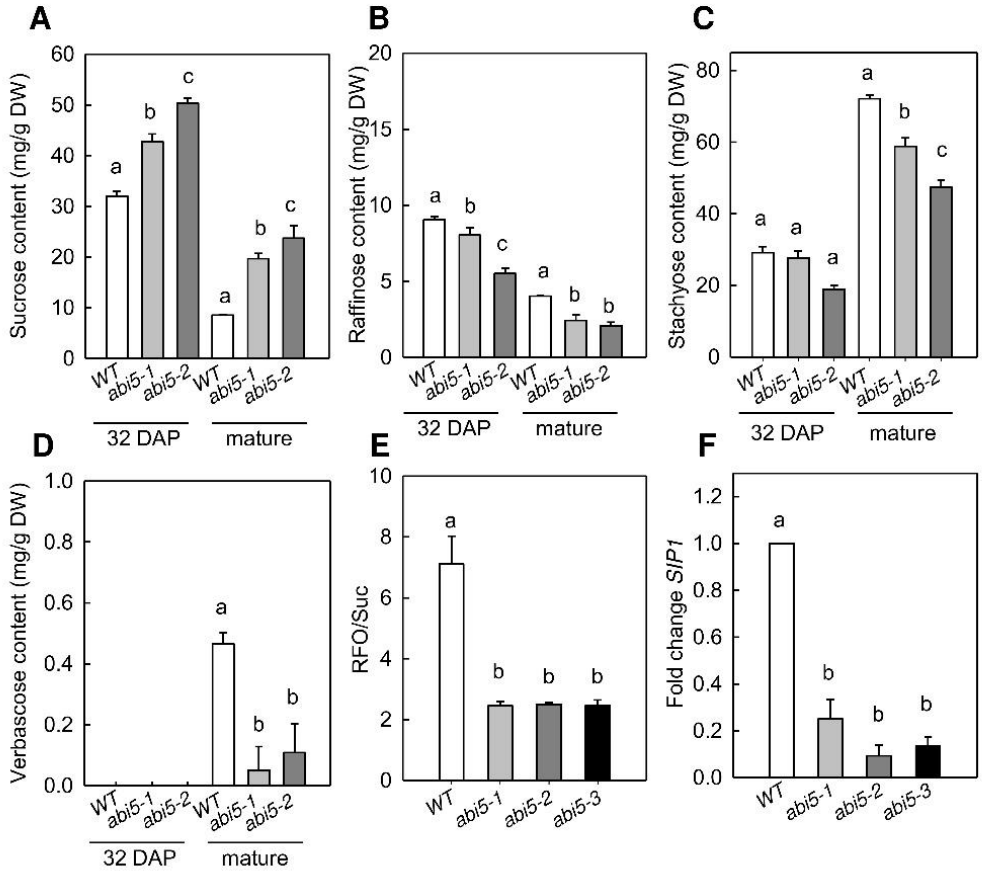


Figure 4. Sugar metabolism is affected in *Mt-abi5* seeds.

A-D) Contents in sucrose, raffinose, stachyose and verbascose in wild-type and *Mt-abi5* seeds harvested at 32 days after pollination (DAP) and at pod abscission (mature). E) Ratio of RFO/Suc. Data are the average (± SE) of 4 replicates of 10 seeds each from a pool of 20 plants. F) Expression of *MtSIP1* (*SEED IMBIBITION PROTEIN 1 /RAFFINOSE SYNTHASE, Medtr3g077280*) in mature wild-type and *Mt-abi5* seeds. Expression was normalized using *MSC27* (TC85211) and *ACTIN11* (Medtr2g008050) as reference genes. Data are the means of 3 independent biological replicates. Significantly different values (assessed by ANOVA, P<0.05) were ranked into groups as indicated by the respective letter using the Student-Newman-Keuls test.

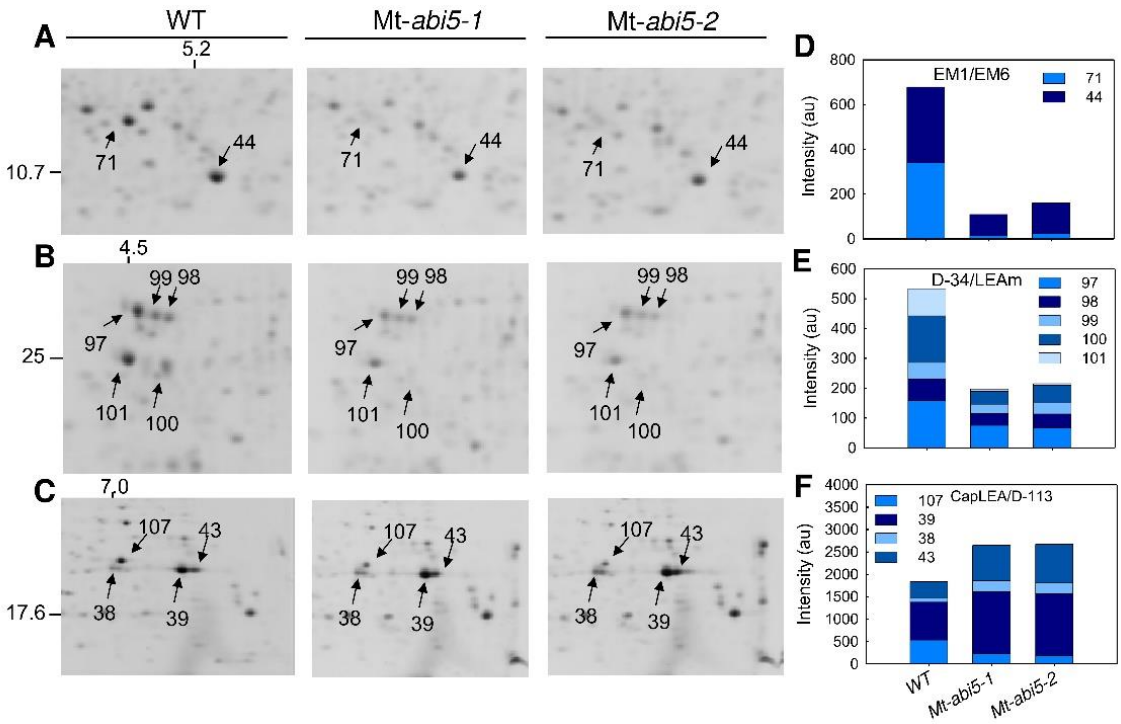


Figure 5. Mt-ABI5 affects LEA polypeptide accumulation.
A-C) Focus on specific areas of a representative 2D gel showing differentially expressed polypeptides between mature wild-type and *Mt-abi5* seeds. Spot numbers indicate the following polypeptides. Panel A: 44, EM6; 71, EM1). Panel B: 97, D34-I; 98, D-34-I/LEAm; 99, LEAm; 100, PM25/D35-II; 101, D34-II/PM25. Panel C: 39, 38, 107, Cap LEA 1; 43, Protein D-113.II. D-F) Polypeptide abundance of the indicated LEA polypeptides. Data are the average of spot intensities obtained from 5-6 gels.

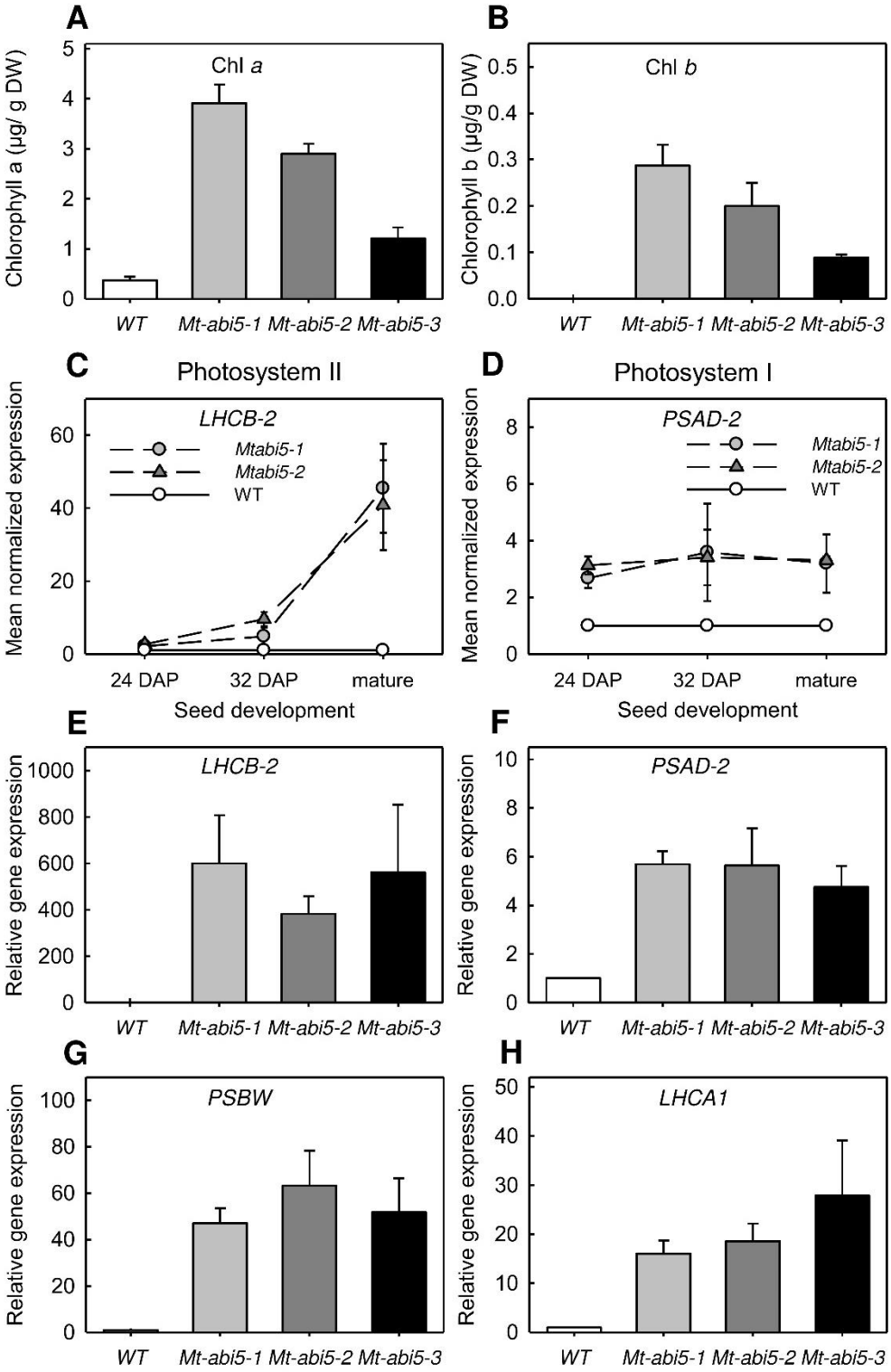


Figure 6. Chlorophyll and photosystem associated gene expression are affected in *Mt-abi5* seeds.

A-B) Chl *a* and Chl *b* contents in mature seeds. Data are the means (±SE) of 3 replicates of 100 seeds from a pool of 20 plants. C-D) Level of expression of Mt-*LCHB-2* and Mt-*LCHA* during seed maturation at 24 and 32 DAP and in mature seeds. Data were normalized using expression values found for wild-type seeds at each specific stage. E-H) Level of expression of PSII genes (Mt-*LCHB-2* and Mt-*PSBW*) and PSI genes (Mt-*LCHA1* and Mt-*PSAD-2*) in mature wild-type and *Mt-abi5* seeds. Data were normalized using expression values of wild-type seeds. *MSC27* and *ACTIN11* were used as reference genes. Data are the means (± SE) of three independent biological replicates. All values for *Mt-abi5* seeds were significantly different from wild-type, except for Mt-*LCHB-2* gene expression at 24 DAP.

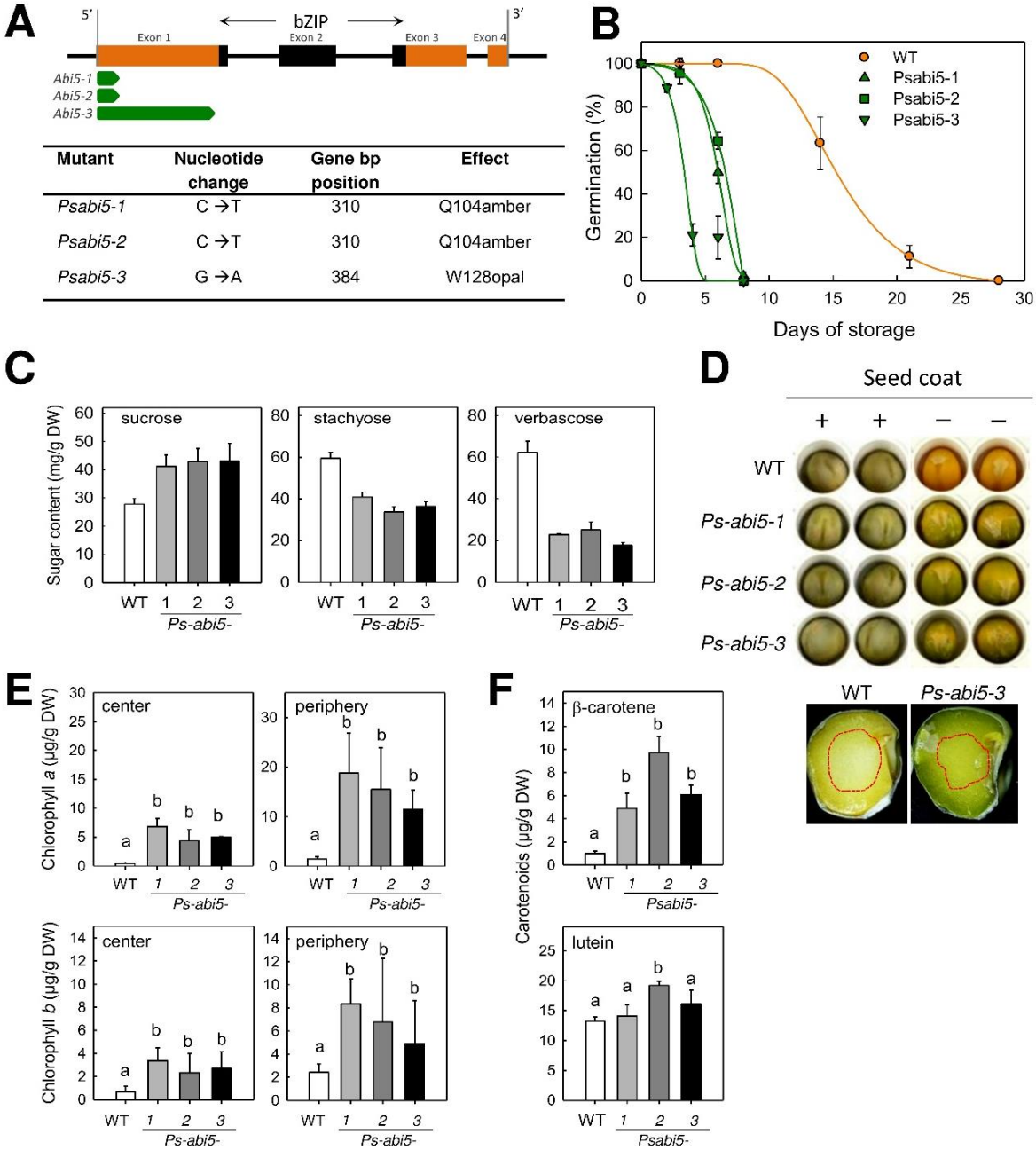


Figure 7. Characterization of *abi5* mutant seeds of pea.

A) Gene structure of Ps-*ABI5* and confirmed Ps-*abi5* EMS mutants detected by TILLING screening. The position of the DNA region encoding the bZIP domain is indicated in black. The open reading frame of the WT *ABI5* gene is indicated in orange . The green arrows depict the open reading frames for the mutant lines that carry premature stop codons. B) Survival curves (percent germination) of mature seeds during storage at 45°C, 75% RH. Data are the means (± SE) of 3 replicates of 30 seeds from a pool of 30 plants. C) Sugar contents in the axis of mature uncoated pea seeds. Data are the means (SE) of 4 replicates of 10 seeds from a pool of 30 plants. D) Representative photographs of dry mature seeds before (+) and after (-) removing the seed coat and after splitting the seed open to show the inside of cotyledons. E) Chlorophyll contents of mature dry cotyledons. T tissues were harvested in the center and periphery of the cotyledons as outlined in panel D (red dashed lines). F) Carotenoid contents of mature dry seeds. Data from panels E and F are the means of 4 replicates of 10 seeds from a pool of 30 plants. When significantly different (assessed by ANOVA , P<0.05, Supplemental Dataset 3), values were ranked into groups as indicated by the respective letter using the Student-Newman-Keuls test.

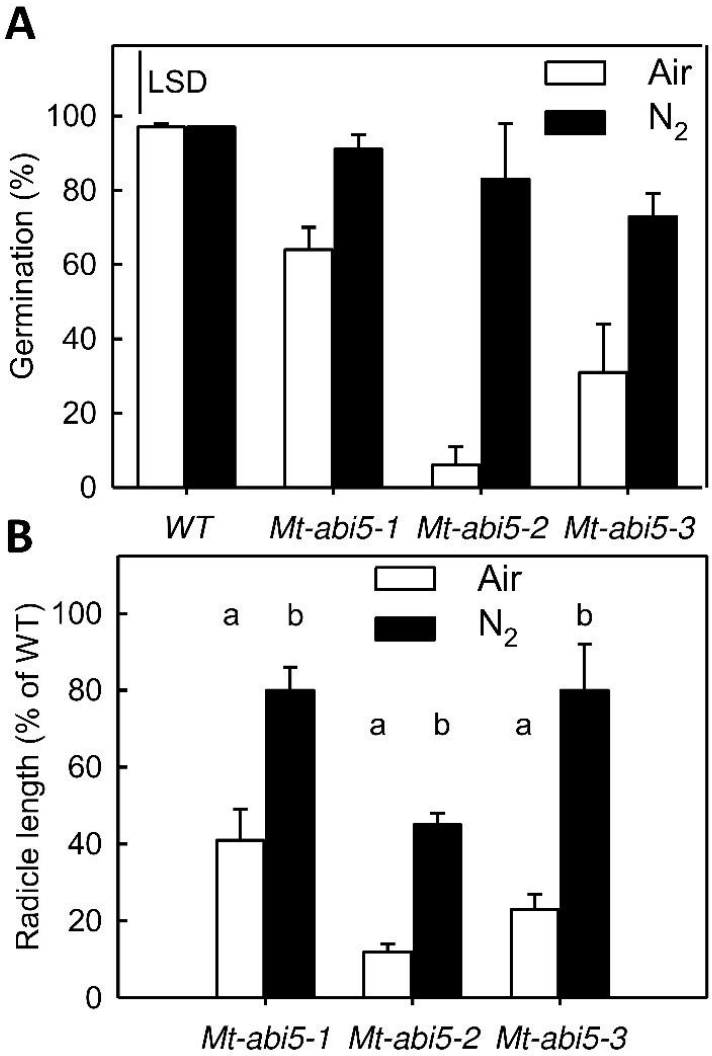


Figure 8. Mature Mt-*abi5* seeds are more sensitive to oxygen. A) Percentage of viability after 14 d of hermetic storage at 35°C under ambient air or nitrogen atmosphere after a 4 d equilibration at 75% RH. Data are the means of triplicates of 50 seeds. B) Radicle length of aged Mt-*abi5* survivors obtained after 14 d of storage. Data are the means of 10-12 radicles (±SE) measured after 48 h of imbibition and are expressed as % of radicle length of aged wild-type seeds. When significantly different (ANOVA, P<0.05, Supplemental Dataset 3), values were ranked into groups as indicated by the respective letter using a Student-Newman-Keuls test.

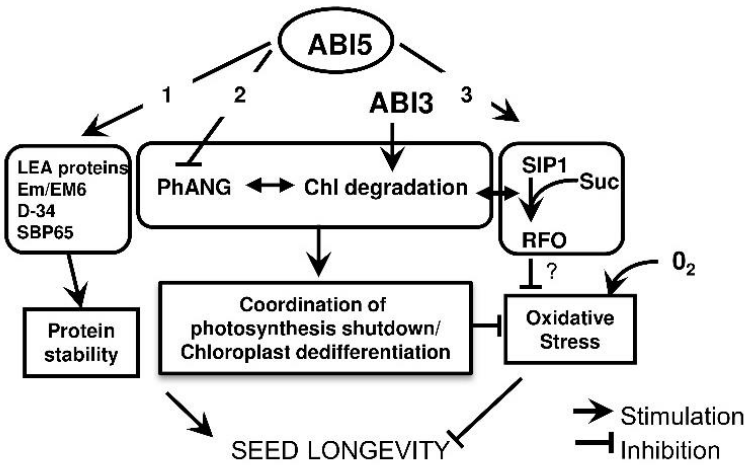
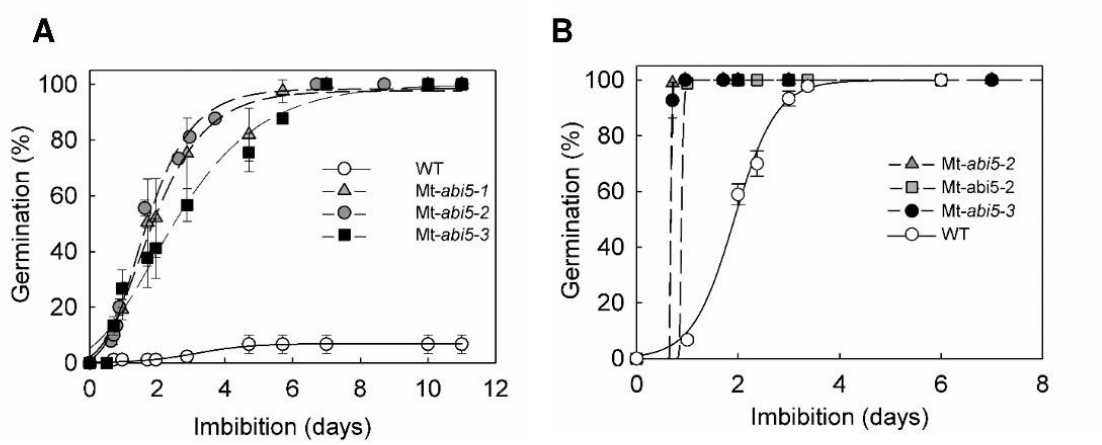


Figure 9. Model summarizing the different actions of ABI5 in the regulation of late seed maturation in legumes.
1) production of LEA proteins Em/Em6, D-34 and SBP65 that protect proteins from aggregation during desiccation/rehydration; 2) down-regulation of expression of photosynthesis associated nuclear genes which is accompanied by Chl and carotenoids degradation (although not directly regulated by ABI5) and leads to chloroplast dedifferentiation, which altogether prevents oxidative stress in the mature seed; 3) induced expression of *SIP1* thus producing RFO which might inhibit oxidative stress both inside and outside the chloroplast.

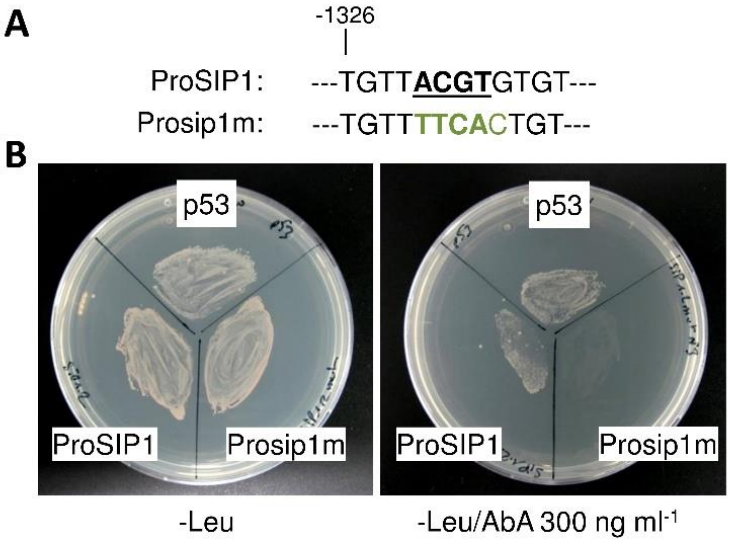
Supplemental Data. Zinsmeister et al. (2016). Plant Cell 10.1105/tpc.16.00470



Supplemental Figure 1. Germination of Mt-*abi5* seeds is insensitive to ABA during imbibition in the dark.

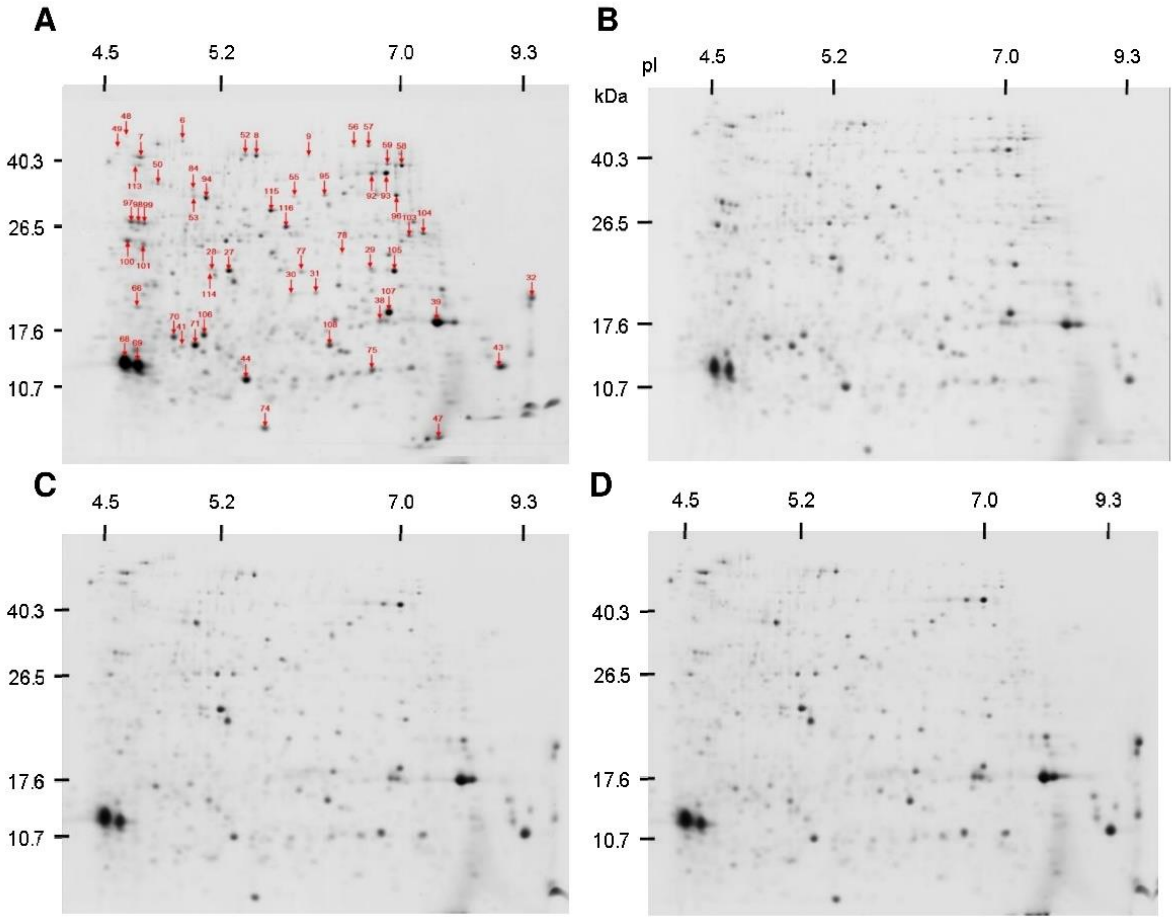
A) Percentages of germination of wild-type (WT) and Mt-*abi5* seeds in the presence of 10 µM ABA and B) in the presence of 0.005% (v:v) methanol (control). Prior to imbibition, seeds were after-ripened for 30 d and scarified. Data represent the mean of 3 biological replicates of 30 seeds pooled from 20 plants (± SE).

Supplemental Data. Zinsmeister et al. (2016). Plant Cell 10.1105/tpc.16.00470



Supplemental Figure 2: Yeast one-hybrid binding assays of ABI5 to the ABRE in the promoter region of Mt-*SIP1*. A) Sequence of the -1326 bp region surrounding the ABRE (bold, underlined) used for the binding assay of the SIP1 promoter (ProSIP1) and its mutated version (Prosip1m, indicated in green). B) Binding assay using indicated baits. p53 sequence containing a p53 binding motif was used as a positive control (p53) whereas the mutated version (Prosip1m) was used as negative control (Prosip1m).

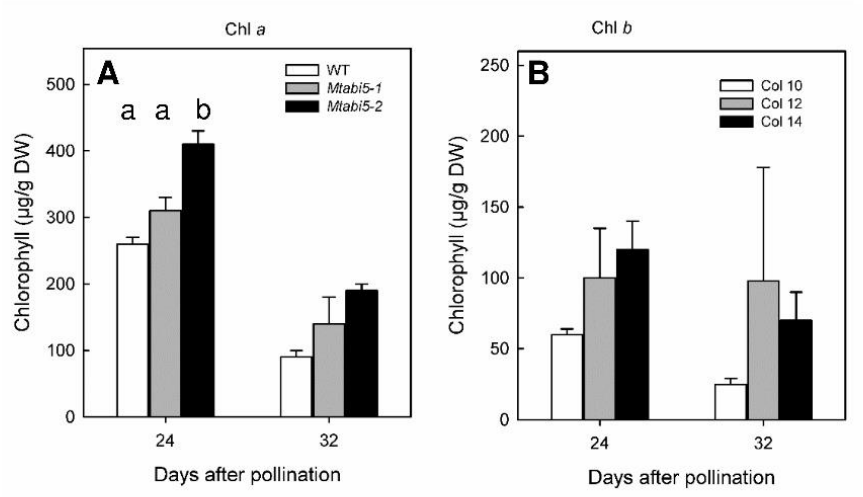
Supplemental Data. Zinsmeister et al. (2016). Plant Cell 10.1105/tpc.16.00470



Supplemental Figure 3. Two dimensional electrophoresis gels of the heat-stable proteome of *M. truncatula* seeds.

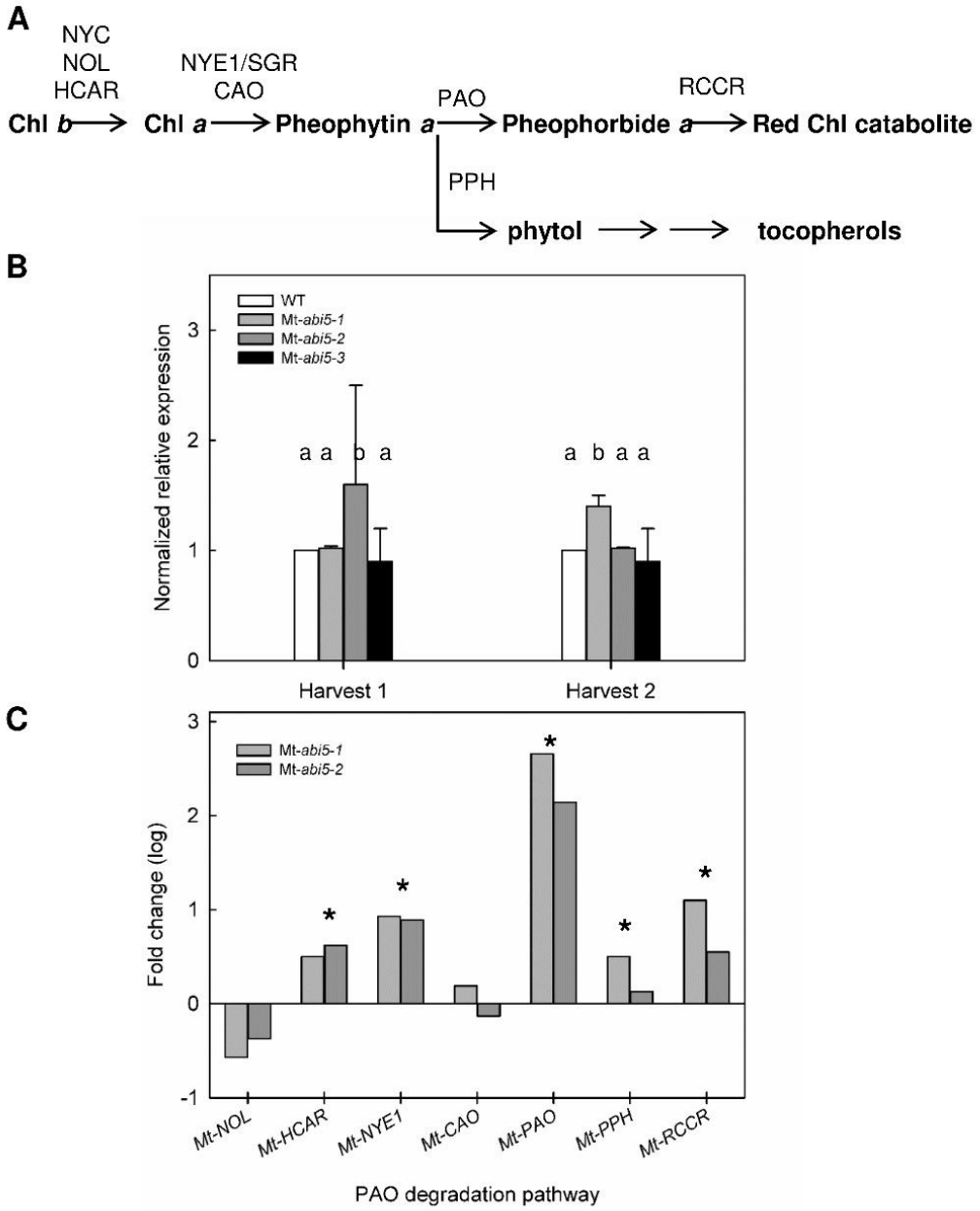
A) Reference map of the heat-stable proteome of mature seeds, genotype R-108. B-D) Representative gels of the heat-stable proteome of mature wild-type (B), Mt-*abi5-1* (C) and Mt-*abi5-2* seeds (D). One hundred milligrams of the heat-stable proteins was separated by SDS-PAGE using 24 cm non linear immobilized pH gradient strips (3-10). pI and molecular mass (in kDa) are indicated. Numbers indicate the spots that were identified (see Supplementary table 1).

Supplemental Data. Zinsmeister et al. (2016). Plant Cell 10.1105/tpc.16.00470



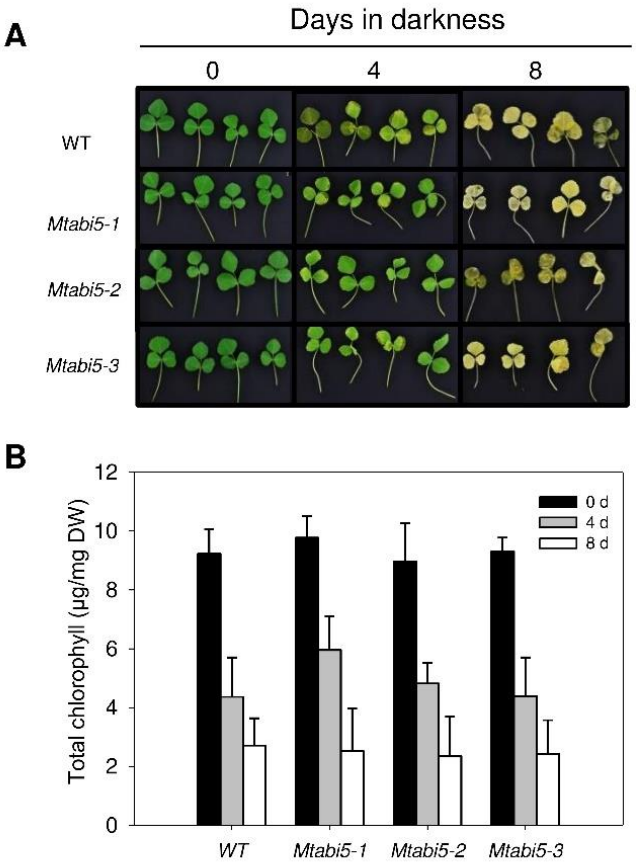
Supplemental Figure 4. Chlorophyll contents in developing wild-type and Mt-*abi5* seeds.
Data are the means (± SE) of 3 replicates of 30 seeds pooled from 20 plants. Letters indicate significant differences as assessed by ANOVA (P>0.05, Supplemental Dataset 3) and post-hoc Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons.

Supplemental Data. Zinsmeister et al. (2016). Plant Cell 10.1105/tpc.16.00470



Supplemental Figure 5. Expression of genes involved in the PAO degradation pathway in mature seeds of Mt-*abi5*. A) PAO Chl breakdown pathway at the thylakoid membrane and associated enzymes (*HCAR, 7-hydroxymethyl Chla reductase*, *NYC*, *NON YELLOW COLORING1*, *NOL*, *NYC1-LIKE*), *PAO Pheide a OXYGENASE*, *SGR/NYE1* (*STAYGREEN*, whose role in Chl degradation is not established), *PPH (PHEIDE HYDROLASE)*, *RCCR REDUCTASE (RCC RED CHL CATABOLITE)*, *CAO (CHLOROPHYLIDE a OXYGENASE).* The branching route to tocopherol synthesis is also shown. B) RT-QPCR data obtained for *MtNYC1*. Data are the means (± SE) of 3 biological replicates obtained from 30 seeds of two independent harvests, each from a pool of four plants. Letters indicate significant differences compared to wild-type (ANOVA and Duncan's test for multiple comparisons). C) Expression data obtained from the transcriptome analysis. Asterisks indicate significant differences between wild-type and mutant at P<0.05 using BH-corrected values.

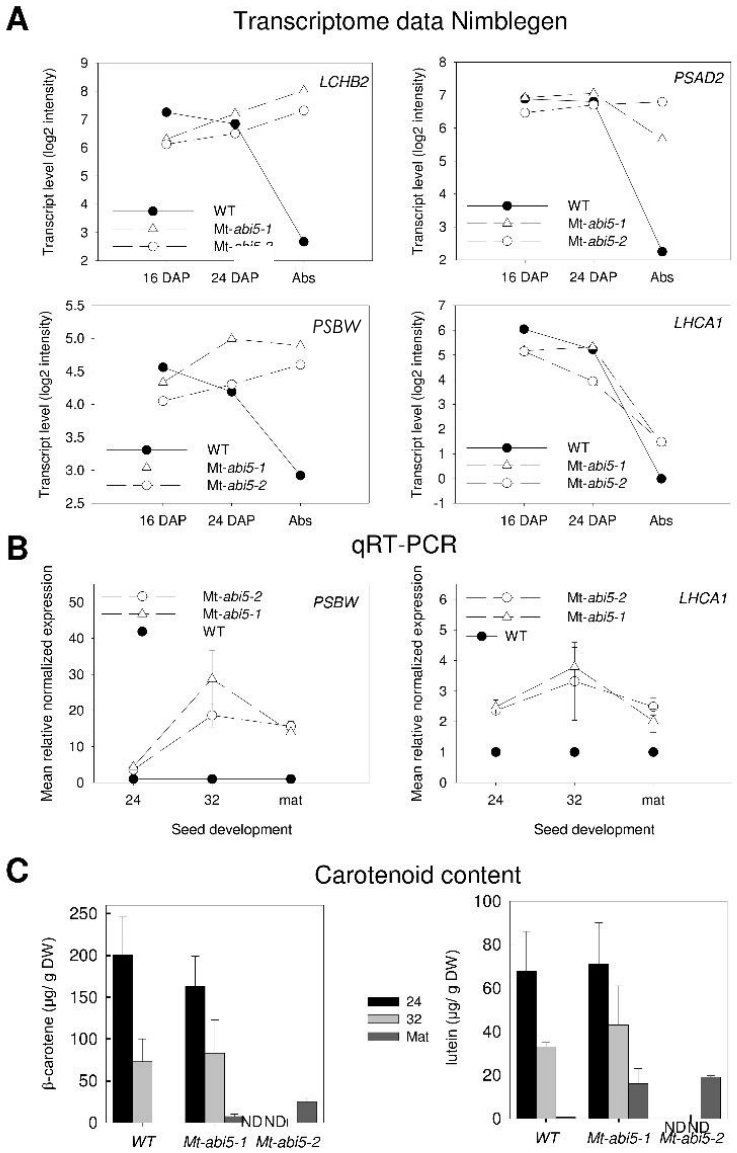
Supplemental Data. Zinsmeister et al. (2016). Plant Cell 10.1105/tpc.16.00470



Supplemental Figure 6. Dark-induced senescence in young seedlings of wild-type and *Mtabi5*

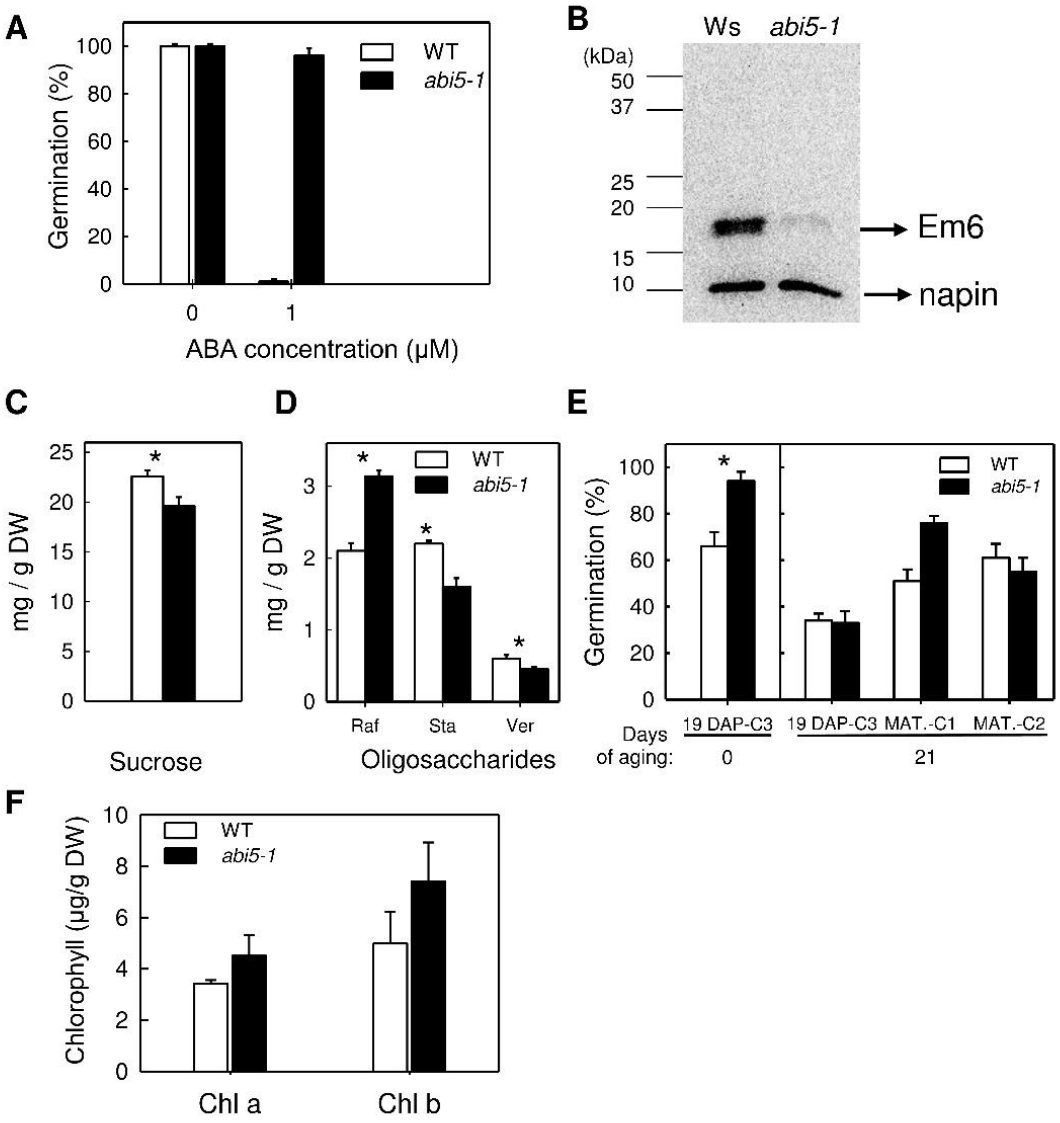
Photographs (A) and Chl content using spectrophotometer analysis (B). Data are means (± SE) of 3 replicates of four leaves from two plants. No significant differences (ANOVA P>0.05, Supplemental dataset 3) were observed between wild-type and mutant seeds during senescence.

