

N° ORDRE :

THESE

présentée à

Toulouse III - Université Paul Sabatier

en vue de l'obtention du

Doctorat de l'Université

Spécialité : Biosciences Végétales

par

Frédéric MASCLAUX

**Analyse fonctionnelle d'une famille de récepteurs
d'adressage vacuolaire (BP80) chez les plantes par
différentes approches de génétique inverse**

-

**Mise en évidence d'un rôle
dans le processus de germination**

Soutenue le 19 mars 2004 devant la commission d'examen :

M. Pierre Rougé	Professeur, Université, Toulouse	Président
Mme Nadine Paris	Chargée de Recherche, CNRS, Rouen	Rapporteur
M. Dominique Job	Directeur de Recherche, CNRS, Lyon	Rapporteur
M. Jean-Marc Neuhaus	Professeur, Université, Neuchâtel, Suisse	Examineur
M. Rafaël Pont-Lezica	Professeur, Université, Toulouse	Examineur
M. Jean-Philippe Galaud	Maître de Conférences, Université, Toulouse	Examineur

Unité Mixte de Recherche CNRS-UPS n°5546
« Surfaces Cellulaires et Signalisation chez les Végétaux »
Pôle de Biotechnologies Végétales – BP 17
24, Chemin de Borde-Rouge – F-31326 Castanet-Tolosan

Ecole doctorale Biologie-Santé-Biotechnologies, Université Paul Sabatier, Toulouse III

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Mme Nadine Paris et M. Dominique Job d'avoir accepté de juger ce travail et à M. Jean-Marc Neuhaus et M. Pierre Rougé d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je remercie M. Rafaël Pont-Lezica de m'avoir accueilli au sein de son équipe pour la réalisation de cette thèse, et également pour ses précieux conseils tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier Jean-Philippe Galaud pour avoir suivi ce travail de thèse avec attention, pour m'avoir laissé toute la liberté d'innovation et d'orientation dont j'avais besoin, et aussi pour son soutien constant.

J'adresse mes remerciements aux membres des équipes « Stress abiotiques » et « Paroi » pour tout ce qu'ils ont pu m'apporter pendant ces années. Merci particulièrement à Caroline Roldan et Arnaud Serin pour leur participation importante dans ce travail. Merci à Anne pour notre collaboration indispensable. Merci à Jordan, Fabienne, Elian, Adriana, Martine, Didier, Hervé, Elisabeth, Benoît.

Mes remerciements vont aussi à Celia Knight, Andy Cuming et Bev Merry pour m'avoir initié à l'utilisation de la mousse dans leur laboratoire à Leeds, et aussi pour avoir contribué à la réalisation de la partie « mousse » de ce travail de thèse.

J'adresse mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé à cette thèse par leurs conseils ou leur assistance :

. Corinne Delalande, Andreas Niebel, Benoît Veron, Taku Takahashi, Alain Latché ;

. l'équipe de Dominique Roby ;

. l'ensemble du service commun de l'UMR 5546, notamment Patricia et Jean-Louis, qui ont pris soin de mes plantes, Catherine qui a accepté de nombreuses commandes de dernière minute, Gisèle et Michel pour les aspects de biochimie des protéines ;

. Alain Jauneau et Yves Martinez de l'IFR40 pour les analyses microscopiques.

Merci à tous ceux qui m'ont témoigné leur amitié au cours de ces trois années, merci notamment à Anne ; à Mat le mauvais joueur ; à Séverine ; à Arnaud ; à Aurel.

Merci à ma famille pour leur confiance et leur soutien.

Ce travail a pu être réalisé grâce au support financier du Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie et du programme européen Marie Curie.

Résumé

La grande majorité des protéines sont synthétisées dans le cytosol et doivent être transportées spécifiquement jusqu'à leur localisation finale par des systèmes de tri et d'adressage pour y exercer leur rôle. Les protéines BP80 (*Binding Protein of 80 kDa*) sont considérées comme les récepteurs permettant l'adressage vers la vacuole lytique de protéines provenant du Golgi. Les gènes codant les protéines BP80 existent chez la plupart des espèces végétales sous forme d'une famille multigénique. Bien que les données *in vitro* indiquent qu'elles agissent comme des récepteurs d'adressage vacuolaire, aucune donnée n'a été obtenue sur leur rôle *in planta*. L'objectif de ce travail vise à réaliser l'analyse fonctionnelle *in planta* des gènes *AtBP80* chez *Arabidopsis thaliana*. Dans une première partie, il a été montré que tous les gènes *AtBP80* sont transcrits et présentent un profil d'expression spécifique au cours du développement. L'analyse de plantes antisens, pour lesquelles tous les gènes *AtBP80* sont éteints, montre que ces protéines sont indispensables au processus de germination. Afin de préciser le rôle individuel de certains membres, l'analyse fonctionnelle du gène *AtBP80a* a été réalisée par l'étude du mutant *vsr-a* présentant une insertion ADN-T dans le promoteur. A l'état homozygote, les graines *vsr-a* présentent des anomalies tégumentaires et une dormance accrue par rapport à des graines sauvages. Cependant, ces phénotypes ne sont pas héréditaires selon les lois de génétique mendélienne car ils ne sont observés que pour des graines homozygotes descendantes d'un individu hémizygote pour l'insertion. Cette instabilité du phénotype suggère une régulation épigénétique de type MSUD (*meiotic silencing by unpaired DNA*) qui pourrait être dépendante de la méthylation de l'ADN. Dans une dernière partie, deux approches alternatives ont été développées : (i) des plantes transformées avec des constructions RNAi spécifiques sous le contrôle d'un promoteur constitutif ou d'un promoteur inductible ont été générées et (ii) des mutants *knock-out* pour le gène *PpBP80.1* ont été récemment obtenus chez la mousse *Physcomitrella patens* par recombinaison homologue. Les lignées RNAi et les mutants *knock-out* constituent de nouveaux outils en vue de comprendre le rôle *in planta* des protéines BP80. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail montrent l'implication des protéines BP80 dans le processus de germination et suggèrent l'existence de plusieurs rôles dans la famille BP80.

Mots-clés : Analyse fonctionnelle, *Arabidopsis thaliana*, BP80, germination, mutant insertionnel, *Physcomitrella patens*, régulation épigénétique, RNAi, *vacuolar sorting receptor*.

Abstract

Most proteins are synthesized in the cytosol and have to be specifically targeted to their final location by sorting systems. BP80 (Binding Protein of 80 kDa) proteins are considered as the receptors for sorting to the lytic vacuole. The genes coding BP80 proteins are organized as a multigenic family in most plant species. Although *in vitro* data point out for a function as vacuolar sorting receptors, no evidence has been obtained on their role *in planta*. The objective of this thesis is to analyze the *in planta* function of the *Arabidopsis thaliana* *AtBP80* gene family. In the first part, it was shown that all the *AtBP80* genes are transcribed and have a specific expression pattern during development. The analysis of antisense plants, for which all the *AtBP80* genes are silenced, shows that these proteins are required for germination. In order to precise the role of certain members, a functional analysis of the *AtBP80a'* gene was done using a mutant (*vsr-a'*) with a T-DNA insertion in the promoter. At the homozygous state, the *vsr-a'* seeds present tegument abnormalities and an increased dormancy compared to wild-type seeds. However, these phenotypes are not inherited in accordance with mendelian laws because they are observed only for homozygous seeds coming from an hemizygous plant. This phenotype instability suggests an MSUD-like (Meiotic Silencing by Unpaired DNA) epigenetic regulation that can be linked to DNA methylation. In the last part, two alternative approaches were developed: (i) plants carrying specific RNAi constructs controlled by constitutive or inducible promoters were created and (ii) *PpBP80.1* knock-out mutants were obtained in the moss *Physcomitrella patens* using homologous recombination. RNAi lines and moss knock-out mutants constitute new tools to investigate the BP80 proteins *in planta* role. All the results obtained in this work indicate the implication of BP80 proteins in germination and suggest the existence of several roles in the BP80 family.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, BP80, functional analysis, germination, insertional mutant, *Physcomitrella patens*, epigenetic control, RNAi, vacuolar sorting receptor.

Table des matières

Abréviations	10
Introduction.....	12
1. L'adressage des protéines dans les cellules végétales	13
1.1. Transport nucléo-cytoplasmique <i>via</i> les pores nucléaires	14
1.2. Transports transmembranaires	15
1.2.1. Vers la mitochondrie	15
1.2.2. Vers le chloroplaste	16
1.2.3. Vers le peroxysome.....	17
1.2.4. Vers le réticulum endoplasmique (RE)	18
1.3. Transport vésiculaire dans le système sécrétoire.....	19
1.4. Stratégies pour étudier l'adressage des protéines.....	21
2. La vacuole et l'adressage des protéines	22
2.1. La vacuole dans la cellule végétale.....	22
2.2. L'adressage des protéines solubles aux vacuoles	23
2.2.1. Les voies et les signaux d'adressage aux vacuoles.....	23
2.2.2. Les protéines BP80	24
3. Objectifs du travail de thèse	27
 Chapitre 1 - Mise en évidence du rôle de la famille AtBP80 dans le processus de germination	 29
1. Publication	30
2. Résumé de l'article et données complémentaires	40
2.1. Tous les membres de la famille <i>AtBP80</i> sont transcrits.....	40
2.2. Implication des protéines AtBP80 dans le processus de germination	40
2.3. Quels sont les rôles de la famille AtBP80 ?	41
2.4. Vers la détermination du rôle individuel de chaque membre.....	42

Chapitre 2 - Analyse fonctionnelle du gène *AtBP80a'* par l'étude d'un mutant d'insertion ADN-T chez *Arabidopsis thaliana* 44

1. Recherche de mutants d'insertion pour les gènes <i>AtBP80</i> 45	
1.1. Criblage par PCR de la collection de lignées ADN-T de l'INRA de Versailles. 45	
1.2. Recherche <i>in silico</i> de mutants knock-out 46	
2. Caractérisation préliminaire des mutants 46	
2.1. Etude préliminaire des mutants <i>vsr-d</i> et <i>vsr-f</i> 46	
2.2. Etude préliminaire du mutant potentiel <i>vsr-c</i> 47	
3. Caractérisation moléculaire et phénotypique du mutant <i>vsr-a'</i> 48	
3.1. Analyse de ségrégation et analyse moléculaire 48	
3.2. Analyses macroscopique et cytologique des graines 49	
3.3. Est-ce que l'inaptitude à germer des graines <i>vsr-a'</i> est réversible ? 52	
3.3.1. Est-ce que les graines <i>vsr-a'</i> présentent un retard de germination ? 53	
3.3.2. Effet de la stratification sur la germination des graines..... 53	
3.3.3. Evaluation de la dormance des graines mutantes 54	
3.3.4. Études des facteurs régulant la dormance des graines 55	
3.3.5. Bilan des tests de germination 56	
3.4. Analyse des lignées homozygotes 57	
3.5. Hypothèse du mécanisme épigénétique..... 58	
3.5.1. Application théorique du modèle de MSUD au mutant <i>vsr-a'</i> 59	
3.5.2. Influence de l'ADN-T sur l'expression du gène <i>AtBP80a'</i> 60	
3.5.3. Confirmation expérimentale du modèle par <i>back-cross</i> 61	
3.5.4. Analyse de la méthylation de la région 5' du gène <i>AtBP80a'</i> 61	
3.6. Bilan de l'étude du mutant <i>vsr-a'</i> 62	

Chapitre 3 - Analyse fonctionnelle des gènes *BP80 in planta* par des approches alternatives de génétique inverse..... 66

1. Extinction spécifique et contrôlée des gènes <i>AtBP80a</i> et <i>AtBP80a'</i> par la stratégie RNAi chez <i>A. thaliana</i>..... 67	
1.1. Mise au point d'un système de RNAi inducible 68	
1.1.1. Expression constitutive de la construction <PDS> 69	
1.1.2. Expression inducible de la construction <PDS>..... 69	
1.2. Etude des gènes <i>AtBP80a</i> et <i>AtBP80a'</i> par RNAi 70	

1.2.1. Analyse des lignées p35S-<AtBP80a> et p35S-<AtBP80a'>	71
1.2.2. Analyse des lignées pHsp18.2-<AtBP80a> et pHsp18.2-<AtBP80a'>	71
1.2.3. Conclusions	72
2. Obtention de mutants <i>bp80</i> par recombinaison homologue chez la mousse	
<i>Physcomitrella patens</i>	73
2.1. La mousse comme modèle végétal de génomique fonctionnelle	73
2.2. Isolement de gènes <i>BP80</i> chez la mousse	74
2.3. Obtention de mutants <i>knock-out bp80.1</i>	75
2.3.1. Obtention de mousses transformées	75
2.3.2. Identification des mutants <i>bp80.1</i> parmi les transformants	76
2.4. Analyse préliminaire des mutants	76
2.5. Etude de l'adressage vers la vacuole	77
2.6. Conclusions	78
Discussion Générale	79
Matériel et Méthodes.....	86
1. Matériel.....	87
1.1. Matériel végétal et conditions de culture.....	87
1.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	87
1.1.2. <i>Physcomitrella patens</i>	87
1.2. Souches bactériennes	88
1.2.1. <i>Escherichia coli</i> DH5α	88
1.2.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101::pMP90.....	88
2. Techniques générales de biologie moléculaire	89
2.1. Extraction de l'ADN génomique d' <i>Arabidopsis</i>	89
2.2. Extraction d'ARN	89
2.3. Rétrotranscription (RT)	90
2.4. Dosage des acides nucléiques.....	90
2.5. Amplification d'ADN par PCR	90
2.6. Clonage des produits PCR	90
2.7. Mini-préparation de plasmides.....	91
2.8. Séquençage	91

2.9. Préparation de bactéries <i>E. coli</i> DH5α compétentes	91
2.10. Transformation des bactéries DH5α compétentes.....	91
2.11. Préparation d'Agrobactéries compétentes	92
2.12. Transformation des Agrobactéries compétentes	92
3. Transformation d'<i>Arabidopsis</i>	92
4. Conditions pour les tests de germination	93
5. Tests de dormance	94
6. Préparation des graines pour observation.....	94
6.1. Microscopie électronique à balayage	94
6.2. Microscopie optique	95
6.3. Coloration au rouge de ruthénium	95
7. Caractérisation moléculaire du mutant <i>vsr-a'</i>	95
7.1. Evaluation du nombre de copies d'ADN-T (Southern Blot)	95
7.2. Analyse de l'insertion / géotypage	96
8. Analyses d'expression chez le mutant <i>vsr-a'</i>	97
8.1. RT-PCR standard	97
8.2. RT-PCR quantitative.....	97
9. Analyse de la méthylation de l'ADN.....	97
9.1. Traitement de l'ADN au bisulfite de sodium.....	98
9.2. Amplification de l'ADN traité.....	98
9.3. Analyse des séquences	98
10. Génération des constructions RNAi.....	99
11. Induction des constructions RNAi.....	99
12. Méthodes relatives à l'utilisation de la mousse <i>P. patens</i>	100
12.1. Extraction des acides nucléiques de mousse	100
12.1.1. Extraction d'ADN	100
12.1.2. Extraction d'ARN	100
12.2. Construction des vecteurs de remplacement	101
12.3. Transformation de la mousse <i>P. patens</i>	101
12.3.1. Obtention des protoplastes.....	101
12.3.2. Transformation des protoplastes	102
12.3.3. Sélection des transformants stables.....	102
12.3.4. Analyse moléculaire des transformants.....	102

Références bibliographiques	104
Annexes.....	113

Abréviations

ABA	Acide abscissique
ADNc	ADN complémentaire
ADN-T	ADN transféré
BET	Bromure d'éthidium
BP80	<i>Binding protein of 80 kDa</i>
CCV	Vésicule recouverte de clathrine
COPI	Vésicule à manteau de protéines I
COPII	Vésicule à manteau de protéines II
CTAB	<i>Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide</i>
CTPP	<i>C-terminal propeptide</i>
dNTP	2'-désoxyribonucléoside-5'-triphosphate
DO	Densité optique
dsRNA	<i>double stranded RNA</i>
DV	Vésicule dense
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELP	<i>EGF-like protein</i>
ERES	ERES pour <i>Endoplasmic Reticulum Exit Sites</i>
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
FST	<i>Flanking Sequence Tag</i>
GA	Acide gibbérellique
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Graines HSH	Graines hémizygotes-sauvages-homozygotes
kb	Kilobase
LV	Vacuole lytique
Mb	Mégabase
MPP	<i>mitochondrial processing peptidase</i>
MPR	<i>Mannose-6-phosphate receptor</i>
mPTS	<i>membranes Peroxisomal Targeting Signal</i>
MSUD	<i>Meiotic silencing by unpaired DNA</i>
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
NPC	<i>Nuclear Pore complex</i>
<i>nptII</i>	Néomycine phosphotransférase II
nt	Nucleotides
NTPP	<i>N-terminal propeptide</i>
PAC	<i>Precursor-ACcumulating</i>
pb	Paires de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDS	Phytoène désaturase
PEG	Polyéthylèneglycol
PSV	Vacuole de réserve
PTGS	<i>Post-transcriptional gene silencing</i>
PTS	<i>Peroxisomal Targeting Signal</i>
RdRP	<i>RNA-dependant RNA polymerase</i>

RE	Réticulum endoplasmique
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNAi	<i>RNA interference</i>
rpm	Rotation par minute
RT	Rétrotranscription
SDS	dodécylsulfate de sodium
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor adaptator protein</i>
SPP	<i>Stromal Processing Peptidase</i>
SRP	<i>Signal recognition particle</i>
TGN	<i>Trans-Golgi Network</i>
TIC	<i>Translocons at the Inner membrane of Chloroplasts</i>
TIM	<i>Translocons of the Inner Membrane</i>
TIP	<i>Tonoplast Intrinsic Protein</i>
TOC	<i>Translocons at the Outer membrane of Chloroplasts</i>
TOM	<i>Translocons of the Outer Membrane</i>
Tris	Tris[hydroxyméthyl]amino-méthane
UTR	<i>Untranslated Region</i>
Vps10p	<i>Vacuolar protein sorting 10 protein</i>
VSD	<i>Vacuolar Sorting Determinant</i>
WT	<i>Wild-type (sauvage)</i>



Introduction

Les protéines ont une multitude de rôles dans la cellule. Certaines, par exemple, participent à l'élaboration du squelette cellulaire, tandis que d'autres participent à des réactions chimiques spécifiques par leur fonction enzymatique. Les cellules eucaryotes sont organisées en plusieurs compartiments qui assurent chacun un rôle essentiel dans la cellule. Ainsi, le noyau contient la plus grande part de l'information génétique et contrôle le fonctionnement de la cellule, alors que les mitochondries et les chloroplastes peuvent être considérés comme des centrales énergétiques. Chaque organe doit recevoir un ensemble spécifique de protéines qui sont indispensables à son fonctionnement. Des systèmes de tri et d'adressage doivent prendre en charge les protéines nouvellement synthétisées afin de les transporter spécifiquement vers l'emplacement sub-cellulaire où elles assurent leurs rôles.

Cette introduction décrira dans une première partie les différents systèmes de tri et d'adressage des protéines aux compartiments cellulaires chez les plantes. Le système vacuolaire de la plante et les mécanismes d'adressage qui s'y rapportent seront examinés en détail dans une deuxième partie de l'introduction.

1. L'adressage des protéines dans les cellules végétales

La majorité des protéines sont codées par le génome nucléaire. Les ARNm, transcrits à partir des gènes, sont exportés dans le cytosol où ils vont servir de matrice pour la synthèse des protéines. Les protéines cytoplasmiques sont directement produites sur leur lieu de fonctionnement et n'ont donc pas besoin d'être transportées. Mais beaucoup de protéines doivent atteindre leur localisation finale qui chez les plantes correspondent principalement à la mitochondrie, aux plastes, au peroxysome, au noyau, au réticulum endoplasmique, au Golgi, au système vacuolaire, à la membrane plasmique et au milieu extracellulaire (figure 1). Cette multitude de localisation nécessite des systèmes de tri et d'adressage capables de transporter spécifiquement les protéines vers le compartiment adéquat. La figure 2 résume les différents types de transports retrouvés dans une cellule végétale.