Supplemental Data. Zinsmeister et al. (2016). Plant Cell 10.1105/tpc.16.00470



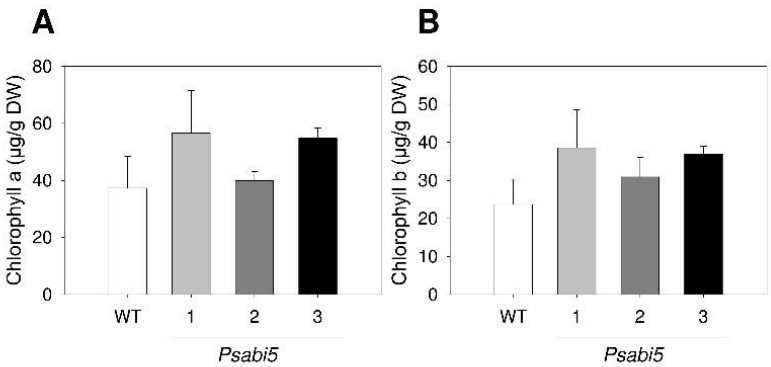
Supplemental Figure 7. Photosynthesis-associated gene expression and carotenoid content during seed development of wild-type and *Mtabi5* seeds. Gene expression (*MtLHCA1,* Medtr6g033320; *MtLHCB.2,* Medtr5g097280; *MtPSAD-2,* Medtr5g006130; *MtPSBW,* Medtr1g070495) was assessed using transcriptome analysis (A) and RT-PCR (B) where data represent the means (±SE) of 3 biological replicates of 25 seeds each pooled from 6 plants. C) β-carotene (left) and lutein contents (right) at indicated time points of days after pollination, (Mat, Mature. Seeds were harvested at the point of abscission). ND, not determined.

Supplemental Data. Zinsmeister et al. (2016). Plant Cell 10.1105/tpc.16.00470



Supplemental Figure 8. Longevity of wild-type (Wassilewskija, Ws) and *abi5-1* seeds of Arabidopsis together with sugar content and EM protein levels in dry mature seeds.
A) ABA sensitivity. B) EM6 amount as assessed by immunoblot using an antibody against a synthetic peptide of a consensus amino-acid sequence. C-D) Sucrose and RFO contents of mature *abi5-1* seeds compared to mature wild-type seeds. Data are the means (± SE) of 3 replicates of 15 mg of mature seeds pooled from two plants. E) Seed dormancy and longevity of *abi5-1* mature seeds compared to mature wild-type seeds harvested at 19 DAP and at abscission (MAT). Data are the means (± SE) of 3 replicates of 100-200 mature seeds from 3 independent cultures (indicated as C1, C2, C3) F) Chlorophyll contents measured by spectrometry. Data are the means of (± SE) of 3 replicates of 15-30 mg of mature seeds pooled from four plants. When indicated, stars indicate significant difference (Student t-test, P>0.05) between wild-type and mutant seeds. Raf, raffinose; Sta, stachyose; Ver, verbascose.

Supplemental Data. Zinsmeister et al. (2016). Plant Cell 10.1105/tpc.16.00470



Supplemental Figure 9. Chlorophyll contents in seed coats of mature wild-type and *Psabi5* mature seeds.
Chl *a* (A) *and* Chl *b* (B) contents were measured spectrophometrically. Data are the means (± SE) of two replicates of 3 seeds from a pool of 30 plants.

Supplemental Data. Zinsmeister et al. (2016). Plant Cell 10.1105/tpc.16.00470

Supplemental table 1. Detected polymorphisms between Jemalong J-6 and DZA315.16 in the region of ABI5 (Medtr7g104480) on LG7 (Mt4.0)

Position	Ref allele	Alt allele	Alt. Allele Count	Alt. Allele Frequency	Effect	Effect Impact	Nearest Gene	Gene Distance	Codon Change	Amino Acid Change	Exon Rank	Transcript ID
42340607	A	G	10	0.021	Upstream Gene Variant	MODIFIER	Medtr7g104480					Medtr7g104480.1
42340702	A	G	20	0.066	5 Prime UTR Variant	MODIFIER	Medtr7g104480	122			1	Medtr7g104480.1
42340937	C	T	283	0.508	Synonymous Variant	LOW	Medtr7g104480	0	ctC/ctT	L38	1	Medtr7g104480.1
42341240	A	G	167	0.265	Synonymous Variant	LOW	Medtr7g104480	0	caA/caG	Q139	1	Medtr7g104480.1
42341352	A	G	12	0.021	Missense Variant	MODERATE	Medtr7g104480	0	Agg/Ggg	R177G	1	Medtr7g104480.1
42341360	A	G	279	0.479	Synonymous Variant	LOW	Medtr7g104480	0	caA/caG	Q179	1	Medtr7g104480.1
42341399	C	G	11	0.024	Synonymous Variant	LOW	Medtr7g104480	0	acC/acG	T192	1	Medtr7g104480.1
42341519	C	T	14	0.077	Synonymous Variant	LOW	Medtr7g104480	0	aaC/aaT	N232	1	Medtr7g104480.1
42341660	C	T	13	0.028	Synonymous Variant	LOW	Medtr7g104480	0	taC/taT	Y279	1	Medtr7g104480.1
42341946	A	T	13	0.052	Intron Variant	MODIFIER	Medtr7g104480	0			1	Medtr7g104480.1
42341945	T	G	13	0.022	Intron Variant	MODIFIER	Medtr7g104480	0			1	Medtr7g104480.1
42342003	T	C	12	0.023	Intron Variant	MODIFIER	Medtr7g104480	0			1	Medtr7g104480.1
42342082	T	A	72	0.146	Intron Variant	MODIFIER	Medtr7g104480	0			1	Medtr7g104480.1
42342098	A	G	11	0.025	Intron Variant	MODIFIER	Medtr7g104480	0			1	Medtr7g104480.1
42342118	A	G	72	0.145	Intron Variant	MODIFIER	Medtr7g104480	0			1	Medtr7g104480.1
42342462	C	G	21	0.042	Downstream Gene Variant	MODIFIER	Medtr7g104490	951			0	Medtr7g104490.7
42342462	C	G	21	0.042	Intron Variant	MODIFIER	Medtr7g104480					Medtr7g104480.1
42343101	G	A	32	0.069	3 Prime UTR Variant	MODIFIER	Medtr7g104480	475			4	Medtr7g104480.1
42343101	G	A	32	0.069	Downstream Gene Variant	MODIFIER	Medtr7g104490					Medtr7g104490.7

Supplemental Data. Zinsmeister et al. (2016). Plant Cell 10.1105/tpc.16.00470

Supplemental table 2: Soluble sugar composition of mature pea cotyledons.
Data (mg/g dry weight) are the means of 4 replicates of 20 cotyledons.

Genotype	Sucrose		Stachyose		Raffinose		Verbascose		RFO/Sucrose	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Wild-type	19.54	0.84	13.96	0.73	3.92	0.28	33.55	0.63	2.64	0.09
Psabi5-1	29.69	0.55	17.68	0.52	7.21	0.24	22.99	0.63	1.61	0.04
Psabi5-2	27.99	0.98	15.01	0.68	6.05	0.37	23.16	0.63	1.58	0.07
Psabi5-3	35.2	1.1	18.64	0.2	7.82	0.48	18.7	0.38	1.29	0.04

Supplemental Data. Zinsmeister et al. (2016). Plant Cell 10.1105/tpc.16.00470

Supplemental table 3. Comparative analysis of affected phenotypes in seeds of the *abi5* mutants of *Medicago truncatula*, *Pisum sativum* and *Arabidopsis thaliana*.

Phenotype	Mt-*abi5*	Ps-*abi5*	At-*abi5-1*
Dormancy	reduced	NA	reduced (at 19 DAP)
Longevity	reduced	reduced	no difference
Chlorophyll retention	yes	yes	no
EM LEA protein/transcript abundance	reduced	reduced	reduced
D-34 LEA protein/transcript abundance	reduced	reduced	reduced[1]
RFO metabolism	affected	affected	affected
PHANG transcripts	increased	ND	ND

DAP, days after pollination. NA, not applicable.ND, not determined.

[1] Bies-Ethève N, Gaubier-Comella P, Debures A, Lasserre E, Jobet E, Raynal M, Cooke R, Delseny M. 2008. Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in Arabidopsis thaliana. Plant Molecular Biology 67, 107–124.

Supplemental Data. Zinsmeister et al. (2016). Plant Cell 10.1105/tpc.16.00470

Supplemental table 4 - List of primer combinations used for mutant selection, gene expression validation by qRT-PCR and yeast one-hybrid analysis

Mapping of MtABI5

gene	detection method	Primer F 5'3'	Primer R 5'3'	restriction enzyme	before digestion size fragment	after digestion size fragment
ABI5 (AC147	CAPS	CATGCGTTGACAAA GGCATCT	CGAAATTCTTGCC GCTATCACAG	Hpy188I	497	419 + 78

Mutant selection

species	Genotype	Primer F 5'3'	Primer R 5'3'
M. truncatul	*Mtabi5-1*	ATGGTGGTAAGAGAAGGTGAGAT	AGCAGCAAGATCTAGAGCCAGA
	Mtabi5-2	ATGGTGGTAAGAGAAGGTGAGAT	AGCAGCAAGATCTAGAGCCAGA
	Mtabi5-3	GGTGGAGCAGTTGGAGAACC	TCCTCTGAACACTGCATGAGAT
Arabidopsis	WS/abi5.1	GCGCAAGCGAGACATAATGG3	TCTGAAGACACCGGGCTTAA3

P. sativum

line	detection method	polymorphism	Primer F 5'3'	Primer R 5'3'	restriction enzyme	before digestion size fragment	after digestion size fragment
1805/3434	dCAPS	C310T	TTGTCTGTGATTCA GAAGGGGATTAGT TAA	TACTATTCCCAG GATACCCCGAA CC	Hpa I	481	451
3584	CAPS	G384A	GAAGAAGCGATCA GGAACGATGTTA	CTGAGCCATTGT AGCGGTGTTATT C	Nde II	573	307 + 255

qRT-PCR

Gene name	seq_id_Mt3_5	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	PCR size (pb)	PCR efficiency	R^2
MSC27	TC85211	GTTGAAGTAGACAT TGGTGCTAAC	AGCTGAGTCATCA ACACCCTCAT	100	74.2	0.994
Actin 11	Medtr2g008050	GCTGACCGTATGAG CAAGGA	TGCCAAGATAGAC CCACCAA	114	100.4	0.998
LHCA1	Medtr6g033320	TGGCATTTGTTGGA ATCGTTGT	ATGTTGTTGTGCCA TGGATCAG	100	93.9	0.991
PSBW	Medtr1g070495	TGGTGGATGAAAGA ATGAGTACTGA	AATAGAGAGCCCA GATAAAACCGAA	111	100.1	0.995
NYC1	Medtr6g088500	TCTGACAGCCGTCT ATGGTTC	CGGGAGATGCAGT ATGGACA	107	102.3	0.999
LHCB2	Medtr5g097280	ACCATGCGTCGTAC TGTGAA	TGTCCCATCCATA ATCACCA	137	107.6	0.999
PSAD-2	Medtr5g006130	GGAAGCACTGGTG GATTGTT	CACCAGTTGGCAT CTCAAAG	100	89.8	0.992
SIP1	Medtr3g077280	AACTCTTGTTTTGCC TGATGGT	AAAACACCCGTGT ATTTGTTGAGA	141	81	0.990
EM1	Medtr7g069250	TGGGAACAAAAGGA GGGCAG	AGCACGTTGTTCA CCAGACT	113	105.7	0.996

Yeast One-Hybrid Assay

Bait	SIP1.2_F	**AGCTT**AAAAAAAAATAATAATCTTTGT**TACGTG**TGTTAATTTAGTAAGATAAGTA**C**
	SIP1.2_R	**TCGAG**TACTTATCTTACTAAATTAACACACGTAACAAAGATTATTATTTTTTTTT**A**
mutated form	SIP1.2 mut_F	**AGCTT**AAAAAAAAATAATAATCTTTGT***TTTCAC***TGTTAATTTAGTAAGATAAGTA**C**
	SIP1.2 mut_R	**TCGAG**TACTTATCTTACTAAATTAACAGTGAAAACAAAGATTATTATTTTTTTTT**A**
	Bold red, adapters for HindIII and XhoI; bold underlined, ABRE element; italics, mutated nucleotides	
Prey	MtABI5PREY_F	GCGCCATATG**ATG**GTGGTAAGAGAAGGTGAGAT
	MtABI5PREY_R	TATACTCGAG**TCA**CAGATGACAACTTGTATTCC
	Bold: start and stop codon of Mt-ABI5	

ABI5 is a Regulator of Seed Maturation and Longevity in Legumes

Julia Zinsmeister, David Lalanne, Emmanuel Terrasson, Emilie Chatelain, Céline Vandecasteele, Benoit Ly Vu, Cécile Dubois-Laurent, Emmanuel Geoffriau, Christine Lesignor, Marion Dalmais, Katharina Gutbrod, Peter Dörmann, Karine Gallardo, Abdelhafid Bendahmane, Julia Buitink and Olivier Leprince

Plant Cell; originally published online November 15, 2016;
DOI 10.1105/tpc.16.00470

This information is current as of December 2, 2016

Supplemental Data	**http://www.plantcell.org/content/suppl/2016/11/15/tpc.16.00470.DC1.html**
Permissions	https://www.copyright.com/ccc/openurl.do?sid=pd_hw1532298X&issn=1532298X&WT.mc_id=pd_hw1532298X
eTOCs	Sign up for eTOCs at: http://www.plantcell.org/cgi/alerts/ctmain
CiteTrack Alerts	Sign up for CiteTrack Alerts at: http://www.plantcell.org/cgi/alerts/ctmain
Subscription Information	Subscription Information for *The Plant Cell* and *Plant Physiology* is available at: http://www.aspb.org/publications/subscriptions.cfm

© American Society of Plant Biologists
ADVANCING THE SCIENCE OF PLANT BIOLOGY

3. Chapitre 3: MtABI4-like is a regulator of seed chlorophyll loss and longevity in *Medicago truncatula*

3.1 Résumé

La longévité est un facteur important de la qualité germinative des graines, et sa diminution est associée à la rétention de la chlorophylle. En chapitre 2, nous avons validé le rôle régulateur de MtABI5 dans l'acquisition de la longévité chez *M. truncatula* et *P. sativum*. Chez les mutants Mt-*abi5*, l'expression des PHANGs est réprimée en fin de maturation et l'accumulation des sucres solubles est fortement altérée. Dans les feuilles, ce phénotype est associé à la signalisation rétrograde du chloroplaste, qui, chez *A. thaliana*, est régulée par ABI4. L'orthologue d'ABI4, MtABL, est également présent dans le module de longévité. L'objectif de ce travail est de tester si MtABL régule la longévité des graines en lien avec le démantèlement des chloroplastes pendant la maturation. Pour cela, nous avons caractérisé les graines des mutants d'insertion *Tnt1* Mt-*abl* chez *M. truncatula*. En lien avec la perte de la longévité, les graines des mutants Mt-*abl* sont également tolérantes à la dessiccation et vertes à la maturité. Afin d'identifier la part des facteurs de transcription ABL et ABI5 dans la régulation des évènements de la maturation de la graine en lien avec l'acquisition de la longévité, nous avons obtenu et caractérisé les graines des double mutants Mt-*abi5*/Mt-*abl*. Cette étude permet d'identifier l'inhibition de l'expression des PHANGs comme étant régulée par MtABL et MtABI5, tandis que la dégradation de la chlorophylle serait principalement régulée par MtABL. Nos résultats indiquent également que MtABI5 seul régule positivement l'activation des gènes codant pour certaines LEA.

3.2 Introduction

Seed longevity is an important economic and ecologic trait governing seedling emergence and proper crop establishment. It is dependent both on genetic and environmental factors and is acquired progressively during late seed maturation, after seed filling and before the seed reaches the dry state (Probert *et al*., 2007; Righetti *et al*., 2015). Concomitantly, protective compounds such as LEA proteins and RFO accumulate and chlorophyll is degraded (Chatelain *et al*., 2012; Verdier *et al*., 2013; Allorent *et al*., 2015; Righetti *et al*., 2015).

Mechanisms that confer seed longevity have been documented. First the physical barriers endowed by the testa may contribute to seed longevity. For example in *A. thaliana*, seeds of testa mutants with altered seed coat structure and properties exhibit a reduced longevity (Leon-Kloosterziel *et al*., 1994; Clerkx, 2004). Testa composition such as the absence of flavonoids (Debeaujon *et al*., 2000) and cutin (De Giorgi *et al*., 2015) affects seed longevity. Within the embryo, accumulation of antioxidant molecules such as glutathione (Kranner *et al*., 2006) and tocopherols (vom Dorp *et al*., 2015) also contribute to seed longevity by preventing oxidation during storage. Seed longevity is associated with DNA and protein repair mechanisms because it is affected by mutations in genes encoding DNA ligase (Waterworth *et al*., 2010), protein L-isopartyl methyltransferase (Oge *et al*., 2008) and a methionine sulfoxide reductase (Châtelain *et al*., 2013). HSPs and LEA proteins have been also widely studied for their protective roles in the survival to dry state (Prieto-Dapena *et al*., 2006; Hundertmark *et al*., 2011; Chatelain *et al*., 2012).

Recently, retention of chlorophyll has been associated with reduced seed longevity (Clerkx, 2003; Nakajima *et al*., 2012, chapter 2). In *A. thaliana*, mature seeds of the double mutant *nyc1/nol*, which are genes encoding enzymes involved in chlorophyll degradation exhibit a reduced seed longevity and contain 10-fold more chlorophylls compared to wild-type (Nakajima *et al*., 2012). In *A. thaliana* seeds, inhibition of photosynthesis during seed development leads to reduced seed longevity, indicating that seed photosynthesis is crucial for seed quality (Allorent *et al*., 2015). We found that ABI5, a bZIP transcription factor involved in the ABA signaling pathway acts as a pleiotropic regulator of late seed maturation (chapter 2). In *M. truncatula* and pea, we showed that mature *abi5* seeds exhibit reduced seed longevity and we proposed a model establishing a link with chlorophyll degradation (Figure 2.9). However, a cause-effect relationship between chlorophyll retention and longevity remains elusive. ABI5 was also found to regulate PHANGs expression. Transcripts of these

genes are up-regulated at the end of seed maturation in Mt-*abi5* seeds, while chloroplast genes are down-regulated. Such symptom is reminiscent of a perturbation of the retrograde signaling pathway (Koussevitzky *et al*., 2007). Thus, we hypothesize that MtABI5 regulates at least partially PHANGS during seed maturation to avoid dysfunctional chloroplasts during chlorophyll degradation and ensuing reduced longevity.

In *A. thaliana* seedlings and leaves, the regulation of the chloroplast and mitochondrial retrograde signaling operates via ABI4 under the control of GENOME UNCOUPLED 1 (GUN1, Koussevitzky *et al*., 2007; Giraud *et al*., 2009, chapitre 2). In the chloroplast retrograde signaling, ABI4 represses PHANGs via the *cis* motif CCAC, particularly when adjacent to, or overlapping with, a Gbox motif (Koussevitzky *et al*. 2007). ABI4 also mediates ABA- and sugar-repression of PHANGs *via* a binding to another motif designated the S-box [CACYKSCA] (Acevedo-Hernández *et al*., 2005). ABI4-inducible gene expression has been demonstrated to be dependent on sequences related to CE1 element overlapping with ABRE element (Koussevitzky *et al*., 2007), which mediate a competition with Gbox binding factors (Acevedo-Hernández *et al*., 2005; Niu *et al*., 2002).

We hypothesize that ABI4 plays a role in seed physiological quality. In *A. thaliana*, it is mainly expressed within the embryo during seed maturation and germination (Söderman *et al*., 2000; Penfield *et al*., 2006) where it regulates the ABA sensitivity both on plastid function, *via* the nuclear genome and on lipid breakdown after germination (Penfield *et al*., 2006). It positively regulates seed dormancy by repressing ABA 8'hydroxylase genes while repressing cotyledon greening (Okamoto, 2006; Shu *et al*., 2013, Penfield 2006). In sorghum, greater embryo sensitivity to ABA and reduced accumulation of GA_4 in dormant seeds coincides with a higher expression of *SbABI4* and *SbABI5* (Cantoro *et al., 2013).* In *A. thaliana*, *abi4* mutant seeds also exhibit increased tolerance to osmotic stress during germination (Wind *et al*., 2013). Interestingly, in *M. truncatula*, an ortholog of ABI4 was found in the longevity module of the gene co-expression network associated with the acquisition of the survival in the dry state Verdier *et al*., (2013). However, whether ABI4 regulates longevity in seeds is unknown.

In this study, we tested whether MtABI4 (Medtr5g082950), previously identified by Verdier *et al*. (2013), is implicated in seed longevity and chlorophyll retention during seed maturation and whether it has a synergetic action with MtABI5 on the expression of PHANGs and other genes involved in seed longevity. In *A. thaliana*, ABI4 activates *ABI5* transcription by binding to the CCACCG box (a CE1 like element) of its promoter region (Bossi *et al*., 2009). ABI4 and ABI5 synergistically interact to control sugar sensitivity and germination

(Wind *et al*., 2013), and share common targets, such as several LEA proteins like EM1 (Reeves *et al*., 2011) and GA2OX3 (Cantoro *et al*., 2013). For this purpose, we obtained *Tnt1* insertion mutants of Mt-*abl* and Mt-*abi5-2*/Mt-*abl-1* digenic mutant and characterized them. MtABI4 was annotated *ABI4-LIKE* (*ABL*) as mutant seeds remained sensitive to ABA. We showed that MtABL is a new regulator of both seed longevity and chlorophyll loss during maturation. We dissected the common and distinct roles of MtABI5 and MtABL in regulating seed maturation events.

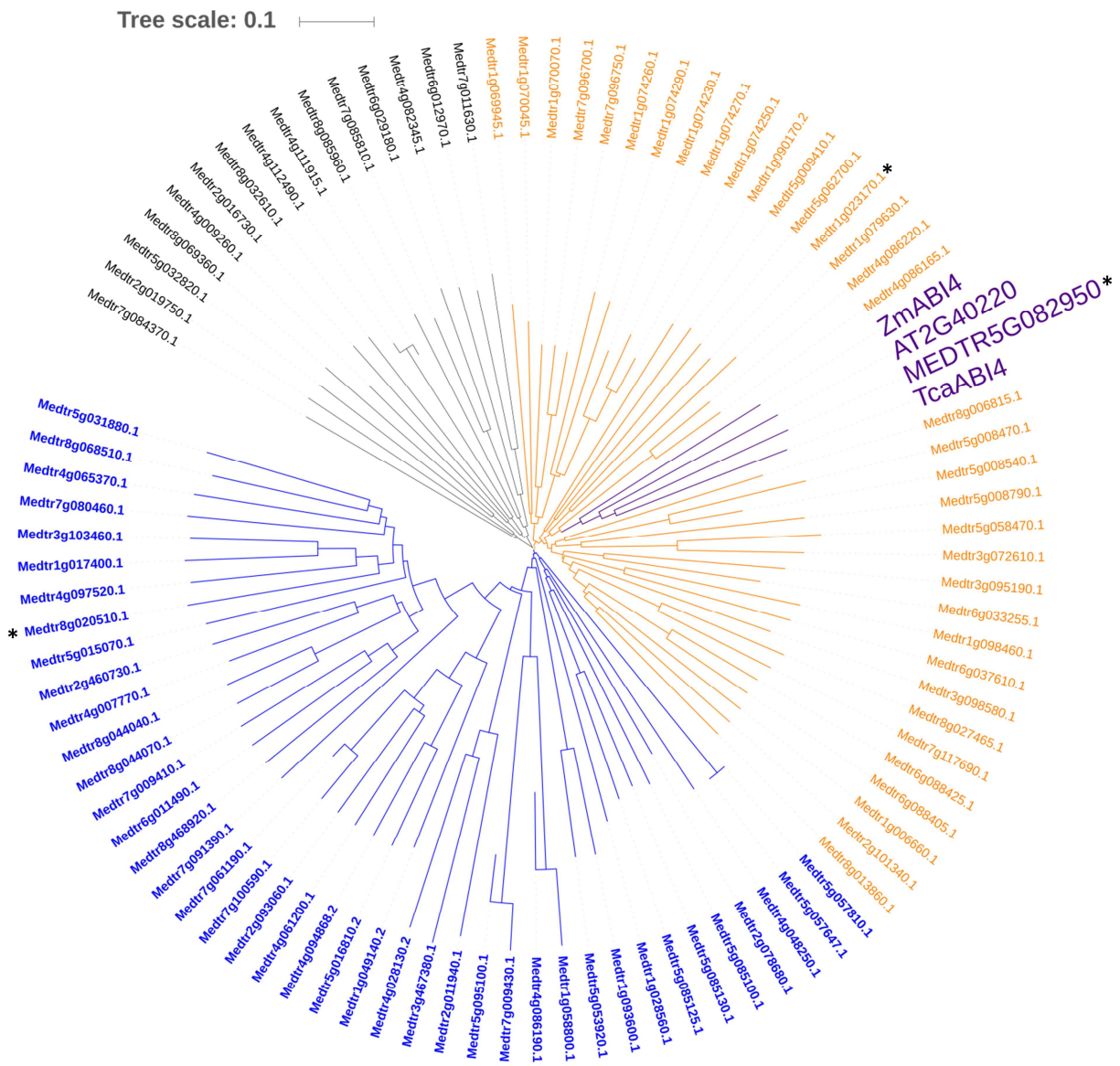


Figure 3.1: Multiple sequence alignment of *M. truncatula* AP2/EREBP transcription factors together with *A. thaliana ABI4* (At2g40220), *Zea mays ZmABI4* and *Theobroma cacao TcaABI4.* The alignment was performed using Clustal Omega [6]. iTOL[7] was used for graphical output. The sub-cluster containing ZmABI4, ABI4 and TcaABI4 is colored in purple. A star indicates genes that are present in the longevity module of Verdier *et al.*, (2013). Three main cluster are represented, number 1, dark, number 2, orange and number 3, blue.

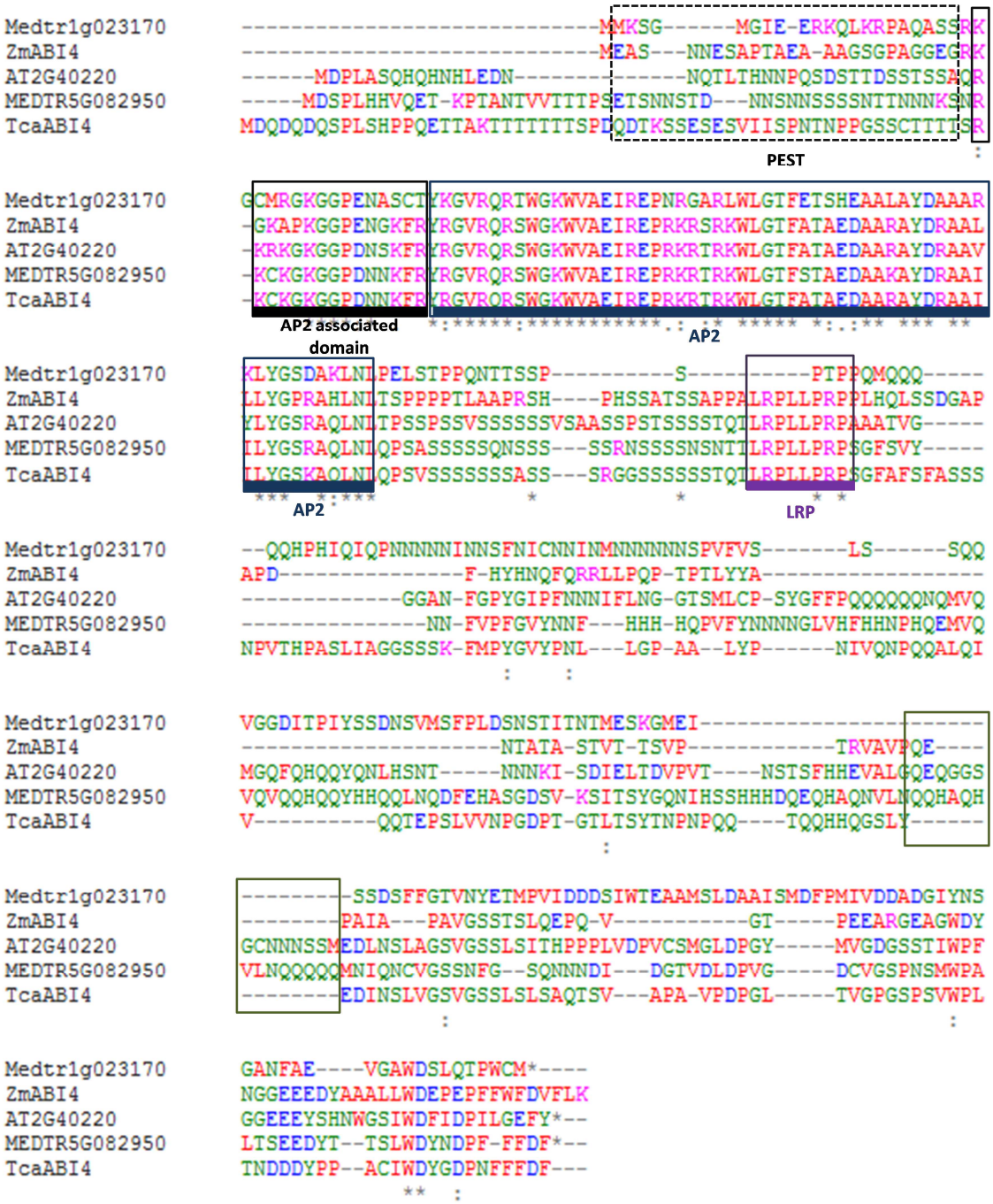


Figure 3.2: Conservation of the ABI4 specific domain in the *M. truncatula* seed specific AP2 transcription factor present in longevity module and ABI4, ZmABI4 and TcaABI4. Orthologs were aligned with Clustal program [6]. Purple box highlights the conserved LRP motif, specific of all ABI4 proteins. The blue box corresponds to the AP2 domain.The black box indicates residues of the conserved PEST domain contributing to the protein stability. The green box indicates the glutamine rich region present in all ABI4 but without specific conservation. Annotated region correspond to motifs associated to ABI4.

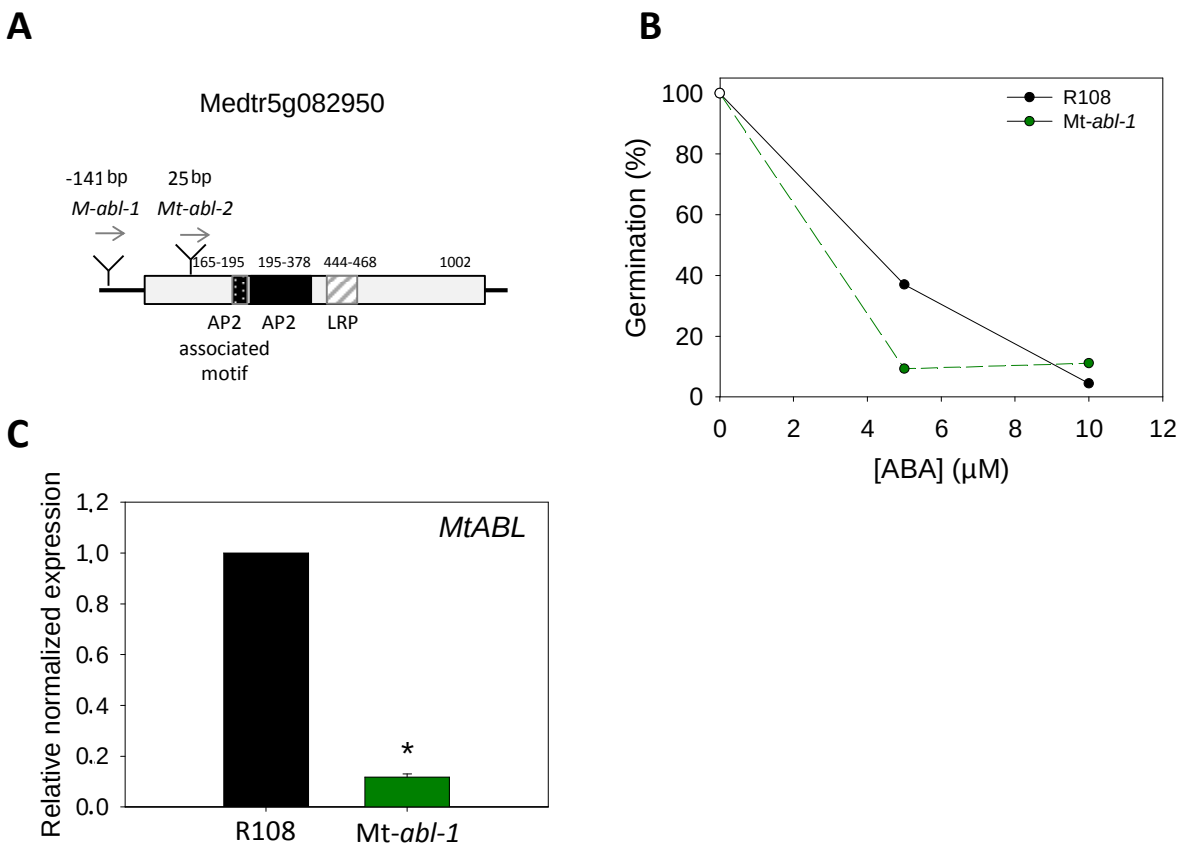


Figure 3.3: Mt-*abl* mutants presentation and ABA sensitivity. A, Gene structure showing the *Tnt1* insertion in the two respective Mt-*abl* alleles. The conserved domains are as follow: black box, AP2 domain; black spotty box, AP2 associated motif. Hatched box, LRP domain. B, The effects of ABA on germination of Mt-*abl-1* seeds compared to wild-type (R108). Germination (n= 50 seeds) was scored after 7 days of imbibition in the respective solution. C, Relative expression of *MtABL* in wild-type and Mt-*abl-1* mature seeds. Data are normalized using *MSC27* and *ACTINE11* as reference genes and are the average (± SE) of three independent biological replicates. Data are significantly different (*) using a t-test (P<0.05).

3.3 Results

3.3.1 Identification of Medtr5g082950 as putative ortholog of *A. thaliana ABI4*

To confirm the identity of the ABI4 probe detected in the *M. truncatula* seed longevity module, we obtained the amino acid sequences of ABI4 from *A. thaliana* (At2g40220) and true orthologs from maize (ZmABI4, AY125490, Niu *et al*., 2002) and *Theobroma cacao* (TcaABI4, CGD0006858, Gregorio *et al*., 2014), as both genes complement the *A. thaliana abi4* mutant. These sequences were aligned with selected AP2/EREBP transcription factors from *M. truncatula*, ABI4 being a member of this family. Among 113 members of the *M. truncatula* AP2/EREBP family in the legume transcription factor database [4], we selected 91 AP2 class genes that were also present in JCVI Medicago data base [8]. These sequences were aligned using Clustal omega [6] and the result is shown in Figure 3.1. Three main clusters are identified (see different colors in Figure 4). Cluster 2 contains a sub-cluster containing *ABI4*, *ZmABI4*, *TcaABI4*, and Medtr5g082950 (the putative MtABI4 and Medtr1g023170, both present in the longevity module. We verified that the expressions of Medtr1g023170 and Medtr5g082950 were seed-specific using a transcriptome data set obtained from Verdier *et al* (2013) and Medicago efp browser [5]. To determine which of these two AP2 transcription factors is the ortholog of ABI4, we performed a multiple sequence alignment with ABI4, ZmABI4, TcaABI4, MEDTR5G082950 and MEDTR1G023170 and determined whether the conserved functional domains that are specific to ABI4 were present (Figure 3.2). According to Gregorio *et al.*, (2014), ABI4 displays a unique LRP domain corresponding to a conserved stretch of eight amino acids (LRPLLPRP) region across species, which is important for its transcriptional activity. As presented in Figure 3.2, both MEDTR5G082950 and MEDTR1G023170 contain AP2 domains that are conserved compared to true orthologs of ABI4. Major differences between each putative *M. truncatula* ABI4 genes were found in the PEST, LRP and AP2 associated domain. Medtr5g082950 was selected in this study because it exhibits 45.6 % identity with ABI4, compared to 32 % for Medtr1g023170.

3.3.2 Characterization of homozygous lines of *Tnt1* insertion of Medtr5G082950

Two *Tnt1* insertion mutants of Medtr5g082950 were obtained from The S. Noble Foundation. As presented in Figure 3.3-A, we identified by PCR analysis insertions respectively at -141bp

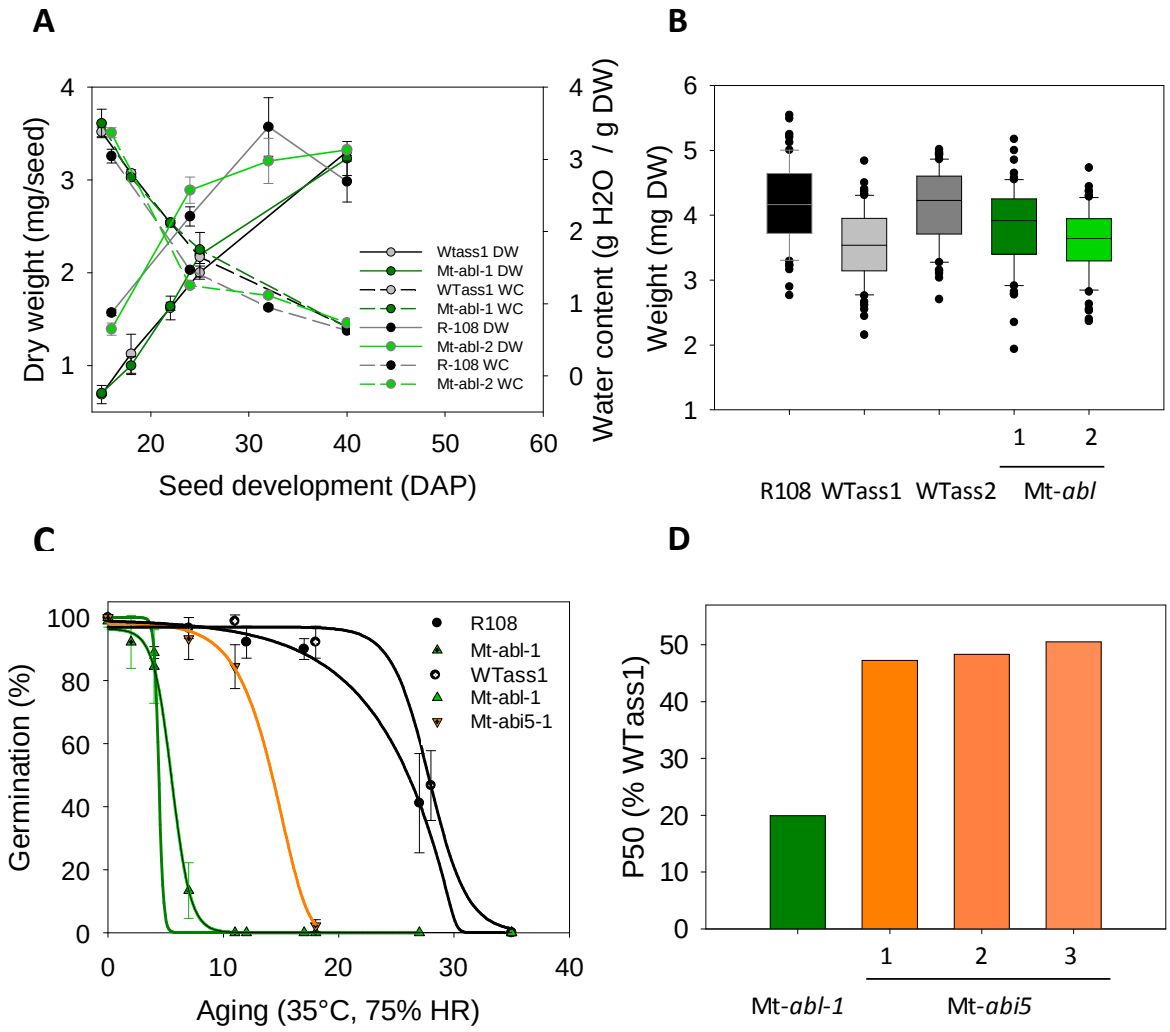


Figure 3.4: Mt-*abl* mature seeds display a strong reduced seed longevity. A, Changes in seed dry weight and water content during maturation of Mt-*abl-1* and its associated wild-type. Data are the average (±SE) of 4 replicates of 5 seeds (WTass1, Mt-*abl-1*) and 5 replicates of 1 seed (R108, Mt-*abl-2*). B, Box plots showing the distribution of individual seed weight of mature seeds (n=60) of Mt-*abl-1*, Mt-*abl-2*, their associated wild-types and R108. C, Loss of viability during storage of indicated phenotype. Data are collected from two independent cultures (grey and black) and are the average (±SE) of 3 replicates of 30 seeds. D, Longevity of indicated phenotypes. Data correspond to P_{50} expressed as percentages of wild-type corresponding to wild-type associated to Mt-*abl-1* and derived from fitting curves shown in panel C.

and 25bp from ATG codon, before the AP2-associated and AP2 domains. In addition to homozygous lines of both mutants, we obtained seeds of *Tnt1* mutants that are wild-type for Medtr5g082950 (named WTass1 for Mt-*abl-1* and WTass-2 for Mt-*abl-2* in this study). We first checked the ABA sensitivity using a germination assay (Figure 3.3-B). Our results show that without ABA, both wild-type and Mt-*abl-1* mature seeds are able to germinate at 100% after 7 days of imbibition. In 5 µM ABA, final germination of wild-type reached 40% while the Mt-*abl-1* seed lot reached only 10% after 7 days. At 10 µM ABA, germination was almost fully inhibited in both mutant and wild-type seeds. Altogether, Mt-*abl-1* seeds did not appear to be ABA insensitive and this lead us to name Medtr5g082950 MtABI4-LIKE (MtABL). Using RT-QPCR, we verified whether the *Tnt1* insertion in the *Mtabl1* allele leads to absence of transcription of *MtABL*. Figure 3.3-C shows a 9-fold decrease in the level of *MtABL* transcripts in Mt-*abl-1* mature seeds compared to wild-type. *ABL* expression and ABA sensitivity assay remain to be done for the second allelic mutant Mt-*abl-2*.