Chaque organe possède un système de tri et d'adressage spécifique. Chaque système doit être capable d'identifier les protéines qu'il doit transporter, ce qui nécessite que chaque protéine soit « étiquetée ». Les protéines possèdent un ou plusieurs signaux d'adressage spécifiques définis par des peptides courts, par des motifs d'acides aminés ou par des signaux de type conformationnel. Pour atteindre sa destination, une protéine doit souvent traverser une ou plusieurs membranes par un processus appelé 'translocation'. Les systèmes de tri et d'adressage possèdent des pores ou des canaux par lesquels les protéines vont transiter. Pour traverser les pores ou les canaux, les protéines doivent se trouver sous une forme non repliée. Des protéines de la famille des *Heat-Shock Protein*, appelées chaperonnes moléculaires,

maintiennent les protéines nouvellement synthétisées dans une conformation linéaire leur permettant d'être acheminées d'un compartiment à un autre. D'autres chaperonnes, présentes dans le compartiment receveur, réceptionnent les protéines à leur arrivée pour faciliter leur repliement en une conformation fonctionnelle. La plupart des systèmes d'adressage nécessitent de l'énergie pour le transport ou la fixation des protéines. Cette énergie est généralement fournie sous forme d'ATP et/ou de GTP. Certains systèmes utilisent le gradient de pH existant entre les deux compartiments.

1.1. Transport nucléo-cytoplasmique via les pores nucléaires

Le compartiment nucléaire est délimité par l'enveloppe nucléaire qui est formée de deux membranes concentriques en continuité avec le réticulum endoplasmique. L'enveloppe nucléaire est perforée par des pores nucléaires à la jonction des membranes externe et interne. Chaque pore est formé par une structure appelée le complexe du pore nucléaire, qui est composée d'au moins 100 protéines différentes. Ces pores permettent aux molécules solubles dans l'eau (ions, petites protéines,...) de traverser l'enveloppe nucléaire par diffusion passive, mais seulement si leur taille est inférieure à 9 nm. Pour les protéines de taille supérieure, un mécanisme sélectif permet leur importation dans le noyau. Les protéines qui doivent être importées possèdent un signal d'adressage appelé NLS (*Nuclear Localization Signal*) qui est un motif court, composé d'acide aminés basiques (par exemple : Lys-Lys-Lys-Arg-Lys). Le motif NLS, dont la position peut varier dans la séquence, n'est pas éliminé au cours de la translocation, ce qui confère à la protéine la possibilité d'être réimportée à plusieurs reprises.

L'import des protéines à travers l'enveloppe nucléaire nécessite deux étapes successives : une étape de reconnaissance du motif NLS par les importines libres dans le cytosol et la translocation par l'intermédiaire du complexe du pore nucléaire (figure 3). De façon générale, l'importine α se lie au motif NLS puis l'importine β permet la liaison au complexe du pore nucléaire. Cette étape permet de sélectionner les protéines importées dans le noyau. La protéine traverse le pore nucléaire grâce à l'intervention de la protéine Ran. La protéine est ensuite libérée dans le noyau et les importines et la protéine Ran sont alors recyclées vers le cytosol.

Il existe aussi un mécanisme d'exportation qui se fait selon un procédé similaire mais qui fait intervenir des exportines à la place des importines. Dans ce cas, le signal d'adressage est un motif NES (*Nuclear Export Signal*). Les protéines peuvent ainsi être importées ou exportées de façon contrôlée, ce qui offre un niveau de régulation supplémentaire. En effet, la disponibilité des motifs NLS et NES peut être modifiée par des phosphorylations ou par la liaison à d'autres protéines qui masquent ces motifs. Ce dernier point peut être illustré par

l'exemple du facteur de transcription appelé Pho4 chez la levure. Pho4 est un facteur de transcription qui intervient dans la réponse à une carence de phosphate et qui peut être phosphorylé à quatre sites. Les différentes possibilités de phosphorylation modulent l'import et l'export de Pho4 dans le noyau et contrôlent ainsi sa localisation (Merkle, 2001).

(Alberts et al., 1994; Smith and Raikhel, 1998; Buchanan et al., 2000; Merkle, 2001)

1.2. Transports transmembranaires

Le transport transmembranaire concerne quatre organites : la mitochondrie, le chloroplaste, le peroxyosome et le réticulum endoplasmique. Il nécessite la présence d'un complexe protéique qui forme un canal dans la membrane et qui est capable de réaliser spécifiquement la translocation des protéines à adresser.

1.2.1. Vers la mitochondrie

Les mitochondries sont présentes dans quasiment toutes les cellules eucaryotes où elles assurent la respiration cellulaire. Bien qu'elles possèdent leur propre génome et leur propre machinerie de traduction, la majorité des protéines qu'elles contiennent sont importées du cytosol. La mitochondrie s'organise en quatre sous-compartiments : deux sous-compartiments aqueux (espace intermembranaire et matrice) et deux membranes (membrane externe et membrane interne). Deux types de signaux d'adressage ont été décrits : les 'préséquences' et les 'signaux internes'. La préséquence est un domaine N-terminal de la protéine composé de 10 à 80 acides aminés le plus souvent basiques, hydrophobes ou hydroxylés. Ce domaine forme une hélice amphipathique α avec une face positive et une face hydrophobe. Le deuxième type de signal, le signal interne, est dissimulé dans la protéine au niveau d'acides aminés importants pour le repliement ou pour la fonction. Ces signaux ne sont pas encore bien caractérisés et il semble qu'ils soient répartis sur toute la longueur de la protéine.

Une protéine possédant une préséquence se lie à un récepteur spécifique localisé sur la membrane externe de la mitochondrie (figure 4). Ce récepteur dirige la protéine vers le complexe TOM (*Translocons of the Outer Membrane*) qui assure la translocation vers l'espace intermembranaire. La protéine est ensuite reconnue et prise en charge par le complexe TIM23 (*Translocons of the Inner Membrane 23*). Dans la plupart des cas, le complexe TIM23 permet la translocation de la protéine à travers la membrane interne. Mais certaines protéines possèdent des signaux internes en plus de la préséquence. Le complexe TIM23 oriente ces protéines vers l'espace intermembranaire ou la membrane interne en fonction des signaux

reconnus. Lorsque la protéine se retrouve dans la matrice, l'enzyme MPP (*mitochondrial processing peptidase*) élimine la préséquence, puis la protéine adopte une conformation fonctionnelle.

Il existe, au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, un complexe appelé 'complexe d'export' dont le premier rôle est d'assurer le transport des protéines codées par le génome mitochondrial vers la membrane interne. Certaines protéines importées du cytosol vers la matrice possèdent des signaux supplémentaires qui vont être reconnus par le complexe d'export. Ces protéines vont ainsi être adressées vers la membrane interne de la mitochondrie (figure 4).

Une protéine du cytosol destinée à la mitochondrie et possédant seulement des signaux internes se lie à un récepteur spécifique (figure 4). Le récepteur dirige la protéine vers le complexe TOM. Suivant les signaux portés par la protéine, le complexe TOM oriente la protéine vers la membrane externe, l'espace intermembranaire ou, *via* une protéine de transport (carrier) vers le complexe TIM22 qui assure son adressage vers la membrane interne. Ce système ne permet pas l'adressage de protéines vers la matrice.

(Alberts et al., 1994; Buchanan et al., 2000; Truscott et al., 2003)

1.2.2. Vers le chloroplaste

Comme la mitochondrie, le chloroplaste possède son propre génome et sa propre machinerie traductionnelle mais la plupart des protéines qu'il contient sont codées par le génome nucléaire et sont importées du cytosol. Le chloroplaste peut être divisé en six sous-compartiments : la membrane externe, l'espace intermembranaire, la membrane interne, le stroma, la membrane du thylakoïde et le lumen du thylakoïde. Les protéines doivent porter des signaux leur permettant d'être adressées non seulement au chloroplaste, mais également d'atteindre le bon sous-compartiment dans le chloroplaste.

Les protéines destinées au chloroplaste possèdent un signal d'adressage de 30 à 100 acides aminés en N-terminal appelé le 'peptide de transit'. Les peptides de transit ne présentent que peu de similarités entre eux et aucune séquence consensus n'a pu être définie. Le peptide de transit peut être 'bipartite', c'est-à-dire qu'il contient d'une part le signal d'adressage pour l'importation dans le chloroplaste et d'autre part le signal nécessaire pour traverser la membrane du thylakoïde. Les peptides de transit sont éliminés de la protéine par des protéases après les différentes étapes de translocation.

La première étape de l'adressage des protéines possédant un signal de transit est la translocation à travers l'enveloppe du chloroplaste (figure 5). Cette étape fait intervenir le complexe TOC (*Translocons at the Outer membrane of Chloroplasts*) qui sélectionne les

protéines à importer et le complexe TIC (*Translocons at the Inner membrane of Chloroplasts*). Lorsque la protéine est dans le stroma, le peptide de transit est clivé par l'enzyme SPP (*Stromal Processing Peptidase*) et la protéine adopte une conformation fonctionnelle.

Lorsque la protéine contient un signal de transit bipartite, son import fait aussi intervenir les complexes TOC et TIC (figure 5). Ensuite, seul le premier signal est clivé, ce qui permet de démasquer le deuxième signal nécessaire pour l'importation dans le thylakoïde. Plusieurs voies semblent exister pour atteindre le thylakoïde mais elles sont encore mal connues : une voie dépendante du pH, une voie dépendante d'une protéine de type SRP bactérienne (*Signal Recognition Particle*) et une voie qui ressemble au système de sécrétion des bactéries (figure 5). Lorsque la protéine atteint le thylakoïde, le peptide de transit est éliminé par la TPP (*Thylakoidal Processing Peptidase*).

Les protéines peuvent porter d'autres signaux de type interne qui permettent d'affiner la localisation finale des protéines. Ces signaux ne sont pas encore bien connus mais il semble qu'ils soient de type membranaire ou conformationnel. Les protéines de la membrane externe possèdent ces signaux, ce qui permet leur mise en place directement à partir du cytosol sans intervention des systèmes de translocation. Ces signaux permettent aussi aux protéines importées dans le stroma d'atteindre la membrane interne ou la membrane du thylakoïde.

(Alberts et al., 1994; Keegstra and Cline, 1999; Buchanan et al., 2000; Robinson et al., 2001; Jarvis and Soll, 2002; Soll, 2002)

1.2.3. Vers le peroxysome

Les peroxysomes sont des organites spécialisés qui participent à de nombreuses réactions métaboliques essentielles, notamment les réactions oxydatives. Le peroxysome est un organe délimité par une seule membrane et dépourvu d'ADN. Ainsi, toutes les protéines du peroxysome doivent être importées du cytosol.

Au moins deux types de signaux d'adressage sont retrouvés sur les protéines solubles destinées au peroxysome : PTS1 et PTS2 (*Peroxisomal Targeting Signal*). PTS1 est un tripeptide (SKL ou équivalents) non clivable, localisé en C-terminal et retrouvé dans la majorité des protéines destinées au peroxysome. PTS2 est un nonapeptide dégénéré qui est localisé soit en N-terminal (clivable), soit à l'intérieur de la protéine. Il semble qu'il existe d'autres PTS qui n'ont pas encore été clairement identifiés.

La protéine Pex5 est un récepteur libre du cytosol qui se lie au signal PTS1 d'une protéine du cytosol destinée à être importée dans le peroxysome (figure 6). Pex5 transporte ensuite la protéine jusqu'à la protéine membranaire du peroxysome Pex13 où va se produire

la translocation. De façon similaire, une protéine possédant un signal PTS2 est pris en charge par un récepteur libre du cytosol appelé Pex7 qui l'achemine jusqu'à la protéine membranaire Pex14 où va se produire la translocation. Les protéines qui forment le système de translocation ne sont pas connues mais il semble que ces protéines soient capables de former une structure qui serait semblable à celle du pore nucléaire et qui permettrait l'importation de protéines sous une conformation repliée. Les protéines Pex5 ou Pex7 restent associées à leur protéine cible et sont co-importées avec cette protéine dans le peroxysome. Une fois dans la matrice du peroxysome, les protéines Pex5 ou Pex7 sont recyclées vers le cytosol (figure 6).

Les protéines membranaires du peroxysome ne possèdent pas les signaux PTS1 et PTS2. Les signaux portés par ces protéines sont appelés mPTS (*membranes Peroxisomal Targeting Signal*). Les mPTS sont de taille variable et ne présentent pas de similarités entre eux. Ils ne correspondent pas à des domaines transmembranaires mais il semble qu'ils puissent interagir avec certains éléments de la double couche lipidique. L'adressage de ces protéines n'est pas connu mais deux voies distinctes existent : une voie qui consiste à importer les protéines directement du cytosol et une voie qui permet l'import des protéines directement à partir du réticulum endoplasmique.

(Alberts et al., 1994; Subramani, 1998; Buchanan et al., 2000; Smith and Schnell, 2001)

1.2.4. Vers le réticulum endoplasmique (RE)

Le RE est composé d'un ensemble de saccules interconnectés qui sont en continuité avec l'enveloppe nucléaire. Le RE constitue le point d'entrée de toutes les protéines qui empruntent la voie du système sécrétoire pour atteindre le Golgi, le système vacuolaire, la membrane plasmique et l'espace extracellulaire (figure 2). Le RE est également le siège de la maturation des protéines (repliements, glycosylations,...). Quelle que soit leur destination finale, les protéines qui entrent dans le RE portent généralement en N-terminal un signal d'adressage de 16 à 30 acides aminés appelé 'peptide signal'. Les peptides signaux sont différents mais sont tous composés de trois parties : une première partie contenant un ou plusieurs acides aminés chargés positivement, une deuxième partie contenant 6 à 12 acides aminés hydrophobes et une troisième partie contenant quelques acides aminés juste avant le site de clivage. Il existe aussi des peptides signaux internes qui sont retrouvés principalement dans les protéines membranaires.

Pour qu'une protéine entre dans le RE, son peptide signal doit être reconnu au cours de la traduction par un complexe libre du cytosol appelé SRP pour *Signal recognition particle* (figure 7). Un arrêt de la traduction se produit lorsque la protéine naissante atteint une

longueur de 70 acides aminés. Le complexe SRP se lie alors à un récepteur de la membrane du RE, ce qui permet le transfert du ribosome et de la protéine naissante au complexe de translocation. La traduction et la translocation se produisent ensuite simultanément. Lorsque la protéine entre dans la lumière du RE, le peptide signal est clivé par le complexe enzymatique 'signal peptidase' qui est lié au complexe de translocation.

Les protéines membranaires sont classées en trois catégories suivant leur orientation dans la membrane et le nombre de domaines transmembranaires qu'elles possèdent (figure 8). Les protéines membranaires de type I et II sont importées dans le RE comme les protéines solubles, mais les domaines hydrophobes transmembranaires agissent comme des signaux 'stop' pour le transfert et permettent à ces protéines d'intégrer la membrane plasmique. Les protéines de type III possèdent plusieurs peptides signaux internes et autant de signaux 'stop' qui permettent leur mise en place dans la membrane.

(Alberts et al., 1994; Walter and Johnson, 1994; Buchanan et al., 2000)

1.3. Transport vésiculaire dans le système sécrétoire

Le système sécrétoire est composé de plusieurs organites : le RE, le Golgi, le système vacuolaire et la membrane plasmique. Les protéines qui entrent dans le RE peuvent soit être retenues dans le système sécrétoire, soit être adressées vers une destination finale qui est le système vacuolaire, la membrane plasmique ou l'espace extracellulaire. Le transport des protéines entre les différents compartiments du système sécrétoire est réalisé grâce aux 'vésicules de transport'. Ces vésicules se forment à la surface de l'organite donneur et fusionnent ensuite avec la membrane de l'organite receveur. Les protéines qui ne possèdent pas de signaux particuliers vont être adressées vers la membrane plasmique pour les protéines membranaires et l'espace extracellulaire pour les protéines solubles : c'est la voie par défaut du système sécrétoire. Les protéines destinées à une autre localisation doivent porter des signaux spécifiques qui permettent soit leur rétention, soit leur réorientation dans le système sécrétoire.

En ce qui concerne les protéines membranaires, les systèmes permettant le tri des protéines ne sont pas connus. Il semble que des signaux internes, comme la conformation, permettent l'adressage de ces protéines vers le compartiment adéquat. L'importance du domaine transmembranaire des protéines de type I a été mise en évidence récemment chez la levure (Rayner and Pelham, 1997) et chez les plantes (Brandizzi et al., 2002). La longueur et la composition du domaine transmembranaire apparaissent déterminantes pour la destination des protéines membranaires, probablement en raison de la composition et de l'épaisseur des différentes membranes de la cellule.

- Transport et rétention des protéines dans le RE

Une fois entrées dans le RE, les protéines subissent un contrôle qualité avant d'être regroupées dans des régions spécialisées du RE appelées sites de sortie (ERES pour *Endoplasmic Reticulum Exit Sites*). Les protéines présentes dans les ERES sont ensuite acheminées par des vésicules vers un compartiment intermédiaire (*cis*-Golgi) qui est un compartiment de triage entre les protéines qui retournent vers le RE et celles qui continuent leur route vers le Golgi. Il existe également des voies d'adressage particulières qui permettent aux protéines d'être transportées directement du RE vers d'autres organites (peroxysome, vacuole) sans passer par le Golgi. Les protéines qui sont destinées à résider dans le RE sont retenues par deux mécanismes différents. Premièrement, leur conformation tridimensionnelle et l'affinité qu'elles ont entre elles semblent être déterminantes pour leur rétention dans le RE. Deuxièmement, certaines protéines possèdent un motif C-terminal (KDEL ou HDEL) qui leur permet de revenir du compartiment intermédiaire vers le RE. Ce retour est réalisé grâce au transport rétrograde du Golgi vers le RE qui fait intervenir des vésicules COPI, c'est-à-dire des vésicules à manteau de protéines I (figure 9).

- Transport et rétention des protéines dans le Golgi

Le transport d'éléments entre les saccules composant le Golgi est réalisé grâce à des vésicules qui se forment à l'extrémité des saccules. Le premier saccule, qui est appelé le *cis*-Golgi, échange des vésicules avec le RE. Le dernier saccule, le *trans*-Golgi ou TGN (*trans-Golgi Network*) permet de diriger les protéines vers leur destination finale (système vacuolaire, membrane plasmique ou espace extracellulaire).

Les protéines non retenues au niveau du RE sont transportées vers la face *cis* du Golgi (transport antérograde) grâce aux vésicules COPII, c'est-à-dire des vésicules à manteau de protéines II (figure 9). Au niveau du Golgi, les protéines sont transportées de saccules en saccules jusqu'au TGN par l'intermédiaire des vésicules qui se forment à l'extrémité des saccules. Au cours de ce transport, différentes modifications post-traductionnelles peuvent être réalisées. En ce qui concerne les protéines résidentes dans le Golgi, les mécanismes de rétention ne sont pas identifiés.

- Tri et exportation des protéines au niveau du Golgi

Les protéines sont exportées du Golgi par l'intermédiaire de vésicules de transport. Ces vésicules apparaissent généralement au niveau du TGN mais dans le cas du transport des protéines vers la vacuole de réserve, les vésicules peuvent se former à divers endroits du Golgi (figure 9). Les protéines destinées au système vacuolaire doivent être triées des protéines qui suivent la voie par défaut du système sécrétoire. Chaque vésicule doit contenir

les protéines spécifiques pour une destination (système vacuolaire ou membrane plasmique et espace extracellulaire) et doit être capable d'atteindre spécifiquement cette destination.