3.3.3 Mt-*abl* mature seeds display a strongly reduced longevity

Next, we wondered if Mt-*abl* seeds achieve full maturation. For this purpose, we monitored the evolution of the dry weight and the water content in Mt-*abl* seeds during development. For two independent cultures (WTass1/Mt-*abl-1* and R108/Mt-*abl*-2). Figure 3.4-A shows that no difference in seed weight accumulation and change in water content between wild-type and Mt-*abl* seeds, indicating that seed filling is not impacted by the mutation. In addition, the weight distribution profiles of 60 individual mature seeds shows no difference between Mt-*abl-1* and Mt-*abl-2* mutant seeds compared to wild-type, indicating that seed filling is equally synchronic in all genotypes. Dry mature Mt-*abl-1* and Mt-*abl-2* seeds are able to germinate (Figure 3.4-C), indicating that they are desiccation tolerant. However, seed longevity of Mt-*abl-1* mutant is severely impaired (Figure 3.4C, D). During storage at 75% RH, 35°C, the viability starts to decline after 7 days and the seed lot was not able to germinate after 14 days of storage. The P_{50}, the time needed to decrease viability to 50%, is estimated to be 6-8 days in two consecutive independent seed productions (Figure 3.4-C). Compared to wild-type seeds, relative P_{50} values are reduced to 20% in Mt-*abl-1* while it is reduced to 50% in Mt-*abi5-1* mature seeds (Figure 3.4-D). Our results reveal that MtABL is a major regulator of seed longevity compared to MtABI5.

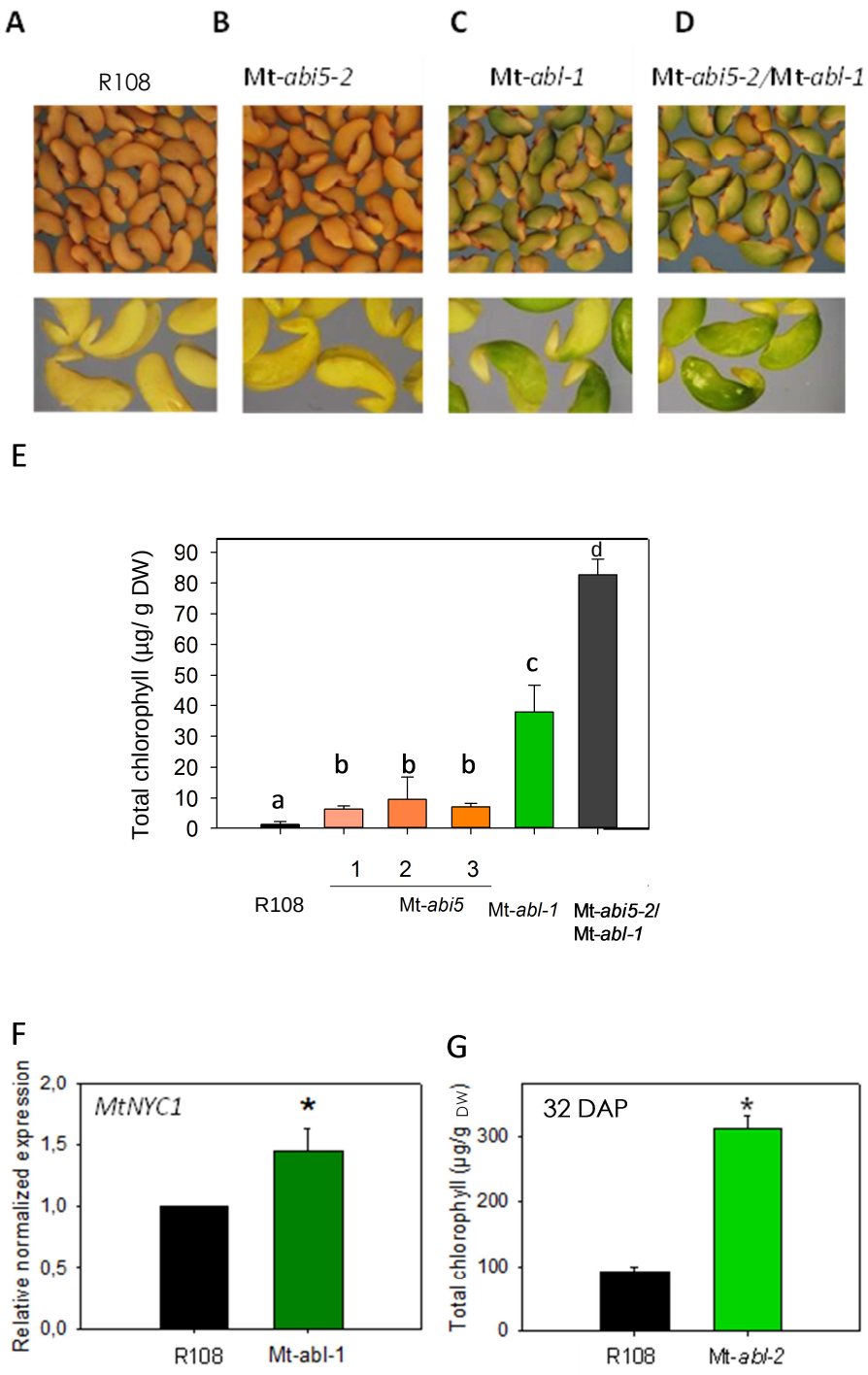


Figure 3.5: MtABL regulates chlorophyll degradation. A-D, Pictures of dry mature seeds and 1 hour imbibed mature seeds without seed coat of indicated genotypes. E, total chlorophyll contents of mature seeds measured by spectrophotometer analysis. Data represent the average (±SE) of 3 replicates of 25 seeds. Significantly different values (assessed by ANOVA, P<0.05) were ranked into groups as indicated by the respective letter using the Student-Newman-Keuls test. F, *MtNYC1* transcript levels in mature seeds of wildtype (R108) and Mt-*abl-1*. Data are normalized using *MSC27* and *ACTINE11* as reference genes and represent the average (±SE) of 3 replicates of 25 seeds. Data are significantly different using a t-test (P<0.05). G, Total chlorophyll contents of Mt-*abl-2* seeds compared to wild-type at 32 DAP. Data are the mean of 5 replicates of one lyophilized seed. Data are significantly different (*) using a t-test (P<0.05).

3.3.4 Mt-*abl* mature seeds display chlorophyll retention and increased level of PHANGs transcripts

The most obvious phenotype of Mt-*abl* seeds is that they retain chlorophyll in the dry state compared to wild-type (Figure 3.5). Chlorophyll retention is also much more important compared to Mt-*abi5* seeds. An analysis of all insertions present in Mt-*abl* genotypes revealed that no *Tnt1* insertion was located in a gene known to be involved in chlorophyll catabolism that could explain the green seed phenotype. To check whether chlorophyll retention was due to the regulation of chlorophyll catabolism pathway by MtABL, we performed a RT-QPCR to assess the level of *MtNYC1* transcripts in mature Mt-*abl-1* seeds compared to wild-type R108, (Figure 3.5-E). Unexpectedly, our results show that transcripts levels of *MtNYC1* are significantly more abundant in *Mt-abl-1* compared to wild-type R108 in mature seeds.

In *A. thaliana* leaves, ABI4 participates to the retrograde signaling and inhibits PHANGs expression (Koussevitzky *et al*., 2007). RT-QPCR was used to analyze transcript levels of PHANGS belonging to PSI (*LHCA1, PSAD-2* Figure 3.6-A-B) and to PSII (*LHCB2, PSBW*, Figure 3.6-C-D). We reveal that these PHANGs transcripts levels are significantly higher in mature seeds of Mt-*abl-1* mutant compared to wild-type. *MtLHCB2* and *PSBW* transcript levels are respectively 20- and 30- fold higher whereas those of *MtLHCA1* are 2-fold higher in *Mt-abl* compared to wild-type. Next, we compared these results with those of Mt-*abi5* mutants where these genes were also upregulated in dry mature seeds (chapter 2) in a same RT-QPCR analysis. As shown in Figure 3.6, we observed that *MtLHCB2* and *PSBW* expression was 5- and 1.5-fold higher in Mt-*abi5* mutants compared to Mt-*abl*, while it was 4-fold higher in Mt-*abi5* compared to Mt-*abl* for *MtLHCA1* and *MtPSAD2*. Next, we wondered whether ABL and ABI5 act in a synergetic manner in this repression and also in regulating chlorophyll degradation.

3.3.5 MtABI5 regulates *MtABL* expression in mature seeds

Considering that in *A. thaliana*, ABI4 regulates ABI5 by binding to its promoter (Bossi *et al*., 2009), we investigated a putative interaction between MtABI5 and MtABL in the signaling pathways controlling chloroplast dismantlement during maturation. First, we tested if these transcriptions factors regulate one another by assessing transcript levels of *MtABL* and *MtABI5* in Mt-*abl* and Mt-*abi5* mature seeds (Figure 3.7). In mature Mt-*abi5* seeds,

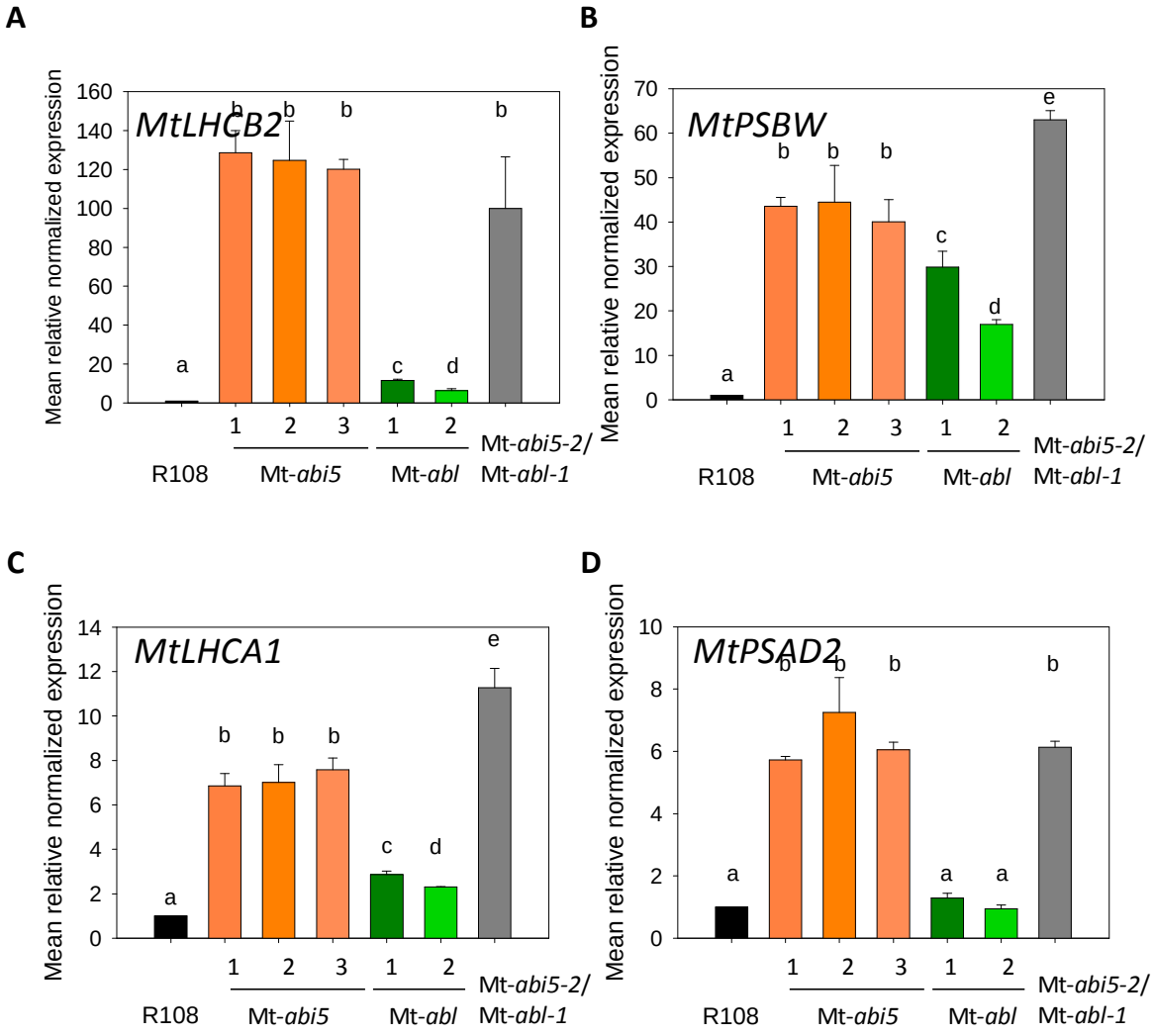


Figure 3.6: Relative expression of indicated photosynthesis-associated nuclear genes in dry mature seeds. A, B, photosystem I. C, D, photosystem II. Data represent the average (±SE) of 3 replicate of 25 mature seeds. Data are normalized using *MSC27* and *ACTINE11* as reference genes. Significantly different values (assessed by ANOVA, P<0.05) were ranked into groups as indicated by the respective letter using the Student-Newman-Keuls test.

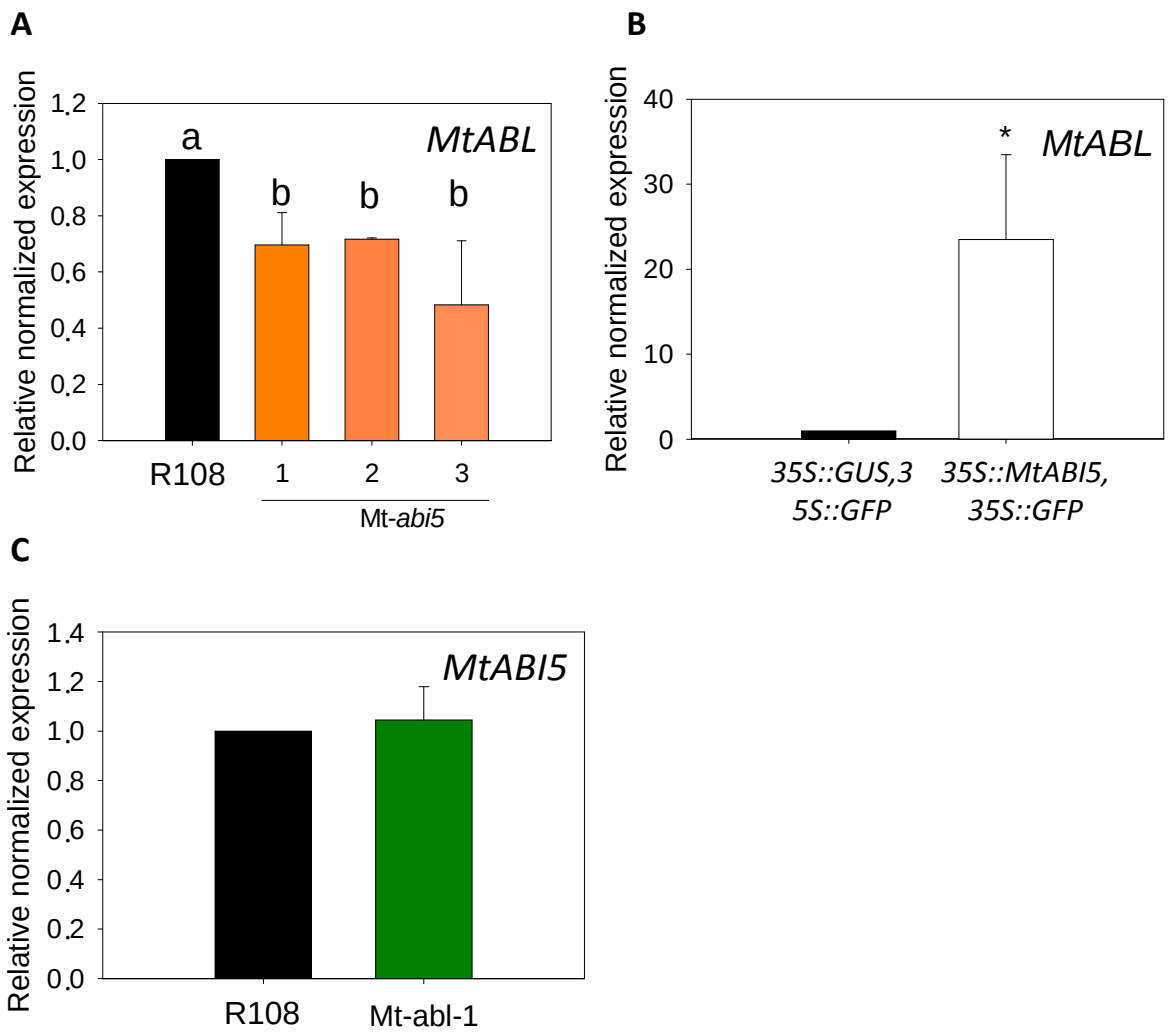


Figure 3.7: MtABI5 positively regulates *MtABL* expression in *M. truncatula* seeds. A, *MtABL* expression in Mt-*abi5* mature seeds compared to wild-type (R108 background). *MSC27* and *ACTIN11* were used as reference genes. Data are the average (±SE) of 3 replicates of 25 mature seeds. Significantly different values (assessed by ANOVA, P<0.05) were ranked into groups as indicated by the respective letter using the Student-Newman-Keuls test. B, *MtABL* expression in *M. truncatula* leaves ectopically over-expressing *35S::MtABI5,35S::GFP* compared to *35S::GUS,35S::*GFP, in the presence of 0.5 µM ABA. Mean relative normalized expression were calculated using *MSC27* and *RPB1* as reference genes (Pellizzaro et al., 2014). Data are the average (±SE) of 4 leaves. Data are significantly different (*) using a t-test (P<0.05). C, *MtABI5* expression in Mt-*abl-1* mature seeds compared to wild-type. Mean relative normalized expression were calculated using *MSC27* and *ACTIN11* as reference genes. Data are the average (±SE) of 3 replicates of 25 mature seeds. Data are significantly different (*) using a t-test (P<0.05).

Table 3.1: Amount of seeds (N) obtained in F2 populations segregating for green seeds and double mutants. The total number of double mutants was assessed in the green seed population only. ND, not determined.

Male population	Female population	Total N of seeds	Total N of green seeds	Total N of green seeds tested	Total N of double mutants in F2
Segregating F1 *abi5-1*	Segregating F1 *abl-1*	288	77	77	0
Segregating F1 *abi5-2*	Segregating F1 *abl-1*	110	28	ND	ND
Segregating F1 for *abl-1*	Segregating F1 for *abi5-2*	292	65	45	4

expression level of *MtABL* was significantly reduced by 20% for three mutants compared to wild-type R108, which is in contrast with the situation in *A. thaliana* seeds (Bossi *et al*., 2009). To further investigate this, we tested whether MtABI5 regulates *MtABL* expression in photosynthetic tissues. For this purpose, we ectopically expressed *MtABI5* in *M. truncatula* leaves using a *35S::MtABI5,35S::GFP* construction and performed a RT-QPCR analysis of *MtABL* from ABA-treated transgenic leaves. Data were compared with ABA-treated leaves over-expressing a *35S::GUS,35S::GFP* with the same fluorescence intensity as in the *35S::MtABI5,35S::GFP* over-expressors. Figure 3.7-C shows that expressing *35S::MtABI5,35S::GFP* leads to a 25-fold increase in *MtABL* expression compared to leaves expressing the control plasmid. In contrast, in Mt-*abl-1* mature seeds, no significant difference in expression level of *MtABI5* was found compared to WTass1 (Figure 3.7-C).

3.3.6 Obtaining double mutants seeds Mt-*abl* and Mt-*abi5*

Next, we investigated whether the lower *MtABL* levels in Mt-*abi5* seeds could account for PHANGS repression and chlorophyll retention. To this end, we generated Mt-*abi5-2*/Mt-*abl-1* and Mt-*abl-1*/Mt-*abi5-1* double mutants. Considering the long time lapse and large space in culture room necessary to obtain a large number of plants segregating for the different mutations, we took advantage of a preliminary observation during our crossings that all homozygous Mt-*abl-1* seeds were green regardless of the *MtABI5* segregation. Therefore, we screened those green seeds for double homozygous mutants using PCR analysis (Table 3.1). When pollen from segregating ABI5/Abi5 and ABL/Abl populations was used, we obtained 77 green seeds out of a total 288 seeds. Among 77 green seeds screened, we obtained a significantly different number of digenic mutant seeds compared to the one expected (χ^2, df=1, P=0.6E-6). Indeed, 1/16 of 288 digenic mutant seeds were expected, and we obtained 0. We suspect that seed abortion occurred at a very early stage in these digenic mutants or there was no pollination. In contrast, we were successful in obtaining 4 seeds of the digenic mutant Mt-*abi5-2*/Mt-*abl-1* among the 45 tested. Because only 45 of 65 were screened, no statistical test can be applied. Another F2 population will be screened shortly of Mt-*abl-1*/Mt- *abi5-2* digenic mutant.

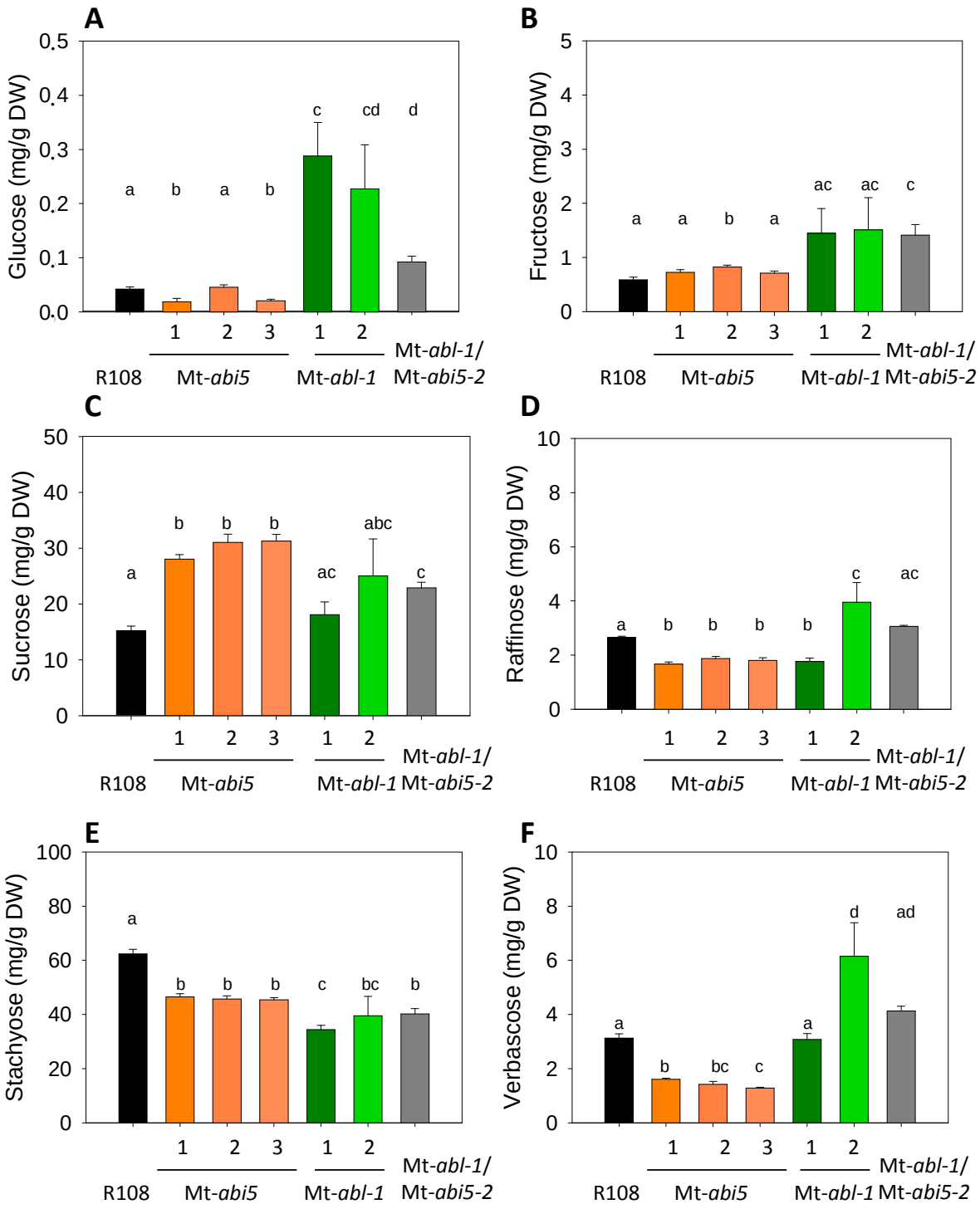


Figure 3.8: Soluble sugar contents in Mt-*abl*, Mt-*abi5* and digenic Mt-*abi5-2*/Mt-*abl-1* mature seeds. A, Glucose, B, Fructose, C, sucrose, D, raffinose, E, stachyose, F, verbascose. Data are the mean (±SE) of 4 replicates of 10 mature seeds. Significantly different values (assessed by ANOVA, P<0.05) were ranked into groups as indicated by the respective letter using the Student-Newman-Keuls test.

3.3.7 PHANGs expression and chlorophyll contents in double mutant seeds

We analyzed PHANGs expression in double Mt-*abi5-2*/Mt-*abl-1* seeds compared to M-*abl* and Mt-*abi5* (Figure 3.6). For *MtLHCB2* and MtPSAD2, where significant differences in transcript levels were found between monogenic mutants, the transcript levels in the digenic mutants were similar to Mt-*abi5* seeds. While transcripts levels of *MtLHCA1* and *MtPSBW* were respectively 1.5- and 1.25-fold higher in digenic mutants. These results can't let us conclude in the evidence of a synergetic effect in repressing PHANGs expression but suggest that MtABL and MtABI5 both regulate PHANGs expression.

Chlorophyll contents analysis revealed that mature digenic mutants seeds retain 2-fold higher total chlorophyll compared to monogenic mutant Mt-*abl-1*, suggesting a synergetic regulation of chlorophyll loss by both transcription factors.

3.3.8 Sugar contents are affected in Mt-*abl* mutants

We previously showed that MtABI5 regulates RFO metabolism. In *A. thaliana*, *ABI4* is an essential element of the sugar signaling pathway (Huijser *et al*., 2000; León *et al*., 2013). We tested whether sugar accumulation was impaired in Mt-*abl* mutants using HPLC analysis. Figure 3.8-A shows that glucose content is 6-fold higher in Mt-*abl* mutants compared to wild-type, while no significant difference is found for fructose and sucrose (Figure 3.8-B-C). In contrast, stachyose content is 1.5-fold lower in both Mt-*abl* mature seeds compared to wild-type (Figure 3.8-E); while no differences in raffinose and verbascose content were observed (Figure 3.8-D-F). In contrast, raffinose and verbascose were 1.6 and 2.4-fold higher in Mt-*abl-2* seeds compared to wild-type. Finally, the ratios RFO/sucrose were 1.8-fold lower in Mt-*abl* seeds compared to wild-type (Figure 3.9). Next, we assessed whether MtABL and MtABI5 have effect on sugar concentrations in mature seeds (Figure 3.8). Glucose content in the double mutant seeds was 2-fold higher compared to Mt-*abi5-2*, and 3-fold lower compared to Mt-*abl-1*. Fructose, sucrose and verbascose contents in double mutant seeds resemble the Mt-*abl* phenotype: they are not significantly different compared to Mt-*abl-1* and are respectively 1.5-, 1.4 and 2.2- fold lower in the double mutants compared to Mt-*abi5-2* (Figure 3.8-B-C-F). Stachyose content was not impacted in the double mutants compared to Mt-*abl-1* and Mt-*abi5-2* monogenic mutants. Raffinose content was not significantly different compared to wild-type seeds and Mt-*abl-2* mutant (Figure 3.8-D).

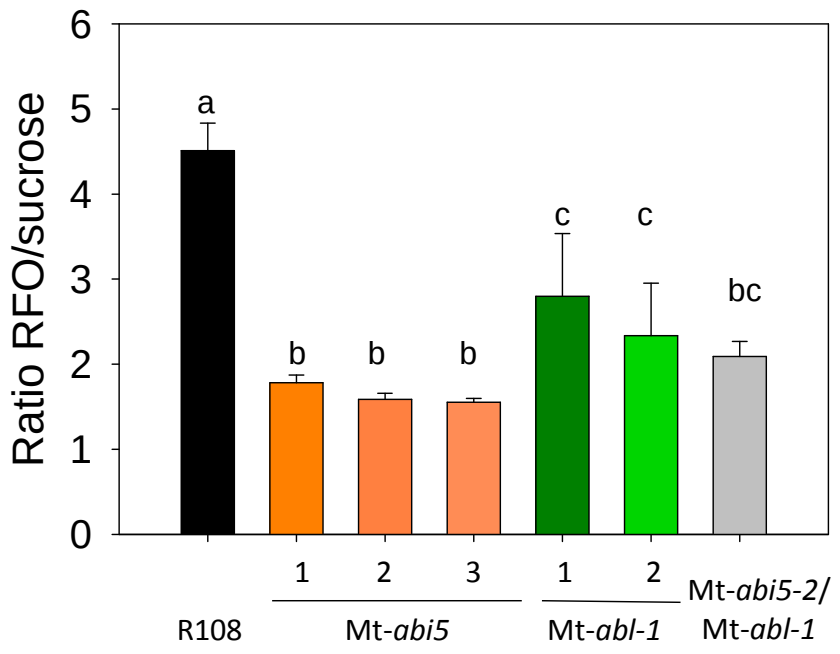


Figure 3.9: Ratio of total RFO contents/Sucrose. Sugar data are the average (±SE) of 4 replicates of 10 seeds. Significantly different values (assessed by ANOVA, P<0.05) were ranked into groups as indicated by the respective letter using the Student-Newman-Keuls test.

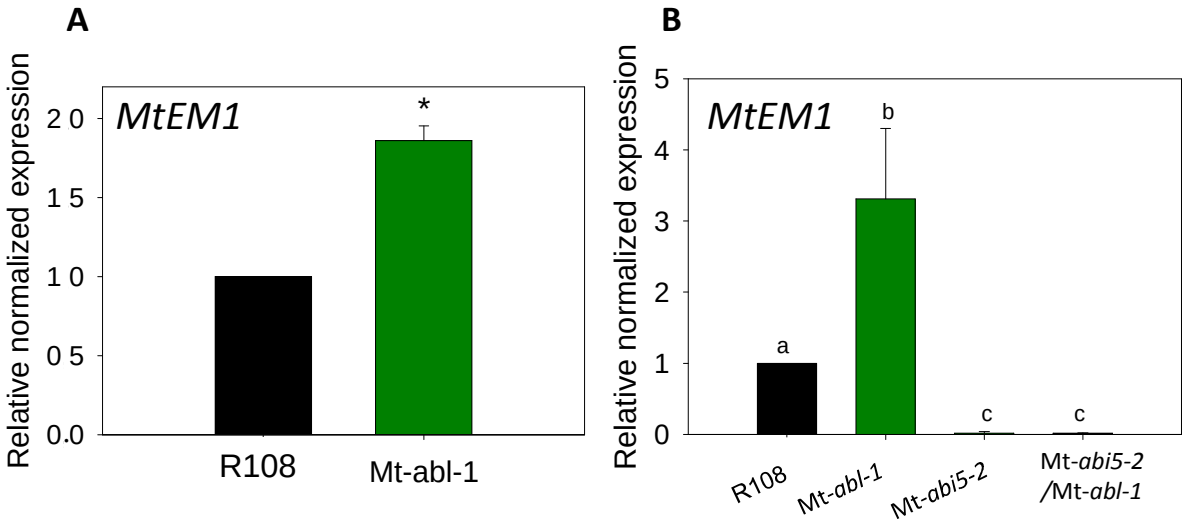


Figure 3.10: Repression and activation of *MtEM1* gene by MtABI4 and MtABI5 in *M. truncatula* mature seeds. A, *MtEM1* gene mean relative normalized expression of mature seeds using *MSC27* and *ACTINE11* as references genes. Data are the mean (±SE) of 3 replicates of 25 mature seeds of Mt-*abl-1* mutant. Data are significantly different (*) using a t-test (P<0.05). B, *MtEM1* gene mean relative normalized expression of mature seeds using *MSC27* and *ACTINE11* as references genes. Data are the mean (±SE) of 4 replicates of one mature seed characterized from segregation from heterozygous double mutants line Mt-*abi5-2*/Mt-*abl-1*. Significantly different values (assessed by ANOVA, P<0.05) were ranked into groups as indicated by the respective letter using the Student-Newman-Keuls test.

3.3.9 *MtEM1* expression is up-regulated in Mt-*abl* mutants

MtABI5 is a positive regulator of *MtEM1* accumulation during maturation, and, in *A. thaliana*, *EM1* can be up-regulated by glucose in germinating seedlings (Dekkers *et al*., 2008). These data prompted us to assess the expression level of this LEA gene in mature seeds of Mt-*abl* mutants. As presented in Figure 3.10-A, *MtEM1* expression is 1.8-fold higher in Mt-*abl-1* compared to wild-type. This result remains to be confirmed on the second allelic mutant. We did not find any evidence of a CE1 motif overlapping with a G box in the promoter region of *MtEM1* that could explain the repressive effect of MtABL. Next, we assessed whether MtABL and MtABI5 interact to regulate *MtEM1* using the double mutants. In this second experiment, *MtEM1* transcript level was 3.5-fold higher in Mt-*abl-1* mature seeds compared to wild-type (Figure 3.10-B). However, they were 10-fold lower in the double mutant and reached similar level as in the Mt-*abi5-2*.

3.4 Discussion

Here, we identified MtABL as a new regulator of seed longevity and chlorophyll loss in *M. truncatula*. MtABL is part of AP2/EREBP family and its sequence comparison with others characterized ABI4 in *A. thaliana*, *Zea Mays* and *Theombra cacao*, unraveled that MtABL is the ortholog of ABI4 (Finkelstein *et al*., 1998; Niu *et al*., 2002; Gregorio *et al*., 2014). Our results confirm the central position of MtABL in regulating seed longevity, as implied by the work of Verdier *et al*., (2013). ABI4 has been associated with seed dormancy and regulates ABA and GA biosynthesis genes (Okamoto, 2006; Cantoro *et al*., 2013; Shu *et al*., 2013). It also participates to lipid breakdown after germination (Penfield *et al*., 2006). However, the literature qualifies as “subtle”, the seed phenotype of *abi4* mutants in *A. thaliana*. To the best of our knowledge, this is the first time that an ABI4 ortholog plays a role in longevity but the effect was dramatic compared to MtABI5. A central question that remains to be answered is whether ABL is the true ortholog of ABI4 since another candidate AP2/EREBP gene showing features of ABI4 are also present in the longevity module. Further phenotyping by assessing germination in ABA and sugars is necessary to address this issue. We have only fragmentary data to explain such a profound impact on seed longevity. We suggest that the chlorophyll retention and glucose accumulation could be the detrimental factors based on literature records showing a negative correlation between these compounds and seed physiological quality.

3.4.1 MtABL is a putative ortholog of ABI4

Our work shows that ABL impacts the expression of target genes that are common with MtABI5, such as *EM1*, PHANGs and *NYC1*, suggesting interactions in regulating ABA responses during seed development that are important for longevity and germination. This is supported by previous studies using *A. thaliana* (Söderman *et al*., 2000; Nakabayashi *et al*., 2005; Bossi *et al*., 2009; Reeves *et al*., 2011). For example, Reeves *et al*., (2011) identified common and distinct targets genes for ABI4 and ABI5 when these genes were expressed ectopically in leaves, representing 12 % of the total transcriptional targets. However, how ABL and ABI5 interact to regulate longevity remains to be established. Both ectopically expressing strategies (Reeves *et al*., 2011) and comparison of *abi4* and *abi5* transcriptomes in *A. thaliana* (Nakabayashi *et al*., 2005) lead to the conclusion that ABRE and Gbox elements

are essential for transcripts accumulation in dry seeds whereas CE1 elements are not necessary to deregulate ABA responsive genes. A plausible mechanism of interaction could be that ABI5 regulates *ABL* expression (Figure 3.7). An analysis of the -3000bp upstream START codon reveals 3 putative ABRE motifs, suggesting that ABI5 could potentially recognize and bind to this sequence. However, this contradicts the data on *A. thaliana* where the opposite observations were made both using protoplast transfection system (Acevedo-Hernández *et al*., 2005; Bossi *et al*., 2009) and mutant analysis (Söderman *et al*., 2000). A direct transcriptional control of ABL by ABI5 cannot explain the results obtained on PHANGs gene expression in the double mutant Mt-*abi5-2*/Mt-*abl-1*. Indeed, MtABL was as effective as MtABI5 in repressing these genes.

3.4.2 MtABL regulates chlorophyll loss and PHANGs expression

The higher chlorophyll contents in Mt-*abl* mutants compared to Mt-*abi5* suggests a higher importance of MtABL in regulating seed chlorophyll loss. Our results (Figure 3.5) indicate that both MtABL and not MtABI5 are regulators of *M. truncatula* seed chlorophyll loss but MtABL acts predominantly.

How MtABL regulates the degradation of chlorophyll during maturation remains unclear. NON YELLOW COLOURING 1 (NYC1) is a key enzyme in initiating degradation of chlorophyll in seeds (Nakajima *et al*., 2012). *MtNYC1* expression was 1.5-fold higher in Mt-*abl-1* compared to wild-type (Figure 3.5), which is the opposite with the chlorophyll retention phenotype. Indeed, *NYC1* gene expression is correlated to LHC protein levels (Jia *et al*., 2015). In *A. thaliana*, treatment with AZD, an inhibitor of the TOR pathway, led to cotyledon greening in seedling of the *trin1* mutant, an allele of ABI4, in contrast to wild-type where it was blocked (Li *et al*., 2015). Upon treatment with AZD, the expression of *PAO* and *PHH*, two genes coding for enzymes involved in chlorophyll catabolism (chapter 1) were down-regulated in the allelic mutant of ABI4, while *HEMA1*, implicated in chlorophyll synthesis was up regulated. Whether MtABL controls *MtPAO* and *MtPPH* gene expression during seed maturation remains to be determined.

In addition to the green seed phenotype, our results show that MtABL repress PHANGs expression as previously described in the literature (Koussevitzky et al., 2007; León et al., 2013). Such repression is thought to be the result of ABI4 regulating the retrograde signaling pathways. Our data extend these previous observations. Indeed, PHANGs repression *via* ABL occurs to a similar extent as MtABI5 for MtPSBW (PSII) and MtPSAD2 (PSI). Since the digenic mutants did not enhance their expression, it is hypothesized that MtABI5 and MtABL act in a redundant manner to ensure down regulation of chloroplastic gene during chlorophyll loss. In contrast, MtABL does not repress MtLHCB2 as efficiently as MtABI5. This raises the possibility that MtABI5 could be an additional actor of the retrograde signaling in developing seeds that could fine-tune the action of MtABL and/or act independently of it. In this case, the situation would be quite different from Arabidopsis seedlings where the current model is of multiple plastid generated signals that converge on one common pathway where ABI4 plays a key role. Our data also suggest that it is necessary to study in parallel the expression of several PHANGs in order to understand the retrograde signaling.