Le tri des protéines est réalisé au cours de la formation des vésicules. Des complexes cytosoliques et des protéines manteau déforment la membrane en un point précis afin de former une vésicule et sont également impliqués dans la sélection des protéines à transporter. Parmi les différents éléments impliqués connus, on peut citer [1] la clathrine qui recouvre les vésicules circulant entre le RE, la membrane plasmique et le système vacuolaire et [2] les complexes adaptateurs appelés AP qui participent au recrutement des protéines-transporteurs.

Chaque vésicule doit ensuite être capable d'atteindre spécifiquement le compartiment adéquat. La fusion d'une vésicule avec une membrane cible dépend des SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor adaptator protein receptor*) présents dans la membrane de la vésicule (v-SNARE) et dans la membrane cible (t-SNARE). A chaque protéine v-SNARE présentée à la surface de la vésicule correspond une protéine t-SNARE spécifique présentée à la surface de la membrane de l'organite receveur. La vésicule peut fusionner avec la membrane de l'organite receveur seulement s'il y a interaction entre la protéine v-SNARE et la protéine t-SNARE. Le principe de fonctionnement des SNARE est présenté à la figure 10.

(Alberts et al., 1994; Buchanan et al., 2000; Jurgens and Geldner, 2002; Nebenfuhr, 2002; Neumann et al., 2003)

Les protéines destinées à la vacuole doivent être spécifiquement triées afin d'être transportées vers le système vacuolaire. Les mécanismes de tri vers le système vacuolaire seront examinés dans le paragraphe 2.

1.4. Stratégies pour étudier l'adressage des protéines

Pour la plupart des organites, les voies de transports des protéines et les composants impliqués ont été identifiés par des études *in vitro* chez la levure ou chez les mammifères. Généralement, ces études ont été réalisées à partir d'organites isolés ou de cellules perméabilisées. Les approches de complémentation fonctionnelle entre les différents systèmes ont mis en évidence la conservation des mécanismes dans les cellules eucaryotes, notamment pour le noyau et la mitochondrie.

Cependant, les modèles levure et mammifères ne permettent pas d'étudier certains processus d'adressage chez les végétaux : le chloroplaste est un organite spécifique du règne végétal et les voies d'adressage dans le système vacuolaire présentent des caractéristiques propres au règne végétal (voir paragraphe 2.).

Les mécanismes de transports vers et dans le chloroplaste ont été étudiés *in vitro* à partir d'organites isolés. Ces études ont permis de décrire les différents éléments des systèmes de translocation ainsi que leur fonction. Toutefois, les approches *in vivo* peuvent apporter des informations complémentaires. L'intérêt des approches *in vivo* est illustré par l'étude d'un mutant d'insertion ADN-T affecté dans l'importation des protéines dans le chloroplaste chez *Arabidopsis* (Jarvis et al., 1998). Ce mutant est d'une couleur pâle pendant les deux premières semaines de son cycle de vie, puis il prend une apparence de type sauvage. Le gène interrompu par l'ADN-T code une protéine de 33 kDa appelée Toc33 qui est très similaire à la protéine Toc34 du complexe de translocation (voir figure 5). Le phénotype observé chez ce mutant suggère qu'il existe deux types de complexes de translocation : un avec la protéine Toc33 et un avec la protéine Toc34. Ces deux types de complexes interviennent à un stade précis du développement : le complexe comprenant Toc33 serait préférentiellement impliqué dans la translocation des protéines dans les structures émergentes de la plante. Le système de translocation de la membrane externe du chloroplaste n'est donc pas figé comme l'avait indiqué les études *in vitro*. Sa formation fait intervenir une dynamique de recrutement des protéines Toc33 et Toc34. L'intérêt de cette dynamique permettant la formation de deux complexes différents n'est pas encore connu.

Le système sécrétoire n'est pas un simple organite, mais un système complexe de membranes qui ne peut être reconstitué *in vitro* avec des organites isolés. La simplicité du modèle levure a permis d'isoler des mutants affectés dans la sécrétion (*sec*) ou l'adressage à la vacuole (*vps*). Ces mutants sont souvent des mutants conditionnels, c'est-à-dire qu'ils ont une croissance normale à 27°C mais leur croissance est perturbée à 37°C. Les résultats obtenus avec ces mutants fournissent des informations pour l'étude du système sécrétoire végétal comme dans le cas de AtVPS45 (Bassham and Raikhel, 1998). Mais les spécificités du système sécrétoire végétal (Bassham and Raikhel, 2000) nécessitent l'utilisation d'outils et de stratégies spécifiques permettant de travailler sur des modèles vivants (Pimpl and Denecke, 2002).

2. La vacuole et l'adressage des protéines

2.1. La vacuole dans la cellule végétale

La vacuole des cellules végétales est un organite qui est délimité par une membrane appelée tonoplaste et qui intervient dans divers processus du développement de la plante. Selon les cellules considérées, les vacuoles présentent une étonnante diversité de formes, de tailles et de contenu et une cellule végétale peut contenir plusieurs types de vacuole. Les

vacuoles assurent les fonctions de compartiments lytiques, de réservoirs à ions et à métabolites comme les pigments. Elles ont un rôle essentiel dans les processus de détoxification et dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire face aux contraintes environnementales. Dans les organes végétatifs de la plante, la vacuole est gorgée d'eau, imposant ainsi une pression, appelée turgescence, indispensable à la croissance cellulaire. Au niveau de la graine, les vacuoles constituent le site d'accumulation des protéines de réserve qui sont nécessaires au processus de germination (Wink, 1993; Marty, 1999).

Malgré leur diversité apparente, la plupart des vacuoles demeurent des compartiments lytiques. Cependant, trois types distincts de vacuoles ont pu être définis par des analyses biochimiques. La vacuole lytique est un compartiment acide contenant des enzymes hydrolytiques analogues aux enzymes contenues dans le lysosome des cellules animales. Le tonoplaste de la vacuole lytique contient des aquaporines spécifiques appelées γ -TIP pour *Tonoplast Intrinsic Protein* (Paris et al., 1996; Jauh et al., 1999). A l'opposé, les vacuoles qui accumulent les protéines de réserve, sont marquées par l'isoforme δ -TIP seule ou associée à d'autres isoformes et sont appelées vacuoles de réserve (Jauh et al., 1998; Jauh et al., 1999). Ces deux compartiments vacuolaires coexistent dans la même cellule au niveau de la graine (Paris et al., 1996). Une troisième isoforme d'aquaporine, l'isoforme α -TIP, a été retrouvée sur le tonoplaste de vacuoles associées à un processus proche de l'autophagie (Moriyasu et al., 2003). La plante possède donc plusieurs types de vacuoles mais le nombre exact de vacuoles spécialisées et leur fonction sont des points qui restent à éclaircir.

La diversité de vacuoles est une caractéristique des cellules végétales. En effet, seul un compartiment lytique est retrouvé dans les cellules de mammifères (le lysosome) et dans les cellules de levure (la vacuole). Chez les plantes, cet organite semble avoir acquis une capacité de spécialisation importante puisqu'au moins deux types différents de vacuoles, la vacuole lytique et la vacuole de réserve, ont été identifiés.

2.2. L'adressage des protéines solubles aux vacuoles

2.2.1. Les voies et les signaux d'adressage aux vacuoles

Le système sécrétoire délivre les protéines solubles à la vacuole par plusieurs voies. Généralement, dans les graines, les protéines de réserve sont acheminées jusqu'à vacuole de réserve par des vésicules denses qui se forment au niveau du Golgi (Hohl et al., 1996). Des vésicules appelées PAC (*Precursor-ACcumulating*), repérées dans les graines de potiron, transportent également des protéines du RE à la vacuole de réserve (Hara-Nishimura et al., 1998). Les protéines destinées à la vacuole lytique sont transportées par des vésicules à manteau de clathrine jusqu'à un compartiment appelé 'prévacuole' situé à proximité de la

vacuole lytique. Les protéines sont libérées dans ce compartiment, puis sont transportées jusqu'à la vacuole lytique (Ahmed et al., 1997; Neuhaus and Rogers, 1998).

Les protéines destinées à la vacuole portent des signaux d'adressage appelés VSD (*Vacuolar Sorting Determinants*). Les VSD sont classés en trois catégories (figure 11) : les NTPP (*N-terminal propeptides*) qui contiennent le motif NPIR (ou dérivés) et qui sont retrouvés dans les précurseurs de la sporamine de patate douce et de l'aleuraine d'orge ; les CTPP (*C-terminal propeptides*) qui sont retrouvés dans les précurseurs de la lectine d'orge et de la chitinase de tabac ; les 'déterminants internes' qui sont retrouvés dans certaines protéines de réserve (Neuhaus and Rogers, 1998). Les CTPP et les NTPP sont éliminés pendant ou après le transport jusqu'à la vacuole. Les protéines portant un NTPP seraient adressées à la vacuole lytique tandis que les protéines portant un CTPP seraient adressées à la vacuole de réserve (Paris and Neuhaus, 2002).

Chez les mammifères, l'adressage des protéines au compartiment prélysosomal (l'endosome) est réalisé par le récepteur du mannose-6-phosphate (MPR) qui reconnaît des résidus de mannose 6-phosphate portées par les protéines destinées au lysosome (Kornfeld, 1992). Chez la levure, les protéines destinées à la vacuole se lient au récepteur Vps10p au niveau du TGN dans des vésicules tapissées de clathrine pour être transportées à la prévacuole (Marcusson et al., 1994). Chacun des deux récepteurs MPR et Vps10p est ensuite recyclé vers le TGN. Ces deux types de récepteurs ne présentent pas d'homologie de séquence mais assurent des fonctions similaires au sein de leurs cellules respectives.

La présence de deux vacuoles distinctes chez les plantes suggère l'existence d'au moins deux types de récepteurs d'adressage : un chargé de l'adressage à la vacuole lytique et un chargé de l'adressage à la vacuole de réserve. Chez les végétaux, la recherche des récepteurs d'adressage aux vacuoles a été engagée par différentes approches principalement basées sur les données concernant l'adressage au lysosome chez les mammifères. Ces approches ont permis d'isoler un récepteur d'adressage vacuolaire putatif appelé BP80 (*Binding Protein of 80 kDa*).

2.2.2. Les protéines BP80

La protéine PsBP80a (BP80) a été isolée chez le pois (*Pisum sativum*) par une approche de colonne d'affinité réalisée dans le groupe de J. Rogers (Kirsch et al., 1994). A partir des connaissances sur le récepteur mannose-6-phosphate chez les mammifères, il a été supposé que le récepteur d'adressage à la vacuole chez les plantes serait présent dans les vésicules à manteau de clathrine et lierait son ligand de façon dépendante du pH. Des extraits enrichis en vésicules à manteau de clathrine ont été obtenus à partir de cotylédons en développement. Les extraits ont été déposés sur une colonne d'affinité contenant le NTPP de

l'aleuraine d'orge, une cystéine protéase vacuolaire, à pH=7. Par une élution acide (pH=4), une protéine membranaire de 80 kDa a été isolée et a été appelée BP80 (renommée PsBP80a). La protéine PsBP80a est capable de lier spécifiquement le NTPP de l'aleuraine d'orge à un pH optimal de 6,5 (pH du TGN). Aucune liaison n'est observée à un pH acide inférieur à 5. Il a été montré que PsBP80a est une glycoprotéine et que sa région C-terminale est cytosolique. Ces caractéristiques biochimiques en accord avec la fonction de récepteur d'adressage à la vacuole lytique ont fait de PsBP80a le premier récepteur potentiel d'adressage à la vacuole chez les plantes.

L'ADNc de la protéine PsBP80a a été cloné et les caractéristiques de cette protéine ont été déterminées (Paris et al., 1997). PsBP80a est une protéine membranaire de 623 acides aminés qui possède un long domaine N-terminal, un domaine transmembranaire unique et un domaine C-terminal court (figure 12). Le domaine N-terminal, qui reconnaît le NTPP de l'aleuraine d'orge, contient trois motifs EGF (*epidermal growth factor*). Ces motifs EGF ne reconnaissent pas directement le signal d'adressage mais ils influencent la spécificité de liaison (Cao et al., 2000). Un domaine d'interaction protéique, appelé 'domaine PA', est retrouvé dans la partie N-terminale de la protéine. La partie N-terminale contient des sites potentiels de glycosylation. La partie C-terminale cytosolique possède un motif appelé 'motif tyrosine', généralement impliqué dans le trafic intracellulaire des récepteurs.

Des expériences d'immunomarquage ont montré que la protéine PsBP80a est présente dans les vésicules à manteau de clathrine, dans le TGN et également au niveau de la prévacuole (Kirsch et al., 1994; Paris et al., 1997).

La fonction de la protéine PsBP80a a été montrée pour la première fois *in vivo* en 2001 par des expériences réalisées avec le modèle levure (Humair et al., 2001). Ces expériences sont basées sur l'utilisation de la GFP (*Green Fluorescent protein*) fusionnée avec divers VSD végétaux, comme la construction appelée 'Aleu-GFP' qui correspond à la fusion entre le NTPP de l'aleuraine et la GFP. Lorsque la protéine de fusion Aleu-GFP est exprimée dans une souche de levure déficiente pour son propre adressage à la vacuole ($\Delta vps10$), il n'y a pas d'accumulation de fluorescence dans la cellule. Par contre, lorsque la protéine PsBP80a est co-exprimée dans la levure mutante $\Delta vps10$ avec la protéine de fusion Aleu-GFP, la fluorescence de la GFP est accumulée dans la vacuole. Ces données montrent que la protéine PsBP80a est capable d'adresser la protéine de fusion Aleu-GFP à la vacuole chez une souche de levure déficiente pour son propre adressage à la vacuole. Ces différentes expériences indiquent que la protéine PsBP80a possède toutes les caractéristiques biochimiques et fonctionnelles pour être un récepteur d'adressage à la vacuole lytique.

D'après l'analyse des bases de données (EST, ADNc et génomique), des homologues de la protéine PsBP80a sont retrouvés chez toutes les plantes. Par contre, aucun homologue n'est retrouvé chez la levure ou chez les mammifères.

Chez *Arabidopsis thaliana*, plusieurs groupes ont isolé de façon indépendante un gène codant un homologue de la protéine PsBP80a (Ahmed et al., 1997; Laval et al., 1999). La protéine codée par ce gène porte différents noms : AtELP1, AtVSR1, VSR_{AT1} ou encore AtBP80b qui sera utilisé dans ce manuscrit. Le séquençage du génome d'*A. thaliana* a révélé que le gène *AtBP80b* appartenait à une famille multigénique de sept membres répartis sur quatre des cinq chromosomes (figure 13A et 13B). Les différentes protéines codées par cette famille multigénique sont très conservées et présentent toutes les motifs caractéristiques de la protéine PsBP80a (annexe 4).

Le gène codant la protéine AtBP80b (ou AtELP) a été isolé par la recherche dans les bases de données de protéines possédant des motifs caractéristiques (motif tyrosine et motifs riches en cystéines) de récepteurs d'adressage à la vacuole (Ahmed et al., 1997)). La protéine AtBP80b a été localisée au niveau des vésicules à manteau de clathrine et au niveau de la prévacuole. Les tests d'interaction ont montré que AtBP80b est capable de lier les NTPP de la sporamine de patate douce et de l'aleuraine d'*A. thaliana* mais pas le CTPP de la lectine d'orge (Ahmed et al., 2000). Ces résultats montrent que la protéine AtBP80b, comme la protéine PsBP80a, pourrait assurer le rôle d'adressage à la vacuole lytique dans la cellule végétale.

Cependant, la localisation sub-cellulaire des protéines BP80 reste complexe. Les travaux réalisés dans l'équipe montrent que, bien que la protéine AtBP80b puisse être détectée dans des fractions enrichies en endomembranes, cette protéine est majoritairement détectée dans des fractions membranaires enrichies en membrane plasmique (Laval et al., 1999). Cette localisation suggère que la protéine AtBP80b pourrait intervenir au niveau de la membrane plasmique, par exemple, pour permettre l'endocytose de protéines solubles.

Le groupe de Hara-Nishimura a isolé la protéine CsBP80.1, appelée aussi PV72, chez le potiron (Shimada et al., 1997). La protéine CsBP80.1 ne semble pas suivre la voie d'adressage précédemment décrite pour les protéines AtBP80b et PsBP80a. En effet, CsBP80.1 a été purifiée à partir de vésicules PAC (*Precursor-ACcumulating*) qui transportent des protéines du RE à la vacuole de réserve (Hara-Nishimura et al., 1998). De plus, il a été montré que la protéine CsBP80 présentait une affinité pour le CTPP ou des signaux internes de l'albumine 2S de potiron qui est une protéine stockée dans la vacuole de réserve (Shimada et al., 1997). Les auteurs suggèrent ainsi que CsBP80.1 permettrait l'adressage des protéines à la vacuole de réserve (Shimada et al., 2002).

La figure 14 résume les différents résultats concernant la localisation sub-cellulaire des protéines BP80. Ces différentes localisations peuvent s'expliquer par le fait que les différents anticorps utilisés pour les expériences d'immunomarquage ne sont pas spécifiques d'une isoforme donnée. Ils peuvent ainsi potentiellement détecter d'autres membres, sans qu'il soit possible de déterminer quel membre est réellement détecté. De plus, une grande variété de tissus a été considérée et pas toujours dans la même espèce : par exemple, des cellules de racines de pois ou d'*A. thaliana*, des cultures cellulaires d'*A. thaliana* et des graines en formation chez le potiron. Le bilan des connaissances sur les protéines BP80 présenté dans une revue récente fait ressortir la grande variété des systèmes expérimentaux utilisés (Paris and Neuhaus, 2002). Il n'a pas été montré que les protéines BP80 d'une même espèce ont toutes la même fonction, la même localisation subcellulaire et qu'elles sont présentes et fonctionnelles dans les mêmes types cellulaires à tous les stades du développement de la plante. En comparaison avec les modèles levure et mammifère où une seule protéine permet l'adressage à la vacuole, l'existence de plusieurs protéines BP80 pour une même espèce végétale suggère que ces protéines ont une diversité de fonction et de rôles. Pour apporter des éléments de réponse à ces différents points, il est nécessaire d'étudier chaque protéine BP80 d'une même famille de manière individuelle.

3. Objectifs du travail de thèse

La majorité des résultats obtenus par les différentes équipes travaillant sur les protéines BP80 sont issus d'approches *in vitro* et *in vivo* dans un système hétérologue. Le rôle *in planta* des protéines BP80 n'ayant pas encore été abordé, le groupe de Rafaël Pont-Lezica s'est orienté vers la caractérisation fonctionnelle des protéines AtBP80 en vue de comprendre le rôle *in planta* de protéines BP80.

L'étude de la famille de protéine AtBP80 a été initiée par des analyses d'expression de trois membres de la famille *AtBP80* (les gènes *AtBP80b*, *AtBP80a* et *AtBP80f*) et ces approches ont montré que ces trois gènes présentent des profils d'expression différents selon l'organe et le stade de développement considérés (Laval et al., 1999; Laval, 2000). En parallèle, une approche de génétique inverse basée sur la génération de lignées perte- et gain-de-fonction par des stratégies sens/antisens a été engagée afin de révéler le rôle *in planta* des protéines AtBP80 (Laval, 2000).