3.4.3 MtABL, MtABI5 and *MtEM1* regulation

Surprisingly, our results indicate that *MtEM1* expression is repressed in dry mature Mt-*abl-1* seeds. In *A. thaliana*, the data on a putative regulatory role of ABI4 in respect with EM1 are contradicting with our results. Indeed, *EM1* transcript level is slightly less abundant in *abi4-1* seedlings compared to wild-type (Söderman *et al*., 2000), while it does not appear to be differentially expressed in the transcriptome of dry seeds of *abi4* (Nakabayashi *et al*., 2005). However, according to Reeves *et al*., (2001), EM1 was identified as a specific target of ABI4, being up-regulated based on the comparison of ectopic expression of *ABI4* and *ABI5* in seedlings. A role of inhibiting *EM1* was found in mutants defective in *EEL*, a gene coding for a protein from bZIP family and which transcription is related to *ABI5* during seed development (Bensmihen *et al*., 2002). In this study, a proposed explanation is that EEL compete with ABI5 to bind *EM1* promoter. We could propose a same explanation in *M. truncatula* seeds where MtABL would fine-tune the level of *MtEM1*. *MtEM1* promoter analysis revealed the presence of two ABRE motifs at -200bp from START codon and, on

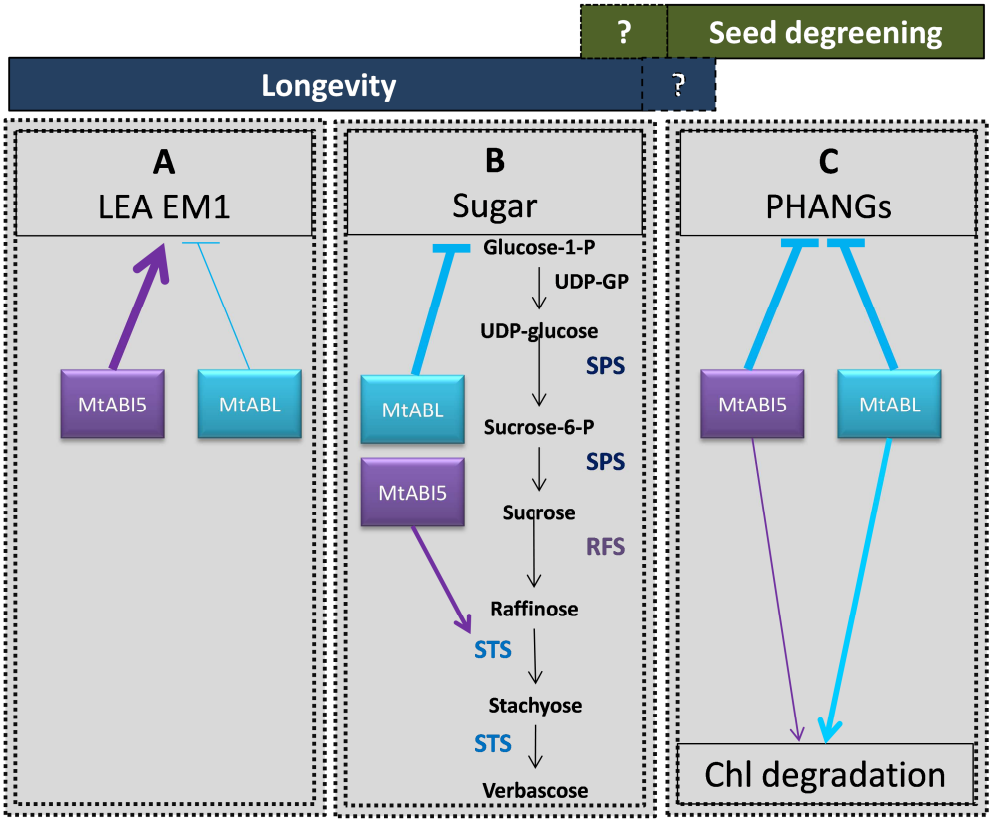


Figure 3.11: Model summarizing the different actions of MtABL and MtABI5 in the regulation of late seed maturation. A, Activation of *MtEM1* expression and EM1 accumulation by MtABI5, while MtABL would inhibit its expression. B, Sugar accumulation would be governed by MtABL and MtABI5. MtABI5 and MtABL both inhibit PHANGs. MtABL is a stronger inducer of seed chlorophyll loss compared to MtABI5.

reverse, at -233bp, concomitantly to a CE1-like element at -212bp, indicating two potential binding site of bZIP and AP2/EREBP transcription factors.

3.4.4 Sugar accumulation is deregulated in Mt-*abl* mutants

Because ABI4 is part of sugar signaling pathway (Huijser *et al*., 2000; Acevedo-Hernández *et al*., 2005), we wondered if sugar accumulation was disrupted in Mt-*abl* mutants. Our analysis revealed that glucose concentration were higher Mt-*abl* seeds whereas stachyose was lower in mutants compared to wild-type (Figure 3.8). At this stage, it is difficult to identify whether these differences are metabolically linked. The increase in glucose could be an indirect effect of the chlorophyll retention that could still stimulate photosynthesis.

Mt-*abl* seeds have a reduced longevity compared to Mt-*abi5* mutants. However, their ratios RFO/sucrose were higher compared to Mt-*abi*5. We suspect that other mechanisms, regulated by MtABL, are altered in mutants Mt-*abl*, conferring them their poor storability. Therefore, the mutants generated in this study will be helpful in disentangling the relationships between longevity, sugar metabolism and chlorophyll retention.

3.4.5 Proposed model for MtABL and MtABI5 in *M. truncatula* seed longevity regulation

In this work, we unraveled common and distinct phenotypes of Mt-*abi5* and Mt-*abl* seeds. Figure 3.11 summarizes the 3 regulatory modules controlled by MtABL and MtABI5 during seed maturation. First (Figure 3.11-A), MtABI5 regulates LEA accumulation, while EM1 was not regulated by MtABL. Then (Figure 3.11-B) we showed that MtABI5 regulates *MtSIP1* and RFO accumulation (chapter 2). In this study, we showed that MtABL is also involved, in an unknown way, in stachyose accumulation, and in reducing glucose contents. Our results also unravealed a common role of MtABL and MtABI5 in regulating PHANGs inhibition at the end of seed development (Figure 3.11-C). In contrast, Mt-*abl* seeds are greener than Mt-*abi5* and wild-type, reinforcing the idea that seed chlorophyll retention is detrimental to seed longevity (Jalink *et al*., 1998; Teixeira *et al*., 2016). From (Figure 3.11-A), we could hypothetize that MtABL regulates seed chlorophyll loss, which would be detrimental to seed longevity, while MtABI5 would regulate the accumulation of protective components that could enhance seed longevity.

4. Chapitre 4 : Caractérisation fonctionnelle de MtHSFA2.2 dans la qualité germinative de la graine de *Medicago truncatula*

4.1 Résumé

Les protéines HSP sont des protéines de stress. Elles sont régulées par des facteurs de transcription de type HSF. Chez le tournesol, HaHSFA9 est exprimé exclusivement au cours de la maturation de la graine, en l'absence de stress. Sa sur-expression chez les graines de tabac conduit à une meilleure résistance à un test de détérioration contrôlé. Chez *M. truncatula,* son orthologue a une place centrale dans un réseau de co-expression génique associé à la longévité. Ces données nous ont amené à chercher à caractériser le rôle de l'orthologue de HSFA9 dans la longévité des graines de *M. truncatula*. Pour cela, nous avons criblé et caractérisé les graines de mutants d'insertions *Tnt1*. Pour identifier des cibles potentielles de ce facteur de transcription, nous avons également réalisé une analyse transcriptomique de sur expression ectopique de *35S ::MtHSFA9,35S ::GFP* comparée à la sur expression ectopique du témoin *35S ::GUS,35S ::GFP* dans des racines de *M. truncatula*. Nos résultats confirment MtHSFA2.2 comme étant le plus proche orthologue de HSFA9. Conjointement, nos données identifient MtHSFA2.2 comme un régulateur de la dormance des graines, en lien putatif avec la régulation des gènes impliqués dans le catabolisme de l'ABA et le métabolisme des GAs.

4.2 Introduction

Les stress abiotiques provoquent des modifications structurales des protéines mais également leur agrégation, engendrant des modifications de fonctions, voir l'inactivation de celles-ci. Dès lors, la perte en eau au cours du développement des graines orthodoxes nécessite la mise en place de mécanismes de protection contre d'éventuelles modifications structurales. Parmi ceux-ci, les HSP jouent un rôle protecteur qui limite l'agrégation des protéines et empêche leur repliement. Elles s'accumulent progressivement lors du développement de la graine (Wehmeyer *et al*., 1996) sous l'effet d'une cascade de régulations complexes impliquant des facteurs de transcription de type Heat Shock Factor (HSF) et la voie de signalisation de l'ABA. Chez *A. thaliana,* 21 HSF ont été caractérisés (Nover *et al*., 2001). Leur nomenclature est basées sur l'homologie de séquence : trois classes (A, B et C) ont été identifiées en fonction de leur domaine d'oligomérisation (OD) et de leur domaine de fixation à l'ADN, le DBD (Nover *et al*., 2001). La classe A possède en partie N-terminale un domaine d'activation Aromatic and large Hydrophobic amino acid residues embedded in an Acidic surrounding (AHA) composé d'acides aminés aromatiques et hydrophobes que ne possèdent pas les classes B et C. Ce domaine AHA est nécessaire à l'activation de la transcription des HSP (Kotak *et al*., 2004). Les HSF de classe B ont un domaine entre OD et DBD plus long.

Le rôle des HSF dans les graines est méconnu. HaHSFA9 du tournesol et ses orthologues chez *A. thaliana* (Kotak *et al*., 2007) et *M. truncatula* (Verdier *et al*., 2013; Righetti *et al*., 2015) sont spécifiquement exprimés dans les graines en développement, en l'absence de stress. La sur-expression ectopique de *HaHSFA9* chez le tabac induit une résistance accrue au test de détérioration contrôlé (Prieto-Dapena *et al*., 2006), et l'activation de diverses HSP (HSP101, sHSP-CI, sHSP-CII, et sHSP plastidiale). La répression de l'expression de *HaHSFA9* chez le tabac, en empêchant la fixation du facteur de transcription au promoteur de ses gènes cibles (Kagale and Rozwadowski, 2011), provoque une perte de stabilité lors du stockage mais n'affecte pas la tolérance à la dessiccation, suggérant ainsi un rôle limité de HSFA9 dans la régulation de la qualité germinative des graines. La sur-expression ectopique de *HaHSFA9* chez le tabac a également pour résultat de retarder la sénescence des feuilles (Almoguera *et al*., 2015). En présence de 200 mM de H_2O_2, les plantules témoins de tabac ne sont pas capables de survivre, alors que les plantules transformées continuent de croître, démontrant une meilleure résistance au stress oxydant (Almoguera *et al*., 2012). L'analyse des protéines thylakoïdales de ces plantules

révèle que le traitement au H_2O_2 conduit à une perte de l'accumulation des protéines des PSI et PSII chez les plantules wild-type contrairement aux plantules sur-exprimant *35S ::HaHSFA9*. Chez *M. truncatula*, la construction d'un réseau de co-expression des gènes codant pour d'une part les facteurs de transcription préférentiellement exprimés dans les graines et d'autres part ceux corrélés à l'acquisition de la survie à l'état sec au cours du développement, a identifié trois modules caractérisant respectivement la tolérance à la dessiccation, la longévité et l'abscission (Verdier *et al*., 2013). Dans ce réseau, l'orthologue de *HSFA9* d'*A. thaliana* connecte le module de la tolérance à la dessiccation à celui de la longévité, renforçant ainsi l'hypothèse d'un rôle des HSF dans la régulation de l'acquisition de la qualité germinative des graines.

Afin de valider le rôle de MtHSFA2.2 dans la longévité des graines chez *M. truncatula*, nous avons obtenu et caractérisé les graines de trois lignées de mutants d'insertion *Tnt1* Mt-*hsfa2.2*. La dormance, la longévité, ainsi que la réponse de la germination aux phytohormones ont été caractérisées. Afin d'identifier les cibles potentielles de ce facteur de transcription dans un environnement différent de la graine, nous avons réalisé une analyse transcriptomique sur des racines de *M. truncatula* sur-exprimant *35S::MtHSFA2.2,35S ::GFP* comparé au témoin sur-exprimant *35S ::GUS,35S ::GFP.* Nos résultats suggèrent une implication de MtHSFA2.2 dans la dormance des graines de *M. truncatula via* l'ABA.

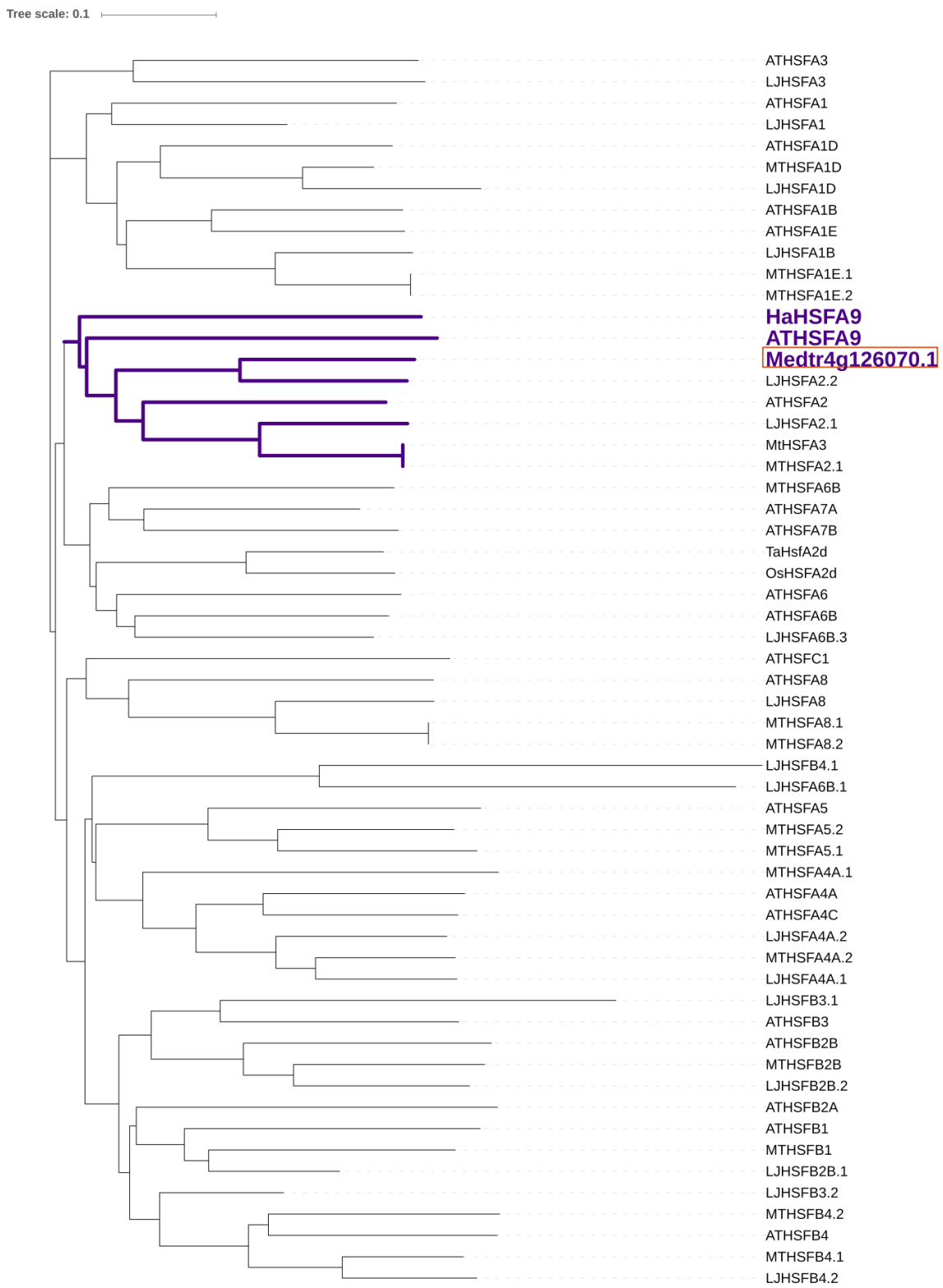


Figure 4.1 : Identification de l'orthologue putatif d'AtHSFA9 chez *M. truncatula*, *MtHSFA2.2.* Identification par homologie de séquences des acides nucléiques de MtHSFA2.2 par comparaison avec HaHSFA9 (Almoguera, 2002), HSFA9 *A. thaliana* (Kotak *et al.,* 2007), OsHSFA2 (Chauhan *et al*., 2011) et TaHSFA2 (Chauhan *et al*., 2013). L'alignement des séquences d'acides aminés a été fait à partir du logiciel clustal omega [6]. Le gène étudié, Medtr4g126070, est mis en évidence par un encadrement.

Tableau 4.1 : Pourcentages d'identité entre les membres présents dans le sous-groupe contenant HaHSFA9, HSFA9, HSFA2, MtHSFA2.1, MtHSFA3, MEDTR4G126070, LjHSFA2.1 et LjHSFA2.2. Les alignements de séquences des acides aminés ont été réalisés à l'aide du logiciel clustal omega [6]. La table des pourcentages d'identité a ensuité été calculée [6].

	HaHSFA9	ATHSFA2	ATHSFA9	MtHSFA3	MTHSFA2.1	Medtr4g126070	LJHSFA2.1	LJHSFA2.2
HaHSFA9	100							
ATHSFA2	38	100						
ATHSFA9	39	37	100					
MtHSFA3	41	57	36	100				
MTHSFA2.1	41	57	36	100	100			
Medtr4g126070	39	42	45	43	43	100		
LJHSFA2.1	39	55	34	75	75	42	100	
LJHSFA2.2	40	41	46	42	42	70	43	100

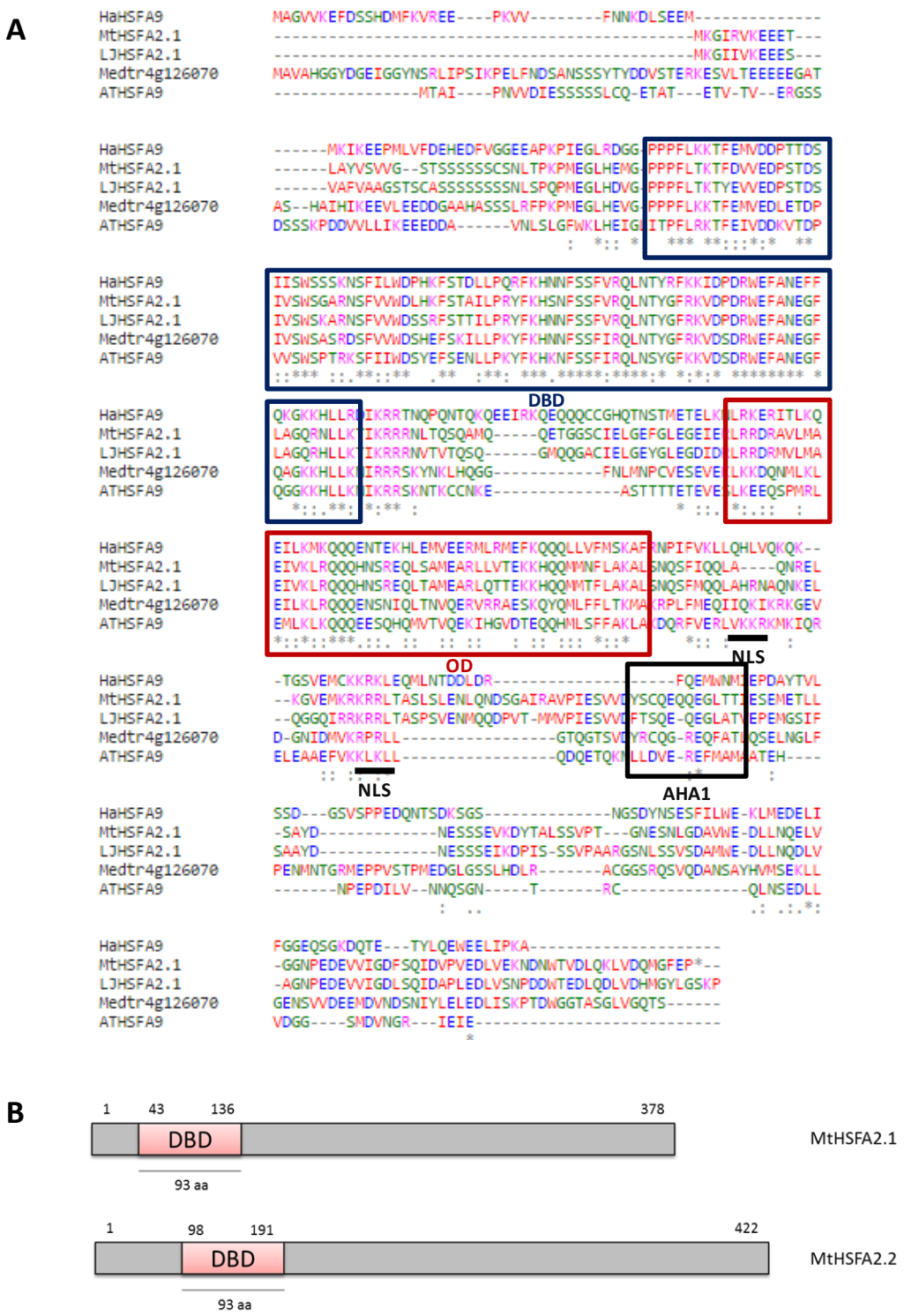


Figure 4.2 : Comparaison des facteurs de transcription regroupés dans le sous-groupe contenant AtHSFA9 et HaHSFA9. A, Alignement des séquences de HSFA9, HaHSFA9, MtHSFA2.2 et LjHSFA2.2. Les séquences d'acides aminés ont été alignées avec le logiciel clustal omega [6]. Les domaines DBD, OD et AHA1 sont représentés respectivement par un rectangle bleu, rouge, une ligne noire et un encadrement noir. L'alignement de séquences a été réalisé avec clustal omega [6]. Deux mêmes couleurs identifient les acides aminés identiques B, Schématisation de la comparaison des structures de MtHSFA2.2 et MtHSFA2.1.

4.3 Résultats

4.3.1 Identification de *MtHSFA2.2* chez *M. truncatula* comme étant l'orthologue d'*AtHSFA9*

Afin de confirmer l'orthologue de HSFA9 chez *M. truncatula*, nous avons réalisé un alignement des séquences d'acides aminés des protéines suivantes : HSFA9 d'*A. thaliana* et du tournesol, tous deux ayant été caractérisés au plan fonctionnel (Kotak *et al*., 2007; Almoguera *et al*., 2002), Medtr4g126070 (décrit dans le réseau de Verdier *et al.,* (2013)) et les seize HSF de *M. truncatula* présents dans la base de données des facteurs de transcription des légumineuses [4]. Afin de caractériser l'orthologue de HSFA9 de façon spécifique aux légumineuses, nous avons enrichi l'alignement avec les HSF du lotier (*Lotus japonicus*) et deux HSFA2 de monocotylédones, TaHSFA2 et OsHSFA2, également fortement exprimés dans les graines (Chauhan *et al*., 2011; 2013). L'alignement des séquences, représenté sous la forme d'un arbre phylogénétique (Figure 4.1), montre que le gène Medtr4g126070 fait partie d'un sous-groupe contenant AtHSFA9 (étudié chez *A. thaliana* par Kotak *et al*., (2007)), HSFA2, et également un homologue chez *M. truncatula* (HSFA2.1). Ce sous-groupe contient également HaHSFA9, caractérisé par le groupe de (Tejedor-Cano *et al*., 2010). Le Tableau 4.1 présente la matrice de pourcentage d'identité de Medtr4g126090 par rapport aux 7 autres HSF présents dans ce sous-groupe. Dans ce tableau, nous voyons que Medtr4g126070 présente 39% d'identité par rapport à HaHSFA9, 43% par rapport à MtHSFA2.1, 45% par rapport à AtHSFA9 et 70% par rapport à LjHSFA2.2. D'après ces données, MtHSFA2.1 serait le plus proche orthologue de HaHSFA9 et MEDTR4G126070 de AtHSFA9.

Nous avons ensuite comparé les séquences protéiques de MtHSFA2.1 et MEDTR4G126070 (Figure 4.2-B). Les régions DBD sont identiques dans les 2 protéines, Figure 4.2-B. La position de la séquence DBD diffère entre les deux protéines, elle est située à 43 acides aminés et 98 acides aminés du début de la séquence.

Ensuite, nous avons questionné les bases de données du EFP browser [3] pour identifier les expressologues d'*AtHSFA9* et *AtHSFA2*, c'est-à-dire les gènes orthologues chez le soja et *M. truncatula* dont les profils d'expressions sont similaires au cours du développement ou lors d'un stress (Patel *et al*., 2012). Pour HSFA9, nous n'avons détecté aucun expressologue, que ce soit sur la modalité « développement » ou « stress ». En revanche, l'arbre présenté en Figure 4.3 montre qu'au cours du développement, ATHSFA2 (dans le même groupe que

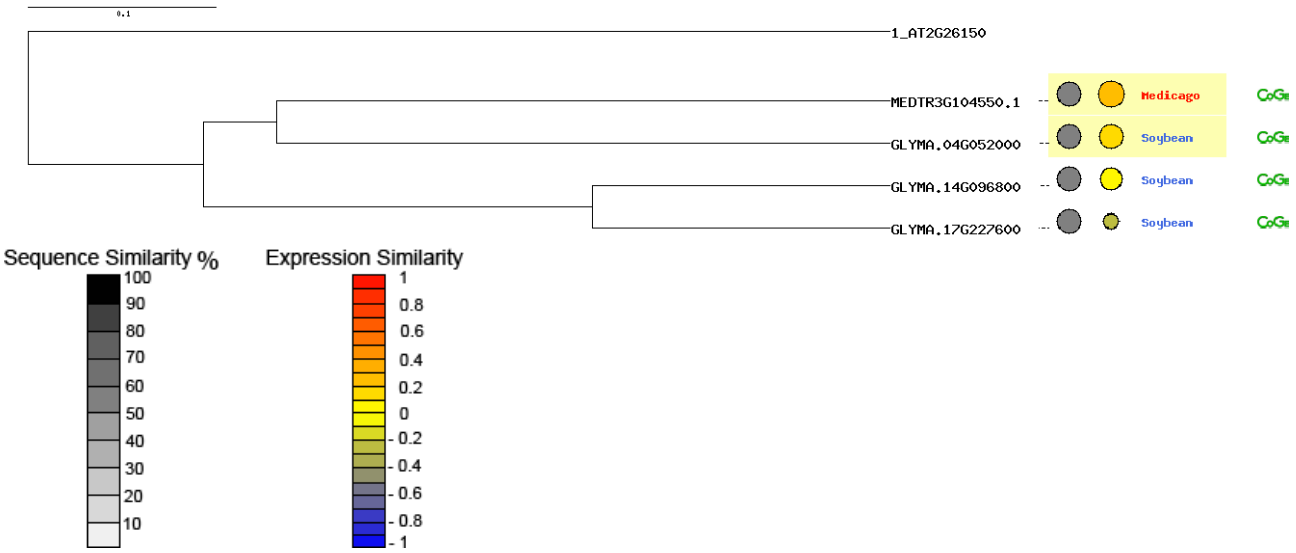


Figure 4.3: MtHSFA2.1 (Medtr3g104550) est l'expressologue chez *M. truncatula* du gène d'*A. thaliana* HSFA9 (At2g26150) au cours du développement. Les analyses ont été réalisées avec efpbrowser [9]. Les expressions ont été comparées chez *M. truncatula* et le soja. Le cercle gris représenté le pourcentage de similarité de séquences (plus la similarité est grande entre la séquence d'HSFA9 et la séquence de l'expressologue et plus le gris est intense). Du rouge au bleu, la similarité d'expression de HSFA9 à l'expressologue. Rouge, les expressions sont positivement similaires. Bleu, les expressions sont inversement similaires.

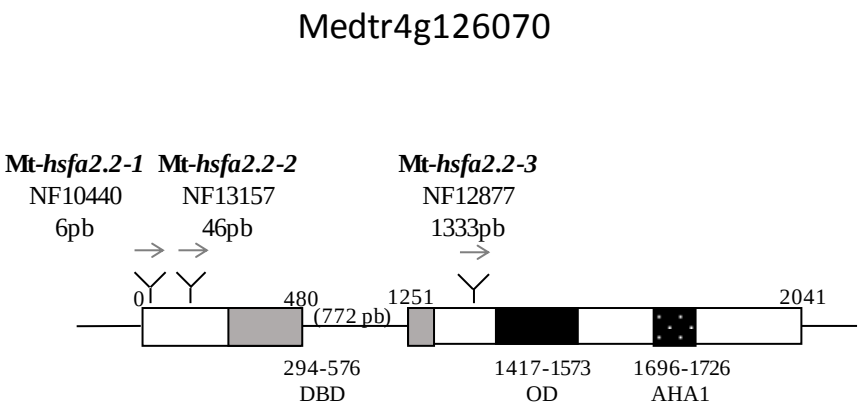


Figure 4.4 : Présentation des mutants *Tnt1* étudiés. Représentation schématique du gène MtHSFA2.2 (Medtr4g126070). La séquence codante est indiquée en rectangle, l'exon en ligne. Les flèches représentent les positions des insertions. DBD, domaine de fixation à l'ADN ; OD, domaine d'oligomérisation ; AHA1, Aromatic and large Hydrophobic amino acid residues embedded in an Acidic surrounding.

Medtr4g126070), présente 40% de similarité d'expression avec Medtr3G104550 (annoté MtHSFA2.1) et 20% avec GLYMA.04G052000 pour la modalité « développement ». Par contre, l'algorithme ne détecte pas d'expressologue d'ATHSFA2 pour la modalité « stress ». A la lumière de ces résultats, Medtr4g126070 a été annoté dans ce travail comme étant MtHSFA2.2, car il est le plus proche orthologue de HSFA9. L'analyse de l'alignement de séquence entre HSFA9 et MtHSFA2.2 présenté en Figure 4.2-A identifie 80% de similitude entre le domaine DBD des deux espèces, seulement 52% de similitude pour le domaine OD, 50% pour le motif NLS et 30% pour le domaine AHA1.

4.3.2 Phénotypage des mutants Mt-*hsfa2.2*

4.3.2.1 Obtention de trois lignées indépendantes Mt-hsfa2.2

Trois lignées T0 en ségrégation pour *MtHSFA2.2* ont été identifiées dans la banque de mutants *Tnt1* de la S. Noble Foundation. Nous avons obtenu les mutants homozygotes par caractérisation PCR, autofécondation et/ou rétrocroisement. Parmi les graines reçues, certaines étaient déjà homozygotes. Ainsi, 14/24 graines sont homozygotes pour l'allèle Mt-*hsfa2.2-1*, 9/21 pour Mt-*hsfa2.2-2* et 4/22 pour Mt-*hsfa2.2-3*. Les mutants commandés possèdent également des insertions *Tnt1* ailleurs dans le génome. Ainsi, le mutant Mt-*hsfa2.2-1* présente 38 autres insertions caractérisées, tandis ce que le mutant Mt-*hsfa2.2-2* en présente 27 et le mutant Mt-*hsfa2.2-3* 159. Afin d'éliminer ces insertions, un rétrocroisement a été réalisé avec le pollen de type sauvage R108 et l'allèle Mt-*hsfa2.2-1*.
La Figure 4.4 indique les positions des insertions *Tnt1* pour ces 3 mutants. Les insertions des mutants Mt-*hsfa2.2-1* et Mt-*hsfa2.2-2* sont situées dans le premier exon. Dans les deux cas, l'insertion est située avant le motif DBD de fixation à l'ADN, et avant le motif AHA1, un motif essentiel pour l'activité transcriptionnelle des HSF de classe A (Kotak *et al*., 2004). En revanche, le troisième mutant Mt-*hsfa2.2-3* présente une insertion *Tnt1* à 1039 paires de bases, après le motif DBD, et avant le motif AHA1.

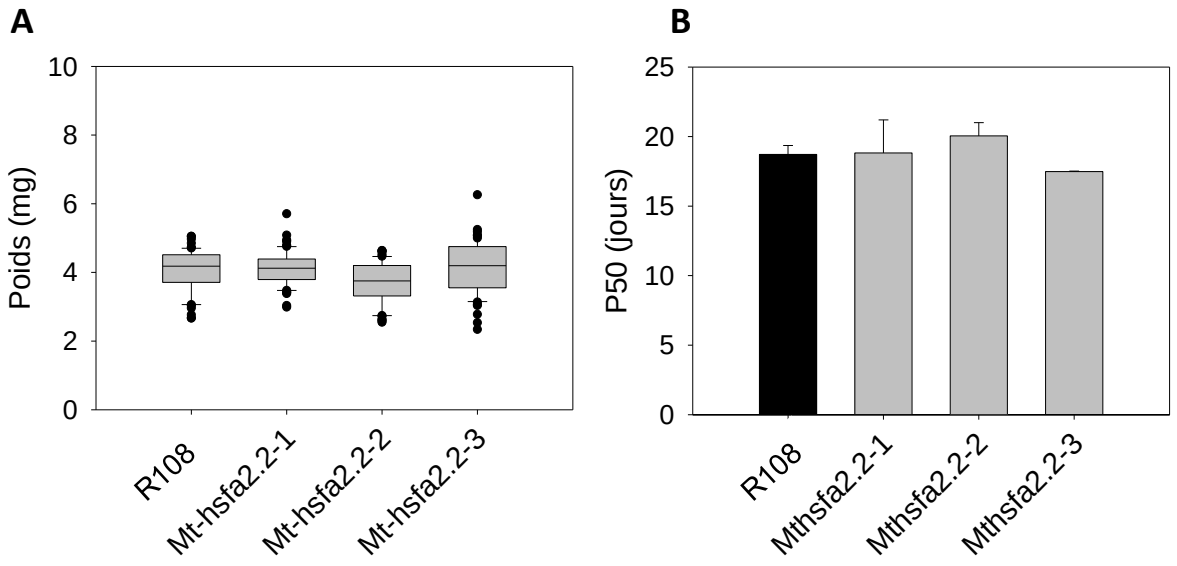


Figure 4.5 : Les graines des mutants Mt-*hsfa2.2* présentent un poids sec et une longévité identiques à ceux des graines de type sauvage. A, Poids individuels de 60 graines des mutants Mt-*hsf2.2* et de type sauvage. La représentation du poids individuel de 60 graines est réalisée par boxplot, illustrant la moyenne (la ligne horizontale), les 5ème et 95ème pourcentages (moustaches) et les valeurs hors rang (cercles). B, P50 de graines de type sauvage et de mutants Mt-*hsfa2.2*. Les tests de vieillissement accéléré ont été réalisés à 35°C, 75% HR sur deux récoltes indépendantes. Les tests de germination ont été réalisés sur trois réplicats de 30 graines. Les barres d'erreur représentent la moyenne (±SE) des P_{50} calculées sur deux récoltes indépendantes (WT R108, Mt-*hsfa2.2-1* et Mt-*hsfa2.2-2*) et sur une seule récolte (Mt-*hsfa2.2-3*).

4.3.2.2 Phénotypage physiologique des graines des mutants Mt-hsfa2.2

Dans un premier temps, nous avons caractérisé la physiologie des graines des mutants Mt-*hsfa2.2*. Nous avons vérifié si MtHSFA2.2 affectait le remplissage de la graine. L'analyse par χ^2 du poids de 60 graines individuelles de type sauvage et mutants montre que le poids des graines n'est pas significativement affecté chez les mutants Mt-*hsfa2.2* (Figure 4.5-A). Ensuite, dans le but de savoir si MtHSFA2.2 est impliqué dans la longévité des graines, nous avons effectué des tests de vieillissement en incubant les graines matures à 75% RH 35°C pendant 0 à 28 jours, et ce pour deux récoltes indépendantes. Comme le montre la Figure 4.5-B, il n'y a pas de différence significative entre les P_{50} (le temps de stockage nécessaire pour perdre 50% de la viabilité du lot) obtenus pour les lots de graines Mt-*hsfa2.2* et les lots de type sauvage. Les P_{50} moyens sont de 18,7 jours pour le type sauvage, de 18,8 et 20,5 jours pour les deux lignées dont l'insertion se trouve en début du gène, Mt-*hsfa2.2*-1 et Mt-*hsfa2.2*-2, et est de 17,5 jours pour la lignée Mt-*hsfa2.2*-3, Figure 4.5-B.

4.3.2.3 MTHSFA2.2 impacte la dormance

Les graines de *M. truncatula* R108 présentent une dormance primaire peu profonde (Bolingue *et al*., 2010). En effet, les graines fraîchement récoltées germent en totalité au bout de 4 jours à 20°C (Figure 4.6-A). Après une post-maturation à sec de 3 mois ou une stratification humide de 2 jours à 4°C levant la dormance, les graines germent au bout d'un jour (Figure 4.6-B, C). Au contraire, les lots de graines de mutants Mt-*hsfa2.2-1* et Mt-*hsfa2.2-2* germent moins rapidement. Ainsi, elles germent à 50 % au bout de 8 jours et environ à 100% après 11 jours (Figure 4.6-A). Les graines de l'allèle Mt-*hsfa2.2-3* sont encore plus dormantes puisque le lot n'atteint que 79% au bout de 11 jours (Figure 4.6A). Tous les génotypes germent à 100% au bout de 24 h après avoir levé la dormance par une stratification au froid ou après un mois de post-maturation à sec (Figure 4.6-B, C).

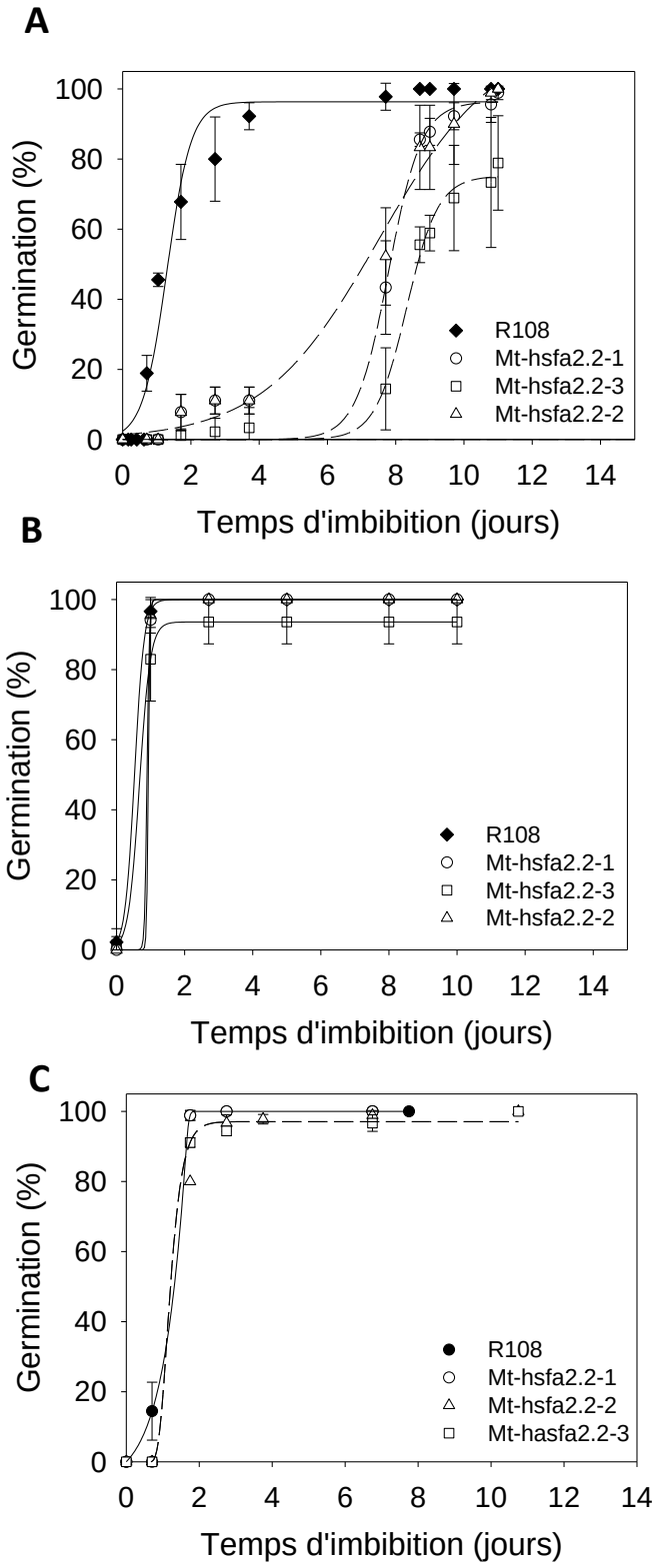


Figure 4.6 : Les graines des mutants Mt-*hsfa2.2* sont plus dormantes que les graines de type sauvage. A, Courbes de germination de graines matures après 2 jours de post-maturation à sec. B, Courbes de germination après 2 jours de post-maturation à sec et stratification au froid 4 jours (4°C) pour lever la dormance. C, Courbes de germination de type sauvage et de mutants Mt-*hsfa2.2* après 1 mois de post-maturation à sec. Les données représentent la moyenne (±SE) de trois réplicats de 30 graines.

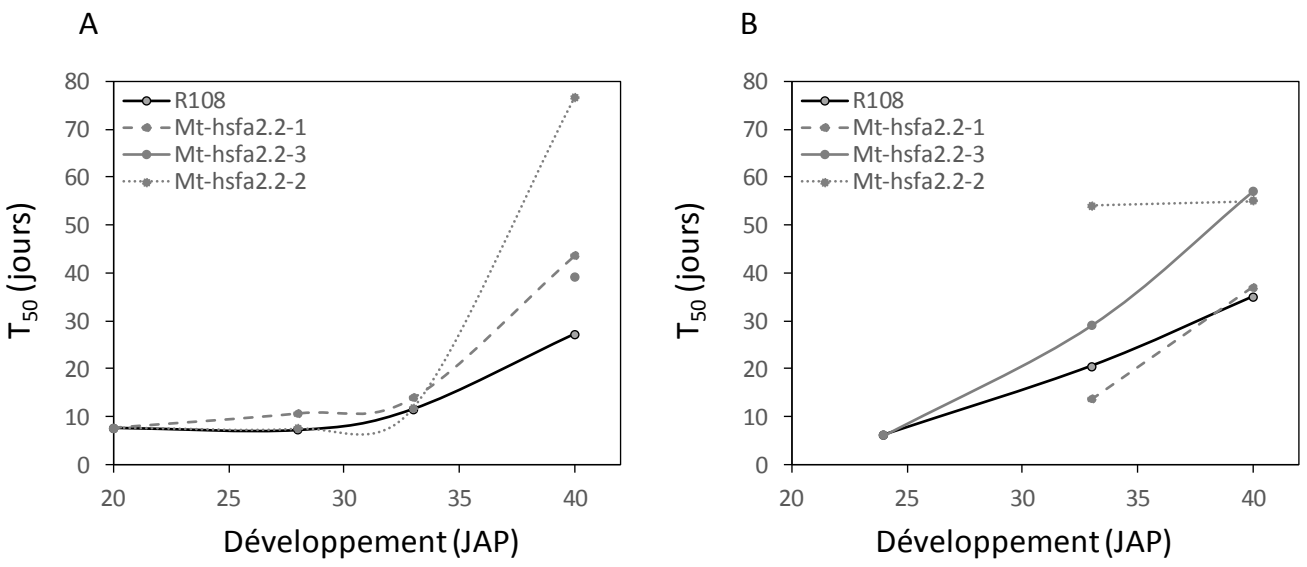


Figure 4.7: L'acquisition de la dormance des graines des mutants Mt-*hsfa2.2* est plus importante que celle des graines de type sauvage en fin de développement. A-B, Evolution du temps nécessaire pour obtenir 50% de germination (T_{50}) des graines de type sauvage et de mutants Mt-*hsfa2.2* au cours du développement pour deux cultures indépendantes. Chaque point est issu des mesures faites sur 50 graines. JAP, Jours Après Pollinisation.

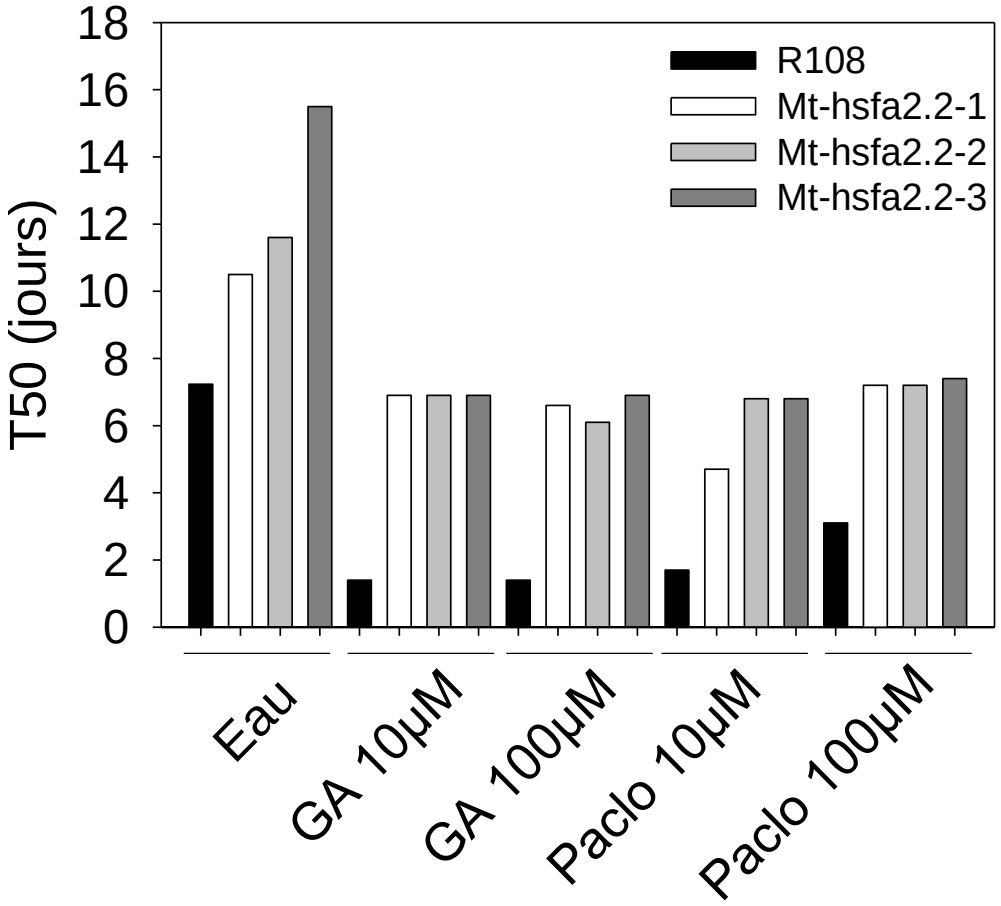


Figure 4.8 : Effet des acides gibberéliques (GA_3) et du paclobutrazol (paclo) sur le T_{50} des graines dormantes. Deux jours après récolte, les graines de type sauvage (barres noires) et des trois allèles Mt-*hsfa2.2* sont imbibées 20°C à l'obscurité. Les tests ont été réalisés sur 50 graines. T_{50}, temps d'imbibition nécessaire pour obtenir 50% de germination d'un lot.

Ensuite, nous nous sommes demandé à quel moment au cours du développement de la graine l'acquisition de la dormance est dérégulée par la mutation. Afin d'estimer la dormance des graines, nous avons obtenu les T_{50} à différents temps de développement, entre 28 et 40 JAP, pour les différents génotypes. Au cours du développement de la graine de R108, les valeurs de T_{50} sont constantes jusqu'à 28 JAP, puis augmentent progressivement jusqu'à 25-35 JAP selon les cultures (Figure 4.7-A, B). A 20 et 28 JAP, les vitesses de germination des graines Mt-*hsfa2.2* ne sont pas différentes de celle du type sauvage (Figure 4.7-A). En revanche, à partir de 33 JAP jusqu'à l'abscission, le T_{50} des mutants Mt-*hsfa2.2* augmente fortement, passant de 18 jours pour les trois mutants à 38-70 jours ; alors qu'il n'augmente que de 18 à 22 jours d'imbibition pour le type sauvage pendant la même période. Cette différence dans l'acquisition de la dormance en fin de développement de la graine des mutants Mt-*hsfa2.2* a été observée sur une deuxième culture indépendante à 24, 33 JAP et à l'abscission. De manière similaire, la dormance des graines à 24 et 33 JAP n'est pas différente entre les graines de type sauvage et de mutant Mt-*hsfa2.2*, alors qu'à l'abscission, le T_{50} du type sauvage est de 35 jours tandis ce que celui des mutants Mt-*hsfa2.2-1* et Mt-*hsfa2.2-2* est de 55 jours (Figure 4.7-B).

4.3.3 Réponse de la germination en présence d'hormones des mutants Mt-*hsfa2.2*

4.3.3.1 Sensibilité de la germination aux acides gibbéréliques et au paclobutrazol des mutants Mt-hsfa2.2

Afin de caractériser plus précisément le rôle de MtHSFA2.2 dans la dormance, nous avons étudié la réponse de la germination des graines fraîchement récoltées en présence de GA_3 ou de l'inhibiteur de la synthèse des GAs, le paclobutrazol. Nous montrons en Figure 4.8 que chez les graines de type sauvage, les valeurs de T_{50} diminuent de 7 jours dans l'eau à 2 jours en présence de GA_3 10 µM. Cette valeur reste toutefois plus élevée que celles obtenues pour les graines non dormantes, indiquant un effet partiel du GA_3. Chez les graines des mutants Mt-*hsfa2.2*, les T_{50} diminuent de 10-16 jours dans l'eau à 7 jours en présence de GA_3. La présence de GA ne permet donc pas d'abolir complètement la différence entre graines sauvage et mutants ni de restaurer un phénotype sauvage. De manière surprenante, la présence de paclobutrazol induit également une diminution des vitesses de germination tant chez les graines sauvages dormantes et mutantes, dès lors, la dormance accrue chez les mutants MtHSFA2.2 semble difficilement être imputable aux GA.

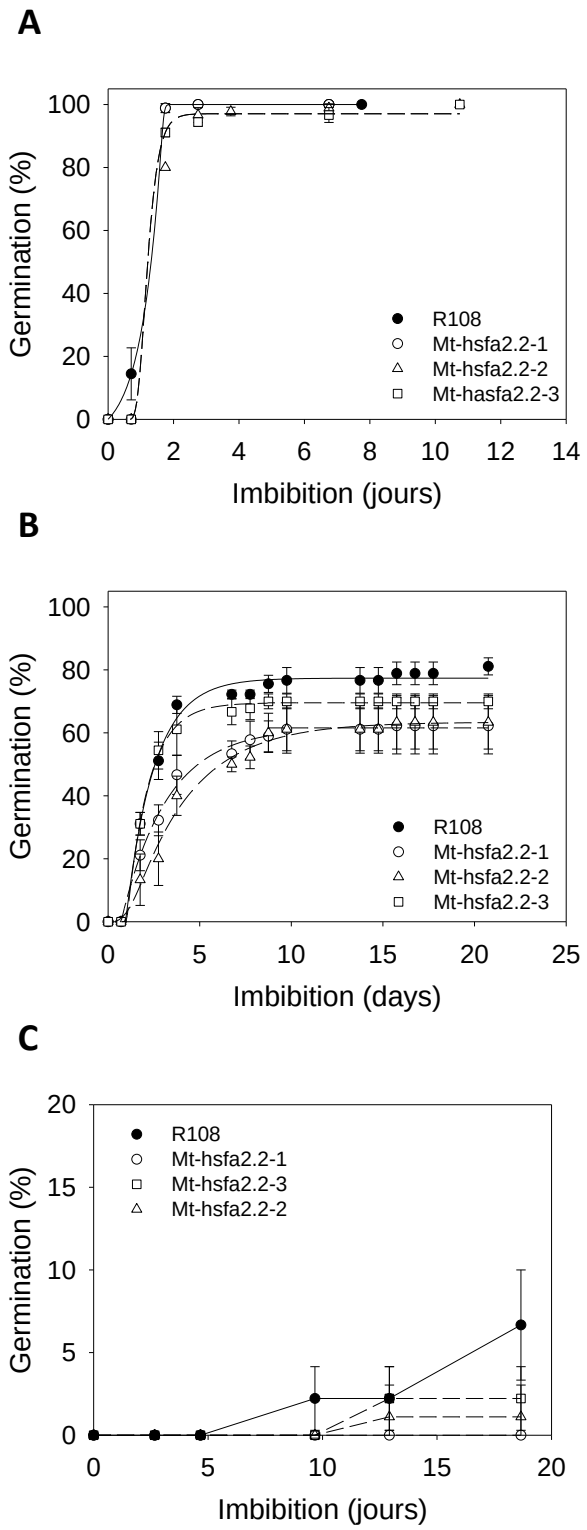


Figure 4.9 : Sensibilité à l'ABA des graines matures Mt-*hsfa2.2* comparées aux graines de type sauvage. A, Courbes de germination des graines de type sauvage et de mutants Mt-*hsfa2.2* dans l'eau. B, Courbes de germination des graines de type sauvage et de mutants Mt-*hsfa2.2* dans 1µM d'ABA. C, Courbes de germination des graines de type sauvage et de mutants Mt-*hsfa2.2* dans 10µM d'ABA. Les données représentent la moyenne (±SE) de trois réplicats de 30 graines.

4.3.3.2 Sensibilité à l'ABA des mutants Mt-hsfa2.2

L'ABA est un important régulateur positif de l'induction de la dormance pendant la maturation des graines et du maintien de la dormance dans les graines imbibées. L'adjonction de fluoridone, empêchant la synthèse de l'ABA, à des graines dormantes conduit à une vitesse de germination comparable à celle de graines post-maturées à sec un mois (Grappin *et al*., 2000; Bolingue *et al*., 2010). Nous avons donc voulu mesurer la sensibilité des graines des mutants Mt-*hsfa2.2* à l'ABA. Des graines post-maturées à sec 1 mois de mutants et de type sauvage ont été imbibées dans le témoin eau et en présence de deux concentrations d'ABA, 1 et 10 µM (Figure 4.9 A-C). Dans l'eau, le T_{50} est de 1,8 jours pour tous les génotypes. A 1 µM d'ABA, le T_{50} des graines du témoin R108 augmente à 2,5 jours et le lot germe à 80%. En revanche, les T_{50} des graines des mutants sont de 5- 6 jours sauf pour Mt-*hsfa2.2-3*, où il est identique à celui du type sauvage (Figure 4.9-B). A 10 µM d'ABA, la germination des graines du type sauvage est fortement réduite, avec une germination finale à seulement 6% (Figure 4.9-C). En revanche, après 10 jours d'imbibition, la germination des graines des mutants Mt-*hsfa2.2* est de 2,5% (Figure 4.9-C), soit significativement différente des sauvages. (P=0,024).

4.3.4 Réponse des graines de mutants Mt-*hsfa2.2* à la germination à la chaleur (30°C)

Au cours de la germination à forte température de la graine de sorgho et de millet, les génotypes thermotolérants synthétisent des protéines HSP (Howarth, 1989). Afin d'identifier si les graines de mutants Mt-*hsfa2.2* seraient thermosensibles, nous avons réalisé une expérience de germination à la chaleur (30°C) de graines post-maturées à sec un mois de mutants Mt-*hsfa2.2* comparé au type sauvage. Nous pouvons voir qu'à 20°C, obscurité, les graines de mutants et de type sauvage germent à 100% après 3 jours d'imbibition (Figure 4.10). A 30°C, le T_{50} du type sauvage est de 25 jours, alors qu'il est de 15 jours pour le mutant Mt-*hsfa2.2-3*, 25 jours pour Mt-*hsfa2.2* et de 30 jours pour le mutant Mt-*hsfa2.2-1*. Bien qu'une différence en vitesse de germination n'ait pas été mise en évidence par cette expérience, nous pouvons noter que les lots de graines ne germent pas totalement après 50 jours d'imbibition. Ainsi, le lot sauvage germe à 90%, comme les lots Mt-*hsfa2.2-1* et Mt-*hsfa2.2-3*, mais pas le lot Mt-*hsfa2.2-2*, qui n'atteint que 60% de germination. Nous n'avons pas mis en évidence un phénotype de thermosensibilité à la germination dans ces conditions expérimentales.

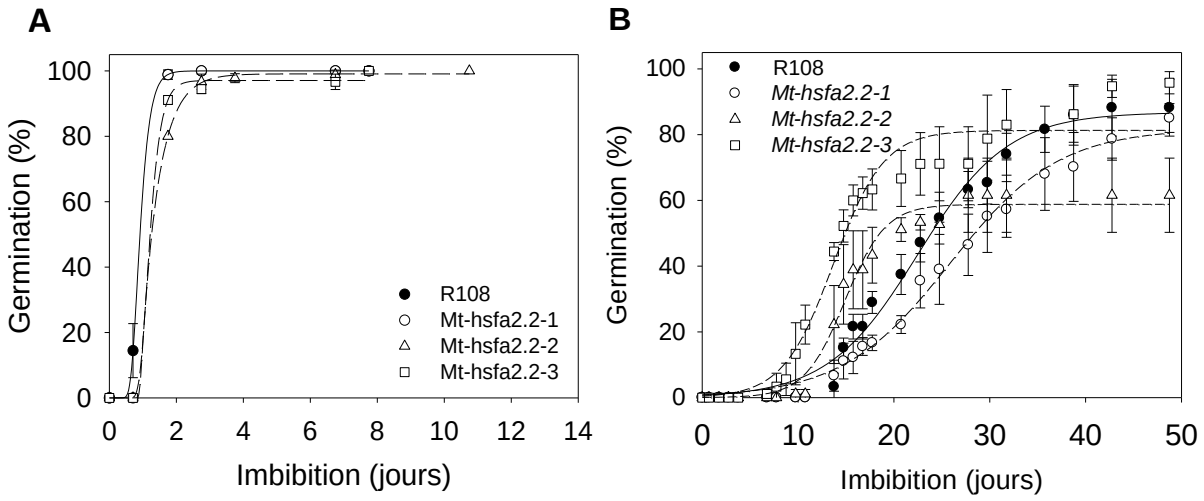


Figure 4.10: Sensibilité à la chaleur (30°C) de la germination des graines des mutants Mt-*hsfa2.2* comparées aux graines de type sauvage. A, Courbes de germination des graines des mutants Mt-*hsfa2.2* comparées aux graines de type sauvage à 20°C, obscurité. B, Courbes de germination des graines des mutants Mt-*hsfa2.2* comparées aux graines de type sauvage à 30°C, obscurité. Les données représentent la moyenne (±SE) de trois réplicats de 30 graines.

Tableau 4.2 : Analyse de l'enrichissement des catégories GO surreprésentées au sein de la liste de transcrits plus abondants dans les racines sur-exprimant *MtHSFA2.2*. Le nombre de transcrits appartenant à une catégorie (#Liste) est comparé au nombre de gènes présent dans la dite catégorie chez *A. thaliana* (#BG) servant de référence. Le test d'enrichissement est basé sur un test de $\chi 2$, dont la P-value est indiquée. FDR taux de découverte de faux positifs. L'analyse a été réalisée grâce au logiciel Agrigo [10] (Du et al., 2010).

GO term	Description	Number in input list	Number in BG/Ref	p-value	FDR
GO:0009408	response to heat	9	161	3E-13	2.2e-11
GO:0009266	response to temperature stimulus	10	485	1.8e-10	6.3e-09
GO:0009628	response to abiotic stimulus	12	1471	6.3e-08	1.5e-06
GO:0050896	response to stimulus	18	4057	1.6e-07	2.8e-06
GO:0006950	response to stress	12	2320	7.5e-06	11 e-05
GO:0006979	response to oxidative stress	5	332	4e-05	48 e-05
GO:0042221	response to chemical stimulus	9	2085	49 e-05	5 e-03
GO:0009416	response to light stimulus	5	596	58 e-05	52 e-04
GO:0009314	response to radiation	5	613	66 e-05	53 e-04

Tableau 4.3 : Liste des intensités des sondes correspondant aux gènes MtHSF2.2, HSP20-like, HSP70b, HSP70, HSP17.6II et LEA dehydrine pour les racines transgéniques témoin (GUS.bg) et celles sur-exprimant *MtHSF2.2* (MtHSFA2.2.bg) dans les racines transformées de *M. truncatula*. Le ratio correspond à la différence d'intensité *GUS.bg/MtHSFA2.2.bg*. La p-valeur représente la significativité de cet écart, au seuil de 5%.

seq_id	BestHit.TAIR10	Description.BH.TAIR10	E-value	Gus.bg	MtHSFA2.2.bg	Ratio	pvalue
MEDTR4G1260	AT2G26150.1	ATHSFA2,HSFA2; heat shock transcription factor A2	9E-63	2,39	5,9	3,5	4,30E-09
MEDTR5G0640	AT1G07400.1	HSP20-like chaperones superfamily protein	5E-57	0,5	3,2	2,69	6,80E-07
MEDTR5G0815	AT1G53540.1	HSP20-like chaperones superfamily protein	1E-60	0,76	2,01	1,24	3,85E-05
MEDTR4G0915	AT1G53540.1	HSP20-like chaperones superfamily protein	4E-61	2,22	4,14	1,91	1,21E-05
MEDTR4G1305	AT1G16030.1	Hsp70b; heat shock protein 70B	0	1,57	3,52	1,94	1,40E-05
IMGA|contig_	AT3G12580.1	HSP70,ATHSP70; heat shock protein 70	0	1,62	3,29	1,66	0,00041897
MEDTR5G0061	AT2G32120.2	HSP70T-2; heat-shock protein 70T-2	0	1,25	2,28	1,02	2,94E-05
NA	AT3G12580.1	HSP70,ATHSP70; heat shock protein 70	0	4,23	5,71	1,47	7,08E-05
IMGA|contig_	AT5G12020.1	HSP17.6II; 17.6 kDa class II heat shock protein	5E-46	0,49	1,6	1,1	0,00041884
MEDTR3G1171	AT2G21490.1	LEA; dehydrin LEA	4E-13	2,02	3,16	1,13	0,04747323

Tableau 4.4 : Gènes impliqués dans le catabolisme de l'ABA, du métabolisme des GAs et des PP2C différentiellement exprimés par sur-expression ectopique de *MtHSF2.2* dans des racines transformées de *M. truncatula*. La p-valeur représente la significativité de cet écart, au seuil de 5%.

probe_id	Gene name	Description.BH.SP	BestHit.TAIR10	Description.BH.TAIR10	e-value	Ratio *35S::MtHSFA2.2 /35S::GUS*	pvalue
Métabolisme ABA							
Medtr_v1_050546	MEDTR8G072260_1	Abscisic acid 8'-hydroxylase	AT4G19230.1	CYP707A1	0	-0,7	0,000703848
Métabolisme GA							
Medtr_v1_060356	NA	Gibberellin 20 oxidase 3	ND	ND	nodata	0,45	0,013293828
PP2C							
Medtr_v1_029773	MEDTR5G009370_1	Probable protein phosphatase 2C	AT1G07430.1	highly ABA-induced PP2C gene 2	1E-67	0,85	0,025273869

Tableau 4.5 : Gènes impliqués dans la synthèse des RFO différentiellement exprimés par sur-expression ectopique de *MtHSF2.2* dans des racines de *M. truncatula*. La p-valeur représente la significativité de cet écart, au seuil de 5%.

seq_id	BestHit.TAIR10	e-value	Description.BH.TAIR10	Gus.bg	MtHSFA2.2	Ratio	pvalue
MEDTR1G084660_1	AT1G56600.1	1E-134	GolS2	2,48	3,73	1,24	0,00089189
MEDTR1G084670_1	AT1G56600.1	1E-145	GolS2	0,94	2,15	1,2	0,00940867
IMGA|contig_58843_1.1	AT3G57520.1	0	SIP2	4,16	4,8	0,63	0,00347736
MEDTR3G077280_1	AT5G40390.1	0	SIP1	1,06	1,92	0,85	0,00364976

4.3.5 Analyse transcriptomique de racines de *M. truncatula* sur-exprimant de manière ectopique *35S ::MtHSFA2.2,35S ::*GFP comparé au témoin 35S *::GUS,35S ::GFP*

Afin d'identifier les gènes cibles potentiels de MtHSFA2.2, nous avons réalisé une analyse transcriptomique de racines de *M. truncatula* sur-exprimant *MtHSFA2.2, 35S ::MtHSFA2.2,35S ::GFP* comparé au témoin sur-exprimant *35S ::GUS,35S ::GFP*, l'intensité de la GFP étant similaire dans les deux cas.

L'analyse transcriptomique révèle 74 transcrits significativement différentiellement exprimés dans les racines transgéniques *MtHSFA2.2* par rapport au témoin (p-valeur<0,05 et -1>$\log_2$ ratio>1), soit 61 étant sur-exprimés et 13 sous-exprimés. Parmi ces derniers, 4 codent pour des protéines inconnues, 4 pour des protéines du photosystème, une pour une protéine liée à la synthèse des parois, une pour un facteur de type b-BOX, une pour l'enzyme réduction ferrique oxydase3 et une pour une protéine de la famille des alpha/beta hydrolase.

Une analyse Agrigo [10] réalisée sur les 61 gènes dont les transcrits sont sur représentés met en évidence les principales fonctions biologiques dont la catégorie GO est sur représentée (Du *et al*., 2010). Ces catégories sont listées dans le tableau 4.2 et correspondent principalement à « réponse à un stress chaleur », « réponse à un stress oxydant » et « réponse à un stress abiotique ». En regardant plus précisément la liste des 61 transcrits sur-exprimés, nous trouvons des HSP20-like, des HSP70 et des HSP17.II, un gène cible de HSFA9 identifié par (Kotak *et al*., 2007). En revanche, nous n'avons pas détecté les transcrits codant pour HSP101, contrairement à ce qui a été trouvé chez les graines de tabac transgénique sur-exprimant *HaHSFA9* (Tejedor-Cano *et al*., 2010). Nous avons également détecté l'expression d'un transcrit codant pour un homologue d'une déhydrine.

Nous avons vu que les graines de mutant Mt-*hsfa2.2* présentent une dormance primaire profonde. Nous avons donc recherché dans le transcriptome de sur-expression si des gènes impliqués dans la dormance seraient des cibles potentielles de MtHSFA2.2 : Trois gènes différentiellement exprimés (P<0,05) ont été détectés en lien avec le métabolisme et la signalisation de l'ABA et le métabolisme des GA, ils sont présentés en Tableau 4.4. Dans les racines transgéniques, la sur-expression de *MtHSFA2.2* induit une diminution significative de la quantité de transcrits codant pour un homologue de l'ABA8'hydroxylase (*CYP707A1*), une enzyme impliquée dans la dégradation de l'ABA (Tableau 4.4). De plus, la quantité de transcrits codant pour un homologue de HAI2 (annotée également HONSU) est légèrement plus abondante. Il s'agit d'un régulateur négatif de la signalisation par l'ABA et de la

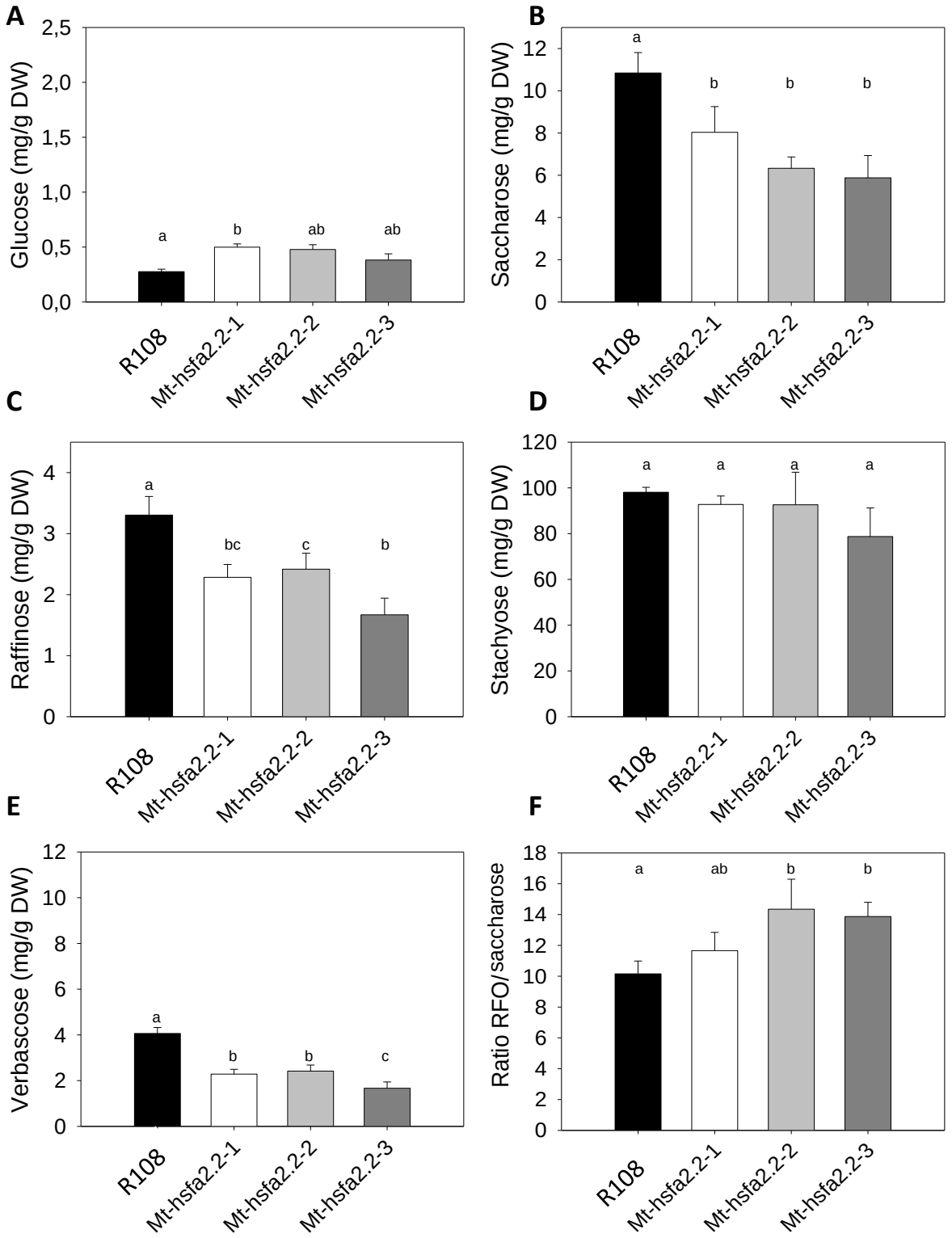


Figure 4.11 : Teneurs en sucres solubles des graines matures des mutants Mt-*hsfa2.2* comparées aux graines de type sauvage. A, glucose, B, saccharose, C, raffinose, D, stachyose, E, verbascose et F, ratio de la teneur totale en RFO (verbascose, stachyose et raffinose) et saccharose. Les données sont les moyennes (±SE) de quatre réplicats de 10 graines matures. 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).

dormance (Kim *et al*., 2013). Nos données montrent également que la sur-expression de *MtHSFA2.2* entraîne une légère augmentation de la quantité de transcrits homologue à une Ga20ox3, une enzyme impliquée dans la synthèse des GAs. Cependant, la significativité de la différence entre les racines témoin et sur-exprimant *MtHSFA2.2* n'est pas très élevée, avec une p-valeur proche de 0,05 (0,0133 pour la Ga20ox3 et 0,0253 pour HONSU).

4.3.6 Métabolisme des sucres et MtHSFA2.2

Parmi les transcrits dont l'accumulation est plus importante comparé au témoin par sur-expression ectopique de *MtHSFA2.2*, nous retrouvons 4 transcrits impliqués dans le métabolisme des sucres (Tableau 4.5). Deux sondes correspondant à un homologue de la Galactinol Synthase2 (GOLS2) sont 2,3 fois plus abondantes dans les racines sur-exprimant *MtHSFA2* alors que les transcrits codant pour des homologues de SIP1 et SIP2 sont 1,5 fois plus abondants comparé au témoin sur-exprimant *GUS.* SIP1 est une enzyme impliquée dans la synthèse des RFOs, tandis ce que GOLS2 est impliquée dans la synthèse du galactinol, et son activité influe sur l'accumulation des RFOs (Nishizawa et al., 2008; Gangola et al., 2016).

Nous avons cherché à savoir si les teneurs en sucres solubles sont affectées dans les graines matures des mutants Mt-*hsfa2.2* (Figure 4.11). L'accumulation de glucose n'est pas significativement différente entre les graines matures des trois mutants et seul Mt-*hsfa2.2-2* a des teneurs significativement différentes comparé au type sauvage, alors qu'elle est 2,4 fois supérieure dans les graines du mutant Mt-*hsfa2.2-1* (Figure 4.11-A). Par contre, l'accumulation de saccharose est réduite de 1,4 fois chez les trois allèles Mt-*hsfa2.2* comparé aux graines de type sauvage (Figure 4.11-B). La teneur en stachyose n'est pas significativement différente entre génotypes alors que l'accumulation de raffinose et de verbascose est significativement réduite de 1,4 et 1,6 fois, respectivement.

4.4 Discussion

Dans cette analyse, nous avons confirmé que MtHSFA2.2 est le plus proche orthologue de HSFA9, comme identifié par Verdier *et al*., (2013). L'analyse des mutants d'insertions *Tnt1* n'identifie pas que les graines sont moins résistantes à un test de vieillissement à 35°C, 75% HR, contrairement aux résultats attendus de par les études de Verdier *et al*., (2013), plaçant MtHSFA2.2 comme un nœud de régulation de la longévité des graines dans le réseau de co-expression, et aux études réalisées par Prieto-Dapena *et al*., (2006) qui ont identifié que les graines *HaHSFA9*-SRDX sont moins tolérantes à un test de détérioration contrôlé. En revanche, nos résultats indiquent que, comme étudié par Kotak *et al*., (2007), la sur-expression de *MtHSFA2.2* entraîne la sur-expression effective des HSP 70 et HSP 17.6II. De façon novatrice, nos résultats identifient MtHSFA2.2 comme un régulateur de la dormance des graines, en lien potentiel avec la régulation des gènes du métabolisme des GAs et du catabolisme de l'ABA.

4.4.1 MtHSFA2.2 présente le plus de similarité de séquence avec AtHSFA9 alors que MtHSFA2.1 présente le plus de similitudes avec HaHSFA9

Nous avons identifié MtHSFA2.2 comme étant le putatif orthologue de AtHSFA9 et présente 45% de similitude de séquence protéique avec HSFA9, et 39% avec HaHSFA9. Tandis que MtHSFA2.1 présente moins de similitude avec HSFA9 (36%) mais une plus forte similarité avec HaHSFA9 (41% contre 39% pour MtHSFA2.2). L'équipe de Prieto-Dapena *et al*., (2006) ont travaillé sur la sur-expression ectopique de *HaHSFA9* dans le tabac, et non pas de HSFA9. Afin d'identifier les régulateurs de la longévité des graines, peut-être faudrait-il caractériser le rôle de MtHSFA2.1 dans la qualité germinative des graines de *M. truncatula*. En effet, bien qu'il ne soit pas retrouvé dans le réseau de co-expression de Verdier *et al.*, (2013), l'étude de son expression au cours du développement de la graine réalisé sur les données d'expression MATNET de Righetti *et al.*, (2015) identifie que *MtHSFA2.1* est de plus en plus fortement exprimé en fin de développement de la graine.

4.4.2 MtHSFA2.2 et longévité

La sur expression ectopique de *HaHSFA9* dans les graines tabac confère une meilleure résistance à un test de détérioration contrôlée (Prieto-Dapena *et al.*, 2006) tandis ce que la

suppression de son expression par une construction *HaHSFA9* SRDX conduit à une moins bonne résistance des graines au même traitement (Tejedor-Cano *et al*., 2010). Les travaux présentés ici montrent que les graines des mutants Mt-*hsfa2.2* ne sont pas plus sensibles à un vieillissement à 35°C et 75% HR par rapport aux graines de type sauvage. Ces résultats ont été retrouvés pour deux récoltes indépendantes. Afin d'expliquer les différences de longévité obtenues entre nos données et les résultats obtenus par Prieto-Dapena *et al*., (2006), plusieurs points vont être discutés ci-dessous.

Premièrement, les tests de détérioration contrôlée réalisées sur les graines transgéniques de tabac sur-exprimant *HaHSFA9* ou *HaHSAF9*-SRDX consistent à les imbiber pendant 15 minutes jusqu'à atteindre une teneur en eau de 15 % avant d'être scellées dans des sachets et placées à 50°C (Almoguera *et al*., 2002). Ce test de détérioration contrôlée ne correspond à nos conditions de stockage. De plus, la teneur en eau de nos graines est équilibrée à 75% HR sans contact avec l'eau liquide avant d'être placées à forte température. Avec la méthode utilisée par Almoguera *et al*., (2002), l'imbibition des graines active la germination et permet notamment du métabolisme de manière locale. La différence en germination des graines transgéniques par rapport aux graines de type sauvage pourrait être due à une fonction caractérisée de HaHSA9 en les rendant thermo-résistantes à 50°C. Cette différence de conditions expérimentales permettrait d'expliquer pourquoi la longévité des graines des mutants Mt-*hsfa2.2* n'est pas différente de celle du type sauvage.

Une deuxième explication possible serait l'existence de redondance fonctionnelle avec d'autres HSF chez *M. truncatula*. Chez *M. truncatula*, 12 HSF appartiennent à la classe A, et des phénomènes de redondances entre les HSF de classe A ont été mis en évidence chez *A. thaliana*. Lohmann *et al*., (2004) montrent que le double mutant Mt-*hsf1*/Mt-*hsf3* présente une différence dans l'accumulation des transcrits de gènes de réponse au stress thermique, mais pas les mutants monogéniques Mt-*hsf1* et Mt-*hsf2*. Un phénomène de redondance a également été suggéré par Tejedor-Cano *et al*., (2009). En effet, les graines de tabac transformées avec une version tronquée du gène où le motif AHA1 est absent ont un faible phénotype de perte de résistance au vieillissement. Or des expériences en simple hybride sur levure montrent que cette protéine HaHSFA9 tronqué est incapable de transactiver l'expression des HSP. Donc il est possible que la mutation de *MtHSFA2.2* soit compensée par un autre HSF préférentiellement exprimé dans les graines. Un argument supplémentaire est que le module longévité du réseau de co-expression associé avec l'acquisition de la survie à l'état sec contient un autre gène HSF représenté par la sonde Mtr.39305.1.S1_at (Verdier *et al*., 2013).

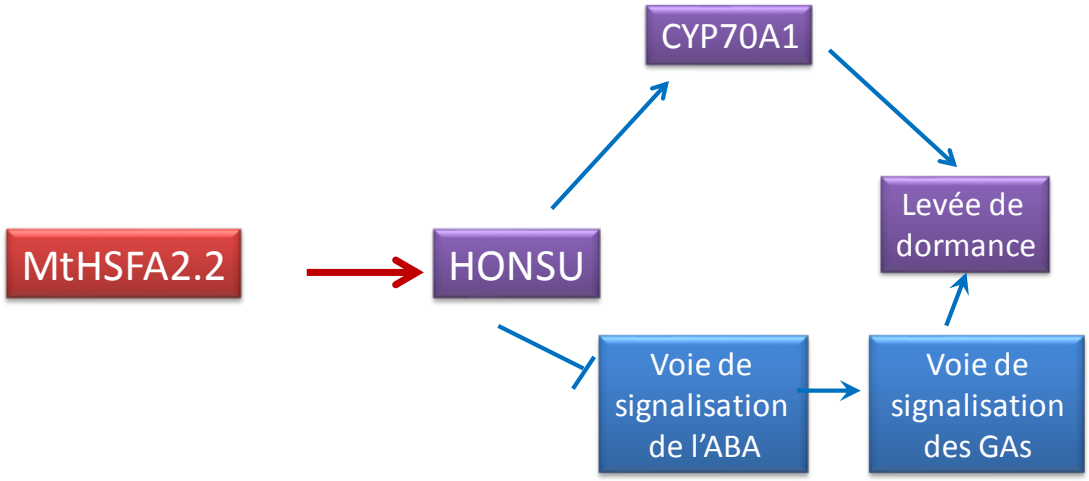


Figure 4.12 : Schéma hypothétique proposant un rôle de MtHSFA2.2 dans la régulation de la dormance. Les flèches/ boîtes rouges et bleues correspondent respectivement aux données expérimentales acquises chez *M. truncatula* dans ce travail et à celles d'*A. thaliana*. D'après Kim *et al*., (2013). Les boîtes mauves indiquent les gènes et processus communs aux deux espèces.

La caractérisation du HSF correspondant à cette sonde n'est plus possible en 2016, du fait de la ré-annotation de génome.

4.4.3 MtHSFA2.2 et dormance

Nos résultats montrent que la dormance est plus profonde en fin de développement de la graine chez les mutants Mt-*hsfa2.2* comparé au témoin. A notre connaissance, il n'existe aucune donnée démontrant un rôle des HSF dans la dormance des graines. Afin d'expliquer ce phénotype, nous avons noté que le transcrit du gène *CYP707A1*, codant pour une enzyme ABA 8' hydroxylase, est moins abondant par sur-expression de *MtHSFA2.2*. Les données transcriptomiques montrent également une légère augmentation de la quantité de transcrits codant pour un orthologue de HONSU (HAI2) un membre du groupe A de la famille des PP2C. Chez *A. thaliana*, HONSU2 est nécessaire pour la dormance. Son rôle est de réguler négativement la signalisation de l'ABA et d'induire la dégradation de l'ABA (Kim *et al*., 2013). Ces observations sont concordantes avec nos données transcriptomiques sur racines et nos données d'hypersensibilité à l'ABA des mutants Mt-*hsfa2.2*. De plus, chez *A. thaliana*, HONSU2 est progressivement exprimé pendant la maturation des graines et le niveau de transcrits est inversement corrélé à la dormance chez Col0 (Kim *et al*., 2013). Alors que chez *M. truncatula*, l'interrogation du réseau de co-expression MATNET construit par Righetti *et al*., (2015) montre que l'orthologue de HONSU détecté dans les racines transgéniques sur-exprimant *MtHSFA2.2* augmente pendant la maturation des graines. En concordance avec les résultats chez *A. thaliana* et *M. truncatula*, la dormance chez les graines Mt-*hsfa2.2* devient de plus en plus profonde en cours de maturation. L'ensemble de ces données nous permet donc de proposer un modèle hypothétique de travail impliquant le rôle de MtHSFA2.2 dans la régulation de la dormance *via* HONSU2 (Figure 4.12). Chez *A. thaliana*, HONSU diminue très fortement après la germination. Ceci pourrait expliquer pourquoi MtHSFA2.2 n'induit pas une forte expression de l'orthologue de HSFA2 ni de HSFA9.

Nos dosages de sucres montrent que les teneurs en saccharose et raffinose sont significativement plus faibles dans les mutants, suggérant un rôle de MtHSFA2.2 dans le métabolisme à l'interface entre la dégradation du saccharose et la synthèse de raffinose. Nous ne savons cependant pas si MtHSFA2.2 régule l'accumulation de ces sucres en se liant directement au promoteur des gènes responsables, tels que la GOLS. Cependant, chez *A. thaliana*, HSFA2 et HSFA3 sont capables d'activer l'expression de *GOLS1* et *GOLS2* par interaction avec les éléments HSE situés dans leur promoteur. Il serait donc intéressant de

vérifier si MtHSFA2.2 pourrait se lier au promoteur de GOLS. En effet, il a été récemment mis en évidence un lien entre l'accumulation de galactinol et dormance par Gangl and Tenhaken, (2016). Ils ont montré chez *A. thaliana* que les graines du double mutant *raffinose synthase 4/raffinose synthase 5* accumulent deux fois plus de galactinol et germent avec cinq jours de retard comparé au type sauvage. Ces auteurs ont ensuite émis l'hypothèse que la quantité de galactinol serait ainsi liée à l'induction de la dormance des graines. Afin de savoir si la dormance plus profonde des graines des mutants Mt-*hsfa2.2* serait liée à une accumulation de galactinol, il est nécessaire de doser les teneurs en galactinol.