Le **sujet de thèse** qui m'a été confié comprend deux parties : la **première partie** s'inscrivait dans la suite des travaux engagés par l'équipe et avait pour objectifs de :

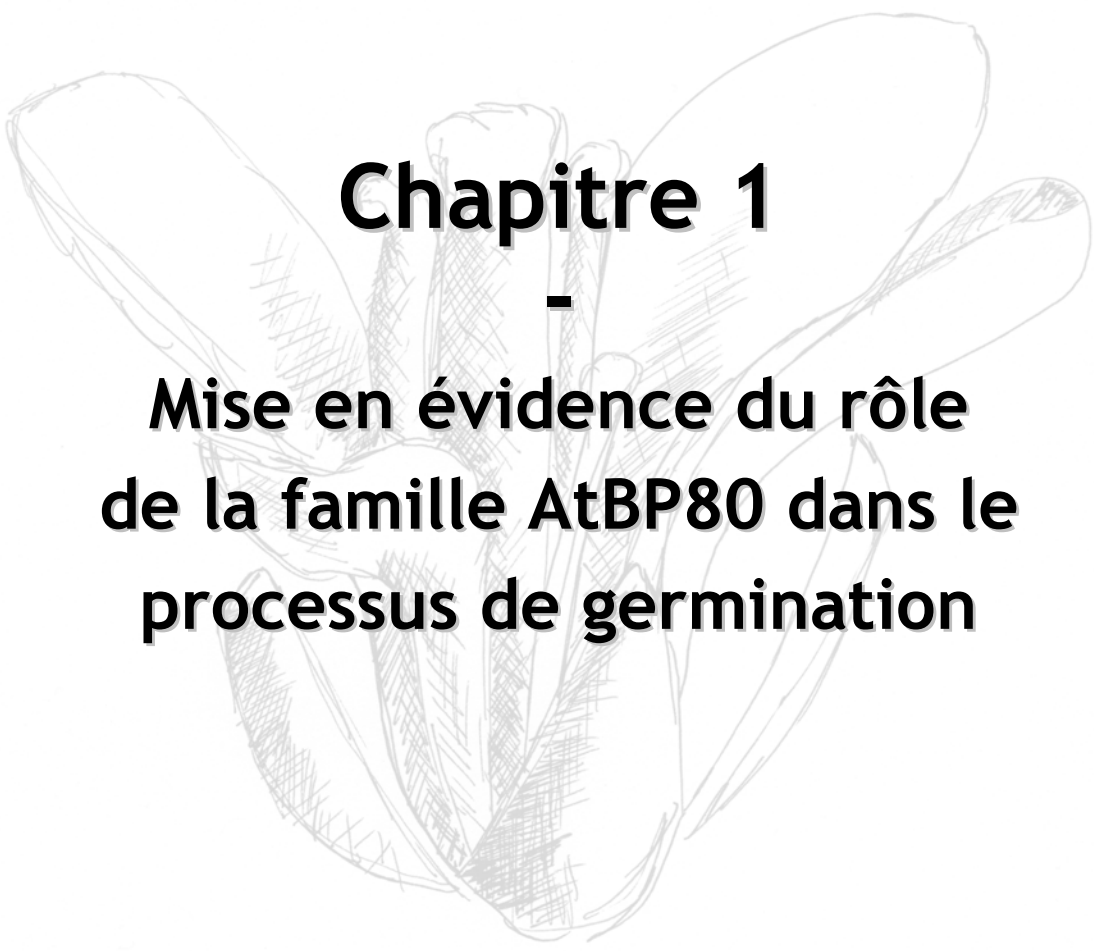
1° / Déterminer si tous les membres de la famille *AtBP80* sont fonctionnels et définir leur profil d'expression en fonction des organes et des stades de développement.

2° / Compléter l'analyse des lignées perte- et gain-de-fonction afin de mettre en évidence le ou les rôles des protéines *AtBP80* au cours du développement chez *A. thaliana*.

Les résultats concernant ces deux points font l'objet du chapitre 1.

La **deuxième partie** du sujet de thèse fait suite aux résultats présentés dans le chapitre 1, qui ont mis en évidence la nécessité d'étudier des mutants perte-de-fonction pour chaque membre individuellement. La recherche (ou l'obtention) et la caractérisation de mutants BP80 ont été réalisées par différentes approches présentées dans le chapitre 3 et le chapitre 4 :

- recherche et analyse de mutants d'insertion chez *A. thaliana*
- obtention de mutants perte-de-fonction spécifiques par la méthode d'ARN interférence
- obtention de mutants spécifiques par recombinaison homologue chez la mousse *Physcomitrella patens*.



Chapitre 1

-

**Mise en évidence du rôle
de la famille AtBP80 dans le
processus de germination**

Alors que les travaux publiés jusqu'en 2000 ont principalement porté sur une caractérisation biochimique des protéines BP80, la stratégie adoptée s'est orientée vers une étude des AtBP80 *in planta*, basée sur des analyses d'expression et sur la génération de lignées gain- et perte-de-fonction.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Journal of Experimental Botany* en 2003. Cette publication est incluse ci-après et les principaux résultats sont résumés dans le paragraphe suivant.

1. Publication

Journal of Experimental Botany

Vol. 54, N° 381, pp. 213-221, Janvier 2003

« Seed germination is blocked in *Arabidopsis* putative vacuolar sorting receptor (*atbp80*) antisense transformants »

Frédéric Masclaux*, Valérie Laval*, Arnaud Serin, Marguerite Carrière, Caroline Roldan, Martine Devic, Rafaël F. Pont-Lezica et Jean-Philippe Galaud.

* contribution équivalente des deux auteurs

2. Résumé de l'article et données complémentaires

2.1. Tous les membres de la famille AtBP80 sont transcrits

La recherche d'EST dans diverses bases de données dédiées à *Arabidopsis* et des analyses d'expression par RT-PCR et *Northern Blot* avaient montré que les gènes *AtBP80b*, *AtBP80a* et *AtBP80f* étaient transcrits (Laval, 2000). Aucune information n'était disponible sur l'expression des autres membres de la famille. Déterminer le profil d'expression d'un gène contribue à préciser les rôles possibles de ce gène dans l'organisme. Les profils d'expression de tous les membres de la famille *AtBP80* ont été déterminés par RT-PCR. Différents organes et différents stades de développement ont été considérés. Tous les transcrits des gènes *AtBP80* sont détectés par RT-PCR, ce qui montre que tous les membres de la famille sont exprimés. Chaque gène présente un profil d'expression particulier. Par exemple, les gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'* sont exprimés dans tous les organes testés et à tous les stades de développement : graine sèche, graine imbibée, plantule, feuille jeune, feuille âgée, racine, tige, bourgeon floral, fleur, silique immature, silique pré-mature. Des expériences d'hybridation *in situ* sur des graines ont montré que les gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'* étaient transcrits dans toutes les cellules de l'embryon excepté dans les cellules en division (figure 15). Les protéines *AtBP80a* et *AtBP80a'* apparaissent ainsi avoir un rôle essentiel durant tout le développement de la plante. Par contre, le gène *AtBP80c* est exprimé uniquement dans les fleurs. Il peut donc jouer un rôle particulier dans le développement floral, la fécondation ou la formation de la graine. Aucun des gènes *AtBP80* ne correspond à un pseudogène et leurs différents profils d'expression suggèrent que chaque membre peut exercer un rôle particulier.

2.2. Implication des protéines AtBP80 dans le processus de germination

Le gène *AtBP80b* a été le premier gène de la famille dont l'ADNc complet a été isolé au laboratoire. L'analyse fonctionnelle s'est donc focalisée sur ce membre en particulier. Afin d'apporter les premières informations sur le rôle de la famille, des plantes sens et antisens pour le gène *AtBP80b* ont été générées. Pour la construction sens, l'ADNc pleine longueur d'*AtBP80b* a été placé sous contrôle du promoteur 35S. Pour la construction antisens, le cadre ouvert de lecture du gène *AtBP80b* a été placé en orientation inverse sous contrôle du promoteur 35S. Le cadre ouvert de lecture correspond à la partie la plus conservée entre les différents gènes *AtBP80*. Cette construction doit interférer avec l'expression de tous les membres de la famille *AtBP80* en réduisant le niveau des transcrits.

Concernant les lignées sens sur-exprimant *AtBP80b*, aucune différence morphologique ou de croissance n'a pu être repérée tout au long du développement des plantes en comparaison avec des plantes sauvages. Par contre, les lignées exprimant le gène *AtBP80b* en orientation antisens présentent une réduction du taux de germination dès la génération T2 par rapport aux graines issues de plantes sauvages. Ce taux varie de 5 % à 100 % selon les lignées. Si la plupart des graines qui germent donnent des plantes identiques aux plantes sauvages, une faible proportion (moins de 1 %) des graines produit des plantules présentant un arrêt précoce du développement. Ces plantules sont caractérisées par la présence d'une longue racine et de cotylédons qui restent piégés dans le tégument. Des analyses cytologiques ont montré que ces plantules présentent des anomalies d'organisation cellulaire des tissus.

Concernant les graines des lignées antisens qui ne germent pas, la viabilité des cellules composant l'embryon a été vérifiée par un test au diacétate de fluorescéine (FDA). Afin de lever l'inaptitude à germer de ces graines, différentes conditions ont été testées : lumière, température, prétraitement au froid, retrait du tégument, apport de gibbérellines, apport d'acides aminés. Dans aucun des cas, une amélioration du taux de germination n'a été observée.

L'effet de la construction antisens sur l'expression des gènes *AtBP80* dans la graine a été évalué par RT-PCR. Pour cela, des graines non germées de la lignée AST2K, qui présentent un taux de germination de 25 %, ont été récupérées. Les RT-PCR conduites sur ces graines montrent qu'aucun membre de la famille *AtBP80* n'est transcrit. Par ailleurs, il a été montré que les transcrits des gènes *AtBP80a*, *AtBP80a'* et *AtBP80b* étaient présents dans la graine sauvage sèche ou imbibée pendant 24 h. La construction antisens est donc capable de réduire les niveaux de transcrits des trois gènes *AtBP80a*, *AtBP80a'* et *AtBP80b*. Cependant, il est impossible de préciser si l'inaptitude à germer est due à l'absence des transcrits d'un, de deux ou des trois gènes.

2.3. Quels sont les rôles de la famille *AtBP80* ?

Les graines de lignées antisens présentent un taux de germination réduit. Ces graines sont composées de cellules vivantes et ne présentent aucune anomalie structurale. La construction antisens n'empêche pas la formation de la graine, mais aucun des traitements réalisés n'a permis la germination des graines. La présence des protéines *AtBP80* est donc indispensable au processus de germination. L'hypothèse proposée pour expliquer ce rôle est que les protéines *AtBP80* pourraient avoir un rôle crucial dans la mobilisation des réserves protéiques de la graine. En effet, les protéines de réserve sont accumulées dans la vacuole de réserve lors de la formation de la graine. Suite à l'imbibition, les vacuoles lytiques et de

réserve fusionnent pour permettre la mobilisation des réserves. L'absence de protéines AtBP80 pourrait empêcher l'adressage vers la vacuole lytique des enzymes nécessaires à la mobilisation des réserves, ce qui rendrait les réserves inutilisables. Exceptionnellement, certaines graines sont capables de germer et de produire des plantules dont la croissance s'arrête avant que les cotylédons soient dégagés du tégument. Ce sont probablement des graines pour lesquelles l'effet de la construction antisens est légèrement atténué. Leur morphologie anormale pourrait être due à la dégradation de certains composés extracellulaires par des enzymes lytiques mal adressées. Les protéines BP80 ont donc un rôle très important dans le processus de germination mais également dans le développement de la plante.

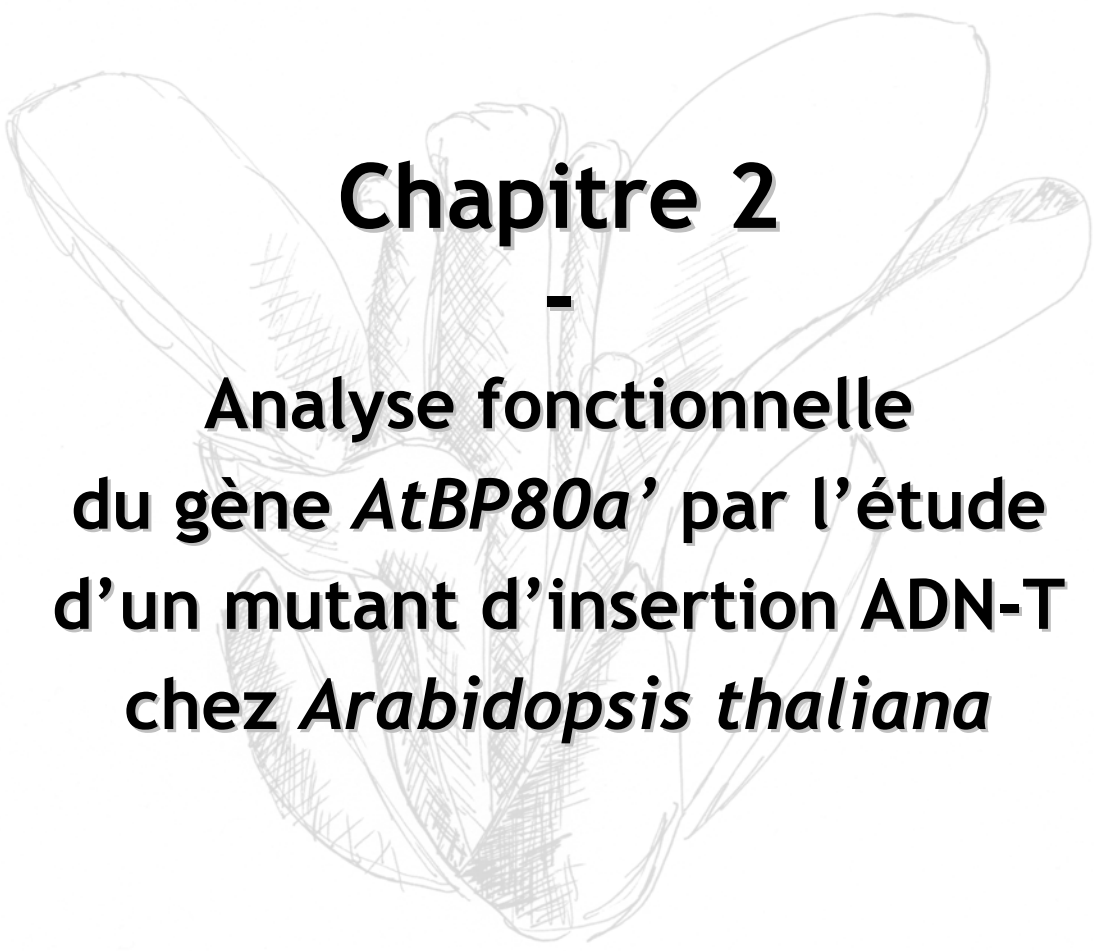
D'un point de vue expérimental, les graines non germées constituent un matériel en quantité limitante, impossible à multiplier. De plus, l'efficacité variable selon les lignées et les problèmes de stabilité des phénotypes pour une même lignée sont un désavantage de la stratégie « antisens » (Bourque, 1995). Les différences de taux de germination entre les lignées antisens peuvent s'expliquer par cette variabilité. Une autre limitation vient du fait que l'approche « antisens » entraîne l'inactivation de tous les membres de la famille *AtBP80*. Cette propriété a été utilisée avantageusement pour attribuer un premier rôle à la famille *AtBP80* mais il est impossible de déterminer quel membre est réellement impliqué dans le processus de germination. Les analyses d'expression laissent penser que les protéines AtBP80a, AtBP80a' et AtBP80b sont nécessaires à la germination mais le rôle des autres membres reste à déterminer. Ces résultats font ressortir la nécessité d'obtenir des informations sur le rôle individuel de chaque membre.

2.4. Vers la détermination du rôle individuel de chaque membre

La mutagenèse par transposons ou par ADN-T, qui consiste à inactiver un gène en l'interrompant par de l'ADN étranger, est maintenant une des stratégies les plus courantes pour faire de la génétique inverse chez *Arabidopsis*. La suite du projet de thèse a donc visé à **isoler et à caractériser des mutants d'insertion chez *Arabidopsis*** pour déterminer le rôle individuel des protéines BP80 *in planta*. La recherche et l'étude de mutants feront l'objet du 2^{ème} chapitre.

Cette recherche de mutants pouvait s'avérer infructueuse car à ce moment là, peu de collections de mutants d'insertion étaient disponibles. C'est pourquoi deux autres approches de génétique inverse ont été également initiées. Elles sont à la fois complémentaires et alternatives à l'étude de mutants d'insertion chez *Arabidopsis*. La première stratégie repose sur la **génération de mutants d'*Arabidopsis* spécifiques pour les gènes *AtBP80* par la méthode d'ARN interférence ou RNAi (*RNA interference*)**. Le RNAi est une méthode dérivée

de la stratégie antisens qui permet une plus grande efficacité et une plus grande spécificité. La deuxième approche est basée sur la **génération de mutants par recombinaison homologue chez la mousse *Physcomitrella patens***. Ces deux approches seront décrites dans le 3^{ème} chapitre.



Chapitre 2

-

**Analyse fonctionnelle
du gène *AtBP80a*' par l'étude
d'un mutant d'insertion ADN-T
chez *Arabidopsis thaliana***

La stratégie « antisens » a montré l'implication de la famille AtBP80 dans le processus de germination. Afin de déterminer le rôle individuel des protéines AtBP80, la recherche de mutants d'insertion a été engagée. Ce chapitre décrit la recherche de mutants d'insertion ainsi que leur caractérisation. Une attention particulière a été portée sur le mutant *vsr-a'* qui présente une insertion ADN-T dans le gène *AtBP80a'*.

1. Recherche de mutants d'insertion pour les gènes *AtBP80*

Les mutants d'insertion constituent un outil performant pour l'étude de gènes chez *Arabidopsis thaliana* (Krysan et al., 1999). De nombreuses collections de mutants d'insertion ont été générées en utilisant l'ADN-T ou des transposons comme mutagènes. L'insertion des transposons et des ADN-T dans le génome des plantes se produit de façon aléatoire. Cette propriété permet théoriquement d'obtenir une insertion dans chaque gène lorsqu'on génère une collection de mutants d'insertion. D'un point de vue statistique, la probabilité de trouver un mutant pour un gène d'intérêt augmente avec la taille du gène et avec le nombre de lignées disponibles dans les collections. Au début du projet de thèse (novembre 2000), plusieurs collections de mutants d'insertion étaient disponibles : les lignées transposons du groupe de J. Jones (Tissier et al., 1999), les lignées transposons du groupe de V. Sundaresan (Parinov et al., 1999), les lignées ADN-T de l'INRA de Versailles (Samson et al., 2002). La recherche d'un mutant pour un gène donné dans ces collections peut être réalisée soit par une approche PCR sur l'ADN des différentes lignées (Krysan et al., 1996), soit par interrogation *in silico* des bases de données contenant les séquences des régions flanquantes des ADN-T ou des transposons (FST).

1.1. Criblage par PCR de la collection de lignées ADN-T de l'INRA de Versailles

Une partie (22500 lignées) de la collection des lignées ADN-T de l'INRA de Versailles (43200 lignées), organisée en pools deux dimensions (F. Gaymard, INRA/ENSAM, Montpellier) a été analysée. Cette collection a été criblée par PCR en utilisant différentes combinaisons d'amorces spécifiques pour les gènes *AtBP80* et pour les bordures de l'ADN-T (annexe 3). Quatre amorces ont été définies pour chaque gène *AtBP80* de façon à permettre la détection de toute insertion dans la séquence codante. Les produits PCR sont hybridés successivement avec une sonde complexe *AtBP80* (mélange de fragments PCR amplifiés à partir des gènes *AtBP80*) puis avec une sonde ADN-T. Un signal d'hybridation identique, obtenue pour chacune des deux hybridations successives, suggère la présence d'une lignée *knock-out* dans le pool

d'ADN pour le gène considéré. Dans ce cas, de nouvelles analyses PCR/hybridation sont conduites sur les sous-pools correspondants. Concernant la recherche de mutant *knock-out* pour les sept gènes *AtBP80*, aucun des produits PCR obtenus n'a donné de signal d'hybridation avec les deux sondes, indiquant l'absence de mutant *atbp80* ayant une insertion d'ADN-T dans la région codante dans la collection de 22500 lignées ADN-T.

1.2. Recherche in silico de mutants knock-out

Quatre bases de données de type FST ont été analysées dans le but de repérer un mutant *atbp80* potentiel. La première base de données est celle générée par le groupe de J. Jones qui contient les séquences FST de 7000 lignées transposons de type En/Spm (Tissier et al., 1999). L'insertion du transposon dans un gène *AtBP80* est recherchée par une approche de type *Blast*. La deuxième base de données provient du groupe de V. Sundaresan : 500 lignées ont été générées avec le transposon Ds (Parinov et al., 1999). Dans les deux cas, aucune insertion dans un gène *AtBP80* n'a été repérée.

La troisième base de données est la base FLAGdb/FST qui contient les séquences FST des lignées ADN-T de l'INRA de Versailles (Samson et al., 2002). Cette base a été enrichie régulièrement de nouvelles séquences FST depuis 2000. L'interrogation de cette base est faite par une approche de type *Blast* ou en soumettant directement le n° d'accension du gène. Deux mutants potentiels ont été repérés en mars 2001 : un mutant pour le gène *AtBP80a'* (nommé *vsr-a'*) et un mutant pour le gène *AtBP80c* (nommé *vsr-c*) (figure 16).

La quatrième base de données consultée est la base de données du *SALK institute* qui est devenue accessible au cours de la thèse. Cette base de données est enrichie régulièrement de nouvelles FST. Elle contient actuellement les séquences FST de 88000 lignées ADN-T (Alonso et al., 2003). En mai 2002, deux autres mutants potentiels ont été repérés dans cette base de données : un mutant pour le gène *AtBP80d* (nommé *vsr-d*) et un mutant pour le gène *AtBP80f* (nommé *vsr-f*).

Ces recherches ont permis de repérer des mutants potentiels pour les gènes *AtBP80a'*, *AtBP80c*, *AtBP80d* et *AtBP80f*. Les graines des lignées mutantes ont été récupérées en vue de réaliser la caractérisation fonctionnelle des gènes correspondants.

2. Caractérisation préliminaire des mutants

2.1. Etude préliminaire des mutants vsr-d et vsr-f

Des graines de génération T3 des deux mutants potentiels *vsr-d* et *vsr-f* ont été obtenues du *SALK Institute* en mai 2002. Pour le mutant *vsr-d*, l'insertion de l'ADN-T est

prédite au niveau du 6^{ème} exon du gène *AtBP80d*, c'est-à-dire au niveau de la région codant le motif EGF1 (figure 16). L'insertion de l'ADN-T pour le mutant *vsr-f* est prédite dans la région codante du gène *AtBP80f*, 70 pb avant le codon 'Stop', c'est-à-dire dans la région codant la partie C-terminale cytosolique de la protéine (figure 16).

Les graines de ces deux mutants ont été semées et les plantes ont été cultivées afin d'obtenir les graines de la génération T4. Les graines de la génération T4 ont été semées sur milieu MS avec sélection kanamycine. Un taux de germination approchant les 100 % a été obtenu pour chaque lignée et aucune plantule résistante à la kanamycine n'a été repérée. A l'occasion du congrès « *Séville Arabidopsis 2002 meeting* », il a été indiqué que 20 % des lignées du *SALK Institute* présentent un phénomène de *silencing* du gène *nptII*, ce qui empêche l'application de la sélection kanamycine. Dans la mesure où ces deux mutants ont été obtenus en mai 2002, ils n'ont pas l'objet d'analyses plus approfondies.

2.2. Etude préliminaire du mutant potentiel *vsr-c*

Le mutant potentiel *vsr-c* provenant de la collection de lignées ADN-T de Versailles a été obtenu en mars 2001. L'insertion de l'ADN-T est prédite à 340 pb en amont du codon d'initiation de traduction du gène *AtBP80c*. D'après la nomenclature des mutants d'insertion proposée par (Krysan et al., 1999), le mutant potentiel *vsr-c* peut être de type *knock-out*, *knock-down* ou *knock-on* suivant si l'ADN-T entraîne respectivement une inactivation, une sous-expression ou une sur-expression du gène.

La caractérisation moléculaire réalisée par *Southern Blot* et par PCR a confirmé que le mutant *vsr-c* possède une insertion unique d'ADN-T dans le génome et que cette insertion est localisée en amont du codon d'initiation 'ATG' du gène *AtBP80c*. Chez la plante sauvage, l'expression du gène *AtBP80c* a été détectée uniquement dans la fleur. Chez une lignée homozygote pour l'insertion, l'analyse d'expression par RT-PCR a révélé l'existence d'un transcrit du gène *AtBP80c* dans les fleurs comme chez la plante sauvage. Le mutant *vsr-c* ne correspond donc pas un mutant *knock-out*. Par ailleurs, l'analyse phénotypique de lignées homozygotes n'a pas permis de révéler un phénotype qui pourrait être corrélé à une modification de l'expression du gène *AtBP80c*.

Au vu de ces résultats, les trois mutants *vsr-d*, *vsr-f* et *vsr-c* n'ont pas fait l'objet d'analyses plus approfondies. Les travaux se sont focalisés sur l'analyse fonctionnelle du quatrième mutant : le mutant *vsr-a*'.

3. Caractérisation moléculaire et phénotypique du mutant *vsr-a'*

3.1. Analyse de ségrégation et analyse moléculaire

Le mutant potentiel *vsr-a'* a été repéré dans la collection de lignées ADN-T de l'INRA de Versailles en mars 2001. La séquence de la FST laisse supposer que l'insertion se situe 450 pb avant le codon d'initiation de la traduction du gène *AtBP80a'*.

Des graines de génération T3 ont été stérilisées et semées sur milieu MS avec sélection kanamycine. Parallèlement, des graines de lignée sauvage WS-4 ont été semées dans les mêmes conditions. Après cinq jours de culture, plus de 95 % des graines sauvages ont germé. Pour les graines T3 de la lignée mutante *vsr-a'*, à cinq jours, le taux de germination est de 68 % et, parmi les plantules obtenues, un tiers sont sensibles à la kanamycine (figure 17C). La ségrégation observée est approximativement : $\frac{1}{4}$ de graines non germées, $\frac{1}{4}$ de plantules sensibles et $\frac{1}{2}$ de plantules résistantes. Selon le modèle proposé par Dubreucq et al. (1996), les graines non germées seraient homozygotes pour l'insertion, les plantules résistantes seraient hémizygotes pour l'insertion et les plantules sensibles seraient de type sauvage (figure 17A). D'après cette hypothèse, une plantule hémizygote doit produire trois types de descendants dans les proportions suivantes : $\frac{1}{4}$ de graines non germées, $\frac{1}{4}$ de plantules sensibles et $\frac{1}{2}$ de plantules résistantes.

Les plantules résistantes (supposées hémizygotes) ont été repiquées sur tourbe et cultivées jusqu'à l'obtention des graines de génération T4. Dix lots de graines de la génération T4 ont été stérilisées et semées sur milieu MS en présence de kanamycine. Après cinq jours de culture, la ségrégation suivante est observée : $\frac{1}{4}$ de graines non germées, $\frac{1}{4}$ de plantules sensibles et $\frac{1}{2}$ de plantules résistantes (figure 17D-E). Les résultats suggèrent que les graines T4 proviennent d'un parent hémizygote (figure 17B).

Afin de confirmer ces données, le génotype de plantules de génération T4 résistantes à la kanamycine a été analysé par PCR. Deux réactions PCR distinctes ont été conduites sur l'ADN de ces plantules : une première réaction qui permet d'amplifier spécifiquement l'allèle sauvage et une deuxième réaction qui permet d'amplifier spécifiquement l'allèle muté. Pour tous les individus testés, un produit PCR est détecté avec chaque couple d'amorces (figure 17F). Les plantules possèdent donc un allèle sauvage et un allèle muté interrompu par l'ADN-T : elles sont hémizygotes pour l'insertion. Le séquençage du fragment de 773 pb obtenu avec une amorce spécifique de la bordure gauche de l'ADN-T (amorce Tag5) et une amorce définie dans le début de la région codante du gène *AtBP80a'* (amorce AP-2) a confirmé l'insertion de l'ADN 450 pb en amont de l'ATG (figures 18A et 18C). Des expériences de type *Southern Blot*

avec une sonde complexe correspondant à l'ADN-T ont montré que le mutant *vsr-a'* ne possédait qu'une insertion d'ADN-T dans son génome (figure 18B). La recherche de transcrit du gène *AtBP80a'* n'a pas été réalisée à partir des graines non germées à cause du manque de matériel et des difficultés d'analyse.

Le mutant *vsr-a'* à l'état homozygote ne germe pas dans les conditions testées. L'absence de germination est due à une mutation monogénique et récessive causée par l'insertion d'un ADN-T dans le gène *AtBP80a'*. Ces résultats sont en accord avec les travaux sur la recherche de gènes essentiels pour la germination (Dubreucq et al., 1996) et peuvent aussi être corrélés avec les résultats obtenus pour les lignées antisens (chapitre 1). **Le mutant *vsr-a'* présente les caractéristiques d'un mutant affecté dans le processus de germination.**

3.2. Analyses macroscopique et cytologique des graines

Le mutant *vsr-a'* présente une inhibition de la germination à l'état homozygote qui peut être la conséquence d'une malformation de la graine. Une graine de type sauvage est composée d'un embryon entouré d'une assise cellulaire (endosperme) et d'une couche épaisse de couleur jaune/marron (tégument). Afin de révéler d'éventuelles anomalies structurales pouvant expliquer l'inhibition de germination du mutant *vsr-a'*, des observations de graines ont été réalisées.

Au niveau macroscopique, les graines non germées du mutant *vsr-a'* ont une couleur et une taille comparables aux graines de la lignée sauvage WS-4. La structure interne de la graine a été observée sur des coupes de graines *vsr-a'* non germées et de graines sauvages après imbibition. Aucune différence significative n'a été mise en évidence indiquant que l'embryon contenu dans les graines du mutant *vsr-a'* est normal.

Parmi les mutants caractérisés présentant un défaut de germination, plusieurs mutants, dont les mutants *gl2* et *bs1-1*, ont une altération de la structure du tégument (Debeaujon et al., 2000; Downie et al., 2003). Afin d'obtenir des informations sur la structure du tégument des graines du mutant *vsr-a'*, la surface de graines sèches a été examinée en microscopie électronique à balayage. Comme il n'est pas possible d'isoler à l'avance les graines incapables de germer, les graines sèches obtenues à partir d'une lignée hémizygote ont été utilisées. Parmi cette population de graines, on retrouve des graines homozygotes pour l'insertion incapables de germer mais également des graines hémizygotes et des graines sauvages. Dans la suite du manuscrit, un lot de graines descendantes d'un individu hémizygote sera désigné par l'expression « **graines HSH** » (HSH pour hémizygotes-sauvages-homozygotes).

En microscopie électronique à balayage, les graines sauvages présentent une couche épidermique de cellules hexagonales avec des parois radiales fines. Chaque cellule possède une structure centrale émergente appelée *columella*. Les contours de chaque cellule apparaissent réguliers (figure 19). Pour le mutant *vsr-a'*, certaines graines HSH présentent des contours moins réguliers que les graines sauvages (figure 19). Environ un tiers des graines HSH présentent ces anomalies de structure du tégument, ce qui permet de supposer qu'elles correspondent à la population des homozygotes mutants. Cette analyse a été conduite sur 91 graines HSH et aucune des anomalies n'a été retrouvée parmi la population de graines sauvages examinées.

Lorsqu'une graine est mise en contact avec de l'eau, la paroi externe des cellules épidermiques est brisée, libérant un manteau transparent de composés polysaccharidiques appelé mucilage. Le mucilage libéré enveloppe rapidement toute la graine (Western et al., 2001). Des observations en microscopie électronique à balayage ont été réalisées sur des graines HSH qui n'ont pas germé et sur des graines sauvages imbibées (36 h). Pour les graines sauvages, le mucilage forme une couche épaisse autour de la graine (figure 20). Pour les graines HSH n'ayant pas réussi à germer, le mucilage n'est plus présent et les contours des cellules sont parfaitement distinguables. Les cellules épidermiques semblent vides comme si le mucilage avait été éliminé. Cette analyse a été réalisée à partir de 90 graines et seulement quatre graines HSH n'ayant pas réussi à germer possèdent encore un manteau de mucilage. Il est possible que ces graines soient des graines de génotype sauvage ou hémizygote présentant une déficience de germination. Ces résultats suggèrent que le tégument des graines homozygotes pour l'insertion présente des anomalies de structure et de fonctionnement.

Afin d'apporter d'autres informations sur ces différences de structure, le mucilage des graines a été étudié au cours de la germination. Le rouge de ruthénium est un colorant qui marque les polysaccharides acides. Il est couramment utilisé pour colorer le mucilage des graines (Western et al., 2001). Des graines HSH et des graines sauvages ont été imbibées pendant 24 h dans de l'eau puis colorées avec une solution de rouge de ruthénium. Les graines sauvages sont toutes entourées d'un halo rouge qui caractérise la présence du mucilage déployé (figure 21). Parmi la population de graines HSH, environ un tiers des graines ne possède pas ce halo rouge. Certaines graines HSH présentent de légères traces de mucilage coloré à leur surface. Ces résultats montrent que le mucilage des graines mutantes *vsr-a'* est rapidement éliminé après imbibition alors qu'il est toujours présent à la surface de graines sauvages.

Les anomalies visibles au niveau du tégument des graines mutantes apparaissent au cours de sa formation. Les étapes de la formation du tégument sont représentées à la figure

22. Les couches cellulaires périphériques de l'ovule mature vont subir une série de réorganisations aboutissant à la formation du tégument. Au niveau de la couche la plus externe (ou couche épidermique), le cytoplasme des cellules est progressivement rassemblé en une colonne au centre de la cellule. La formation de cette colonne s'accompagne d'une réduction de la taille de la vacuole et de la création d'un espace extracellulaire délimité par la paroi et la membrane plasmique. Les composés polysaccharidiques constituant le mucilage, essentiellement des pectines, sont accumulés dans l'espace extracellulaire. Une paroi secondaire cellulosique se forme à la surface de la membrane plasmique enfermant ainsi le mucilage dans un espace interpariétal. La déshydratation de la graine entraîne un affaissement de la structure cellulaire qui donne cette forme hexagonale avec une colonne centrale. Le mucilage déshydraté est compacté et occupe une grande partie de la cellule (Windsor et al., 2000; Western et al., 2001).

Il est important de remarquer que les cellules qui forment le tégument sont d'origine maternelle. Ces cellules sont donc hémizygotes. Chez le mutant *vsr-a'*, il peut paraître surprenant qu'un phénotype soit observé sur le tégument alors que ce tégument devrait, d'après son génotype, être de type sauvage. La plupart des mutations affectant le tégument sont à effet maternel, c'est-à-dire que la structure du tégument est déterminée par le génotype des cellules qui le composent (Leon-Kloosterziel et al., 1994). Toutefois, le tégument peut être affecté par des mutations à effet embryonnaire, c'est-à-dire que le génotype de l'embryon conditionne la formation du tégument. Plusieurs mutations de ce type ont été décrites, notamment la mutation *iku* chez *Arabidopsis* (Garcia et al., 2003) et les mutations *bks/ks* chez la tomate (Downie et al., 2003). Ces données montrent que, pendant la formation de la graine, l'embryon, l'endosperme et le tégument doivent suivre un développement coordonné qui fait intervenir une communication entre eux. La nature des signaux de communication n'a pas été déterminée. Comme ces mutants, le mutant *vsr-a'* présente des anomalies du tégument conditionnées par le génotype de l'embryon.

Comment la mutation *vsr-a'* de l'embryon peut affecter le développement du tégument? Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer les anomalies de structure : (i) les parois ne sont pas assez rigides et elles subissent un relâchement, (ii) la compaction du mucilage est incomplète. La compaction incomplète du mucilage pourrait être due à une modification de sa composition chimique. Au cours de l'imbibition, le mucilage est éliminé rapidement de la surface de la graine. Cette instabilité du mucilage pourrait être due à l'activité d'enzymes hydrolytiques à l'extérieur des cellules. Des déficiences dans l'adressage des protéines à la vacuole, dues à la mutation du gène *AtBP80a'*, pourraient expliquer la présence de ces enzymes hydrolytiques à l'extérieur des cellules.

La recherche de protéines dans le liquide d'imbibition des graines a été entreprise. Après imbibition des graines pendant 3 h, le liquide a été récupéré, concentré par évaporation sous vide et déposé sur gel de polyacrylamide monodimensionnel. Dans le liquide d'imbibition de graines mutantes *vsr-a'*, deux bandes de faible intensité ont été repérées. Ces deux bandes sont visuellement absentes dans le liquide d'imbibition de graines sauvages. L'identification par MALDI-TOF montre que ces deux bandes correspondent aux deux sous-unités de la cruciférine (At4g28520, appelée aussi globuline 12S). La cruciférine est une protéine de réserve synthétisée sous forme d'un précurseur qui est clivé en deux sous-unités. La forme mature de la protéine est accumulée dans la vacuole de réserve de la graine. Ces résultats préliminaires laissent penser que le mutant *vsr-a'* accumule les deux sous-unités de la cruciférine dans l'espace extracellulaire ou dans l'espace interpariétal contenant le mucilage. Ce résultat est inattendu car le rôle présumé de la protéine AtBP80a' est d'adresser les protéines à la vacuole lytique. En effet, la cruciférine est une protéine normalement accumulée dans la vacuole de réserve.

3.3. Est-ce que l'inaptitude à germer des graines *vsr-a'* est réversible ?

Le rôle de la graine est de permettre la propagation de l'espèce en assurant la protection et la nutrition de l'embryon. La formation de la graine commence par une phase active de division cellulaire et de morphogenèse et se poursuit par une phase de maturation pendant laquelle il y a accumulation de réserves et dessiccation. Même dans des conditions idéales, la plupart des graines demeurent incapables de germer pendant une période que l'on appelle « dormance ». La dormance est une mise en veille physiologique dont le but est d'empêcher la germination de la graine à un moment non favorable. Elle est contrôlée par des facteurs externes et des facteurs internes à la graine. Tant que les facteurs inhibiteurs prédominent sur les facteurs activateurs, la germination est impossible. Lorsque la dormance est levée et que les conditions sont favorables, l'activité métabolique de l'embryon augmente et la croissance redémarre : c'est la germination (Bewley, 1997; Bentsink and Koornneef, 2002).

Chez *Arabidopsis*, le rôle crucial de l'acide abscissique (ABA) dans la mise en place et le maintien de la dormance a été mis en évidence. Le rôle de l'ABA s'oppose à l'effet des gibbérellines (GA) qui favorisent la germination (Bewley, 1997). Des facteurs externes, comme la lumière et la température, interviennent également dans la régulation de la dormance (Bewley and Black, 1994). Il existe aussi une dormance qui est imposée par le

tégument (inhibition tégumentaire). La figure 23 résume les différents facteurs connus qui régulent la dormance chez *Arabidopsis*.

Le mutant *vsr-a'* présente une déficience de germination par rapport à la lignée sauvage WS-4 dans les conditions testées. Des anomalies de structure ont été repérées sur le tégument des graines mutantes mais pas au niveau de l'embryon. Les raisons pour lesquelles les graines ne germent pas restaient à déterminer. Différents essais ont été réalisés pour essayer de restaurer la capacité germinative de ces graines. Tous ces essais ont été réalisés sur des graines HSH de génération T4.