5. Discussion et perspectives : Apports et perspectives sur l'identification des régulateurs de la qualité germinative des graines de *M. truncatula*

La graine acquiert sa qualité germinative au cours de son développement. Cette qualité initiale détermine sa capacité à germer de façon rapide et uniforme indépendamment des conditions environnementales (la vigueur), ainsi que sa capacité à se conserver à l'état sec sans perdre de sa viabilité (la longévité). De nombreux événements interviennent lors de la maturation de la graine, après le remplissage, et qui contribuent à l'expression de la qualité germinative, comme l'acquisition de la tolérance à la dessiccation, de la longévité, l'établissement de la dormance et la dégradation de la chlorophylle. Chez *M. truncatula*, ces évènements sont régulés par des réseaux complexes de facteurs de transcription dont certains ont été identifiés par construction d'un réseau de co-expression de gènes associés à la longévité et à la tolérance à la dessiccation (Verdier *et al*., 2013; Righetti *et al*., 2015). L'objectif de cette thèse était de caractériser le rôle de trois facteurs de transcription identifiés dans ce réseau, à savoir MtABI5, MtABL et MtHSFA2.2, dans l'acquisition de la qualité germinative en se focalisant sur la longévité. Dans ce travail, nous avons confirmé le rôle de MtABI5 et MtABL (un orthologue putatif d'ABI4 chez *A. thaliana*) dans la longévité chez *M. truncatula* (Figure 2.2 et Figure 3.4). Le rôle d'ABI5 a également été validé chez le pois. MtABI5 et MtABL sont également impliqués dans la dégradation de la chlorophylle à des degrés divers, MtABL semblant jouer un rôle nettement plus important que MtABI5. Ces deux facteurs de transcription connus pour interagir dans la réponse à l'ABA inhibent également l'expression des PHANGs en fin de développement de la graine (Figure 3.6). Ces données suggèrent que le démantèlement coordonné des chloroplastes est une étape nécessaire à la mise en place de la longévité. Une étude biochimique et protéomique plus poussée sur les facteurs contribuant à la dégradation de longévité chez les mutants Mt-*abi5* montre que ce gène joue un rôle important dans l'accumulation des composés protecteurs tels que les protéines LEA et les sucres non réducteurs. Chez *M. truncatula*, MtABI5 jouerait également un rôle en amont en régulant l'expression de *MtABL* et *MtHSFA2.2* (Figure 3.7 ; supplemental dataset 1). Par ailleurs, l'obtention de double mutant Mt-*abi5-2*/Mt-*abl-1* a permis de suggérer que ces deux gènes ont une action régulatrice redondante qui reste à caractériser. Les données

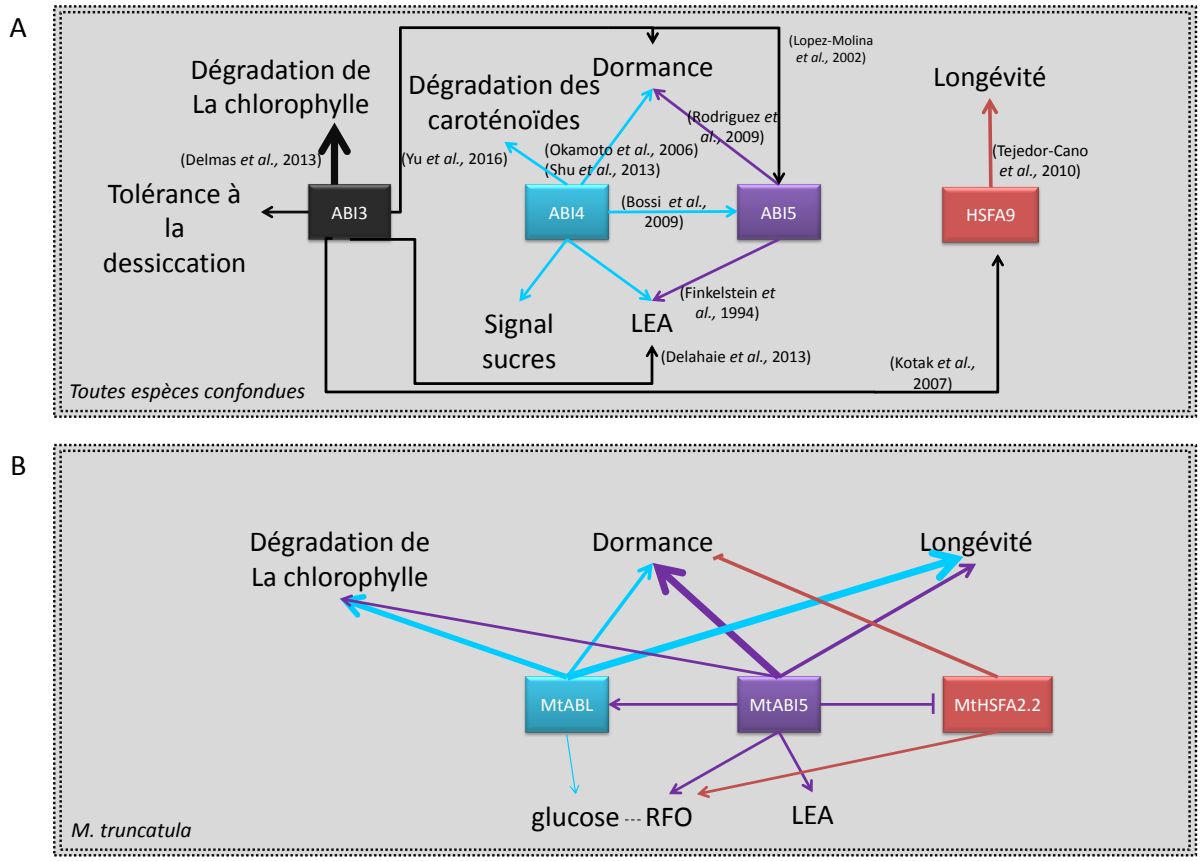


Figure 5.1 : Apports des travaux de thèse à la connaissance des phénotypes graines impliquant MtABL, MtABI5 et MtHSFA2.2. A, Représentation schématique du rôle des facteurs de transcription ABI3, ABI4 et HSFA9 dans la régulation de la qualité germinative des graines, toute espèces confondues. Les données ont été sélectionnées selon la caractérisation de leur rôle dans la qualité germinative de la graine. B, Représentation schématique des phénotypes de graines identifiés sur les graines des mutants chez *M. truncatula* au cours de ce travail. Les flèches indiquent une induction, les traits une inhibition. L'épaisseur du trait représente l'intensité du phénotype observé.

physiologiques et biochimiques des mutants Mt-*hsfa2.2* révèlent que MtHSFA2.2 est un régulateur de l'établissement de la dormance des graines. Les mécanismes par lesquels il régule cette dormance restent encore à déterminer. Cependant, l'analyse du transcriptome de racines exprimant *MtHSFA2.2* de manière ectopique suggère qu'il agirait *via* les voies de signalisation de l'ABA et la dégradation de l'ABA. Dans cette partie, nous allons discuter les rôles des trois facteurs de transcription dans la régulation de la qualité germinative de la graine des légumineuses avec une attention particulière portée sur la régulation de la longévité et la dégradation de la chlorophylle

Dans cette discussion, nous allons montrer comment les travaux réalisés lors de cette thèse s'intègrent aux connaissances scientifiques actuelles, et discuter nos résultats à la lumière de celle-ci. Pour cela, nous avons proposé un modèle en Figure 5.1 récapitulant les phénotypes régulés par les facteurs de transcription ABI5, ABL/ABI4 et HSFA2.2/HSFA9 d'après la littérature, sur les graines d'*A. thaliana*, *M. truncatula* et de sorgho. Les points de ce modèle vont être discutés dans les parties ci-dessous.

5.1 Régulation de la dormance des graines de *M. truncatula* par MtHSFA2.2 et MtABI5

Nos résultats indiquent que les mutants Mt-*hsfa2.2* ont une dormance plus profonde, alors que les graines des mutants Mt-*abi5* ne présentent pas de dormance. A notre connaissance, aucune expérience n'a montré un lien entre HSFA9 et la dormance des graines. En revanche, chez le sorgho, les graines plus dormantes ont une moins forte accumulation de protéines ABI5, contrairement à nos données pour lesquelles les mutants Mt-*abi5* ne sont pas dormants.

La dormance plus profonde des mutants Mt-*hsfa2.2* peut être liée à une régulation directe putative des gènes codant pour HONSU et CYP707A1 (Tableau 4.4). Aux vus de ces résultats, plusieurs expériences seraient intéressantes afin d'élucider le rôle de MtHSFA2.2 dans la régulation de la dormance de la graine de *M. truncatula*. Le taux d'ABA et de GAs joue un rôle prépondérant dans la dormance des graines. Chez *A. thaliana*, les mutants déficients dans les gènes de synthèse à l'ABA présentent une dormance plus profonde que les graines de type sauvage (Nambara and Marion-Poll, 2003; Okamoto, 2006). Afin d'identifier si l'installation d'une dormance plus profonde dans les graines de mutants Mt-*hsfa2.2* en fin de développement est associée à une accumulation différentielle en hormones, il faudrait

mesurer l'évolution des teneurs en ABA et GA au cours de leur développement. Une autre hypothèse, étayée par les résultats transcriptomiques d'expression ectopique de *MtHSFA2.2* (présentés en Tableau 4.5) serait le lien avec les teneurs en galactinol des graines. Gangl and Tenhaken, (2016) ont montré que les mutants impactés en galactinol présentaient une dormance plus profonde que les graines de type sauvage lorsqu'ils sont mis à germer au noir. En revanche, cette différence ne se retrouve pas dans des conditions de germination à la lumière. Afin de tester l'hypothèse d'un lien entre la plus forte dormance des graines de Mt-*hsfa2.2* due à une plus forte teneur en galactinol, des tests de germination des graines matures dormantes des mutants devraient être réalisés à l'obscurité et à la lumière. Cependant, l'imbibition des graines dormantes de *M. truncatula* à la lumière blanche réduit la vitesse de germination (Bolingue *et al*., 2010). Dans un deuxième temps, il serait donc nécessaire de quantifier les teneurs en galactinol dans les graines. Ainsi, il faudrait mesurer les teneurs en galactinol à 24 JAP (graines n'ayant pas encore acquis de dormance) à l'abscission (la dormance est installée), et sur graines matures dormantes (fraîchement récoltées, après 2 jours de post-maturation à sec) afin de voir si une plus forte accumulation de galactinol corrèle avec l'installation de la dormance plus profonde. De plus, il faudrait valider par RT-QPCR chez les graines matures des mutants Mt-*hsfa2.2* la dérégulation des gènes codant pour les enzymes MtGOLS1 et MtGOLS2.

En chapitre 2, nous avons montré que les graines des mutants Mt-*abi5* n'acquièrent pas de dormance, soit le phénotype inverse de celui des graines Mt-*hsfa2.2*. Les données transcriptomiques de graines Mt-*abi5* au cours du développement montrent que, à 24 JAP, lorsque la dormance commence à s'établir, la quantité de transcrits du gène *MtHSFA2.2* est moins élevée dans les graines des mutants Mt-*abi5-1* et Mt-*abi5-2* que dans les graines de type sauvage, alors qu'elle est plus importante à l'abscission (supplemental dataset 1). Afin de voir si l'établissement de la dormance des graines ne ferait pas intervenir MtABI5 en amont de MtHSFA2.2, une étude par RT-QPCR des niveaux d'expression de *MtHSFA2.2* et de *MtABI5* dans les graines au cours de l'établissement de la dormance des mutants Mt-*abi5* et Mt-*hsfa2.2* serait à réaliser. En fonction de ces résultats, une validation *in vivo* pourrait être réalisée en obtenant des graines de double mutants Mt-*abi5*/Mt-*hsfa2.2*. L'hypothèse de travail est que si MtABI5 inhibe la transcription de MtHSFA2.2 en fin de développement de la graine, les graines de double mutant ne devraient présenter aucune dormance. Enfin, nos données ouvrent de nouvelles pistes de recherche concernant la thermodormance. En effet, nous pouvons envisager un rôle régulateur de facteurs de type HSF (dont certains sont régulés

par les stress thermiques) très en amont de l'action de l'ABA qui contrôleraient la thermodormance.

5.2 Régulation de l'accumulation des protéines LEA par MtABI5

La régulation de l'accumulation des protéines LEA par ABI3 et ABI5 (Parcy *et al*., 1994; Carles *et al*., 2002), et, en moindre mesure, ABI4 (Finkelstein, 1994) a été documentée. Chez les mutants *abi3* d'*A. thaliana*, l'accumulation des LEA EM1 et EM6 est fortement réduite, alors que celle d'autres LEA comme une déhydrine et une LEA_5 est plus importante (Parcy *et al*., 1994), démontrant une régulation différentielle des types de LEA. Chez *M. truncatula*, Chatelain *et al*., (2012) ont montré que l'accumulation de certaines LEA spécifiquement exprimées dans les graine, la protéine EM, D-113.I/II, D-34.III et CapLEA.I/II, est corrélée à la longévité. Chez *A. thaliana*, l'accumulation de EM6 et EM1 est régulée par ABI5 dans les graines (Finkelstein, 1994). Ces résultats sont en accord avec la Figure 2.5 pour laquelle nous montrons que l'accumulation des protéines EM6 et EM1 chez *M. truncatula* est fortement dérégulée chez les mutants Mt-*abi5*. Comme chez *A. thaliana*, nos résultats identifient MtABI5 comme un régulateur de l'accumulation d'EM1 et EM6 dans les graines. En revanche, le rôle d'ABI4 dans la régulation de l'accumulation de ces protéines est moins clair. Le transcriptome des graines sèches du mutant *abi4* ne contient pas de EM1 Nakabayashi *et al*., (2005) En revanche, l'analyse de Söderman *et al*., (2000) réalisée sur des plantules *abi4* montrent une légère baisse d'expression de *EM1*, ce qui est en accord avec les données de Reeves *et al*., (2011) sur plantules.

Nos données indiquent que, comme chez *A. thaliana*, MtABL et MtABI5 sont impliqués de façon différente dans la régulation de l'accumulation de la protéine EM1. Cependant, nos résultats ne portent que sur l'analyse de la quantité de transcrits, et seulement de *MtEM1* (Figure 3.10). Afin d'étayer l'hypothèse de l'inhibition de l'expression de *MtEM1* chez *M. truncatula*, nous pourrions examiner par western blot les polypeptides EM1 et EM6 sur des extraits de graines matures des mutants Mt-*abl* et de double mutant Mt-*abi5-2*/Mt-*abl-1* en comparaison avec le type sauvage. De plus, une analyse protéomique, notamment sur l'accumulation des protéines LEA dont les teneurs sont corrélées à la longévité, mis en évidence par Chatelain *et al*., (2012), devrait être réalisée, afin d'identifier si les différences de longévité des graines pourraient être expliquées par une dérégulation de l'accumulation de certaines LEA.

5.3 L'expression de *MtABL* serait activée par un signal sucre régulé par MtABI5

Nous avons montré en Figure 2.4 que MtABI5 est impliqué dans la régulation de la teneur en RFO, et que la teneur en saccharose est 1,5 fois plus élevée chez Mt-*abi5* comparé au type sauvage. Chez ces mutants, l'expression de *MtABL* est réduite de 1,4 fois (Figure 3.7). ZmABI4 est capable d'activer la transcription de *ADH1*, un gène régulé par le sucre chez le maïs, tout en étant capable de se fixer aux motifs CE1 présents dans les promoteurs de gènes liés à l'ABA (Niu *et al*., 2002). Chez *A. thaliana*, ABI4 est impliqué dans la voie de réponse au sucre. En effet, les graines des mutants *sun6*, un mutant allélique à *abi4*, sont capables de germer sur un milieu contenant du sucrose à une concentration qui stoppe la germination et la croissance des graines et plantules de type sauvage (Huijser *et al*., 2000). L'implication d'ABI4 dans la réponse au sucre a également été montrée par l'étude de l'insensibilité au sucrose chez les mutants *sugar insensitive 4* (*sis4*) et *sis5* (Laby *et al*., 2000), ainsi qu'au glucose (Arenas-Huertero *et al*., 2000) et au fructose (Li *et al*., 2011). Le facteur de transcription ABI4 participe donc à la transduction du signal de différents sucres, tout en faisant partie de la voie de signalisation de l'ABA. Nous pouvons supposer, de manière spéculative, que MtABI5 régule indirectement *MtABL* en régulant les teneurs en sucres. Cette régulation indirecte permettrait d'expliquer en partie pourquoi l'expression de *MtABL* n'est pas plus réprimée chez les mutants Mt-*abi5* (Figure 3.7).

5.4 Régulation de l'accumulation du glucose par MtABL et des RFO par MtABI5

En Figure 2.4, nous avons montré que les teneurs en RFO dans les graines de mutants Mt-*abi5* étaient moins importantes comparées aux graines de type sauvage. De plus, l'expression de *MtSIP1* est moins importante chez ces mutants, suggérant que le métabolisme des RFO est régulé par MtABI5. Or il a été proposé que les RFO participent à la formation de l'état vitreux (Koster and Leopold, 1988) et qu'ils protégeraient les membranes des dommages causés par le retrait de l'eau (Hoekstra *et al*., 2001). La thèse réalisée par Chatelain , (2012) a montré que le ratio RFO/saccharose est corrélé à la longévité chez *M. truncatula*. Chez les mutants Mt-*abi5*, ce ratio est sévèrement réduit tandis que la longévité est diminuée de moitié. De plus,

nous avons vu en section 5.1.2 que la plus forte dormance des graines de Mt-*hsfa2.2* pourrait être associée à une plus forte accumulation de galactinol, et que MtABI5 inhiberait potentiellement l'expression de *MtHSFA2.2*. Or l'accumulation de galactinol a également été corrélée à la longévité des graines (de Souza Vidigal *et al*., 2016). Si MtABI5 inhibe l'expression de MtHSFA2.2, alors nous pourrions supposer que la réduction de la longévité des graines de mutants Mt-*abi5*, en lien avec l'accumulation de RFO, serait potentiellement due à la levée de l'inhibition de *MtHSFA2.2* par MtABI5 et à une moins forte accumulation de galactinol.

Le glucose est un précurseur des RFOs, comme schématisé par Verdier *et al*., (2013). Nous avons montré en Figure 3.8 que les teneurs en glucose sont environ 6 fois plus élevées chez les mutants Mt-*abl*. En parallèle, les graines de ces mutants sont vertes. Nous avons également montré en Figure 3.5 que les teneurs en chlorophylle à 32 JAP des mutants Mt-*abl-2* sont trois fois supérieures à celles obtenues chez le type sauvage. En plus des teneurs en chlorophylle plus élevées, nos résultats (Figure 3.6) indiquent que, comme pour les mutants Mt-*abi5*, l'expression des PHANGs n'est pas inhibée en fin de développement. Nous pouvons supposer que les graines matures Mt-*abl* présentent des chloroplastes, potentiellement fonctionnels, par comparaison avec les graines de mutants pour lesquelles la dédifférentiation des plastes a eu lieu. De ce fait, plus tôt au cours du développement, comme par exemple à 32 JAP (Figure 3.5), les graines Mt-*abl* réaliseraient plus de photosynthèse que les graines de type sauvage. Rolletschek *et al*., (2004) ont démontré qu'une plus forte accumulation d'amidon est réalisée dans les tissus les plus photosynthétiquement actifs. Or le glucose est un précurseur de l'amidon. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la plus forte accumulation de glucose chez les mutants Mt-*abl* résulte d'un plus grand laps de temps au cours duquel les graines immatures auraient été capables de réaliser la photosynthèse.

5.5 Régulation de la dégradation de la chlorophylle des graines chez *M. truncatula*

Nous avons identifié MtABI5 et MtABL comme étant des régulateurs putatifs de la dégradation de la chlorophylle de la graine de *M. truncatula*. Nos résultats de quantification de l'expression de *MtNYC1* chez Mt-*abi5* et Mt-*abl*, (supplemental Figure 4, Figure 3.5) ne montrent pas une diminution de l'expression de ce gène codant pour une enzyme impliquée dans la dégradation de la chlorophylle chez les mutants Mt-*abi5* et Mt-*abl*. De ce fait, nous pouvons nous demander comment MtABL et MtABI5 régulent la dégradation de la chlorophylle des graines. Il faudrait quantifier les niveaux d'expression des gènes codant pour des enzymes de dégradation de la chlorophylle dans les graines des mutants Mt-*abl* et de type sauvage plus tôt au cours du développement, les teneurs en chlorophylle à 32 JAP étant différentielles (Figure 3.5).

Ensuite, nous pouvons nous demander si seul MtABL régule la dégradation de la chlorophylle, ou si celle-ci est régulée par MtABI5 et MtABI4. Parce que MtABI5 semble modifier l'expression de *MtABL*, il est difficile de mettre en évidence le rôle de chacun. L'analyse phénotypique des photographies des graines matures des doubles mutants (Figure 3.5) ne montre pas de différence en chlorophylles notable comparées aux graines matures des mutants Mt-*abl*. Ces résultats indiquent que, chez *M. truncatula*, MtABL serait le régulateur prépondérant de la dégradation de la chlorophylle des graines, et non pas MtABI5. Cependant, ce résultat reste à valider par une analyse des teneurs en chlorophylles.

Jusqu'alors, ABI3 avait été mis en évidence comme étant le régulateur de la dégradation de la chlorophylle des graines (Delmas *et al.*, 2013) chez *A. thaliana*, et la couleur verte des mutants Mt-*abi3* semble indiquer le même résultat (Delahaie *et al.*, 2013). Il serait intéressant d'identifier comment MtABI3 et MtABI4 sont impliqués dans la dégradation de la chlorophylle des graines au cours du développement.

5.6 Apports sur la connaissance des mécanismes de régulation de la longévité des graines

Nos résultats tendent à montrer qu'une persistance de la chlorophylle serait liée à la diminution de la qualité germinative de la graine, en accord avec les résultats de (Jalink *et al.*, 1998; Allorent *et al.*, 2015). Nous avons montré (Figure 3.4) que la longévité des graines des

mutants Mt-*abl* était sévèrement réduite en comparaison du type sauvage. Parmi les phénotypes mis en évidence, le phénotype de graines vertes à maturité est le phénotype le plus fort. Bien que des analyses des teneurs totales en protéines LEA, en α-tocophérols, et en molécules antioxydantes comme le glutathion soient à réaliser, nous pouvons émettre l'hypothèse que la perte de la longévité serait directement liée à la dégradation imparfaite de la chlorophylle dans ces graines.

Dans la graine, deux mécanismes de dégradation de la chlorophylle semblent à distinguer : nous décidons de les appeler la dégradation « normale » et « anormale » des chloroplastes. Les graines appelées « normales » sont les graines vertes à maturité, comme le pois vert de Mendel (Armstead *et al*., 2007), pour lesquelles les graines ne présentent pas de phénotype sévère de perte de la longévité. En second lieu, nous pouvons distinguer les « anormales ». Il s'agit soit des graines vertes à maturité, dû à des problèmes de conditions environnementales lors de la culture (Teixeira *et al*., 2016), ou bien les graines vertes par mutation, comme les graines du mutant *nyc1*, Mt-*abi5* et Mt-*abl* (Nakajima *et al*., 2012, chapitre 2 et 3). Afin de comprendre le lien existant, s'il existe, entre la dégradation de la chlorophylle et la qualité germinative des graines de légumineuses, il serait intéressant de 1) réaliser une étude comparative du développement des graines de ces deux types de graines, puis, 2) d'identifier en quoi ces différences en dégradation de la chlorophylle impactent la longévité. Une analyse microscopique de l'évolution de l'ultrastructure des chloroplastes au cours du développement des deux types de graines permettrait d'identifier s'il existe une différence en dédifférentiation des chloroplastes. L'étude comparative des graines de variétés de soja vertes à maturité réalisée par Monma *et al*., (1994) montre que la structure des chloroplastes des variétés de graines vertes présente des particularités : il n'y a plus de structure lamellaire dans ces plastes. Nous pourrions supposer que la différence entre les graines vertes « normales » et « anormales » réside dans la différence de régulation de la dégradation des structures lamellaires des plastes. 2) Dans le but de comprendre en quoi une dédifférentiation « anormale » des chloroplastes conduirait à une baisse de la qualité germinative, nous pourrions mettre en évidence l'existence d'un stress photooxydatif dans les graines vertes de mutants Mt-*abi5* et Mt-*abl*. Pour cela, nous pourrions réaliser un dosage des métabolites intermédiaires de dégradation de la chlorophylle ainsi que des produits de dégradation issus de la peroxydation par des ROS. Une étude récente menée par Zhang *et al*., (2016) a permis de mettre en évidence l'occurrence d'un stress photo oxydatif dans les graines *nyc1*. En effet, la complémentation des mutants d'*A. thaliana nyc1* par *VIPP1* (codant pour une enzyme

assurant l'intégrité des membranes thylakoïdiennes) restaure le phénotype de cotylédons normaux.

5.7 Mise en perspective des voies de régulation des facteurs de transcription MtABL, MtABI5 et MtHSFA2.2

Afin de replacer nos résultats dans leur globalité, nous proposons le schéma représenté en Figure 5.2. Ce schéma représente le modèle proposé au cours de ce travail dans la régulation des phénotypes de dormance, de longévité et de dégradation de la chlorophylle. Les rôles putatifs régulateurs des protéines étudiées sont replacés dans les voies métaboliques globales. Ceci permet de mieux mettre en évidence les liens métaboliques existant entre ces différents mécanismes. Notre schéma met en évidence la régulation de *MtSIP1* et de l'accumulation des sucres RFOs par MtABI5. Dans notre hypothèse, ceci modifie le signal sucre qui en retour dérégule en partie l'expression de *MtABL*. MtABL régule la dégradation de la chlorophylle des graines, tandis ce que l'inhibition des PHANGs est réalisée par MtABL et MtABI5.

Figure 5.2 : Schéma global proposé pour la régulation des évènements de la maturation chez la graine de *M. truncatula* par MtHSFA2.2, MtABL et MtABI5. Le schéma identifie une cellule de la graine. Les flèches indiquent une activation de la transcription des gènes, alors qu'un tiret indique une répression de l'expression. Les traits en pointillés indiquent les mécanismes de régulations connus de la littérature sur la régulation de l'expression des gènes par les facteurs de transcription étudiés. Le code couleur indiqué correspond au lien putatif avec le phénotype de graine. Rouge foncé, lien avec la dormance. Bleu foncé, lien avec la longévité et vert clair, lien avec la dégradation de la chlorophylle. ABL, ABSCISSIC ACID INSENSITIVE 4-LIKE ; ABI5, ABSCISSIC ACID INSENSITIVE 5 ; ABI3, ABSCISSIC ACID INSENSITIVE 3 ; HSFA2.2, Heat Shock Factor A 2.2 ; PGM = phosphoglucomutase ; UDP-GP = UDP-glucose pyrophosphorylase ; SPS = saccharose phosphate synthase ; SPP = saccharose phosphate phosphorylase ; RFS = raffinose synthase ; STS = stachyose synthase ; DGAT, diacylglycerol acyltransferase ; AOX, Alternative Oxydase ; PGA, 3-phosphoglyceric acid ; ABA, Abscissic Acid ; GA, Gibberellic Acid ; NCED, Nine Cis Epoxycarotenoid Dioxygenase ; AAO3, Aldehyde Oxydase 3; LHC, Light Harvesting Complex; PS, Photosystem ; LEA, Late Embryogenesis Abundant. D'après Finkelstein, (1994); Okamoto, (2006); Kotak *et al*., (2007); Bossi *et al*., (2009); Cantoro *et al*., (2013); Delahaie *et al*., (2013); Delmas *et al*., (201)3; Yu *et al*., (2016).

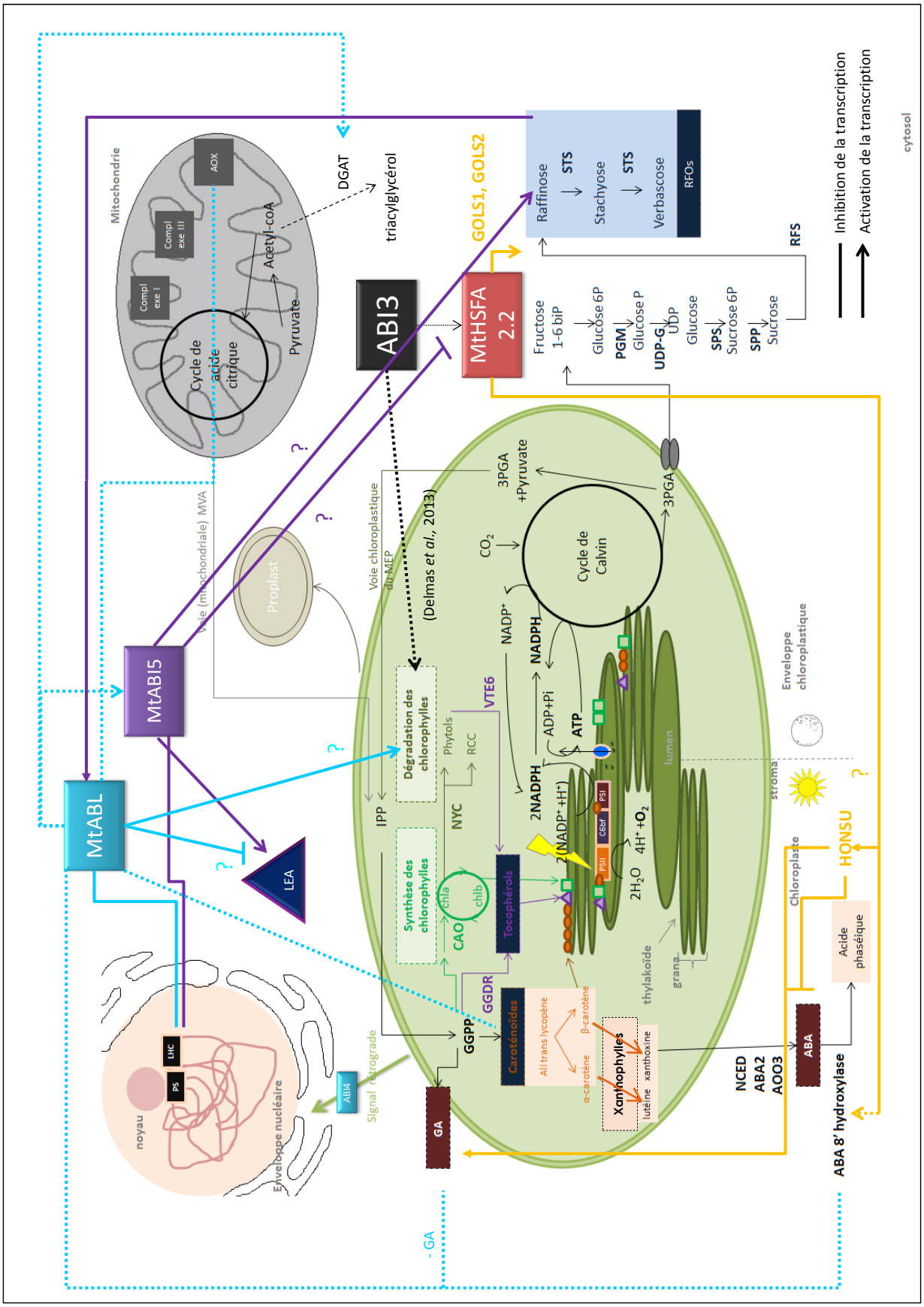

Mitochondrie
Compl exe I
Compl exe III
AOX
Cycle de acide citrique
Acetyl-coA
Pyruvate
DGAT
triacylglycérol
ABI3
GOLS1, GOLS2
MtHSFA 2.2
Raffinose
STS
Stachyose
STS
Verbascose
RFOs
Fructose 1-6 biP
Glucose 6P
PGM
Glucose P
UDP-G
UDP Glucose
SPS
Sucrose 6P
SPP
Sucrose
RFS
Inhibition de la transcription
Activation de la transcription
cytosol
Voie (mitochondriale) MVA
Proplast
Voie chloroplastique du MEP
(Delmas et al., 2013)
3PGA +Pyruvate
CO2
Cycle de Calvin
3PGA
NADP+
NADPH
ADP+Pi
ATP
Dégradation des chlorophylles
Phytols
RCC
VTE6
IPP
NYC
Synthèse des chlorophylles
chla
chlb
CAO
Tocophérols
2NADPH
2(NADP+ +H+)
PSII
C6bf
PSI
2H2O
4H+ +O2
lumen
stroma
Enveloppe chloroplastique
thylakoïde
grana
Chloroplaste
HONSU
Acide phaséique
MtABI5
MtABL
LEA
noyau
LHC
PS
Enveloppe nucléaire
ABI4
Signal rétrograde
GGPP
GGDR
Caroténoïdes
All trans lycopène
β-carotène
α-carotène
Xanthophylles
lutéine
xanthoxine
GA
NCED
ABA2
AOO3
ABA
ABA 8' hydroxylase
- GA

Tableau 6.1 : Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour les expériences réalisées en PCR (sélection des mutants d'insertion *Tnt1*). Les amorces ont été dessinées avec l'aide du logiciel primer Blast [12].

	Séquence F 5'3'	Tm (°C)	Primer R 5'3'	Tm (°C)	Taille attendue amplicon
M. truncatula					
Mt-abi5-1	ATGGTGGTAAGAGA AGGTGAGAT	57	AGCAGCAAGATCTA GAGCCAGA	59	
Mt-abi5-2	ATGGTGGTAAGAGA AGGTGAGAT	57	AGCAGCAAGATCTA GAGCCAGA		59
Mt-abi5-3	GGTGGAGCAGTTGG AGAACC	60	TCCTCTGAACACTG CATGAGAT	59	986
Mt-abl-1	ACTGAACGAGGTAA CCAAGTAGTC	60	GATGCTGTTGCACTT GCACTT	60	760
Mt-abl-2	ACTGAACGAGGTAA CCAAGTAGTC	60	GATGCTGTTGCACTT GCACTT	60	760
Mt-Hsfa2.2-1	GTTACGACGGTGAA ATCGGTG	59,6	GAGCTGGCGAATGA AGCTAGA	60,2	452
Mt-Hsfa2.2-2	CGGTGGTTACGACG GTGAAA	58,6	ATAGGTGTTGAGCT GGCGAA	59,3	466
Mt-Hsfa2.2-3	TGATTCAGACCGTTG GGAGT	60,6	TAGAACCACCACAA GCCCTC	59,4	587
A. thaliana					
abi5	GCGCAAGCGAGACA TAATGG	59.37	TCTGAAGACACCGG GCTTAAGGATC		

Tableau 6.2 : Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour les PCR DCAPS chez le pois *Pisum sativum*.

Lignée	Méthode de détection	Primer F 5'3'	Primer R 5'3'	Enzyme de restriction	(Avant digestion) Taille amplicon	(Après digestion) Taille amplicon
1805/3434	dCAPS	TTGTCTGTGATTCAG AAGGGGATTAGTTAA	TACTATTCCCAGGAT ACCCCGAACC	Hpa I	481	451
3584	dCAPS	GAAGAAGCGATCAG GAACGATGTTA	CTGAGCCATTGTAGC GGTGTTATTC	Nde II	573	307 + 255

6. Matériel et méthodes

6.1 Matériel biologique

6.1.1 Mutants pour le gène *ABI5*

M. truncatula truncatula

Pour l'étude du facteur de transcription MtABI5 (MEDTR7G104480), trois lignées indépendantes homozygotes mutantes d'insertion *Tnt1 M. truncatula* dans le fond génétique R108 ont été utilisées. Les lignées NF4383 (Mt-*abi5-1*) et (NF3376, Mt-*abi5-2*) ont été caractérisées précédemment par le laboratoire et les lignées homozygotes sont disponibles. La lignée Mt-*abi5-1* a été précédemment rétro-croisée deux fois avec le pollen de R108 (Chatelain Emilie, 2012). La lignée NF7680 (Mt-*abi5-3*) a été commandée à la S. Noble Foundation et les lignées homozygotes ont été criblées par PCR avec les amorces listées en Tableau 6.1. Les mutants Mt-*abi5-1*, Mt-*abi5-2* et Mt-*abi5-3* possèdent l'insertion *Tnt1* à 599, 1033 et 732 paires de bases du codon start.

Pisum sativum

Les mutants *Psabi5* et le type sauvage *Pisum sativum var Caméor* ont été isolés par TILLING selon (Dalmais et al., 2008) par le laboratoire en 2011. Les mutants ont été retro-croisés deux fois et la présence des mutations a été vérifiée par dCAPS avec les amorces présentées en Tableau 6.2.

Arabidopsis thaliana

La lignée homozygote N8105 (*abi5-1*, AT2G36270) a été commandée à NASC (Finkelstein, 1994). La présence de la mutation provoquant un changement de base de G en T en position 931, entraînant un codon STOP avant le motif bZIP de la protéine a été vérifiée par séquençage. Le génotype Ws (WASSILEWSKIJA) a été utilisé comme type sauvage pour le mutant *abi5-1* (Ws).

6.1.2 Mutants pour le gène *MtHSFA2.2*

Pour l'étude du facteur de transcription MtHSAF2.2 (Medtr_v1_092930), trois lignées indépendantes homozygotes mutantes d'insertion *Tnt1 M. truncatula* dans le fond génétique R108 ont été utilisées. Les lignées NF10440 (Mt-*hsfa2.2-1*), NF13157 (Mt-*hsfa2.2-2*) et

NF12877 (Mt-*hsfa2.2-3*) ont été obtenues à la S. Noble Foundation par commande de reverse screening du gène représenté par la sonde Medtr_v1_092930, MEDTR4G126070. Les mutants Mt-*hsfa2.2-1*, Mt-*hsfa2.2-2* et Mt-*hsfa2.2-3* possèdent respectivement l'insertion *Tnt1* à 6, 46 et 1333 paires de bases du codon start. Les lignées homozygotes ont ensuite été criblées par PCR avec les amorces listées en tableau 6.1. La lignée Mt-*hsfa2.2-1* a été rétro-croisée une fois avec le pollen de R108, puis les lignées homozygotes ont été criblées par PCR. En plus de ces trois lignées, une lignée témoin a été sélectionnée par un criblage par PCR sur les plantules de la génération N+1 provenant de graines issues de plantes hétérozygotes Mt-*hsfa2.2-1*_BC1.

6.1.3 Mutants pour le gène *ABL*

M. truncatula truncatula

Pour l'étude des facteurs de transcription *MtABL* (MEDTR5G082950), deux lignées indépendantes homozygotes mutantes d'insertion *Tnt1* de *M. truncatula* dans le fond génétique R108 ont été obtenues à la S. Noble Foundation. Les lignées NF19813 (Mt-*abl-1*) et NF2525 (Mt-*abl-2*) hétérozygotes (pas d'homozygotes reçus) ont été criblées par PCR avec les amorces listées en Tableau 6.1. Les graines issues de la ségrégation ont été criblées par PCR, et trois plantes homozygotes ainsi que celles des témoins (WTassocié_1, NF19813 et WTassocié_2, NF2525) ont été retenues. Les mutants Mt-*abl-1* et Mt-*abl-2* possèdent l'insertion *Tnt1* à -141 et 157 paires de bases du codon start.

Arabidopsis thaliana

La lignée homozygote N8104 (*abi4*, AT2G40220) a été commandée à NASC (Finkelstein, 1994). Le génotype Col-0 (Columbia-0) a été utilisé comme type sauvage pour le mutant *abi4* (Col-0).

6.1.4 Double mutants Mt-*abi5*/Mt-*abl*

Les lignées doubles mutant hétérozygotes ont été obtenues en croisant les plantes homozygotes Mt-*abi5-1*, Mt-*abi5-2*, Mt-*abi5-3* et Mt-*abi4-1* dans les deux sens de croisement. Les lignées hétérozygotes ont été criblées par PCR en réalisant successivement une PCR pour le gène MEDTR5G082950, puis pour le gène MEDTR7G104480, avec les amorces listées en Tableau 6.1. Puis la lignée homozygote Mt-*abi5-2*/Mt-*abl-1* (croisement mâle Mt-*abl-1* x femelle Mt-*abi5-2*) a été criblée par PCR et mise en culture. Les graines

Tableau 6.3 : Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour le clonage de *MtABI5* dans le vecteur d'entrée pENTR™/D-TOPO®

Nom de l'amorce	Annotation	Gène associé	Séquence 5'3'	Tm (°C)
Abi5-F	MEDTR7G104480	ABI5	CACCATGGTGGTAAGAGAAGGTGAGAT	59
Abi5-R	MEDTR7G104480	ABI5	TCTGGCTCTAGATCTTGCTGCT	60
Mt-HSFA9 S	MEDTR4G126070	MtHSFA2.2	CACCATGGCGGTAGCACACG	59
Mt-HSFA9 AS	MEDTR4G126070	MtHSFA2.2	TCAACTAGTTTGTCCCACTAATCC	59
M13 F		Site de clonage du pENTR	GTAAAACGACGGCCAG	60
M13 R		Site de clonage du pENTR	CAGGAAACAGCTATGAC	60

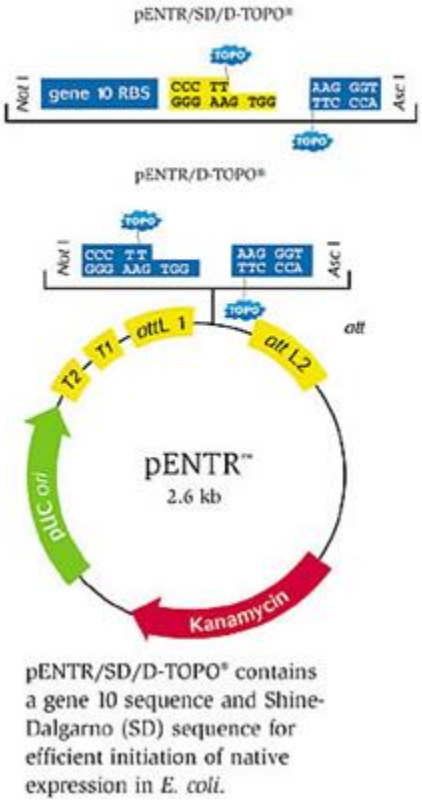


Figure 6.1 : Caractéristiques du vecteur d'entrée pENTR™/D-TOPO®.

issues de cette plante ont été utilisées pour les dosages de sucres, des chlorophylles, pour les photographies de graines matures et pour les RT-QPCR (chapitre 3).

6.1.5 Obtention de racines transformées *35S ::MtHSFA2.2,35S ::GFP*, *35S ::GUS,35S : :GFP* et *35S ::MtABI5,35S ::GFP*

6.1.5.1 Construction des plasmides 35S ::MtHSFA2.2,35S ::GFP et *35S ::MtABI5,35S : :GFP pour la sur-expression de MtHSFA2.2 dans des racines transgéniques de M. truncatula et la sur-expression de MtABI5 dans les feuilles transgéniques de M. truncatula*

Les amplicons de 2,041 kb et de 1,8 kb des régions génomiques de *MtHSFA2.2* et *MtABI5* ont été amplifiées par PCR à partir de l'ATG avec les amorces listées en Tableau 6.3. Les amplicons ont été amplifiés à bouts francs et avec le motif CACC avant le codon TGA et ont été insérés dans le vecteur d'entré pENTR®/D-TOPO® (Figure 6.1) avec le kit pENTR™ Directional TOPO® Cloning kits (Invtrogen) selon les instructions du fournisseur. La transformation de souches chimio compétentes One shot® TOP 10 de *E.* coli a été réalisée en mélangeant 3µL de mix de vecteur d'entrée avec 50µL de bactéries suivi par un choc thermique de 30s à 42°C. Soixante-quinze et 120 µL de milieu bactérien ont été étalés sur milieu de culture solide LB (composition en Tableau 6.4), kanamycine 25 µM. Après 24 h à 37°C, les colonies positives ont été sélectionnées par PCR (Tableau 6.3) puis multipliées 24 h en milieu LB liquide additionné d'antibiotique (kanamycine 25 µM). L'ADN des plasmides des colonies d'*E. coli* ayant intégré le vecteur d'entrée avec la séquence de *MtABI5* a été purifié avec le kit Plasmid DNA purification, NucleoSpin®Plasmid/Plasmid (Macherey-Nagel), en éluant dans 100µL de Buffer AE à 70°C les ADNp finaux. La séquence insérée a été vérifiée par séquençage (Genoscreen). Le plamide pENTR® ayant intégré le gène *MtHSFA2.2* a ensuite été recombiné avec le vecteur de destination pK7WG2D,1 (Karimi, Inzé et Depicker, 2002) par recombinaison avec le kit Gateway® LR Clonase™II Enzyme Mix. La séquence du plasmide pK7WG2D,1 est représentée en Figure 6.2. Une seconde transformation de bactéries *E. coli* compétentes One shot® TOP 10 a été réalisée et étalée sur milieu LB solide additionné de streptomycine et de spectinomycine 50 µM, suivi par une PCR pour sélectionner les colonies positives. Les vecteurs d'expression *35S::MtHSFA2.2,35S ::GFP* et *35S::MtABI5,35S ::GFP* ont été purifiés à partir de 1 mL de culture liquide comme décrit ci-dessus.

Tableau 6.4 : Composition des milieux de culture LB (Lysogeny Broth) et Fahräeus. Micro éléments : $MnSO_4$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$, H_3BO_3, Na_2MoO_4. Les solutions ont été autoclavées.

	Réactif
Constituants du milieu LB	10g/L Bacto-tryptone
	5g/L Bacto-yeast extract
	10 g/L NaCl
	pH ajusté à 7 avec du NaOH
	15g/L de Bacto-Agar
Constituants du milieu Fahräeus	MgSO4, 0,5 mM
	KH2PO4, 0,7 mM
	Na2HPO4, 0,8 mM
	Fe-EDTA, 50 µM
	Micro éléments, 0,1 µg/mL
	CaCl2, 1mM final
	HCl, 5 µL/L
	Agar HP696, 15 g/L
	Fongicide (plant preservative mixture), 1/1000 e

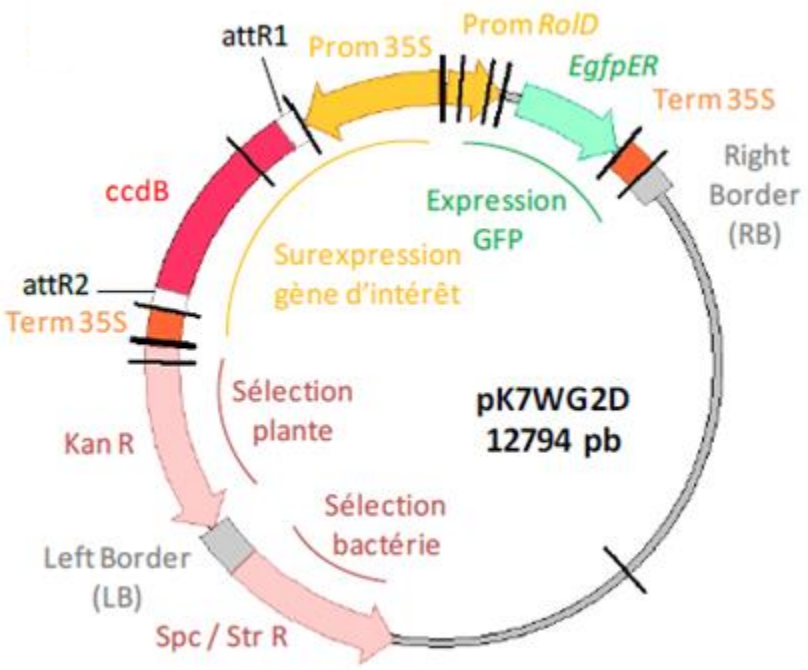


Figure 6.2 : Carte du vecteur de destination pK7WG2D.1 utilisé pour la surexpression de *MtABI5* et de *MtHSFA2.2*. La séquence d'intérêt est sous le contrôle du promoteur 35S. Les gènes codant pour la GFP (EgFP, gène rapporteur) et la résistance à la Kanamycine sont présents entre les bornes RB et LB.

6.1.5.2 Transformation de souches d'Agrobacterium rhizogenes

Deux cent µL de bactéries *Agrobacterium rhizogenes* compétentes *Arq1* ont été transformées avec 1 µg de vecteur d'expression *35S::MtHSFA2.2,35S ::GFP* et *35S::MtABI5,35S ::GFP* en réalisant deux chocs thermiques, l'un à -196°C pendant 5 min puis un second, 5 min au bain marie à 37°C. Les transformants ont été mis en culture 4 h à 28°C, sous agitation légère (200 rpm) en milieu liquide streptomycine (STR) + spectynomycine (SPC) 50 µM. La culture a ensuite été étalée sur milieu LB solide en présence de STR et SPC, et cultivée 48 h à 28°C. Les colonies positives ont été sélectionnées par PCR et mises en culture liquide 48 h à 28°C. Une colonie a ensuite été étalée sur milieu LB solide, STR+SPC 25 µM, afin de former le tapis bactérien pour la transformation des racines de *M. truncatula.* La souche d'*A. rhizogenes Arq1* transformée avec le plasmide *35S ::GUS,35S ::GFP*, et qui constitue le témoin de l'expérience, a déjà été construite dans le laboratoire.

6.1.5.3 Transformation de racines de M. truncatula

Le protocole de transformation est celui de (Chabaud et al., 2006). Quatre cent graines de R108 ont été scarifiées, stérilisées pendant 5 min sous agitation dans un bain de javel à 3% (25 mL de solution de javel à 6%, 10 µL de Triton x 100, 25 mL d'eau stérile), puis rincées à l'eau stérile. Les graines ont été mises à imbiber 30 h dans de l'eau stérile pour obtenir des radicules de 1 cm environ. La pointe (environ 3 mm) des radicules a été excisée sous hotte à flux laminaire, en conditions stériles puis trempée dans le tapis bactérien d'*A. rhizogenes* transformées avec les plasmides *35S ::MtHSFA2.2,35S ::GFP* et *35S ::GUS,35S ::GFP*. Elles ont ensuite été cultivées sur boite de pétri carrée avec 50 mL de milieu Fahraeus (Tableau 6.4), Kanamycine 25 µM, en conditions stériles à 20°C, avec une photopériode de 16 h. Après environ 6 semaines, les racines transformées montrant une fluorescence verte ont été sélectionnées sous microscope UV (stereomicroscope, Olympus U-RFL-T), filtre GFP puis congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN.

6.1.6 Obtention de feuilles transformées *35S ::MtABI5,35S ::GFP* et *35S :GUS,35S ::GFP*

6.1.6.1 Transformation de souches d'Agrobacterium tumefaciens

Deux cent µL de bactéries *A. tumefaciens* compétentes *Agl1* ont été transformées avec 1 µg de vecteur d'expression *35S::MtABI5,35S ::GFP* et *35S::GUS,35S ::GFP* en réalisant deux chocs thermiques, l'un à -196°C pendant 5 min puis un second, 5 min au bain marie à 37°C. Les transformants ont été mis en culture 4 h à 28°C, sous agitation légère (200 rpm) en milieu LB liquide STR+SPC+ carbeniciline (C) 50 µM. La culture est ensuite étalée sur milieu LB solide en présence de STR, SPC et C, et cultivée 48 h à 28°C. Les colonies positives ont été sélectionnées par PCR et mises en culture liquide 48 h à 28°C.

6.1.6.2 Transformation de feuilles de M. truncatula

Quatre réplicats de trois feuilles (1er stade) de plantules âgées de 14 jours ont été piquées à l'aide d'une seringue. Un mL de filtrat contenant *A. tumefaciens* cultivé 24 heures en milieu LB liquide avec antibiotique a été dilué dans de l'eau au 1/10 avant d'être infiltré manuellement. Les plantules transformées ont été placées 24 heures à 20-22°C, 16h lumière en chambre de culture. Après 24 heures, une solution d'ABA 0,5 µM a été injectée dans la feuille. Les feuilles transformées ont été récoltées 48 heures après l'ajout d'ABA comme décrit en section 6.1.5.3.

6.2 Conditions de culture

Pour la production de graines de *M. truncatula*, celles–ci ont été semées en mottes gifi (Grosseron) individuelles, puis transférées en jardinière ou en pot individuel de 3 L dans un terreau à 21 et 24°C, avec une photopériode de 16 h et d'environ 200 µmol photons/m² s². Les plantules de 1 mois sont ensuite fertilisées à l'aide d'engrais NPK en granulés. Après l'abscission, les gousses ont été récupérées, séchées 3 jours à 44% HR, 20°C avec une solution de sel saturé de K_2CO_3 et les graines matures ont été disséquées et post-maturées 1 mois avant d'être stockées à 4°C à court terme, mise en sachet hermétique à -80°C pour du long terme.

La production de graines de *P. sativum* a été réalisée en serre. Les graines ont été semées dans un pot de 3 L dans un mix de terreau et de vermiculite et placées en condition de serre à 18/22°C avec une photopériode de 16 heures lumière. Les gousses ont été récoltées à l'abscission puis séchées 2-3 semaines à température et humidité relative ambiantes.
Les plantes d'*A. thaliana* ont été cultivées en pots contenant du terreau et placées en chambre de culture (23°C, 16h lumière, 100 µmol/m²/s). Les graines ont été récoltées à maturité puis séchées trois jours à 44% HR, 20°C.

6.3 Tests de physiologie

6.3.1 Germination

Avant imbibition, les graines matures ont été scarifiées sur du papier de verre pour lever la dormance tégumentaire puis imbibées à l'obscurité, 20°C sur du papier Whatman No 1 dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre avec 4 mL d'eau déminéralisée. Pour les tests de dormance au cours du développement, les graines immatures ont directement été dégoussées et imbibées dans 4 mL d'eau déminéralisée, puis placées à 20°C à l'obscurité. Une graine est considérée germée lorsque la pointe de la radicule a percé les téguments. Les tests ont été réalisés en 3 réplicats de 30 ou 50 graines.
Trente graines matures de *P. sativum* ont été disposées hile dirigé vers le haut sur du papier plissé de germination dans une boite de germination fermée (SNES). L'imbibition a été faite avec 100 mL d'eau déminéralisée à 20°C, à l'obscurité. Une graine est considérée germée lorsque la pointe de la radicule a percé les téguments.

Les graines matures d'*A. thaliana* ont été mises à imbiber à la lumière (photopériode de 16 h lumière) à 20°C, avec 1 mL d'eau déminéralisée et deux papiers whatmann No 1 dans des boites de Pétri de 4,5 cm de diamètre.

6.3.2 Sensibilité à l'ABA

Pour les préparations d'ABA et de témoin, 2.64 mg de poudre de ±ABA (Sigma Aldrich A-1049) a été dissout dans 57 µL de méthanol. Puis 9 mL d'eau mQ ont été ajoutés et le PH a été ajusté à 6.6 avec du NaOH. Le volume final est ajusté à 10 mL. Pour la solution témoin, les mêmes étapes ont été réalisées mais sans ABA. La concentration de la solution mère est de 500 µM. Les aliquotes ont été réalisés à 1, 5 et 10 µM et n'ont pas été gardés plus d'un mois.

Pour déterminer la sensibilité à l'ABA, 3 réplicats de 30-50 graines sont mis à imbiber avec 4 mL de solution d'ABA à 10µM. La solution mère d'ABA est réalisée en ajoutant 53µL de MeOH à 2.64mg de *cis* ABA (Sigma-Aldrich), puis en ajustant le pH à 6.6 et en complétant avec de l'eau mQ jusqu'à 10 mL. Le témoin consiste en l'incubation dans une solution de MeOH à concentration équivalente.

6.3.3 Test de longévité

La longévité des graines a été déterminée sur 3 réplicats de 30-50 graines pour *M. truncatula* et le pois et sur 3 réplicats de 100-150 graines pour *A. thaliana*. Après scarification (pour les graines de *M. truncatula*), les graines de *M. truncatula* et *d'A. thaliana* ont été stockées à 75 % HR dans une enceinte contenant une solution saturée de NaCl à 35°C pendant 0, 7, 14, 21 ou 28 jours, et à 45°C pour le pois. Les graines ont ensuite été mises à germer et les graines viables ont été comptabilisées après 10 jours de germination. La P_{50} est déterminée par le temps de vieillissement qui conduit à 50% de perte de viabilité.

6.3.4 Acquisition de la dormance

Pour les tests d'acquisition de la dormance chez *M.* truncatula, cinquante graines à 24, 28 et 33 DAP, abscission et trois réplicats de 30 ou 50 graines matures ont été récoltées. Le T_{50}, le temps au bout duquel 50% du lot de graine a germé, est calculé pour chaque génotype.

6.3.5 Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau est déterminée à partir de la mesure de la masse fraiche et de la masse sèche des graines en utilisant une balance d'ultra-précision (Perkin-Elmer) sur 1 graine avec 5-10 répétitions. La masse sèche est obtenue après séchage à 96°C pendant deux jours. La teneur en eau est calculée selon la formule TE(%)=100*((Poids frais-Poids sec)/Poids sec).

6.4 Expérience de sénescence

Le protocole a été adapté de Sakuraba et al., (2014). Deux feuilles du même âge ont été récoltées pour deux plantes âgées d'un mois pour chaque génotype, et ce en trois réplicats. Les feuilles ont ensuite été placées dans une boite de Pétri de diamètre 12,5 cm avec 5 mL d'eau non traitée entourée de papier aluminium, rangées dans une boite elle-même entourée de papier aluminium et placée en chambre de culture (20-22°C). Après 0, 4 ou 8 jours à l'obscurité, les réplicats ont été pris en photographies, récoltés dans l'azote liquide et conservés à -80°C pour les dosages de chlorophylle.

6.5 Dosages des sucres solubles

Quatre réplicats de 10 graines (100mg) de *M. truncatula* et quatre réplicats d'axe (20mg) ou de cotylédon (20mg) de pois ont été broyés dans 1mL de MeOH 80% et 40µL de mélézitose 4g/L. Pour *A. thaliana*, trois réplicats de 15 mg de graines environ ont été broyés dans 1mL de MeOH 80% et 40µL de mélézitose 4g/L. Les échantillons ont ensuite été incubés 15 minutes à 76°C, puis séchés au speed-vac (40°C, 2h ½), les culots ont été repris dans 1ml d'eau mQ avant l'analyse HPLC d'une dilution au 1/15 (*M. truncatula*) et ¼ (pois) de l'échantillon. Les sucres ont été analysés par un système DIONEX BioLC (Dionex Corp.,Sunnyvale, CA, USA) équipé d'une pré-colonne AS11 ion exchanger, d'une colonne DionexCarboPac PA1 (2 x 250 mm) et d'un solvant compatible avec la cellule de détection électrochimique (électrode de travail en or et électrode de référence Ag/AgCl). Les sucres ont été séparés avec NaOH 100 mM à 0.25 mL/min pendant 45 minutes, suivi par une étape de rinçage (NaAc150 mM , NaOH850 mM) de 5 minutes avant de ré-équilibrer la colonne avec NaOH100 mM . Les temps de rétention de chaque sucre ont été évalués par un standard composé d'un mélange de

glucose, fructose, sucrose, stchayose, mélézitose, raffinose, respectivement à 10, 10, 20, 40 et 40 mg/L qui permet également la quantification absolue des sucres.

6.6 Dosages HPLC des chlorophylles et des caroténoïdes

Trois réplicats de 100 graines de grains matures de *M. truncatula*, 20-100mg de graines immatures et trois réplicats de 10 graines de pois ont été lyophyilisés, broyés et pesées. L'extraction a été adaptée de Nicolle et al., (2004). Deux mL de MeOH+$MgCO_3$ (5,7 g/L) ont été ajoutés au broyat avant d'être vortexé. Deux mL de chloroforme ont ensuite été ajoutés. Le tout a été vortexé et incubé 15 minutes dans la glace à l'obscurité. Deux mL d'eau mQ ont été ajoutés, suivi par une centrifugation de 10 minutes à 1 500rpm, 8°C. La phase inférieure a été prélevée et filtrer à l'aide d'un filtre de 0,45 µM dans un flacon en verre ambré. Un mL a été transféré dans un vial et séché 30 minutes au speed vac. L'extrait sec a été repris dans 200µL de solvant (acétonitrile/dichlorométhane 50/50 (v/v) + BHT 0,1%). Les mesures ont ensuite été réalisées à l'aide d'une HPLC Shimadzu (Shimadzu Corp., Kyoto, Japon) équipé d'un appareil autosampler thermostaté (SIL-10ADVP) et d'un détecteur à barrettes de diode (SPD-M10AVP). Les caroténoïdes ont été détectés à 450nm (lutéine, α-carotène), 400 nm (beta carotène), les chlorophylles à 647nm (chlorophylle b) et 664nm (chlorophylle a) et ont été quantifiés selon une gamme étalon de lutéine et de β-carotène.

6.7 Dosages au spectrophotomètre des chlorophylles

Trois ou quatre réplicats de 10-25 graines ont été broyés au broyeur à billes TIssuelyser (Qiagen), avec deux billes de 5 mm pendant 60 s à 30 HZ (1800 oscillations/minute), dans 300 µL de tampon d'extraction N-N diméthylformamide.

Pour l'extraction de chlorophylle des feuilles, trois réplicats de 2*2 feuilles ont été récoltés dans l'azote liquide, lyophilisés pendant 24 heures, puis pesées. Les feuilles ont ensuite été broyées au broyeur à billes TIssuelyser (Qiagen), avec trois billes en verre de 3 mm pendant 60 s à 30 HZ (1800 oscillations/minute). Puis 1-20 mg de poudre a été pesé et mélangé à 600 µL de N-N diméthylformamide.

L'ensemble a été placé à 4°C sous agitation horizontale (100 rpm) au noir. Après 16 heures d'agitation, les échantillons ont été centrifugés deux fois 5 minutes à 14 000 rpm, 4°C et le surnageant a été prélevé. Cent µL de surnageant a été dosé au spectrofluorimètre (Fluostar

Tableau 6.5 : Mix PCR et détails des programmes utilisés pour les PCR. Le programme PSC a été réalisé à l'aide d'un thermocycleur. X, la température d'hybridation de l'amorce, listée en Tableau 6.1.

Produit	[ ] initiale	[ ] finale	Quantité par puits	Quantité par mix	Thermocycleur :
H_2O_{up} stérile			9,1	9,1	Programme :
Tampon DreamTaq	10 X	1X	1,5	1,5	
dNTPs	2,5 mM	125 µM	0,75	0,75	95 °C 2 min
Amorce sens	10 µM	0,5 µM	0,75	0,75	95 °C 30 sec
Amorce anti-sens	10 µM	0,5 µM	0,75	0,75	**X** °C 30 sec (35×)
DreamTaq Polymérase	(5 u) / µL	0,05 u/µL	0,15	0,15	72 °C 60 sec (35×)
					72 °C 5 min
ADN			2		10 °C ∞

Omega, BMG Labtech, Durham, USA), pas de 1 nm, spectre 350-750 nm. La teneur en chlorophylle totale a été calculée selon la méthode de (Moran, 1982): Chl_totale=7.04A664+20.27A647, en µg/mL, Chla =12.64*A664-2.99*A647 et Chlb=-5.6*A664+23.26*A647.

6.8 Extraction d'ADN génomique

Une foliole a été broyée au micro-pilon dans 400 µL de tampon d'extraction (200 mM tris pH 8, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8, SDS 0,5% p/v). Après centrifugation à 14 000 rpm pendant 5 min à 4°C, 300 µL de surnageant ont été mélangés à 300 µL de propan-2-ol. Après centrifugation identique et élimination du surnageant, le culot a été séché et repris dans 50 µL de tampon TE (10 mM Tris pH 8, 1 M EDTA 0,5). Les quantités et la qualité des ADNg extraits ont été évalués par spectrophotométrie au Nanodrop ND 1000.

6.9 PCR

Pour le criblage des mutants, les PCR ont été réalisées dans un volume final de de 15 µL avec 20 ng d'ADN, avec l'ADN polymérase DreamTaq (Thermoscientific, 5 U/µL), selon les paramètres décrits en Tableau 6.5. Les produits PCR ont été vérifiés par migration sur gel d'agarose standard 1% ou 1,5%, TAE 0,5X, 25 min, 100 Volts, avec l'agent intercalent SYBR Safe (Invitrogen) et révélés aux UV. Les amorces ont été désignées à l'aide du logiciel Primer 3 output (Untergasser et al., 2007).

6.10 Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux de trois réplicats de 25 graines matures de type sauvage et de mutant *Mt-abi5-1*, *Mt-abi5-2*, *Mt-abi5-3*, *Mt-abl-1*, Mt-*abl-2*, et de trois réplicats de 10 à 20 graines immatures de mutants *Mt-abi5-1* et R108 ont été extraits à l'aide du kit NucleoSpin RNA Plant (Machery Nagel) selon les instructions du fournisseur. La quantité des ARN totaux extraits a été vérifiée par spectrométrie au Nanodrop ND 1000, la qualité des ARN totaux par migration sur gel 1% TBE 0,5X, 25 minutes, 100 V avec un agent intercalent (SYBRSafe), et révélée aux UV.

Tableau 6.6 : Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour les expériences réalisées en RT-QPCR. Les amorces ont été dessinées avec l'aide du logiciel primer blast [11]. Les gammes d'efficacité ont été déterminées comme décrit en section 6.12. Les courbes de fusion à pic unique sont représentées.

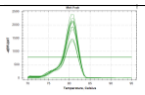
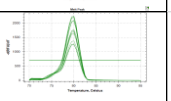
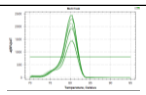
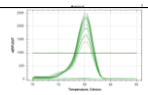
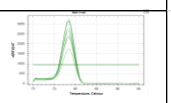
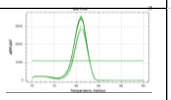
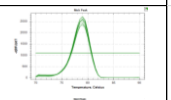
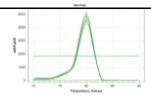
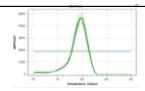
Nom de la préotéine	*M. truncatula* ID (Mtv4)	Arabidopsis TAIR10	E-value	Forward/Reverse 5'-3'	Taille amplicon (pb)	Efficacité	R2	Courbe de fusion
MSC27	TC85211			GTTGAAGTAGACATTGG TGCTAAC/AGCTGAGTCA TCAACACCCTCAT	100	(Kakar *et al.*, 2008)		
Actine 11	Medtr2g008050			GCTGACCGTATGAGCAA GGA/TGCCAAGATAGAC CCACCAA	114	100,4	0,998	
LHCA1; photosystem I light harvesting complex gene	Medtr6g033320	AT3G54890	1,00E-108	TGGCATTTGTTGGAATC GTTGT/ATGTTGTTGTGC CATGGATCAG	100	93,9	0,991	
PSBW; Photosystem II reaction center W protein	Medtr1g070495	AT2G30570	8,00E-35	TGGTGGATGAAAGAATG AGTACTGA/AATAGAGA GCCCAGATAAAACCGAA	111	100,1	0,995	
NYC1; chlorophyll(ide) b reductase	Medtr6g088500	AT4G13250	0	TCTGACAGCCGTCTATG GTTC/CGGGAGATGCAG TATGGACA	107	102,3	0,999	
LHCB2 light harvesting complexII	Medtr5g097280	AT2G05100	1,00E-138	ACCATGCGTCGTACTGT GAA/TGTCCCATCCATAA TCACCA	137	107,6	0,999	
PSAD-2; photosystem I subunit D-2	Medtr5g006130	AT1G03130	8,00E-82	GGAAGCACTGGTGGATT GTT/CACCAGTTGGCATC TCAAAG	100	89,8	0,992	
MtABL	Medtr5g082950	AT2G40220	5,00E-38	ATGTTCAAGAAACCAAA CCCACC/TTGTTGGTAGT GTTACTGCTGC	118	105,7	0,992	
SIP1	Medtr3g077280	AT5G40390	0	AACTCTTGTTTTGCCTGA TGGT/AAAACACCCGTGT ATTTGTTGAGA	141	81	0,99	
EM1	Medtr7g069250	AT3G51810	1,00E-27	TGGGAACAAAAGGAGG GCAG/AGCACGTTGTTC ACCAGACT	113	105,7	0,996	

Tableau 6.7 : Cycles Biorad pour les RT- QPCR.

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

6.11 RT-QPCR

Après extraction des ARN totaux, l'ADNg résiduel a été éliminé en incubant 600 ng d'ARN totaux avec 1µL de tampon DNase 10X, 200 U de DNase I RNase Free (Fermentas) et 3 µL eau DEPC. Après 30 min à 37°C, 1 µl EDTA 25mM a été rajouté et la solution a été incubé 10 min à 65°C. La rétrotranscription (RT) a été réalisée avec le kit de rétrotranscription Quantitect (Qiagen, Courtaboeuf, France). Un µg d'ARN totaux a été mélangé à 4 µL de mix de RT et d'eau nuclease free. Le mélange a été placé au thermocycleur Biorad selon un cycle de 5 minutes à 25°C, 30 minutes à 42°C. L'enzyme a été inactivée par passage 5 minutes à 85°C. La qualité de la RT a été vérifié par PCR pour le gène de référence *MSC27*. La QPCR a été réalisée avec les amorces listées en Tableau 6.6 avec le mix evagreen So Avanced (Bio-Rad Laboratories) selon les données du fabricant. L'efficacité de la PCR a été mesurée avec une gamme de dilution de 1/2, 1/4, 1/8, 1/10, eau pour les gènes étudiés, avec l'ADNc du type sauvage, avec le programme décrit en Tableau 6.7. Les témoins No Amplification Control (NAC) et No Template Control (NTC) ont été réalisés en réalisant le mix de RT sans l'enzyme de rétrotranscription avec les ARN et avec le mix de rétrotranscription sans les ARN. L'appareil utilisé est un CFX96 Real-Time Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Les gènes de référence utilisés sont *MSC27* (Bolingue et al., 2010) et *ACTINE11* (Medtr2g008050). L'expression relative normalisée a été calculée par la méthode comparative des 2Δ(Ct) (Schmittgen and Livak, 2008). Chaque point représente la moyenne de trois réplicats indépendants de 30 graines.

6.12 Analyse transcriptomique

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

Les ARN totaux (500 ng) des racines qui sur expriment *35S::MtHSFA2.2,35S ::GFP* ou *35S::GUS,35S ::GFP* (témoin) ont été amplifiés avec le kit MessageAmp™ II aRNA (Ambion). Les ARN ont été rétrotranscrits en ADNc pleine longueur avec une amorce d'oligo (dT) et une ArrayScript™ reverse transcriptase. Le brin complémentaire a été synthétisé puis

les ARNa (antisens) ont été transcrits avec une T7 ARN polymérase. Après quantification, les ARNa ont été dilués à 1 ng/µL avec de l'eau Rnase Free. Le marquage des ARNa rétrotranscrits a été effectué avec le kit NucleoSpin PCR clean-up (Macherey-Nagel). Cinq ng d'ARNa ont été rétrotranscrits en ADNc marqué au fluorophore cyanine3 (Cy3 sous forme de Cy3-dUTP) ou au fluorophore Cy5. La concentration des ADNc marqués a ensuite été évaluée au nanodrop ND 1000. Ensuite, les échantillons marqués (30 pmoles) ont été mélangés selon *MtHSFA2.2*Cy3-témoinCy5 et *MtHSFA2.2*Cy5-témoinCy3.

6.12.2 Hybridation sur lame

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

6.12.3 Traitement des données

Les intensités de fluorescence Cy3 et Cy5 ont été traduites en valeurs numériques et normalisés avec les logiciels DEVA 1.2.1, R2.14 et Rstudio. Les gènes ont été considérés différentiellement exprimés quand la p-valeur est <0.05 et ratio d'expression en log2 est > 1 ou <-1).

6. 13 Analyses bioinformatiques

Les séquences d'acides nucléiques des promoteurs (-3000pb avant le codon START) des gènes cibles de *M. truncatula* ont été récupérés grâce au logiciel « workflow protocol » sur le site internet legoo [12]. L'analyse des motifs présents a été réalisée en utilisant le logiciel softberry [13].

Les analyses AgriGo (Du et al., 2010; [10]) ont été réalisées afin de voir les fonctions biologiques surreprésentées dans les listes de gènes identifiées dans ce travail. L'annotation TAIR10 a été utilisée, et les tests statistiques ont été réalisés selon un test de Fisher, p<0,05.

Les séquences protéiques des gènes codant pour les facteurs de transcription MtABL, MtHSFA2.2 et MtABI5 ont été récupérées sur le site du jcvi Medicago [8], les séquences d'*A. thaliana* sur TAIR [14].

7. Bibliographie

Acevedo-Hernández GJ, León P, Herrera-Estrella LR (2005) Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4. Plant J **43**: 506–519

Agarwal P, Kapoor S, Tyagi AK (2011) Transcription factors regulating the progression of monocot and dicot seed development. Bioessays **33**: 189–202

Allen JF, de Paula WB, Puthiyaveetil S, Nield J (2011) A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. Trends Plant Sci **16**: 645–655

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

Almeida J, da Silva Azevedo M, Spicher L, Glauser G, vom Dorp K, Guyer L, del Valle Carranza A, Asis R, de Souza AP, Buckeridge M (2016) Down-regulation of tomato PHYTOL KINASE strongly impairs tocopherol biosynthesis and affects prenyllipid metabolism in an organ-specific manner. J Exp Bot **67**: 919–934

Almoguera C, Personat J-M, Prieto-Dapena P, Jordano J (2015) Heat shock transcription factors involved in seed desiccation tolerance and longevity retard vegetative senescence in transgenic tobacco. Planta **242**: 461–475

Almoguera C, Prieto-Dapena P, Personat J-M, Tejedor-Cano J, Lindahl M, Diaz-Espejo A, Jordano J (2012) Protection of the Photosynthetic Apparatus from Extreme Dehydration and Oxidative Stress in Seedlings of Transgenic Tobacco. PLoS ONE **7**: e51443

Almoguera C, Prieto-Dapena P, Díaz-Martín J, Espinosa JM, Carranco R, Jordano J (2009) The HaDREB2 transcription factor enhances basal thermotolerance and longevity of seeds through functional interaction with HaHSFA9. BMC Plant Biol **9**: 75

Almoguera, C., Rojas, A., Díaz-Martín, 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 (**46**), 43866-43872

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

Armstead I, Donnison I, Aubry S, Harper J, Hörtensteiner S, James C, Mani J, Moffet M, Ougham H, Roberts L (2007) Cross-species identification of Mendel's I locus. Science **315**: 73–73

Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiol **141**: 391–396

Asokanthan PS, Johnson RW, Griffith M, Krol M (1997) The photosynthetic potential of canola embryos. Physiol Plant **101**: 353–360

Atkinson BG, Raizada M, Bouchard RA, Frappier JRH, Walden DB (1993) The independent stage-specific expression of the 18-kDa heat shock protein genes during microsporogenesis in *Zea mays* L. Dev Genet **14**: 15–26

Bailly C, Audigier C, Ladonne F, Wagner MH, Coste F, Corbineau F, Côme D (2001) Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing

bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. 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. Physiol Plant **97**: 104–110

Baker J, Van dennSteele C, Dure III L (1988) Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. Plant Mol Biol **11**: 277–291

Baniwal SK, Bharti K, Chan KY, Fauth M, Ganguli A, Kotak S, Mishra SK, Nover L, Port M, Scharf K-D (2004) Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. J Biosci **29**: 471–487

Baskin JM, Baskin CC (2004) A classification system for seed dormancy. Seed Sci Res **14**: 1–16

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

Benedito VA, Torres-Jerez I, Murray JD, Andriankaja A, Allen S, Kakar K, Wandrey M, Verdier J, Zuber H, Ott T (2008) A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. Plant J **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

Bentsink L, Alonso-Blanco C, Vreugdenhil D, Tesnier K, Groot SP, Koornneef M (2000) Genetic analysis of seed-soluble oligosaccharides in relation to seed storability of *Arabidopsis*. Plant Physiol **124**: 1595–1604

Bentsink L, Jowett J, Hanhart CJ, Koornneef M (2006) Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci **103**: 17042–17047

Bewley JD, Black M (1997) Seed germination and dormancy. Plant Cell **9**: 1055

Bienz M, Pelham HR (1987) Mechanisms of heat-shock gene activation in higher eukaryotes. Adv Genet **24**: 31–72

Bies-Etheve N, da Silva Conceicao A, Koornneef M, Léon-Kloosterziel K, Valon C, Delseny M (1999) Importance of the B2 domain of the *Arabidopsis* ABI3 protein for Em and 2S albumin gene regulation. Plant Mol Biol **40**: 1045–1054

Blackman SA, Obendorf RL, Leopold AC (1992) Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. Plant Physiol **100**: 225–230

Bolingue W, Ly Vu B, Leprince O, Buitink J (2010) Characterization of dormancy behaviour in seeds of the model legume *Medicago truncatula*. Seed Sci Res **20**: 97

Borisjuk L, Nguyen TH, Neuberger T, Rutten T, Tschiersch H, Claus B, Feussner I, Webb AG, Jakob P, Weber H (2005) Gradients of lipid storage, photosynthesis and plastid differentiation in developing soybean seeds. New Phytol **167**: 761–776

Borisjuk L, Rolletschek H, Walenta S, Panitz R, Wobus U, Weber H (2003) Energy status and its control on embryogenesis of legumes: ATP distribution within *Vicia faba* embryos is developmentally regulated and correlated with photosynthetic capacity. Plant J **36**: 318–329

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. Plant J **59**: 359–374

Brady SM, Sarkar SF, Bonetta D, McCourt P (2003) The ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in *Arabidopsis*. Plant J **34**: 67–75

Brenac P, Horbowicz M, Downer SM, Dickerman AM, Smith ME, Obendorf RL (1997) Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize (*Zea mays* L.) seed development and maturation. J Plant Physiol **150**: 481–488

Britt AB (1996) DNA damage and repair in plants. Annu Rev Plant Biol **47**: 75–100

Brocard IM (2002) Regulation and Role of the *Arabidopsis* Abscisic Acid-Insensitive 5 Gene in Abscisic Acid, Sugar, and Stress Response. Plant Physiol **129**: 1533–1543

Brocard-Gifford IM (2003) Regulatory Networks in Seeds Integrating Developmental, Abscisic Acid, Sugar, and Light Signaling. Plant Physiol **131**: 78–92

Browne J, Tunnacliffe A, Burnell A (2002) Anhydrobiosis: plant desiccation gene found in a nematode. Nature **416**: 38–38

Buitink J, Leprince O (2008) Intracellular glasses and seed survival in the dry state. C R Biol **331**: 788–795

Buitink J, Leger JJ, Guisle I, Vu BL, Wuillème S, Lamirault G, Bars AL, Meur NL, Becker A, Küster H, et al (2006) Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. Plant J **47**: 735–750

Buitink J, Leprince O (2004) Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. Cryobiology **48**: 215–228

Buitink J, Hemminga MA, Hoekstra FA (2000) Is there a role for oligosaccharides in seed longevity? An assessment of intracellular glass stability. Plant Physiol **122**: 1217–1224

Buitink J, Walters-Vertucci C, Hoekstra FA, Leprince O (1996) Calorimetric properties of dehydrating pollen (analysis of a desiccation-tolerant and an intolerant species). Plant Physiol **111**: 235–242

Cadman CSC, Toorop PE, Hilhorst HWM, Finch-Savage WE (2006) Gene expression profiles of *Arabidopsis* Cvi seeds during cycling through dormant and non-dormant states indicate a common underlying dormancy control mechanism. Plant J **46**: 805–822

Canfield MR, Guiamét JJ, Noodén LD (1995) Alteration of soybean seedling development in darkness and light by the stay-green mutation cytG and Gd1d2. Ann Bot **75**: 143–150

Cairns NG, Pasternak M, Wachter A, Cobbett CS, Meyer AJ (2006) Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. Plant Physiol **141**: 446–455

Cantoro R, Crocco CD, Benech-Arnold RL, Rodriguez MV (2013) In vitro binding of *Sorghum bicolor* transcription factors ABI4 and ABI5 to a conserved region of a GA 2-OXIDASE promoter: possible role of this interaction in the expression of seed dormancy. J Exp Bot **64**: 5721–5735

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. Plant J **30**: 373–383

Carranco R, Espinosa JM, Prieto-Dapena P, Almoguera C, Jordano J (2010) Repression by an auxin/indole acetic acid protein connects auxin signaling with heat shock factor-mediated seed longevity. Proc Natl Acad Sci **107**: 21908–21913

Chabaud, M., Boisson-Dernier, A., Zhang, J., Taylor, C. G., Yu, O., & Barker, D. G. (2006). Agrobacterium rhizogenes-mediated root transformation. *The Medicago truncatula handbook, version November*.

Chakrabortee S, Boschetti C, Walton LJ, Sarkar S, Rubinsztein DC, Tunnacliffe A (2007) Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. Proc Natl Acad Sci **104**: 18073–18078

Châtelain E, Satour P, Laugier E, Vu BL, Payet N, Rey P, Montrichard F (2013) Evidence for participation of the methionine sulfoxide reductase repair system in plant seed longevity. Proc Natl Acad Sci **110**: 3633–3638

Chatelain E, Hundertmark M, Leprince O, Gall SL, Satour P, Deligny-Penninck S, Rogniaux H, Buitink J (2012) Temporal profiling of the heat-stable proteome during late maturation of *Medicago truncatula* seeds identifies a restricted subset of late embryogenesis abundant proteins associated with longevity: LEA proteome in developing seeds of M. *truncatula*. Plant Cell Environ **35**: 1440–1455

Chauhan H, Khurana N, Agarwal P, Khurana JP, Khurana P (2013) A seed preferential heat shock transcription factor from wheat provides abiotic stress tolerance and yield enhancement in transgenic *Arabidopsis* under heat stress environment. PloS One **8**: e79577

Chauhan H, Khurana N, Agarwal P, Khurana P (2011) Heat shock factors in rice (*Oryza sativa* L.): genome-wide expression analysis during reproductive development and abiotic stress. Mol Genet Genomics **286**: 171–187

Cheah KS, Osborne DJ (1978) DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seed. Nature **272**: 593–599

Chen H, Zhang J, Neff MM, Hong S-W, Zhang H, Deng X-W, Xiong L (2008) Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. Proc Natl Acad Sci **105**: 4495–4500

Choi, H. K., Kim, D., Uhm, T., Limpens, E., Lim, H., Mun, J. H., ... & Roe, B. A. (2004). A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics*, *166*(3), 1463-1502.

Cillard J, Cillard P (2006) Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. Ol Corps Gras Lipides **13**: 24–29

Clerkx EJ, Vries B-D, Ruys GJ, Groot SP, Koornneef M (2004) Genetic differences in seed longevity of various *Arabidopsis* mutants. Physiol Plant **121**: 448–461

Clerkx EJM (2004) Analysis of Natural Allelic Variation of *Arabidopsis* Seed Germination and Seed Longevity Traits between the Accessions Landsberg erecta and Shakdara, Using a New Recombinant Inbred Line Population. Plant Physiol **135**: 432–443

Clerkx EJM (2003) Characterization of green seed, an Enhancer of abi3-1 in *Arabidopsis* That Affects Seed Longevity. Plant Physiol **132**: 1077–1084

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, Sáez CMB, Lewis GP, Kranner I (2015) The distribution of glutathione and homoglutathione in leaf, root and seed tissue of 73 species across the three sub-families of the Leguminosae. Phytochemistry **115**: 175–183

Corbineau F, Picard MA, Fougereux J-A, Ladonne F, Côme D (2000) Effects of dehydration conditions on desiccation tolerance of developing pea seeds as related to oligosaccharide content and cell membrane properties. Seed Sci Res **10**: 329–339

Corbineau F, Bagniol S, Côme D (1990) Sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed dormancy and its regulation by ethylene. Isr J Bot **39**: 313–325

Coumans M, Come D, Gaspar T (1976) Stabilized dormancy in sugarbeet fruits. I. Seed coats as a physicochemical barrier to oxygen. Bot Gaz 274–278

Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM (1992) Anhydrobiosis. Annu Rev Physiol **54**: 579–599

Crowe LM (2002) Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **131**: 505–513

Dalmais, M., Schmidt, J., Le Signor, C., Moussy, F., Burstin, J., Savois, V., ... & Thompson, R. (2008). UTILLdb, a *Pisum sativum in silico* forward and reverse genetics tool. Genome biology, *9*(2), 1.