3.3.1. Est-ce que les graines *vsr-a'* présentent un retard de germination ?

Les tests de ségrégation présentés dans le paragraphe 3.1. ont été conduits sur une durée courte (5 jours) basée sur la vitesse de germination de la lignée sauvage WS-4. De nouveaux tests ont été réalisés en plaçant les graines dans des conditions standard de germination mais pendant une durée plus longue. A 10 jours après semis, une faible proportion (moins de 3 % du total de graines) de plantules homozygotes peut être identifiée par PCR parmi les plantules résistantes à la kanamycine. En augmentant le temps d'incubation des boîtes après semis à 50 jours, la proportion de plantules homozygotes atteint environ 5 % mais environ 20 % des graines ne germent toujours pas. Ces résultats indiquent que certaines graines *vsr-a'* homozygotes sont capables de germer mais que leur cinétique de germination est beaucoup plus lente que la cinétique de germination de graines sauvages WS-4. Certaines graines restent incapables de germer même après une longue période dans des conditions optimales. Ces résultats laissent penser que les graines *vsr-a'* homozygotes ont une dormance accrue par rapport à la lignée sauvage.

3.3.2. Effet de la stratification sur la germination des graines

Un des facteurs connus pour lever la dormance est un traitement des semis par une basse température pendant un temps plus ou moins long (Bewley and Black, 1994). Ce traitement est appelé stratification car, au départ, il consistait à placer des graines dans des couches de sables humides (strates) et à les exposer à de basses températures. Pour les écotypes classiques d'*Arabidopsis* comme Col-0 ou WS, il n'est généralement pas nécessaire de stratifier les graines car elles ont une dormance très faible, levée par moins d'un mois de stockage. L'incubation à 4°C des semis d'*Arabidopsis* est généralement utilisée pour permettre la synchronisation de la germination.

Un traitement de stratification destiné à lever l'inaptitude à germer du mutant *vsr-a'* a été réalisé. Pour cela, des graines HSH de génération T4 ont été stérilisées et semées sur milieu MS. Les boîtes ont ensuite été incubées à 4°C pendant 2 jours (stratification) puis placées à 23°C pendant cinq jours. Les taux de germination mesurés pour ces semis sont présentés à la figure 24. Chaque lignée présente une amélioration du taux de germination par rapport à des graines non stratifiées. Par exemple, la lignée T4.1 présente un taux de germination de 78 % sans traitement de stratification. Si les graines de cette lignée sont stratifiées, le taux de germination atteint 98 %. Lorsqu'une sélection kanamycine est appliquée, la ségrégation observée pour des graines stratifiées est 75 % de plantules résistantes et 25 % de plantules sensibles. La stratification permet donc la germination des graines homozygotes mutantes.

Ces résultats montrent que la capacité à germer des graines mutantes peut être restaurée avec une grande efficacité par la stratification. Ils confirment l'existence d'une dormance qui peut être levée par la stratification des graines.

3.3.3. Evaluation de la dormance des graines mutantes

La dormance des graines peut être levée généralement par stockage à température ambiante avec une humidité faible. Ce stockage est appelé *after-ripening*. L'état de dormance des graines est mesuré en déterminant le pourcentage de germination de lots de graines après différents délais d'*after-ripening*. Les niveaux de dormance de graines HSH et de graines sauvages WS-4 ont été évalués.

Lorsque des graines sauvages WS-4 sont semées immédiatement après récolte (délai 0 j), le taux de germination à 10 jours après semis atteint 80 % (figure 25). Plus le délai de stockage des graines est long, plus le taux de germination à 10 jours après semis augmente : 87 % pour un délai de 5 jours, 95 % pour un délai de 10 jours et 100 % pour un délai de 21 jours. Les graines sauvages WS-4 présentent donc une légère dormance immédiatement après récolte. Cette dormance est efficacement éliminée par l'*after-ripening*.

Les graines fraîchement récoltées, descendantes d'un hémizygote (graines HSH), ont un taux de germination de 40 % à 10 jours après semis. Comme pour les graines sauvages WS-4, ce taux augmente en fonction du délai de stockage : 69 % pour un délai de 5 jours, 88 % pour un délai de 10 jours et 99 % pour un délai de 21 jours. Les graines HSH ont donc une dormance plus élevée que les graines sauvages. Comme pour les graines sauvages WS-4, cette dormance est progressivement éliminée par l'*after-ripening*. Les conditions de stockage des graines utilisées dans cette expérience (23°C, humidité 40 %) éliminent donc la dormance des graines HSH.

Le mélange de graines HSH contient deux types de graines : les graines avec un phénotype sauvage (génotype hémizygote ou sauvage) et les graines avec un phénotype mutant (génotype homozygote). Les graines avec un phénotype sauvage ont une dormance équivalente à celle de la lignée sauvage. Les graines homozygotes mutantes ont une dormance accrue. Ces résultats montrent que le mutant *vsr-a'* a une dormance accrue par rapport à la lignée sauvage WS-4. Cette dormance est éliminée par un stockage des graines à 23°C (*after-ripening*).

3.3.4. Études des facteurs régulant la dormance des graines

Les résultats précédents montrent que les graines du mutant *vsr-a'* ont une dormance accrue par rapport à la lignée sauvage WS-4. Cette dormance peut être levée par un traitement de stratification ou par *after-ripening*. Plusieurs tests ont été réalisés dans le but de définir les caractéristiques physiologiques de cette dormance. Chaque test a pris en compte un minimum de 200 graines par lignée.

- Est-ce que la dormance est d'origine tégumentaire ?

Le tégument peut constituer une barrière à la germination. Ainsi lorsque les téguments de graines sauvages dormantes sont retirés, ces graines peuvent germer (Debeaujon et al., 2000). Les graines *vsr-a'* présentent des anomalies du tégument. La dormance de ces graines peut être d'origine tégumentaire. Le taux de germination de graines HSH dont le tégument a été retiré mécaniquement a été évalué. Après cinq jours, le taux de germination observé est de 75 % (figure 26B). Des graines sauvages dont le tégument a été retiré germent à 96 %. Le retrait du tégument ne permet donc pas aux graines dormantes de germer. L'inhibition tégumentaire n'est donc pas un facteur déterminant de la dormance des graines *vsr-a'*.

- Est-ce que la dormance est d'origine phytohormonale ?

Les phytohormones ont un rôle très important dans le contrôle de la dormance. En modifiant les ratios phytohormonaux, il est possible de modifier la dormance des graines (Bewley and Black, 1994).

L'éthylène favorise la germination des graines dormantes de certaines espèces (Bewley and Black, 1994). Des graines HSH ont été semées et incubées dans une atmosphère enrichie en éthylène (50 ppm, renouvelés toutes les 24 h) pendant cinq jours. Le taux de germination n'a pas été amélioré par ce traitement (figure 26C).

Les GA favorisent la germination de graines dormantes. Des graines HSH ont été semées sur des milieux contenant différentes concentrations en GA. Aucune des différentes concentrations en GA ne permet une amélioration du taux de germination (figure 26D-26F).

L'ABA est un des facteurs inhibant fortement la germination. L'ABA est accumulé au cours de la formation et de la maturation de la graine. Au cours de l'imbibition de graines dormantes, il y a une nouvelle synthèse d'ABA (Grappin et al., 2000). Le fluridone est un inhibiteur de la synthèse d'ABA. Il empêche la conversion du phytoène en ζ -carotène dans la voie de synthèse de l'ABA. Il a été montré que l'application de fluridone sur des graines dormantes pouvait améliorer le taux de germination en empêchant une nouvelle synthèse d'ABA lors de l'imbibition (Grappin et al., 2000). Des graines HSH ont été semées sur des milieux contenant du fluridone à 10 μ M ou à 100 μ M. A 10 μ M, le taux de germination de la lignée HSH T4.5 atteint 86 %. A 100 μ M, le taux de germination de plusieurs lignées HSH T4 est supérieur à 90 %. L'application de fluridone permet donc une amélioration du taux de germination. L'inhibition de la synthèse d'ABA restaure donc la capacité à germer des graines mutantes.

- Effets d'apports nutritifs et de modifications des conditions de culture

Plusieurs conditions de culture ont été testées : nature du milieu nutritif (milieu MS ou eau), nature du support (agar, papier filtre, terreau), en présence ou non de lumière. Aucune de ces différentes conditions ne modifie le taux de germination des graines HSH.

L'inhibition de la germination peut être due à un problème de mobilisation des réserves comme cela a été proposé dans l'étude des lignées antisens. Les effets d'apports d'acides aminés ou de saccharose ont été étudiés. L'apport d'acides aminés comme source nutritive n'améliore pas le taux de germination (figure 26K). L'apport de saccharose à 10 % dans le milieu ne permet pas une amélioration du taux de germination (figure 26L). La germination des graines mutantes n'est pas favorisée par les apports nutritifs d'acides aminés ou de saccharose.

L'effet positif du nitrate de potassium sur la levée de dormance chez *Arabidopsis* a été rapporté bien que les mécanismes de cet effet soient inconnus (Derkx and Karssen, 1993). Des graines HSH ont été mises à germer sur des milieux enrichis en nitrate de potassium (KNO_3). Les taux de germination des graines HSH sur ces milieux avoisinent 90 % (figure 26I-26J). Le nitrate, apporté sous forme de KNO_3 , améliore le taux de germination des graines HSH.

3.3.5. Bilan des tests de germination

Les graines du mutant *vsr-a'* présentent une dormance accrue par rapport aux graines sauvages de la lignée WS-4. Cette dormance est levée par le stockage des graines à une température de 23°C (*after-ripening*) et par la stratification des graines. L'inhibition de

la synthèse d'ABA par du fluridone et l'apport de KNO_3 permettent également d'éliminer cette dormance.

3.4. Analyse des lignées homozygotes

L'inhibition de la germination du mutant *vsr-a'* a pu être levée par un traitement de stratification. Il était donc envisageable de cultiver les plantules homozygotes obtenues pour récupérer des lots de graines contenant uniquement des individus homozygotes.

Les plantules T3 résistantes provenant de graines stratifiées sont cultivées dans les conditions standard pour obtenir des graines T4. Cet ensemble de plantules comprend à la fois des homozygotes et des hémizygotes. Toutes les plantes ont une croissance comparable à la croissance de plantes sauvages. Les graines T4 obtenues ont ensuite été stérilisées, semées sur milieu MS avec sélection kanamycine et incubées à 23°C avec ou sans traitement de stratification préalable.

Après cinq jours, les taux de germination observées sont inattendus (figure 27). Certaines lignées (T4.11 à T4.14) présentent un taux de germination supérieur à 100 % sans traitement de stratification. Les plantules obtenues pour ces lignées sont toutes résistantes à la kanamycine, ce qui confirme que le parent de chacune de ces lignées était homozygote et que ces lignées sont par conséquent elles aussi homozygotes pour l'insertion. De plus, le génotype de ces plantules a été confirmé par PCR. Conformément à ce qui est décrit dans les paragraphes précédents, le taux de germination attendu pour une lignée homozygote devrait être proche de zéro.

Les autres lignées (T4.15 à T4-18) présentent un taux de germination proche de 75 % sans traitement de stratification (figure 27). Parmi les plantules obtenues pour ces lignées, il y a des plantules sensibles à la kanamycine. Ceci montre que le parent de chacune de ces lignées était hémizygote. Ces lots de graines T4 descendants d'un individu hémizygote présentent la ségrégation attendue : $\frac{1}{4}$ de graines non germées, $\frac{1}{4}$ de plantules sensibles et $\frac{1}{2}$ de plantules résistantes. L'inhibition de germination n'est donc observée que lorsque le parent de la lignée de graines est hémizygote. **Ces résultats indiquent que, de façon surprenante, les lignées homozygotes ne présentent plus l'incapacité à germer.**

Les graines homozygotes de génération T4 ont été observées en microscopie électronique à balayage et colorées avec du rouge de ruthénium pour rechercher les anomalies repérées précédemment. Ces graines sont comparables avec des graines sauvages (figure 28). Aucune anomalie n'a pu être repérée sur l'ensemble des graines homozygotes de génération T4 étudiées.

La recherche d'un transcrit du gène *AtBP80a'* a été réalisée par RT-PCR sur des plantes homozygotes pour l'insertion. Cette analyse permet de détecter un transcrit du gène dans les plantes. Ce résultat montre que le gène *AtBP80a'* peut s'exprimer chez le mutant homozygote *vsr-a'*. Ce mutant n'est donc pas un mutant *knock-out* mais il peut y avoir une dérégulation du gène due à la présence de l'ADN-T dans la région promotrice. Cependant, l'existence possible de cette dérégulation n'explique pas l'instabilité du phénotype du mutant *vsr-a'*.

Des plantes homozygotes de génération T4 ont ensuite été cultivées jusqu'à l'obtention des graines de génération T5. Les graines de génération T5 germent avec un taux proche de 100 % au bout de cinq jours dans les conditions standard. De plus, des tests de dormance ont montré que des graines T5 avaient la même aptitude à germer que des graines sauvages (figure 29). Ces résultats montrent que la perte du phénotype « incapacité à germer » est héritable de génération en génération. **L'hypothèse qui paraît la plus vraisemblable pour expliquer ces résultats est l'existence d'une régulation épigénétique au niveau du locus muté par l'insertion de l'ADN-T.** L'étude de cette hypothèse fait l'objet du paragraphe suivant.

3.5. Hypothèse du mécanisme épigénétique

Le terme « épigénétique » est employé pour décrire les phénomènes biologiques qui ne peuvent pas être expliqués par la génétique mendélienne classique. La régulation épigénétique produit un changement héritable, mais potentiellement réversible, de l'expression génique sans modification de la séquence d'ADN (Wolffe and Matzke, 1999). Le support de l'information épigénétique est (i) la méthylation de l'ADN, c'est-à-dire l'ajout de groupement méthyl aux cytosines et (ii) la modification des histones par acétylations, phosphorylations,... Les mécanismes épigénétiques ont un rôle très important dans le développement et dans l'adaptation à l'environnement comme dans le cas du contrôle de la floraison par la vernalisation (Sheldon et al., 2000; Finnegan, 2002). Les mécanismes épigénétiques sont aussi impliqués dans le contrôle des éléments génétiques envahissants comme les transposons ou les virus. De nombreux mécanismes permettent la détection et l'inactivation de ces ADN intrus qui menacent l'intégrité du génome (Kumapala et al., 1998).

Chez le champignon filamenteux *Neurospora crassa*, un mécanisme de contrôle de ces éléments a été découvert récemment : le MSUD ou *meiotic silencing by unpaired DNA* (Shiu et al., 2001). Lors de la prophase I de la méiose, il y a appariement des chromosomes homologues. Si une région de l'ADN d'un chromosome ne peut pas s'apparier avec la région correspondante de l'autre chromosome, une boucle d'ADN non appariée va alors se former.

Cette boucle d'ADN non appariée est détectée et entraîne un *silencing* de tous les gènes qui présentent une homologie de séquence avec l'ADN non apparié (figure 30). De plus, il a été montré qu'une ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRP) codée par le gène *sad-1* était nécessaire pour le MSUD (Shiu et al., 2001; Shiu and Metzenberg, 2002). Ceci suggère que le MSUD a des points communs avec les mécanismes de *silencing* post-transcriptionnel (PTGS) qui impliquent également des RdRP. Chez *N. crassa*, le MSUD apparaît comme un mécanisme de protection contre l'invasion de transposons ou de virus car il peut détecter et inactiver les nouvelles séquences présentes en une seule copie dans le génome diploïde. Ce mécanisme n'a été décrit que chez *N. crassa*, mais son existence a été suggéré chez d'autres espèces eucaryotes où il pourrait aussi participer au contrôle des éléments mobiles (Shiu et al., 2001; Cogoni, 2002).

3.5.1. Application théorique du modèle de MSUD au mutant *vsr-a'*

L'existence d'un mécanisme similaire chez les végétaux permettrait d'expliquer les ségrégations inattendues du mutant *vsr-a'*. Un parent hémizygote possède un ADN-T inséré dans le gène *AtBP80a'* dans un seul chromosome. Lors de l'appariement des chromosomes à la méiose, cet ADN-T va former une boucle d'ADN non apparié. Cet ADN non apparié pourrait alors être une cible pour le mécanisme de MSUD, entraînant le *silencing* des gènes de cette boucle d'ADN non apparié. L'influence du MSUD sur l'expression du gène *AtBP80a'* sera examinée dans le paragraphe 3.5.2. Le MSUD peut générer des épiallèles, c'est-à-dire des allèles méthylés portant une information épigénétique transmissible à la descendance. Une plante hémizygote subissant le MSUD lors de la formation des gamètes va produire trois types de graines (figure 31) :

- des graines qui ont reçu deux allèles sauvages (non méthylés) et qui sont capables de germer (graines sauvages),
- des graines qui ont reçu un allèle sauvage et un épiallèle et qui sont capables de germer grâce à la présence de l'allèle sauvage (graines hémizygotes),
- des graines qui ont reçu deux épiallèles et qui sont déficientes pour la germination (graines homozygotes pour l'insertion).

Il a été montré qu'un traitement de plantes par de basses températures entraînait une réduction de la méthylation du génome (Burn et al., 1993). La stratification qui consiste à traiter les graines par un froid humide peut entraîner la déméthylation de l'ADN-T permettant alors la réactivation du gène *AtBP80a'* chez les graines homozygotes (figure 31) et la restauration de la capacité germinative de ces graines.

Une plante homozygote obtenue par stratification va se développer comme une plante sauvage. A la méiose, les deux copies d'ADN-T sont appariées. Il n'y a pas formation d'une boucle d'ADN non apparié et il n'y a donc pas méthylation de l'ADN (figure 31). Le gène *AtBP80a'* peut donc s'exprimer permettant la germination des graines homozygotes mutantes.

3.5.2. Influence de l'ADN-T sur l'expression du gène *AtBP80a'*

L'insertion de l'ADN-T se situe à 450 pb en amont du codon 'ATG'. La région entre la bordure gauche de l'ADN-T et le codon 'ATG' a une taille suffisante pour permettre l'expression du gène *AtBP80a'*. En effet, un transcrit de ce gène est détecté par RT-PCR avec des amorces s'hybridant dans la région 3' (voir paragraphe 3.4.). L'insertion de l'ADN-T n'entraîne donc pas une inactivation du gène (*knock-out*) mais peut modifier son niveau de transcription.

Le mécanisme de MSUD peut entraîner une méthylation de l'ADN non apparié qui correspond à l'ADN-T. Il a été montré que la méthylation d'une région délimitée de l'ADN peut se propager aux régions adjacentes (Pelissier et al., 1999; Arnaud et al., 2000). Chez le mutant *vsr-a'*, il est donc envisageable que la méthylation se propage au-delà de l'ADN-T et affecte la région entre la bordure gauche de l'ADN-T et le codon 'ATG' (figure 32). La méthylation de cette région pourrait être responsable de l'inactivation du gène *AtBP80a'*. Des travaux récents décrivent l'inactivation d'un promoteur associée à une propagation de la méthylation (Fojtova et al., 2003).

L'insertion d'un ADN-T peut aussi entraîner une perturbation de l'expression des gènes à proximité. Il a été montré qu'un ADN-T pouvait entraîner la production de transcrits anormaux du gène dans lequel il est inséré (Zhu et al., 2002). Ces nouveaux transcrits peuvent être des transcrits dits « aberrants », c'est-à-dire des transcrits qui sont reconnus et détruits par des mécanismes de PTGS. La recherche de transcrits anormaux a été réalisée chez le mutant *vsr-a'*. En utilisant une amorce s'hybridant à l'extrémité de l'ADN-T (Tag5) et une amorce s'hybridant dans la région 3' UTR du gène *AtBP80a'* (At2a'AS), un transcrit « hybride » de 2673 pb est détecté (figure 32). Ce transcrit est appelé transcrit « hybride » car il comprend un fragment de l'ADN-T et le cadre ouvert de lecture du gène *AtBP80a'*.