Dave A, Hernández ML, He Z, Andriotis VM, Vaistij FE, Larson TR, Graham IA (2011) 12-Oxo-phytodienoic acid accumulation during seed development represses seed germination in *Arabidopsis*. Plant Cell **23**: 583–599

De Giorgi J, Piskurewicz U, Loubery S, Utz-Pugin A, Bailly C, Mène-Saffrané L, Lopez-Molina L (2015) An Endosperm-Associated Cuticle Is Required for *Arabidopsis* Seed Viability, Dormancy and Early Control of Germination. PLOS Genet **11**: e1005708

Debeaujon I, Léon-Kloosterziel KM, Koornneef M (2000) Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. Plant Physiol **122**: 403–414

Dekkers BJW, He H, Hanson J, Willems LAJ, Jamar DCL, Cueff G, Rajjou L, Hilhorst HWM, Bentsink L (2016) The *Arabidopsis DELAY OF GERMINATION 1* gene affects *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 (ABI5)* expression and genetically interacts with *ABI3* during *Arabidopsis* seed development. Plant J **85**: 451–465

Dekkers BJ, Schuurmans JA, Smeekens SC (2008) Interaction between sugar and abscisic acid signalling during early seedling development in *Arabidopsis*. Plant Mol Biol **67**: 151–167

Delahaie J, Hundertmark M, Bove J, Leprince O, Rogniaux H, Buitink J (2013) LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance. J Exp Bot **64**: 4559–4573

DellaPenna D, Pogson BJ (2006) Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. Annu Rev Plant Biol **57**: 711–738

Delmas F, Sankaranarayanan S, Deb S, Widdup E, Bournonville C, Bollier N, Northey JGB, McCourt P, Samuel MA (2013) ABI3 controls embryo degreening through Mendel's I locus. Proc Natl Acad Sci **110**: E3888–E3894

Delouche JC, Caldwell WP (1960) Seed vigor and vigor tests. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. JSTOR, pp 124–129

Díaz-Martín J, Almoguera C, Prieto-Dapena P, Espinosa JM, Jordano J (2005) Functional interaction between two transcription factors involved in the developmental regulation of a small heat stress protein gene promoter. Plant Physiol **139**: 1483–1494

Djemel N, Guedon D, Lechevalier A, Salon C, Miquel M, Prosperi J-M, Rochat C, Boutin J-P (2005) Development and composition of the seeds of nine genotypes of the *Medicago truncatula* species complex. Plant Physiol Biochem **43**: 557–566

vom Dorp K, Hölzl G, Plohmann C, Eisenhut M, Abraham M, Weber APM, Hanson AD, Dörmann P (2015) Remobilization of Phytol from Chlorophyll Degradation Is Essential for Tocopherol Synthesis and Growth of *Arabidopsis*. Plant Cell **27**: 2846-2859

Du J, Wang L, Zhang X, Xiao X, Wang F, Lin P, Bao F, Hu Y, He Y (2016) Heterologous expression of two Physcomitrella patens group 3 late embryogenesis abundant protein (LEA3) genes confers salinity tolerance in *Arabidopsis*. J Plant Biol **59**: 182–193

Du Z, Zhou X, Ling Y, Zhang Z, Su Z (2010) agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. Nucleic Acids Res

Dunlop RA, Rodgers KJ, Dean RT (2002) Recent developments in the intracellular degradation of oxidized proteins 1, 2. Free Radic Biol Med **33**: 894–906

Ellis RH, Hong TD, Jackson MT (1993) Seed production environment, time of harvest, and the potential longevity of seeds of three cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). Ann Bot **72**: 583–590

Ellis RH (1991) The longevity of seeds. HortScience **26**: 1119–1125

Ellis RH, Hong TD, Roberts EH (1988) A low-moisture-content limit to logarithmic relations between seed moisture content and longevity. Ann Bot **61**: 405–408

Estavillo GM, Chan KX, Phua SY, Pogson BJ (2013) Reconsidering the nature and mode of action of metabolite retrograde signals from the chloroplast. Front Plant Sci **3**: 300

Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G (2006) Seed dormancy and the control of germination: Tansley review. New Phytol **171**: 501–523

Finkelstein R, Lynch T, Reeves W, Petitfils M, Mostachetti M (2011) Accumulation of the transcription factor ABA-insensitive (ABI) 4 is tightly regulated post-transcriptionally. J Exp Bot

Finkelstein R, Gampala SSL, Lynch TJ, Thomas TL, Rock CD (2005) Redundant and Distinct Functions of the ABA Response Loci ABA-INSENSITIVE(ABI)5 and ABRE-BINDING FACTOR (ABF)3. Plant Mol Biol **59**: 253–267

Finkelstein RR, Lynch TJ (2000) The *Arabidopsis* abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. Plant Cell **12**: 599–609

Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, Goodman HM (1998) The *Arabidopsis* abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA2 domain protein. Plant Cell **10**: 1043–1054

Finkelstein RR (1994a) Maternal effects govern variable dominance of two abscisic acid response mutations in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol 105: 1203–1208

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

Flachmann R (1997) Composition of photosystem II antenna in light-harvesting complex II antisense tobacco plants at varying irradiances. Plant Physiol **113**: 787–794

Flachmann R, Kühlbrandt W (1995) Accumulation of plant antenna complexes is regulated by post-transcriptional mechanisms in tobacco. Plant Cell **7**: 149–160

Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. J Plant Res **124**: 509–525

Gallardo, K., Lesignor, C., Darmency, M., Burstin, J., Thompson, R., Rochat, C., Boutin, JP., Kuster, H., Buitink, J., Leprince, O., Limami, A., Grusak, M. A. (2006). Seed biology of *Medicago truncatula*.

Gangl R, Tenhaken R (2016) Raffinose family oligosaccharides act as galactose stores in seeds and are required for rapid germination of *Arabidopsis* in the dark. Front Plant Sci 7: 562

Gangola MP, Jaiswal S, Kannan U, Gaur PM, Båga M, Chibbar RN (2016) Galactinol synthase enzyme activity influences raffinose family oligosaccharides (RFO) accumulation in developing chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. Phytochemistry **125**: 88–98

Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garciarrubio A, Covarrubias AA (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. J Biol Chem **275**: 5668–5674

Giraud E, Van Aken O, Ho LH, Whelan J (2009) The transcription factor ABI4 is a regulator of mitochondrial retrograde expression of ALTERNATIVE OXIDASE1a. Plant Physiol **150**: 1286–1296

Giraudat J, Hauge BM, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman HM (1992) Isolation of the *Arabidopsis* ABI3 gene by positional cloning. Plant Cell **4**: 1251–1261

Goel A, Sheoran IS (2003) Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. Biol Plant **46**: 429–434

Goldovsky L, Cases I, Enright AJ, Ouzounis CA (2005) BioLayoutJava. Appl Bioinformatics **4**: 71–74

Gonzalez-Jorge S, Mehrshahi P, Magallanes-Lundback M, Lipka AE, Angelovici R, Gore MA, DellaPenna D (2016) ZEAXANTHIN EPOXIDASE activity potentiates carotenoid degradation in maturing *Arabidopsis* seed. Plant Physiol 00604.2016

Grappin P, Bouinot D, Sotta B, Miginiac E, Jullien M (2000) Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. Planta **210**: 279–285

Gregorio J, Hernández-Bernal AF, Cordoba E, León P (2014) Characterization of evolutionarily conserved motifs involved in activity and regulation of the ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 transcription factor. Mol Plant **7**: 422–436

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

Groot SPC, Karssen CM (1987) Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. Planta **171**: 525–531

Grusak MA, DellaPenna D (1999) Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health 1. Annu Rev Plant Biol **50**: 133–161

Gurusinghe S, Bradford KJ (2001) Galactosyl-sucrose oligosaccharides and potential longevity of primed seeds. Seed Sci Res **11**: 121–134

Gutierrez L, Van Wuytswinkel O, Castelain M, Bellini C (2007) Combined networks regulating seed maturation. Trends Plant Sci **12**: 294–300

Haaning S, Radutoiu S, Hoffmann SV, Dittmer J, Giehm L, Otzen DE, Stougaard J (2008) An unusual intrinsically disordered protein from the model legume *Lotus japonicus* stabilizes proteins *in vitro*. J Biol Chem **283**: 31142–31152

Hara M, Fujinaga M, Kuboi T (2005) Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. J Exp Bot **56**: 2695–2703

Hare PD, Cress WA, Van Staden J (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. Plant Cell Environ **21**: 535–553

Haslbeck M, Buchner J (2015) Assays to characterize molecular chaperone function in vitro. Stress Responses Methods Protoc 39–51

Hay F, Timple S, van Duijn B (2015) Can chlorophyll fluorescence be used to determine the optimal time to harvest rice seeds for long-term genebank storage? Seed Sci Res **25**: 321–334

Hilhorst HWM, Karssen CM (1992) Seed dormancy and germination: the role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. Plant Growth Regul **11**: 225–238

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. Biochim Biophys Acta BBA-Biomembr **1612**: 172–177

Hoekstra et al. (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. Trends Plant Sci **6**: 431

Hoekstra FA, Haigh AM, Tetteroo FAA, Van Roekel T (1994) Changes in soluble sugars in relation to desiccation tolerance in cauliflower seeds. Seed Sci Res **4**: 143–147

Hörtensteiner S (2012) Update on the biochemistry of chlorophyll breakdown. Plant Mol Biol **82**: 505–517

Hörtensteiner S (2009) Stay-green regulates chlorophyll and chlorophyll-binding protein degradation during senescence. Trends Plant Sci **14**: 155–162

Howarth C (1989) Heat shock proteins in *Sorghum bicolor* and *Pennisetum americanum* I. Genotypic and developmental variation during seed germination. Plant Cell Environ **12**: 471–477

Howitt CA, Pogson BJ (2006) Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. Plant Cell Environ **29**: 435–445

Hsu JL, Sung JM (1997) Antioxidant role of glutathione associated with accelerated aging and hydration of triploid watermelon seeds. Physiol Plant **100**: 967–974

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. Plant J 23: 577–585

Hundertmark M, Hincha DK (2008) LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. BMC Genomics **9**: 1

Hundertmark M, Buitink J, Leprince O, Hincha DK (2011) The reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in *Arabidopsis thaliana*. Seed Sci Res **21**: 165–173

Isaacson T (2002) Cloning of tangerine from Tomato Reveals a Carotenoid Isomerase Essential for the Production of beta-Carotene and Xanthophylls in Plants. Plant Cell **14**: 333–342

Ischebeck T (2005) A Salvage Pathway for Phytol Metabolism in *Arabidopsis*. J Biol Chem **281**: 2470–2477

Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F (2002) bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. Trends Plant Sci **7**: 106–111

Jalink H, van der Schoor R, Frandas A, van Pijlen JG, Bino RJ (1998) Chlorophyll fluorescence of *Brassica oleracea* seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance. Seed Sci Res **8**: 437–443

Jia T, Ito H, Hu X, Tanaka A (2015) Accumulation of the NON-YELLOW COLORING 1 protein of the chlorophyll cycle requires chlorophyll b in *Arabidopsis thaliana*. Plant J **81**: 586–596

Jonhson-Flanagan (1994) Humidification of green canola seed leads to pigment degradation in the absence of germination. Crop Sci **34**: 1618–1623

Kagale S, Rozwadowski K (2011) EAR motif-mediated transcriptional repression in plants: an underlying mechanism for epigenetic regulation of gene expression. Epigenetics **6**: 141–146

Katagiri T, Ishiyama K, Kato T, Tabata S, Kobayashi M, Shinozaki K (2005) An important role of phosphatidic acid in ABA signaling during germination in *Arabidopsis thaliana*. Plant J **43**: 107–117

Keith K, Kraml M, Dengler NG, McCourt P (1994) fusca3: a heterochronic mutation affecting late embryo development in *Arabidopsis*. Plant Cell **6**: 589–600

Keller F, Pharr DM (1996) Metabolism of carbohydrates in sinks and sources: galactosyl-sucrose oligosaccharides. Photoassimilate Distrib Plants Crops Source-Sink Relatsh Marcel Dekker N Y 157–183

Kim W, Lee Y, Park J, Lee N, Choi G (2013) HONSU, a protein phosphatase 2C, regulates seed dormancy by inhibiting ABA signaling in *Arabidopsis*. Plant Cell Physiol pct017

Koag M-C, Wilkens S, Fenton RD, Resnik J, Vo E, Close TJ (2009) The K-segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. Plant Physiol **150**: 1503–1514

Kong Y, Chen S, Yang Y, An C (2013) ABA-insensitive (ABI) 4 and ABI5 synergistically regulate DGAT1 expression in *Arabidopsis* seedlings under stress. FEBS Lett **587**: 3076–3082

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

Koster KL, Leopold AC (1988) Sugars and desiccation tolerance in seeds. Plant Physiol **88**: 829–832

Kotak S, Port M, Ganguli A, Bicker F, Koskull-Döring V (2004) Characterization of C-terminal domains of *Arabidopsis* heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization. Plant J **39**: 98–112

Kotak S, Vierling E, Baumlein H, Koskull-Doring P v. (2007) A Novel Transcriptional Cascade Regulating Expression of Heat Stress Proteins during Seed Development of *Arabidopsis*. Plant Cell **19**: 182–195

Koussevitzky S, Nott A, Mockler TC, Hong F, Sachetto-Martins G, Surpin M, Lim J, Mittler R, Chory J (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. Science **316**: 715–719

Kovacs D, Agoston B, Tompa P (2008) Disordered plant LEA proteins as molecular chaperones. Plant Signal Behav **3**: 710–713

Kranner I, Birtić S, Anderson KM, Pritchard HW (2006) Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death? Free Radic Biol Med **40**: 2155–2165

Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. Seed Sci Res **15**: 281–307

Kurup S, Jones HD, Holdsworth MJ (2000) Interactions of the developmental regulator ABI3 with proteins identified from developing *Arabidopsis* seeds. Plant J **21**: 143–155

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

Lapinski J, Tunnacliffe A (2003) Anhydrobiosis without trehalose in bdelloid rotifers. FEBS Lett **553**: 387–390

Lazarova G, Zeng Y, Kermode AR (2002) Cloning and expression of an ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3 (ABI3) gene homologue of yellow-cedar (*Chamaecyparis nootkatensis*). J Exp Bot **53**: 1219–1221

Lee KP, Piskurewicz U, Tureckova V, Carat S, Chappuis R, Strnad M, Fankhauser C, Lopez-Molina L (2012) Spatially and genetically distinct control of seed germination by phytochromes A and B. Genes Dev **26**: 1984–1996

Lefebvre V, North H, Frey A, Sotta B, Seo M, Okamoto M, Nambara E, Marion-Poll A (2006) Functional analysis of *Arabidopsis* NCED6 and NCED9 genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. Plant J **45**: 309–319

León P, Gregorio J, Cordoba E (2013) ABI4 and its role in chloroplast retrograde communication. Front Plant Sci **3**: 304

Leon-Kloosterziel KM, Keijzer CJ, Koornneef M (1994) A seed shape mutant of *Arabidopsis* that is affected in in tegument development. Plant Cell **6**: 385–392

Li D, Mou W, Luo Z, Li L, Limwachiranon J, Mao L, Ying T (2016) Developmental and stress regulation on expression of a novel miRNA, Fan-miR73, and its target ABI5 in strawberry. Sci. Rep. 6:

Li L, Song Y, Wang K, Dong P, Zhang X, Li F, Li Z, Ren M (2015) TOR-inhibitor insensitive-1 (TRIN1) regulates cotyledons greening in *Arabidopsis*. Front. Plant Sci. 6:

Li P, Wind JJ, Shi X, Zhang H, Hanson J, Smeekens SC, Teng S (2011) Fructose sensitivity is suppressed in *Arabidopsis* by the transcription factor ANAC089 lacking the membrane-bound domain. Proc Natl Acad Sci 108: 3436–3441

Liao C-J, Lai Z, Lee S, Yun DJ, Mengiste T (2016) *Arabidopsis* HOOKLESS1 regulates responses to pathogens and abscisic acid through interaction with MED18 and acetylation of WRKY33 and ABI5 chromatin. Plant Cell tpc. 00105.2016

Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001) Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. Curr. Protoc. Food Anal. Chem.

Linkies A, Leubner-Metzger G (2011) Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. Plant Cell Rep **31**: 253–270

Lohmann C, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, Schöffl F (2004) Two different heat shock transcription factors regulate immediate early expression of stress genes in *Arabidopsis*. Mol Genet Genomics **271**: 11–21

Lopez-Molina L, Chua N-H (2000) A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol **41**: 541–547

Lopez-Molina L, Mongrand S, Chua N-H (2001) A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci **98**: 4782–4787

Lopez-Molina L, Mongrand S, Kinoshita N, Chua N-H (2003) AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. Genes Dev **17**: 410–418

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. Plant J **32**: 317–328

Lotan T, Ohto M, Yee KM, West MA, Lo R, Kwong RW, Yamagishi K, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (1998) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. Cell **93**: 1195–1205

Maia J, Dekkers BJW, Dolle MJ, Ligterink W, Hilhorst HWM (2014) Abscisic acid (ABA) sensitivity regulates desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis* seeds. New Phytol **203**: 81–93

Mailer RJ, Orchard B, Vonarx MM, Wratten N (2003) The influence of cultivar and environment on the chlorophyll concentration of Australian canola seed. Anim Prod Sci **43**: 169–176

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 Cell Physiol **50**: 243–253

Mascarenhas JP, Crone DE (1996) Pollen and the heat shock response. Sex Plant Reprod **9**: 370–374

Matile P, Hortensteiner S, Thomas H, Krautler B (1996) Chlorophyll breakdown in senescent leaves. Plant Physiol **112**: 1403

McCarty DR, Carson CB, Stinard PS, Robertson DS (1989) Molecular analysis of *viviparous-1*: an abscisic acid-insensitive mutant of maize. Plant Cell **1**: 523–532

Medford JI, Sussex IM (1989) Regulation of chlorophyll and Rubisco levels in embryonic cotyledons of *Phaseolus vulgaris*. Planta **179**: 309–315

Meinke DW, Franzmann LH, Nickle TC, Yeung EC (1994) Leafy cotyledon mutants of *Arabidopsis*. Plant Cell **6**: 1049–1064

Mène-Saffrané L, Jones AD, DellaPenna D (2010) Plastochromanol-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci **107**: 17815–17820

Miura K, Lee J, Jin JB, Yoo CY, Miura T, Hasegawa PM (2009) Sumoylation of ABI5 by the *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 negatively regulates abscisic acid signaling. Proc Natl Acad Sci **106**: 5418–5423

Mönke G, Altschmied L, Tewes A, Reidt W, Mock H-P, Bäumlein H, Conrad U (2004) Seed-specific transcription factors ABI3 and FUS3: molecular interaction with DNA. Planta **219**: 158–166

Monma M, Ito M, Saito M, Chikuni K (1994) Carotenoid components in soybean seeds varying with seed color and maturation stage. Biosci Biotechnol Biochem 58: 926–930

Moran R (1982) Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N, N-dimethylformamide. Plant Physiol **69**: 1376–1381

Morscher F, Kranner I, Arc E, Bailly C, Roach T (2015) Glutathione redox state, tocochromanols, fatty acids, antioxidant enzymes and protein carbonylation in sunflower seed embryos associated with after-ripening and ageing. Ann Bot **116**: 669–678

Müller P, Li X-P, Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. Plant Physiol **125**: 1558–1566

Nagel M, Kranner I, Neumann K, Rolletschek H, Seal CE, Colville L, FERNÁNDEZ-MARÍN B, Börner A (2015) Genome-wide association mapping and biochemical markers reveal that seed ageing and longevity are intricately affected by genetic background and developmental and environmental conditions in barley. Plant Cell Environ **38**: 1011–1022

Nakabayashi K, Okamoto M, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E (2005) Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed: Molecular profiling in *Arabidopsis* seed. Plant J **41**: 697–709

Nakajima S, Ito H, Tanaka R, Tanaka A (2012) Chlorophyll b Reductase Plays an Essential Role in Maturation and Storability of *Arabidopsis* Seeds. Plant Physiol **160**: 261–273

Nakamura S, Lynch TJ, Finkelstein RR (2001) Physical interactions between ABA response loci of *Arabidopsis*. Plant J **26**: 627–635

Nambara E, Marion-Poll A (2003) ABA action and interactions in seeds. Trends Plant Sci **8**: 213–217

Nambara E, Marion-Poll A (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. Annu Rev Plant Biol **56**: 165–185

Nambara E, Naito S, McCourt P (1992) A mutant of *Arabidopsis* which is defective in seed development and storage protein accumulation is a new *abi3* allele. Plant J **2**: 435–441

Nambara E, Okamoto M, Tatematsu K, Yano R, Seo M, Kamiya Y (2010) Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. Seed Sci Res **20**: 55–67

NDong C, Danyluk J, Wilson KE, Pocock T, Huner NP, Sarhan F (2002) Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses. Plant Physiol **129**: 1368–1381

Nguyen T-P, Cueff G, Hegedus DD, Rajjou L, Bentsink L (2015) A role for seed storage proteins in *Arabidopsis* seed longevity. J Exp Bot

Nguyen, T. P., Keizer, P., van Eeuwijk, F., Smeekens, S., & Bentsink, L. (2012). Natural variation for seed longevity and seed dormancy are negatively correlated in *Arabidopsis*. Plant physiology, 160 (**4**), 2083-2092.

Nicolle, C., Simon, G., Rock, E., Amouroux, P., & Rémésy, C. (2004). Genetic variability influences carotenoid, vitamin, phenolic, and mineral content in white, yellow, purple, orange, and dark-orange carrot cultivars. Journal of the American Society for Horticultural Science, 129 (4), 523-529.

Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. Plant Physiol **147**: 1251–1263

Niu X, Helentjaris T, Bate NJ (2002) Maize ABI4 binds coupling element1 in abscisic acid and sugar response genes. Plant Cell **14**: 2565–2575

Norris SR, Barrette TR, DellaPenna D (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. Plant Cell **7**: 2139–2149

Nover L, Bharti K, Döring P, Mishra SK, Ganguli A, Scharf K-D (2001) *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? Cell Stress Chaperones **6**: 177

Obendorf RL (1997) Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. Seed Sci Res **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

Okamoto M, Kuwahara A, Seo M, Kushiro T, Asami T, Hirai N, Kamiya Y, Koshiba T, Nambara E (2006) CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8′-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. Plant Physiol **141**: 97–107

Okamuro JK, Caster B, Villarroel R, Van Montagu M, Jofuku KD (1997) The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci **94**: 7076–7081

Olvera-Carrillo Y, Campos F, Reyes JL, Garciarrubio 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

O'Neill CM, Gill S, Hobbs D, Morgan C, Bancroft I (2003) Natural variation for seed oil composition in *Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry **64**: 1077–1090

Ooms JJ, Leon-Kloosterziel KM, Bartels D, Koornneef M, Karssen CM (1993) Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana* (a comparative study using abscisic acid-insensitive abi3 mutants). Plant Physiol **102**: 1185–1191

Pádua GPD, França-Neto JDB, Carvalho MLMD, Krzyzanowski FC, Guimarães RM (2009) Incidence of green soybean seeds as a function of environmental stresses during seed maturation. Rev Bras Sementes **31**: 150–159

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

Patel RV, Nahal HK, Breit R, Provart NJ (2012) BAR expressolog identification: expression profile similarity ranking of homologous genes in plant species. Plant J **71**: 1038–1050

Pellizzaro A, Clochard T, Cukier C, Bourdin C, Juchaux M, Montrichard F, Thany S, Raymond V, Planchet E, Limami AM (2014) The nitrate transporter MtNPF6. 8 (MtNRT1. 3) transports abscisic acid and mediates nitrate regulation of primary root growth in *Medicago truncatula*. Plant Physiol **166**: 2152–2165

Penfield S, Li Y, Gilday AD, Graham S, Graham IA (2006) *Arabidopsis* ABA INSENSITIVE4 regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm. Plant Cell **18**: 1887–1899

Perruc E, Kinoshita N, Lopez-Molina L (2007) The role of chromatin-remodeling factor PKL in balancing osmotic stress responses during *Arabidopsis* seed germination. Plant J **52**: 927–936

Peterbauer T, Lahuta LB, Blöchl 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 Physiol **127**: 1764–1772

Pogson BJ, Woo NS, Förster B, Small ID (2008) Plastid signalling to the nucleus and beyond. Trends Plant Sci **13**: 602–609

Poiatti VA, Dalmas FR, Astarita LV (2009) Defense mechanisms of Solanum tuberosum L. in response to attack by plant-pathogenic bacteria. Biol Res **42**: 205–215

Popova AV, Rausch S, Hundertmark M, Gibon Y, Hincha DK (2015) The intrinsically disordered protein LEA7 from *Arabidopsis thaliana* protects the isolated enzyme lactate dehydrogenase and enzymes in a soluble leaf proteome during freezing and drying. Biochim Biophys Acta BBA-Proteins Proteomics **1854**: 1517–1525

Potts HC, Duangpatra J, Hairston WG, Delouche JC (1978) Some influences of hardseededness on soybean seed quality. Crop Sci **18**: 221–224

Pourcel L, Routaboul J-M, Kerhoas L, Caboche M, Lepiniec L, Debeaujon I (2005) TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. Plant Cell **17**: 2966–2980

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, Castaño 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 J **54**: 1004–1014

Probert RJ, Daws MI, Hay FR (2009) Ecological correlates of *ex situ* seed longevity: a comparative study on 195 species. Ann Bot **104**: 57–69

Probert R, Adams J, Coneybeer J, Crawford A, Hay F (2007) Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. Aust J Bot **55**: 326–335

Pružinská A, Anders I, Aubry S, Schenk N, Tapernoux-Lüthi E, Müller T, Kräutler B, Hörtensteiner S (2007) *In vivo* participation of red chlorophyll catabolite reductase in chlorophyll breakdown. Plant Cell **19**: 369–387

Rajjou L, Gallardo K, Debeaujon I, Vandekerckhove J, Job C, Job D (2004) The effect of α-amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. Plant Physiol **134**: 1598–1613

Reeves WM, Lynch TJ, Mobin R, Finkelstein RR (2011) Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive(ABI)4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors. Plant Mol Biol **75**: 347–363

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 Environ **28**: 709–718

Righetti K, Vu JL, Pelletier S, Vu BL, Glaab E, Lalanne D, Pasha A, Patel RV, Provart NJ, Verdier J, et al (2015) Inference of Longevity-Related Genes from a Robust Coexpression Network of Seed Maturation Identifies Regulators Linking Seed Storability to Biotic Defense-Related Pathways. Plant Cell tpc.15.00632

Rivera-Najera LY, Saab-Rincón G, Battaglia M, Amero C, Pulido NO, García-Hernández E, Solórzano RM, Reyes JL, Covarrubias AA (2014) A group 6 late embryogenesis abundant protein from common bean is a disordered protein with extended helical structure and oligomer-forming properties. J Biol Chem **289**: 31995–32009

Rodríguez 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. Ann Bot

Rohde A, Adiles-Diaz W, Van Montagu M, Boerjan W (1998) Isolation and expression analysis of an ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3 (ABI3) homologue from Populus trichocarpa. J Exp Bot **49**: 1059–1060

Rojas A, Almoguera C, Jordano J (1999) Transcriptional activation of a heat shock gene promoter in sunflower embryos: synergism between ABI3 and heat shock factors. Plant J **20**: 601–610

Rolletschek H, Radchuk R, Klukas C, Schreiber F, Wobus U, Borisjuk L (2005) Evidence of a key role for photosynthetic oxygen release in oil storage in developing soybean seeds. New Phytol **167**: 777–786

Rolletschek H, Weschke W, Weber H, Wobus U, Borisjuk L (2004) Energy state and its control on seed development: starch accumulation is associated with high ATP and steep oxygen gradients within barley grains. J Exp Bot **55**: 1351–1359

Romanel EA, Schrago CG, Couñago RM, Russo CA, Alves-Ferreira M (2009) Evolution of the B3 DNA binding superfamily: new insights into REM family gene diversification. PloS One **4**: e5791

Ruuska SA, Schwender J, Ohlrogge JB (2004) The capacity of green oilseeds to utilize photosynthesis to drive biosynthetic processes. Plant Physiol **136**: 2700–2709

Sakuraba Y, Han S-H, Lee S-H, Hörtensteiner S, Paek N-C (2016) *Arabidopsis* NAC016 promotes chlorophyll breakdown by directly upregulating STAYGREEN1 transcription. Plant Cell Rep **35**: 155–166

Sakuraba Y, Park S-Y, Paek N-C (2015) The divergent roles of STAYGREEN (SGR) homologs in chlorophyll degradation. Mol Cells **38**: 390–395

Sakuraba Y, Jeong J, Kang M-Y, Kim J, Paek N-C, Choi G (2014) Phytochrome-interacting transcription factors PIF4 and PIF5 induce leaf senescence in *Arabidopsis*. Nat Commun **5**

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*. Plant J **54**: 608–620

Sattler SE (2004) Vitamin E Is Essential for Seed Longevity and for Preventing Lipid Peroxidation during Germination. Plant Cell **16**: 1419–1432

Scharf K-D, Berberich T, Ebersberger I, Nover L (2012) The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech **1819**: 104–119

Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, *3*(6), 1101-1108.

Schöffl F, Prändl R, Reindl A (1998) Regulation of the heat-shock response. Plant Physiol **117**: 1135–1141

Schwarzländer M, König A-C, Sweetlove LJ, Finkemeier I (2012) The impact of impaired mitochondrial function on retrograde signalling: a meta-analysis of transcriptomic responses. J Exp Bot **63**: 1735–1750

Schwender, J., Goffman, F., Ohlrogge, J. B., & Shachar-Hill, Y. (2004). Rubisco without the Calvin cycle improves the carbon efficiency of developing green seeds. *Nature*, *432*(**7018**), 779-782.

Shen-Miller J, Mudgett MB, Schopf JW, Clarke S, Berger R (1995) Exceptional Seed Longevity and Robust Growth: Ancient Sacred Lotus from China. Am J Bot **82**: 1367

Shkolnik-Inbar D, Bar-Zvi D (2010) ABI4 mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in *Arabidopsis*. Plant Cell **22**: 3560–3573

Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat Protoc **3**: 1101–1108

Shu, K., Chen, Q., Wu, Y., Liu, R., Zhang, H., Wang, S., ... & Xie, Q. (2016). ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 4 negatively regulates flowering through directly promoting *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS C transcription. *Journal of experimental botany*, *67*(**1**), 195-205.

Shu K, Zhang H, Wang S, Chen M, Wu Y, Tang S, Liu C, Feng Y, Cao X, Xie Q (2013) ABI4 regulates primary seed dormancy by regulating the biogenesis of abscisic acid and gibberellins in *Arabidopsis*. PLoS Genet **9**: e1003577

Sinniah UR, Ellis RH, John P (1998) Irrigation and seed quality development in rapid-cycling brassica: soluble carbohydrates and heat-stable proteins. Ann Bot **82**: 647–655

Soares-Cavalcanti NM, Belarmino LC, Kido EA, Pandolfi V, Marcelino-Guimarães FC, Rodrigues FA, Pereira GA, Benko-Iseppon AM (2012) Overall picture of expressed Heat Shock Factors in *Glycine max*, *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. Genet Mol Biol **35**: 247–259

Söderman 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

de Souza Vidigal D, Willems L, van Arkel J, Dekkers BJ, Hilhorst HW, Bentsink L (2016) Galactinol as marker for seed longevity. Plant Sci **246**: 112–118

Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2001) LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. Proc Natl Acad Sci **98**: 11806–11811

Stone SL, Williams LA, Farmer LM, Vierstra RD, Callis J (2006) KEEP ON GOING, a RING E3 ligase essential for *Arabidopsis* growth and development, is involved in abscisic acid signaling. Plant Cell **18**: 3415–3428

Sugliani M, Brambilla V, Clerkx EJ, Koornneef M, Soppe WJ (2010) The conserved splicing factor SUA controls alternative splicing of the developmental regulator ABI3 in *Arabidopsis*. Plant Cell **22**: 1936–1946

Sugliani, M., Rajjou, L., Clerkx, E. J., Koornneef, M., & Soppe, W. J. (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*(4), 898-908.

Sun W, Van Montagu M, Verbruggen N (2002) Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. Biochim Biophys Acta BBA-Gene Struct Expr **1577**: 1–9

Suzuki M, Wang HH-Y, McCarty DR (2007) Repression of the LEAFY COTYLEDON 1/B3 regulatory network in plant embryo development by VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3 genes. Plant Physiol **143**: 902–911

Tanaka A, Tanaka R (2006) Chlorophyll metabolism. Curr Opin Plant Biol **9**: 248–255

Tanaka R, Tanaka A (2011) Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. Biochim Biophys Acta BBA-Bioenerg **1807**: 968–976

Teixeira RN, Ligterink W, França-Neto J de B, Hilhorst HWM, da Silva EAA (2016) Gene expression profiling of the green seed problem in Soybean. BMC Plant Biol. doi: 10.1186/s12870-016-0729-0

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 Environ no-no

Terrasson E, Buitink J, Righetti K, Ly Vu B, Pelletier S, Zinsmeister J, Lalanne D, Leprince O (2013) An emerging picture of the seed desiccome: confirmed regulators and newcomers identified using transcriptome comparison. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2013.00497

Thomas H, Howarth CJ (2000) Five ways to stay green. J Exp Bot **51**: 329–337

To A, Valon C, Savino G, Guilleminot J, Devic M, Giraudat J, Parcy F (2006) A network of local and redundant gene regulation governs *Arabidopsis* seed maturation. Plant Cell **18**: 1642–1651

Tolleter 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

Trent JD (1996) A review of acquired thermotolerance, heat-shock proteins, and molecular chaperones in archaea. Fems Microbiol Rev **18**: 249–258

Upendra K, Shekhawat S, Srinivas L, Ganapathi TR (2011) MusaDHN-1, a novel multiple stress-inducible SK^ sub 3^-type dehydrin gene, contributes affirmatively to drought- and salt-stress tolerance in banana. Planta **234**: 915

Vandecasteele C, Teulat-Merah B, MorèRe-Le Paven M-C, Leprince O, Ly Vu B, Viau L, Ledroit L, Pelletier S, Payet N, Satour P, Lebras C, Gallardo K, Huguet T, Limami AM, Prosperi JM, Buitink J (2011) Quantitative trait loci analysis reveals a correlation between the ratio of sucrose/raffinose family oligosaccharides and seed vigour in *Medicago truncatula*. Plant Cell Environ **34**: 1473–1487

Verdier J, Lalanne D, Pelletier S, Torres-Jerez I, Righetti K, Bandyopadhyay K, Leprince O, Chatelain E, Vu BL, Gouzy J, et al (2013) A Regulatory Network-Based Approach Dissects Late Maturation Processes Related to the Acquisition of Desiccation Tolerance and Longevity of *Medicago truncatula* Seeds. Plant Physiol **163**: 757–774

Vierling E (1991) The roles of heat shock proteins in plants. Annu Rev Plant Biol **42**: 579–620

Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. Trends Plant Sci **9**: 244–252

Wang Z, Cheng K, Wan L, Yan L, Jiang H, Liu S, Lei Y, Liao B (2015) Genome-wide analysis of the basic leucine zipper (bZIP) transcription factor gene family in six legume genomes. BMC Genomics **16**: 1053

Waters ER, Lee GJ, Vierling E (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. J Exp Bot **47**: 325–338

Waterworth WM, Bray CM, West CE (2015) The importance of safeguarding genome integrity in germination and seed longevity. J Exp Bot erv080

Waterworth WM, Masnavi G, Bhardwaj RM, Jiang Q, Bray CM, West CE (2010) A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity: Characterization of *Arabidopsis* DNA ligase 6. Plant J **63**: 848–860

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 Physiol **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

Weitbrecht K, Müller K, Leubner-Metzger G (2011) First off the mark: early seed germination. J Exp Bot **62**: 3289–3309

Whistance GR, Threlfall DR (1970) Biosynthesis of phytoquinones. Homogentisic acid: a precursor of plastoquinones, tocopherols and α-tocopherolquinone in higher plants, green algae and blue–green algae. Biochem J **117**: 593–600

Wise MJ, Tunnacliffe A (2004) POPP the question: what do LEA proteins do? Trends Plant Sci **9**: 13–17

Wolkers WF, McCready S, Brandt WF, Lindsey GG, Hoekstra FA (2001) Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. Biochim Biophys Acta BBA-Protein Struct Mol Enzymol **1544**: 196–206

Woodson JD, Chory J (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. Nat Rev Genet **9**: 383–395

Woodward RB (1961) The total synthesis of chlorophyll. Pure Appl Chem **2**: 383–404

Wu J, Seng S, Sui J, Vonapartis E, Luo X, Gong B, Liu C, Wu C, Liu C, Zhang F (2015) Gladiolus hybridus ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 (GhABI5) is an important transcription factor in ABA signaling that can enhance Gladiolus corm dormancy and *Arabidopsis* seed dormancy. Front. Plant Sci. 6:

Xu D, Li J, Gangappa SN, Hettiarachchi C, Lin F, Andersson MX, Jiang Y, Deng XW, Holm M (2014) Convergence of Light and ABA Signaling on the ABI5 Promoter. PLoS Genet **10**: e1004197

Xu X, Chi W, Sun X, Feng P, Guo H, Li J, Lin R, Lu C, Wang H, Leister D (2015) Convergence of light and chloroplast signals for de-etiolation through ABI4-HY5 and COP1. Nat Plants **2**: 16066–16066

Yamasaki K, Kigawa T, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S (2013) DNA-binding domains of plant-specific transcription factors: structure, function, and evolution. Trends Plant Sci **18**: 267–276

Yan F, Deng W, Wang X, Yang C, Li Z (2012) Maize (Zea mays L.) homologue of ABA-insensitive (ABI) 5 gene plays a negative regulatory role in abiotic stresses response. Plant Growth Regul **68**: 383–393

Yang Y, Yu X, Song L, An C (2011) ABI4 activates DGAT1 expression in *Arabidopsis* seedlings during nitrogen deficiency. Plant Physiol **156**: 873–883

Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. Plant J **61**: 672–685

Young AJ (1991) The photoprotective role of carotenoids in higher plants. Physiol Plant **83**: 702–708

Yu B, Gruber MY, Wei S, Zhou R, Hegedus D, Khachatourians GG, Hannoufa A (2016) Global gene expression and secondary metabolite changes in *Arabidopsis thaliana* ABI4 over-expression lines. Botany

Yu F, Wu Y, Xie Q (2015) Precise protein post-translational modifications modulate ABI5 activity. Trends Plant Sci **20**: 569–575

Zhang L, Kusaba M, Tanaka A, Sakamoto W (2016) Protection of Chloroplast Membranes by VIPP1 Rescues Aberrant Seedling Development in *Arabidopsis* nyc1 Mutant. Front. Plant Sci. 7:

Zhou X, Yuan F, Wang M, Guo A, Zhang Y, Xie CG (2013) Molecular characterization of an ABA insensitive 5 orthologue in Brassica oleracea. Biochem Biophys Res Commun **430**: 1140–1146

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 Mol Biol **66**: 675–683

Ouvrages

Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H (2013) Longevity, Storage, and Deterioration. Seeds Physiol. Dev. Germination Dormancy 3rd Ed. Springer New York, New York, NY, pp 341–376

Chatelain E (2012) Contribution à la caractérisation des phases tardives de la maturation des graines de *Medicago truncatula* : une étude physiologique et biochimique pour comprendre la longévité. Thèse. Université d'Angers, Angers

Terrasson E (2013) Régulation des qualités physiologique et sanitaire de la graine de *Medicago truncatula*: rôles de MtABI5 et transmission des Xanthomonas aux semences

8. Sitographie

[1] http://www.gnis.fr/

[2] http://www.worldseed.org/resources/seed-statistics/

[3] http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi) (08/2016)

[4] http://legumetfdb.psc.riken.jp/ (15/09/2016)

[5] http://bar.utoronto.ca/efpmedicago/

[6] http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/

[7] http://itol.embl.de/tree/1479912724289861470737051

[8] http://jcvi.org/medicago/

[9] http://bar.utoronto.ca/expressolog_treeviewer/

[10] http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php

[11] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/

[12] https://www.legoo.org/

[13] http://www.softberry.com/

[14] https://www.arabidopsis.org/

RÉSUMÉ *ABSTRACT*

La phase de maturation des graines est caractérisée par l'acquisition successive de composantes qui constituent la qualité physiologique d'un lot de semences, à savoir la tolérance à la dessiccation (capacité à survivre au retrait total de l'eau cellulaire), la longévité (capacité de survivre à l'état sec pendant le stockage), la dormance ainsi que la vigueur germinative (capacité à germer de façon rapide et homogène quelques soient les conditions de l'environnement). La production de semences à haute qualité germinative représente un enjeu majeur pour les semenciers car elle constitue un levier clef pour augmenter les rendements agricoles. Cependant, les mécanismes régulant l'acquisition de la qualité germinative et en particulier la longévité restent peu connus. Une étude préalable d'un réseau de co-expression génique de facteurs de transcription avait identifié trois gènes candidats associés à la longévité chez *Medicago truncatula : MtABL (ABA INSENSITIVE4-LIKE), MtABI5 (ABA INSENSITIVE5)* et *MtHSFA2.2 (HEAT SHOCK FACTOR A2.2)*. L'objectif de cette thèse était de valider ces gènes et d'en comprendre leur fonction chez *Medicago truncatula* et le pois par la caractérisation de mutants d'insertion et EMS. ABL et ABI5 jouent un rôle dans la maturation en régulant positivement la longévité alors que celle-ci n'est pas affectée dans les mutants *hsfa2.2*. Des études transcriptomiques et biochimiques montrent que ABL et ABI5 régulent de manière complexe la photosynthèse, la dégradation de la chlorophylle et l'accumulation des oligosaccharides de la famille du raffinose. De plus, ABI5 joue un également un rôle dans l'accumulation de protéines protectrices de type LEA. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives en établissant un lien entre la régulation de composés antinutritionnels et qualité germinative chez les légumineuses.

Mots-clefs : *Medicago truncatula*, maturation de la graine, longévité, dormance, ABA, ABI5, HSFA9, ABI4.

Seed maturation is characterized by the acquisition of the various components that collectively constitute the physiological quality or vigor of the seed: desiccation tolerance (DT, i.e. the capacity to survive complete drying), seed storability or longevity (the capacity to remain alive during storage), dormancy, as well as fast and uniform germination and seedling emergence under stressful conditions. These traits are pivotal to ensure rapid and homogenous seedling establishment required for stable yield and are a major economic challenge for the seed industry. Despite their agronomic importance, the mechanisms regulating their acquisition, including longevity, are still poorly understood. In Medicago truncatula, a gene co-expression network inferred that transcription factors such as MtABL (ABA INSENSITIVE4-LIKE), MtABI5 (ABA INSENSITIVE5) *and* MtHSFA2.2 (HEAT SHOCK FACTOR A2.2) *are putative regulators of seed longevity. The aim of this thesis was to characterize their roles in* Medicago truncatula *and* Pisum sativum *using* Tnt1 *insertion and EMS mutants. ABL and ABI5 are positive regulators of longevity while defects in* hsfa2.2 *do not affect it. Transcriptomic and biochemical analyses show that ABL and ABI5 are involved in the regulation of photosynthesis associated genes, chlorophyll loss and accumulation of raffinose family oligosaccharides (RFO). ABI5 is also involved in the accumulation of stress proteins such as LEA proteins. By establishing a link between degreening, RFO contents and longevity, our work offers new opportunities to tackle anti-nutritional characteristics of grain legumes.*

Keywords: Medicago truncatula*, seed maturation, longevity, dormancy, ABA, ABI5, HSFA9, ABI4.*

AGROCAMPUS OUEST • Institut supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
65 rue de Saint-Brieuc – CS84215 – F-35042 Rennes Cedex
Tél. : 02 23 48 50 00
www.agrocampus-ouest.fr