Afin de quantifier le niveau de transcription du gène *AtBP80a'*, des expériences de RT-PCR quantitative ont été réalisées avec des amorces s'hybridant dans la région 3' du gène (At2a'S et At2a'AS). Les résultats montrent que l'expression du gène *AtBP80a'* est augmentée d'un facteur 10 chez les plantes homozygotes et hémizygotés par rapport aux plantes sauvages (figure 33). A cette étape, il n'est pas possible de déterminer si ce niveau de

transcrits est dû à l'accumulation de transcrits sauvages du gène ou à l'accumulation de transcrits « hybrides ».

Ces résultats montrent que l'ADN-T entraîne la génération d'un nouveau transcrit chez le mutant *vsr-a'*. Ce transcrit « hybride » pourrait être à l'origine de l'inactivation du gène *AtBP80a'* via la propagation de la méthylation de l'ADN-T au gène ou par des mécanismes associés à la dégradation d'ARN.

3.5.3. Confirmation expérimentale du modèle par *back-cross*

Pour confirmer le modèle de MSUD présenté ci-dessus, des individus homozygotes de la lignée T4.11 ont été croisés avec des individus de la lignée sauvage WS-4. En effet, l'inhibition de la germination est observée uniquement sur des graines homozygotes issues d'un parent hémizygote. Si l'hypothèse est correcte, le croisement d'une plante homozygote avec une plante sauvage va produire une lignée hémizygote pour l'insertion. Cet hémizygote doit produire une population de graines HSH dont le pourcentage de germination doit être d'environ 75 %. Le principe de ce *back-cross* est présenté en annexe 5.

Pour réaliser le croisement, le pollen d'individus homozygotes a été placé sur le pistil de fleurs d'individus sauvages. Plusieurs siliques ont été récupérées et les graines obtenues ont été semées sur milieu avec sélection kanamycine. Toutes les plantules obtenues (71 plantules pour 71 graines semées) sont résistantes à la kanamycine, ce qui signifie qu'elles sont hémizygotes. Dix plantules ont été repiquées sur tourbe et cultivées jusqu'à l'obtention des graines. Ces graines, appelées BC, ont été semées sur milieu avec sélection kanamycine, puis incubées à 25°C avec ou sans traitement de stratification préalable. Les ségrégations observées sur plus de 400 graines après cinq jours sont présentées à la figure 34. Les graines non stratifiées ont un taux de germination réduit par rapport aux graines sauvages : ce taux est compris entre 70 % et 80 % pour chaque lignée. Les graines stratifiées présentent une augmentation du taux de germination par rapport aux graines non stratifiées.

Ces résultats obtenus à partir de dix lignées sont en accord avec l'hypothèse de MSUD proposée pour expliquer les ségrégations. **Ils montrent que le défaut de germination est certainement dû à un contrôle épigénétique de l'expression du gène *AtBP80a'*.** De plus, le *back-cross* confirme l'existence de la liaison entre le défaut de germination et la présence de l'ADN-T dans le gène *AtBP80a'*.

3.5.4. Analyse de la méthylation de la région 5' du gène *AtBP80a'*

Afin de vérifier l'hypothèse du contrôle épigénétique par la méthylation de l'ADN, la méthylation des cytosines de la région de l'insertion a été analysée par la méthode de

traitement de l'ADN au bisulfite. Cette analyse s'est focalisée sur la région de 650 pb située en amont de l'ATG du gène *AtBP80a'* dans les graines sauvages, les graines homozygotes pour l'insertion et les graines hémizygotiques pour l'insertion. Seul le brin positif de l'ADN a été considéré.

L'analyse de méthylation de l'ADN extrait de graines sauvages ou de graines homozygotes capables de germer révèle qu'aucune cytosine n'est méthylée dans cette région.

L'analyse de méthylation peut difficilement être réalisée sur des graines homozygotes non germées en raison de la difficulté d'isoler un grand nombre de graines. D'après le modèle de MSUD présenté, un individu hémizygotique produit des graines homozygotes et hémizygotiques pour lesquelles les allèles interrompus par l'ADN-T sont méthylés. L'analyse de graines HSH doit donc permettre de déterminer si l'insertion de l'ADN-T peut entraîner une méthylation. Pour l'ADN extrait à partir de graines HSH, 105 cytosines sur 109 sont méthylées dans la région correspondant à l'allèle muté par insertion (figure 35). Seulement quatre cytosines ont un niveau de méthylation variable.

Ces données restent encore préliminaires et demandent à être répétées et confirmées à partir d'une grande quantité d'ADN. Cependant, elles sont en accord avec le modèle proposé qui prévoit que l'aptitude à germer est corrélée avec le niveau de méthylation de la région 5' du gène *AtBP80a'*.

3.6. *Bilan de l'étude du mutant vsr-a'*

- Le mutant *vsr-a'* présente une dormance accrue des graines

Les graines homozygotes du mutant *vsr-a'* obtenues à partir d'un parent hémizygotique présente une dormance accrue par rapport à des graines sauvages. Des anomalies structurales ont été retrouvées au niveau du tégument des graines mais la dormance ne semble pas liée à une inhibition tégumentaire. Cette dormance peut être levée par l'*after-ripening*, c'est-à-dire en conservant les graines récoltées au sec et à température ambiante (23°C), mais également par la stratification, par l'apport de nitrate de potassium et par le fluridone, un inhibiteur de la synthèse d'ABA.

D'une façon générale, l'ABA maintient les graines en état de dormance tandis que les GA s'opposent à cet effet en favorisant la germination. Il a été montré que le niveau d'ABA augmente au cours de l'imbibition de graines dormantes chez le tabac et que l'application de fluridone, qui bloque la synthèse d'ABA, permet leur germination (Grappin et al., 2000). Le froid et l'*after-ripening* ont un effet stimulant sur la levée de dormance en augmentant la sensibilité de l'embryon aux GA, mais aussi par d'autres voies indépendantes des GA (Derks and Karssen, 1993; Debeaujon and Koornneef, 2000; Alonso-Blanco et al., 2003). La levée de

dormance de la graine par la stratification et l'*after-ripening* semble aussi liée à une réduction importante du niveau d'ABA (Debeaujon and Koornneef, 2000). En ce qui concerne le nitrate de potassium, son mode d'action n'a pas été déterminé. Un modèle général basé sur ces résultats et inspiré du modèle de Debeaujon et al. (2000) est présenté à la figure 36.

Dans le cas du mutant *vsr-a'*, la dormance est levée par la stratification, l'*after-ripening* et par le fluridone. Comme ces trois facteurs interviennent sur la dormance notamment via l'ABA, **l'hypothèse qui est proposée est que les graines du mutant *vsr-a'* auraient une accumulation élevée d'ABA** (figure 36, hypothèse n°1). L'inhibition de la synthèse d'ABA (fluridone) ou une réduction importante du niveau d'ABA (stratification, *after-ripening*) favoriserait alors la germination. Une accumulation d'ABA trop importante pourrait expliquer l'inefficacité sur la germination des apports exogènes de GA : la balance phytohormonale est trop déséquilibrée.

Une deuxième hypothèse (figure 36, hypothèse n°2) peut également expliquer les résultats obtenus. L'apport de GA à différentes concentrations ne lève pas la dormance bien que ce traitement soit généralement efficace sur les graines dormantes. **Il est possible que les graines ne soient plus suffisamment sensibles aux GA.** La stratification et l'*after-ripening* sont connus pour être capable d'augmenter la sensibilité aux GA. Quant au fluridone, il permettrait de rééquilibrer la balance phytohormonale en empêchant la synthèse d'ABA dans la graine imbibée.

La protéine AtBP80a' semble donc jouer un rôle dans la dormance et la germination des graines. La sensibilité aux GA ou le métabolisme de l'ABA peut être affecté par l'inactivation du gène *AtBP80a'*. La première hypothèse proposée pour expliquer la dormance accrue des graines est une augmentation de l'ABA. L'ABA peut s'accumuler dans les graines mutantes incapables de germer soit parce qu'il y a surproduction d'ABA, soit parce que l'ABA n'est pas éliminé de façon efficace. L'ABA peut être éliminé de trois façons : par dégradation, par conjugaison et par compartimentation. Les voies de dégradation de l'ABA sont peu connues mais certaines font intervenir des enzymes de la vacuole lytique.

Afin de valider l'hypothèse de l'accumulation de l'ABA dans les graines *vsr-a'* incapables de germer, le contenu en ABA des graines pourrait être évalué. De plus, certains gènes nécessaires à la germination sont contrôlés par les GA et l'ABA. Il serait intéressant d'établir le profil d'expression de ces gènes pour les graines *vsr-a'* incapables de germer. L'obtention de ces données permettrait de mieux comprendre la régulation de la dormance chez le mutant *vsr-a'*.

- Le mutant accumule des protéines de réserve dans l'espace extracellulaire

Le mutant *vsr-a'* semble accumuler des protéines de réserve dans l'espace extracellulaire mais en quantité faible. Ce résultat pourrait être interprété comme un défaut d'adressage des protéines de réserve à la vacuole dû à l'inactivation du gène *AtBP80a'*. Toutefois, le mutant *vsr-a'* présente une dormance accrue qui semble impliquer l'ABA et les GA. Il a été montré que le mutant *ga-1* (déficient en GA), incapable de germer sans l'apport exogène de GA, présente une hyper accumulation de protéines de réserve (Gallardo et al., 2002). L'accumulation des protéines de réserve chez *vsr-a'* peut être due, comme chez le mutant *ga-1*, à une surproduction liée à la perturbation de la balance GA/ABA. Dans ce cas, l'accumulation des protéines de réserve dans l'espace extracellulaire du mutant *vsr-a'* n'est pas directement liée à l'inactivation du gène *AtBP80a'*.

- L'insertion de l'ADN-T induit des modifications épigénétiques

Le mutant *vsr-a'* présente une régulation épigénétique du gène *AtBP80a'* causée par l'insertion de l'ADN-T dans la région promotrice du gène. Seule une plante hémizygote peut produire des graines homozygotes incapables de germer. Lorsque des traitements sont réalisés pour permettre la germination de ces graines, des plantes homozygotes sont obtenues. Ces plantes homozygotes produisent des graines homozygotes parfaitement capables de germer. Ainsi, le phénotype n'est pas héritable selon les lois de génétique mendélienne. Le modèle proposé pour expliquer ces résultats est basé sur le modèle de MSUD (*meiotic silencing by unpaired DNA*) mis en évidence récemment chez *N. crassa*.

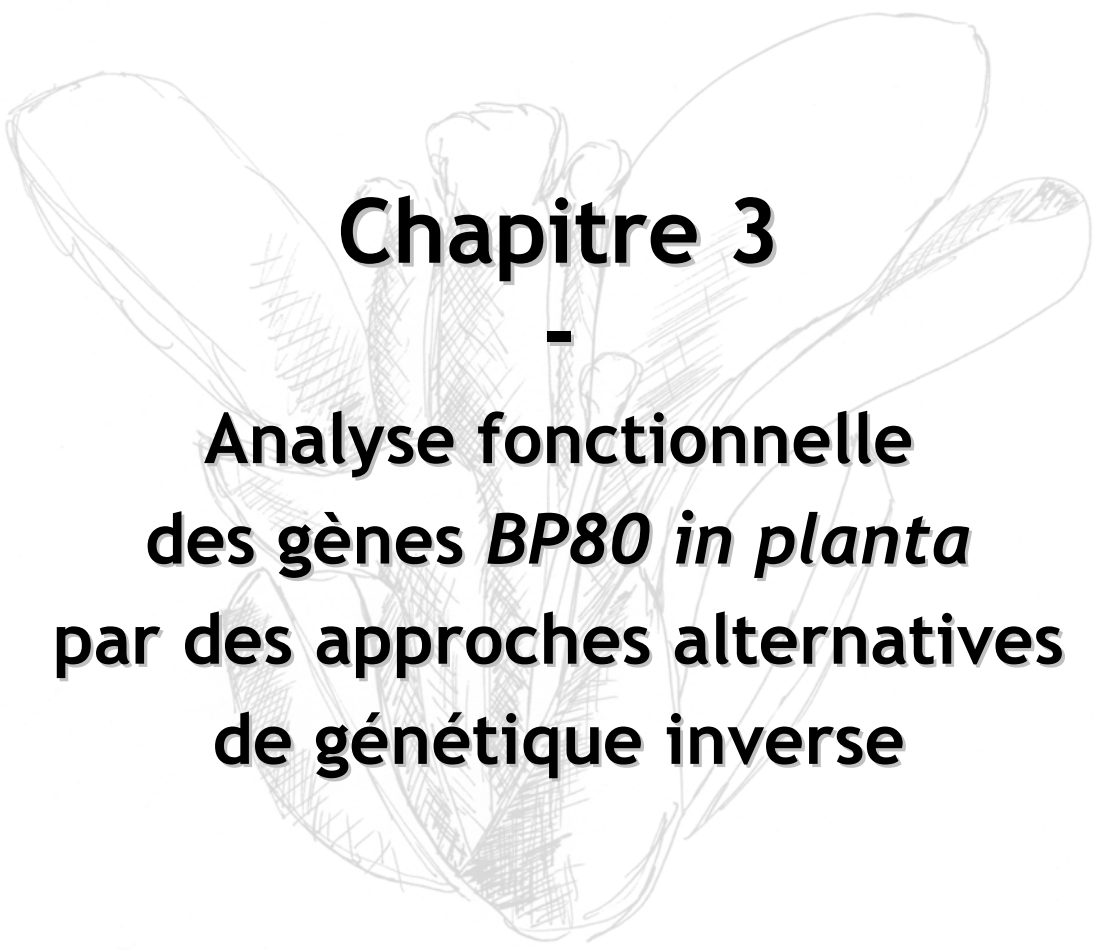
Les résultats obtenus à partir d'un croisement de type *back-cross* ont confirmé la validité du modèle de MSUD. L'analyse de méthylation étant préliminaire, il est difficile d'associer le phénomène de MSUD à une méthylation de l'ADN. Ces résultats suggèrent cependant qu'un mécanisme de MSUD existe chez *A. thaliana* comme chez *N. crassa*. L'étude du MSUD chez le mutant *vsr-a'* peut être approfondie par de nouvelles analyses de méthylation et également par la recherche de siRNA correspondant à cette région (voir chapitre 3, paragraphe 1. et figure 38). De plus, il serait intéressant d'analyser d'autres mutants hémizygotes pour une insertion d'ADN-T afin de mettre en évidence que le MSUD peut toucher toute séquence qui est non appariée à la méiose.

En ce qui concerne la dormance des graines, elle pourrait être directement causée par l'inactivation du gène *AtBP80a'* par la méthylation. Les facteurs levant la dormance pourraient intervenir directement sur le niveau de méthylation du gène. Il a été montré que les traitements à basse température diminuent le niveau de méthylation du génome (Burn et al., 1993). La stratification pourrait ainsi éliminer la méthylation au niveau du gène *AtBP80a'*

et permettre par conséquent son expression. Hypothétiquement, le nitrate de potassium, le fluridone et l'*after-ripening* pourraient également intervenir sur la méthylation du génome. Une publication récente décrit une variation de méthylation chez des bourgeons plus ou moins dormants chez la pomme de terre (Law and Suttle, 2003). Les différents facteurs régulant la dormance pourraient entraîner, entre autres, une méthylation/déméthylation de certains gènes impliqués dans la dormance/germination. Un modèle hypothétique est proposé à la figure 37.

- Conclusion

Le mutant *vsr-a'* présente un défaut de germination dû à une dormance accrue ainsi que des anomalies structurales du tégument. Le phénotype du mutant *vsr-a'* est instable et ne peut pas être maintenu dans une lignée homozygote pour l'insertion d'ADN-T. Cette instabilité est liée à un mécanisme épigénétique qui semble de type MSUD. Même si ce mutant possède des caractéristiques intéressantes, les phénomènes épigénétiques entraînent des difficultés pour l'analyse du gène *AtBP80a'*. Les résultats concernant la dormance et la structure du tégument devront être confirmés et approfondis par l'analyse d'un nouveau mutant ayant intégré l'ADN-T dans la séquence codante du gène *AtBP80a'*.



Chapitre 3

-

**Analyse fonctionnelle
des gènes *BP80 in planta*
par des approches alternatives
de génétique inverse**

Au début de l'année 2001, aucun mutant d'insertion n'avait pu être isolé chez *A. thaliana* malgré les différentes approches mises en œuvre (criblage par PCR d'une collection, interrogation de bases de données FST). Deux approches alternatives ont alors été initiées dans le but d'étudier le rôle des protéines BP80 *in planta*. La première approche consiste à générer des mutants perte-de-fonction spécifiques d'un seul gène en utilisant la méthode d'ARN interférence. La deuxième approche vise à obtenir des mutants pour un gène *BP80* chez la mousse *Physcomitrella patens* en utilisant la recombinaison homologue.

1. Extinction spécifique et contrôlée des gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'* par la stratégie RNAi chez *A. thaliana*

Les lignées antisens pour le gène *AtBP80b* présentent un défaut de germination. Ce défaut de germination, aussi retrouvé pour le mutant *vsr-a'*, indique que les gènes *AtBP80* sont importants pour le fonctionnement de la cellule au cours du processus de germination. Les trois gènes (*AtBP80a*, *AtBP80a'* et *AtBP80b*) exprimés dans la graine sèche et dans la graine après imbibition sont également exprimés dans la plante entière. Les approches développées précédemment (antisens, mutants) n'ont pas permis d'appréhender le rôle des protéines BP80 après la germination. Pour déterminer le rôle de l'une de ces protéines dans le développement post-germinatif de la plante, il est nécessaire de pouvoir déclencher l'inactivation du gène à un moment choisi.

Le RNAi ou ARN interférence exploite la découverte d'un mécanisme de *silencing* post-transcriptionnel (PTGS) qui est déclenché par la détection d'un ARN double brin (dsRNA) et constitue ainsi un nouvel outil permettant de déterminer la fonction de gènes (figure 38) (Hannon, 2002; Waterhouse and Helliwell, 2003). Tout ARNm ayant une homologie forte avec cet ARN double brin est dégradé. Le rôle supposé de ce mécanisme est notamment de protéger la cellule contre les acides nucléiques mobiles comme les virus et les transposons. Les différents acteurs de ce mécanisme commencent à être identifiés (Hannon, 2002). Le RNAi a été utilisé avec succès comme outil de génétique inverse chez plusieurs organismes comme *Caenorhabditis elegans* (Fraser et al., 2000) ou *A. thaliana* (Chuang and Meyerowitz, 2000). Le RNAi nécessite la génération d'ARN double brin dans la cellule. Chez *Arabidopsis*, l'ARN double brin est généralement obtenu par le repliement en épingle à cheveux d'un ARN autoccomplémentaire produit par un transgène. Cette stratégie est dérivée de l'approche « antisens » mais elle est beaucoup plus efficace (Waterhouse et al., 1998; Chuang and Meyerowitz, 2000). Cette grande efficacité permet d'utiliser des fragments du gène d'intérêt plus petits et donc d'avoir une plus grande spécificité. Cette spécificité peut être utile pour inactiver un seul membre d'une famille multigénique comme dans le cas de la famille *AtBP80*.

L'intérêt du RNAi pour l'étude des protéines AtBP80 vient aussi du fait que l'expression du transgène est contrôlable. En utilisant un promoteur tissu-spécifique ou un promoteur inductible, il est possible de choisir le stade auquel le gène ciblé doit être inactivé. **Le RNAi apparaît ainsi comme un moyen de définir le rôle des protéines AtBP80 dans le développement post-germinatif de la plante.** C'est également une approche qui permet de confirmer les résultats obtenus avec le mutant *vsr-a'* (chapitre 2).

Tout d'abord, la mise au point d'un système de RNAi inductible sera présentée puis l'application de ce système à l'étude des gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'* sera détaillée.

1.1. Mise au point d'un système de RNAi inductible

Plusieurs travaux ont décrit l'utilisation d'ARN double brin chez les plantes pour interférer avec la fonction de gènes de façon efficace et spécifique (Chuang and Meyerowitz, 2000; Smith et al., 2000; Wesley et al., 2001). Ces travaux ont défini les critères à prendre en compte pour une efficacité optimale du système. Le RNAi est possible même en utilisant des portions courtes (100-400 pb) du gène ciblé (Chuang and Meyerowitz, 2000; Smith et al., 2000). Lorsque le gène ciblé appartient à une famille multigénique, il est important de choisir une portion du gène qui n'est pas conservée entre les différents membres (Fire et al., 1998). Il a été montré que la construction était plus efficace lorsque les parties du gène en répétition inverse étaient séparées par un intron épissable (Smith et al., 2000). En 2000, des systèmes de RNAi inductibles avaient été utilisés chez les animaux (Shi et al., 2000; Tavernarakis et al., 2000) mais pas encore chez les végétaux.

L'étude des *AtBP80* nécessite un système de RNAi capable de cibler spécifiquement un seul gène. Les régions 5' UTR et 3' UTR sont les seules régions variables dans la famille *AtBP80*. Ces régions ont une taille courte d'environ 300 pb. Le système de RNAi doit donc fonctionner efficacement avec des portions de gène d'une taille de 300 pb. La mise au point du système a été faite en utilisant 300 pb de la région 3' UTR du gène de la phytoène désaturase (*PDS*, At4g14210). Le gène *PDS* code une enzyme impliquée dans la synthèse des caroténoïdes. Lorsque ce gène est inactivé, la synthèse des caroténoïdes devient impossible. L'excès d'énergie lumineuse reçu n'est plus pris en charge par les caroténoïdes ce qui entraîne une destruction de tous les pigments (*photobleaching*). Les parties chlorophylliennes de la plante deviennent alors blanches ou translucides. Le gène *PDS* a déjà été utilisé pour l'étude de mécanismes de *silencing* car le phénotype provoqué par son inhibition est facilement observable (Baulcombe, 1999).

Chez *C. elegans*, un système de RNAi inductible a permis de reproduire efficacement le phénotype de mutants perte-de-fonction (Tavernarakis et al., 2000). Le promoteur

inductible utilisé dans cette étude est le promoteur du gène *Hsp16.2* qui est inductible à la chaleur. L'avantage d'un promoteur inductible à la chaleur est d'être induit facilement et de façon homogène. Chez *A. thaliana*, le promoteur du gène *Hsp18.2* qui est un promoteur inductible à la chaleur a été caractérisé (Takahashi et al., 1992). Lorsque les plantes ne sont pas exposées à une température de 37°C, la transcription du gène *Hsp18.2* est quasi-nulle dans les tissus de la plante à l'exception d'une forte expression au niveau de la fleur. Ce promoteur est un outil intéressant pour contrôler l'expression de gènes par un simple traitement à 37°C (Sieburth et al., 1998; Matsuhara et al., 2000). Ce promoteur inductible a servi de base pour générer le système de RNAi inductible de ces travaux de thèse.

Le gène *PDS* a été utilisé pour la mise au point du système de RNAi inductible. Dans un premier temps, l'efficacité de la construction [3' *PDS* antisens - intron - 3' *PDS* sens] (désignée par <PDS>) a été confirmée en analysant des plantes exprimant cette construction sous contrôle du promoteur constitutif 35S. Ensuite, la construction <PDS> a été placée sous contrôle du promoteur *Hsp18.2* dans le but de vérifier l'efficacité du promoteur inductible. Le système de RNAi inductible a finalement été utilisé pour étudier les gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'*.

1.1.1. Expression constitutive de la construction <PDS>

La construction <PDS> a été placée sous contrôle du promoteur 35S afin d'évaluer l'efficacité du système. Des plantes ont été transformées avec la construction p35S-<PDS> et les graines obtenues ont été semées sur milieu sélectif. Les plantules n'ayant pas intégré l'ADN-T sont sensibles à la kanamycine et deviennent rapidement de couleur jaune pâle. Les plantules ayant intégré l'ADN-T (p35S-<PDS>) se développent grâce à la résistance à la kanamycine et se distinguent nettement des plantules sensibles par leur couleur blanche voire translucide (figure 39). Seules les parties ayant une activité de division importante (bourgeon central) possèdent des pigments. Ceci s'explique par le fait que le PTGS ne fonctionne pas dans les tissus méristématiques et aussi par le fait que les conditions de lumière ne sont pas suffisamment intenses pour détruire les pigments. La construction <PDS> est donc capable d'induire le *silencing* du gène *PDS*, ce qui valide le choix des composants du système (intron et séquences 3' de petite taille).

1.1.2. Expression inductible de la construction <PDS>

La construction <PDS> a été placée sous contrôle du promoteur *Hsp18.2*. Des plantes ont été transformées avec la construction p*Hsp18.2*-<PDS> et les graines obtenues ont été

semées sur milieu sélectif. Les plantules résistantes à la kanamycine sont vertes et se développent de façon comparable à des plantules sauvages. Ces plantules ont été repiquées sur tourbe et cultivées jusqu'à l'obtention des graines. Ces graines ont été semées sur milieu sélectif. Toutes les plantules résistantes sont vertes et se développent comme des plantules sauvages.

Des plantules au stade « deux cotylédons » ont été incubées à une température de 37°C pendant 2 h (traitement d'induction). Après quelques jours de culture, les nouvelles feuilles qui apparaissent sont blanches (figure 40). Ce blanchiment des feuilles n'est retrouvé que sur les plantules *pHsp18.2-<PDS>* ayant subi un traitement à 37°C. Des plantules *pHsp18.2-<PDS>*, n'ayant pas subi de traitement, ou des plantules témoins (transformées avec le promoteur *Hsp18.2* seul), ayant subi un traitement, restent vertes. Ces résultats montrent qu'à une température standard (23°C), le système RNAi est inactif et qu'il n'entraîne pas l'extinction du gène *PDS*. L'induction par la chaleur entraîne l'extinction du gène *PDS* dans les nouvelles feuilles formées. Le promoteur *Hsp18.2* permet donc de contrôler efficacement le *silencing* du gène *PDS*.

L'induction par la chaleur a été réalisée sur des plantes plus âgées (stade rosette) cultivées sur tourbe. Après plusieurs jours de culture, les plantes *pHsp18.2-<PDS>* présentent un blanchiment ou un jaunissement des feuilles jeunes (figure 41). Les plantes *pHsp18.2-<PDS>* qui n'ont pas été traitées à la chaleur sont identiques à des plantes sauvages. Les plantes témoins (transformées avec le promoteur *Hsp18.2* seul) ayant subi un traitement à 37°C sont identiques aux plantes témoins n'ayant pas subi de traitement. Ces résultats confirment que le promoteur *Hsp18.2* permet de contrôler efficacement le *silencing* du gène *PDS*. Cependant, les feuilles ne deviennent pas complètement blanches ce qui indique la nécessité d'optimiser les conditions d'induction. Ce point a été discuté dans les travaux sur l'utilisation du promoteur *Hsp18.2* (Matsuhara et al., 2000).

Les résultats obtenus avec le gène *PDS* montrent que le système RNAi inductible est utilisable pour l'extinction contrôlée de gènes. Ce système a été retenu pour étudier les gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'*.

1.2. Etude des gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'* par RNAi

Parmi les sept gènes de la famille *AtBP80*, l'étude par RNAi s'est limitée aux gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'*. Ces deux gènes sont localisés sur le chromosome II, en orientation inverse et sont séparés par un seul gène. Ils sont transcrits dans les mêmes organes (chapitre 1) et les protéines présentent 97,1 % d'identité. Ces informations suggèrent que les protéines pourraient avoir des fonctions similaires. Les travaux ont donc porté sur le gène *AtBP80a'* dans le but d'approfondir les résultats obtenus pour le mutant *vsr-a'* et sur le gène *AtBP80a*.

Les gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'* ont une forte homologie de séquence excepté dans les régions non traduites 5' UTR et 3' UTR qui présentent une variabilité. Les régions 3' UTR des gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'* sont suffisamment divergentes entre elles pour permettre un *silencing* spécifique d'un seul gène par RNAi. L'alignement des régions 3' UTR des gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'* est représenté à la figure 42.

Deux constructions en répétition inverse séparées par un intron ont été générées : la construction [3' *AtBP80a* antisens - intron - 3' *AtBP80a* sens] spécifique du gène *AtBP80a* (désignée par <AtBP80a>) et la construction [3' *AtBP80a'* antisens - intron - 3' *AtBP80a'* sens] spécifique du gène *AtBP80a'* (désignée par <AtBP80a'>). Ces deux constructions ont été placées sous contrôle du promoteur 35S et sous contrôle du promoteur *Hsp18.2*. Des plantes ont été transformées avec ces différentes constructions et des graines ont été obtenues.

1.2.1. Analyse des lignées p35S-<AtBP80a> et p35S-<AtBP80a'>

Les graines T1 ont été récoltées et semées sur milieu sélectif. Pour les deux constructions p35S-<AtBP80a> et p35S-<AtBP80a'>, des plantules résistantes à la sélection apparaissent et se développent de façon comparable aux plantules sauvages et aux plantules témoins (transformées avec le promoteur 35S seul). Le nombre de plantules obtenues est similaire au nombre de plantules témoins obtenues avec le promoteur 35S seul. Le développement des plantes a été suivi en comparaison avec des plantes sauvages et des plantes témoins : aucune différence n'a été repérée. Les plantes ont été cultivées jusqu'à l'obtention des graines T2.

Les graines T2 ont été semées sur milieu sélectif. Le taux de germination de ces graines a été évalué à 5 jours et il a été comparé au taux de germination de graines issues de plantes témoins (figure 43A). Les taux de germination des lignées obtenues pour les constructions p35S-<AtBP80a> et p35S-<AtBP80a'> sont équivalents au taux de germination des lignées témoins. Ces taux sont proches de 90 %, ce qui montre que les graines de toutes les lignées sont capables de germer. Les plantes obtenues ont été comparées avec des plantes sauvages au cours du développement et aucune différence n'a été repérée.

1.2.2. Analyse des lignées pHsp18.2-<AtBP80a> et pHsp18.2-<AtBP80a'>

Les graines T1 ont été récoltées et semées sur milieu sélectif à 23°C. Des plantules résistantes à la sélection ont été isolées et cultivées pour les deux constructions pHsp18.2-<AtBP80a> et pHsp18.2-<AtBP80a'>. Les plantes se développent de façon comparable à des

plantes sauvages et à des plantes témoins (transformées avec le promoteur *pHsp18.2* seul). Ces plantes ont été cultivées jusqu'à l'obtention des graines T2.

Les graines T2 ont été mises à germer directement à 23°C. Dans ces conditions, après 5 jours, les taux de germination de toutes les lignées sont supérieurs à 95 % (figure 43B). Les graines T2 ont été semées sur du papier filtre imbibé et ont été placées à 37°C pendant 2 h pour permettre l'induction. Après 5 jours de culture à 23°C, toutes les lignées ont un taux de germination supérieur à 95 %.

1.2.3. Conclusions

L'induction des constructions *pHsp18.2-AtBP80a* ou *pHsp18.2-AtBP80a'* dans des graines matures ne permet pas une réduction du taux de germination. Les taux de germination observés sont équivalents aux taux de germination de graines n'ayant pas reçu de traitement d'induction et aux taux de germination de graines sauvages.

Au cours de la maturation de la graine, les protéines nécessaires à la mobilisation des réserves sont accumulées dans la vacuole lytique par les protéines AtBP80a et AtBP80a' (hypothèse). Le processus de germination ne nécessite pas une nouvelle accumulation de protéines dans la vacuole lytique. Le traitement d'induction est peut-être inefficace car réalisé à un stade où la germination est indépendante des AtBP80. Il serait intéressant de refaire les tests mais en appliquant le traitement d'induction au cours de la formation des graines. Ce traitement peut également être réalisé sur des plantes plus âgées dans le but de mettre en évidence le rôle des protéines AtBP80a et AtBP80a' à un stade plus avancé du développement.

Des plantes *p35S-AtBP80a* et *p35S-AtBP80a'* ont pu être isolées. Le nombre de transformants T1 obtenus est similaire au nombre de transformants obtenus pour les lignées témoins. Ceci indique que les constructions n'empêchent pas les graines de germer. Bien que le système RNAi soit efficace sur le gène *PDS*, il sera indispensable de vérifier par des analyses d'expression que les constructions RNAi ont un effet de *silencing* sur les gènes cibles *AtBP80a* et *AtBP80a'*. De plus, une attention particulière devra être portée sur l'évaluation du niveau de dormance des graines issus des plantes *p35S-AtBP80a* et *p35S-AtBP80a'*.

Ces lignées constituent des outils intéressants pour l'étude des gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'*. Les premiers tests réalisés sur ces lignées RNAi n'ont pas permis de mettre en évidence une inhibition de germination mais laissent penser que l'extinction spécifique d'un seul gène ne conduit pas à un blocage du processus de germination.

2. Obtention de mutants *bp80* par recombinaison homologue chez la mousse *Physcomitrella patens*

2.1. La mousse comme modèle végétal de génomique fonctionnelle

Depuis de nombreuses années, les Bryophytes sont considérées comme un modèle expérimental de biologie végétale. Les mousses présentent un développement relativement simple qui conduit pourtant à une structure (tige feuillée) similaire à la structure des autres plantes terrestres. Leur métabolisme et leur développement sont contrôlés par les mêmes régulateurs de croissance et signaux environnementaux que les autres plantes terrestres. L'analyse génétique est facilitée par le fait qu'elles ont une dominance de la phase haploïde (gamétophyte) durant leur cycle de vie. La plupart des aspects biologiques végétaux peuvent ainsi être étudiés chez les mousses (Cove et al., 1997; Reski, 1999).

Parmi les différentes mousses étudiées, la mousse *Physcomitrella patens* bénéficie d'un intérêt plus important depuis que les études de transformation génétique ont montré que l'ADN étranger pouvait s'intégrer dans son génome par recombinaison homologue de façon aussi efficace que chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette propriété, unique chez les plantes, permet d'envisager la génération directe de mutants *knock-out* par intégration ciblée dans le but d'étudier la fonction des gènes végétaux. Cette stratégie a été appliquée avec succès dans plusieurs travaux (Girke et al., 1998; Strepp et al., 1998; Girod et al., 1999). La protéine MCB1 est une sous unité du complexe 26S du protéasome présent chez tous les eucaryotes. La disruption du gène *MCB1* chez la levure a mis en évidence une sensibilité accrue à des analogues des acides aminés. Chez la souris, l'inactivation du gène *MCB1* provoque une létalité embryonnaire. Chez la mousse, les travaux de Girod *et al.* ont mis en évidence que la disruption du gène *PpMCB1* entraînait un blocage de la différenciation des bourgeons en plus de la sensibilité accrue à des analogues des acides aminés (Schaefer, 2002). Ces résultats mettent en valeur l'intérêt et l'efficacité du modèle mousse pour les études de génétique inverse.

Les étapes du cycle de développement de *P. patens* sont présentées figure 44. En présence de lumière, la spore germe et forme un réseau de filaments appelés protonema. Le protonema se compose de deux types de cellules : les chloronemata qui assurent la plus grande partie de l'activité photosynthétique et les caulonemata sur lesquels vont apparaître les bourgeons. Le bourgeon est composé de quatre cellules. Sa formation marque la transition entre la croissance apicale monodimensionnelle et la croissance caulinaire tridimensionnelle. Une tige feuillée, le gamétophyte, se développe à partir de ce bourgeon. Elle est non

vascularisée et porte des feuilles constituées d'une seule assise cellulaire. A la base de la tige, on trouve des filaments appelés rhizoïdes. Dans les conditions d'humidité et de températures adéquates, les organes femelles, les archégones, et les organes males, anthéridies, se forment sur le gamétophyte. L'anthérozoïde, issu de l'anthéridie, fusionne avec l'oogone pour former la première cellule diploïde du sporophyte. Le sporophyte se différencie au sein de l'archégone et forme une capsule contenant environ 5000 spores haploïdes.

La taille du génome de *P. patens* est estimée à 480 Mb répartis en 27 chromosomes (Reski, 1999). Pour le moment, ce génome n'a pas fait l'objet d'un programme de séquençage et aucune carte génétique ou physique n'a été réalisée. Cependant, plusieurs programmes de séquençage d'EST (*Physcomitrella EST Program*, University of Leeds, Angleterre et Washington University, Etats-Unis, www.moss.leeds.ac.uk ; PHYSCObase, National Institute for Basic Biology, Japon, moss.nibb.ac.jp) ont permis d'accumuler plus de 100000 EST dans les bases de données publiques (situation à l'automne 2003). L'analyse de ces EST montre que plus de 66 % des gènes d'*Arabidopsis* ont des orthologues chez *P. patens* (Nishiyama et al., 2003). La disruption ciblée de gènes chez *P. patens* apparaît comme un outil performant de génomique fonctionnelle pour déterminer la fonction des gènes végétaux découverts par les programmes de séquençage à grande échelle.

Alors qu'aucun mutant pour les gènes *AtBP80* n'avait pu être repéré chez *Arabidopsis* en décembre 2000, le modèle mousse a été retenu comme approche alternative pour étudier le rôle des BP80. En plus de la possibilité de cibler spécifiquement un gène pour l'inactiver, la mousse offre un accès facile aux phénotypes cellulaires grâce à sa simplicité structurale.

Les travaux décrits dans ce chapitre ont été réalisés en étroite collaboration avec les groupes de Celia Knight et d'Andrew Cuming (University of Leeds, Angleterre). Une partie de ce projet a été conduite grâce à un financement de 3 mois du programme européen de mobilité des jeunes chercheurs *Marie Curie Fellowship*.

2.2. Isolement de gènes BP80 chez la mousse

Bien que des gènes *BP80* aient été retrouvés chez plusieurs espèces comme *Arabidopsis*, le maïs, la tomate ou le potiron, leur existence chez la mousse *P. patens* restait à démontrer. Tout d'abord, en utilisant des amorces dégénérées définies dans les régions conservées de protéines BP80 chez *Arabidopsis*, des approches de PCR ont permis d'obtenir des signaux suggérant la présence de gènes *BP80* chez la mousse. Ensuite, des recherches dans les bases de données ont permis de repérer une EST de 487 pb (n° accession GenBank : AW509740) qui présente une homologie avec les *AtBP80s*. Le séquençage du clone complet correspondant à cette EST a permis d'isoler un ADNc de 1543 pb. La figure 45 présente

l'alignement entre la protéine déduite de cet ADNc et la protéine AtBP80b. La séquence partielle de cette protéine s'aligne sur 60 % de la séquence de la protéine AtBP80b. Elle présente une identité de 58,2 % avec la portion correspondante de la protéine AtBP80b. Malgré la divergence évolutive des espèces, les différents motifs protéiques caractéristiques des BP80 sont retrouvés dans la protéine de mousse : le motif d'internalisation YMPL (YxxΦ), les motifs EGF composés par des résidus cystéine et un domaine transmembranaire potentiel. Ces différentes données suggèrent que cette protéine de mousse, désormais nommée PpBP80.1, appartient à la grande famille des protéines végétales BP80.

Des amplifications PCR sur de l'ADN génomique de *P. patens* font apparaître un produit PCR d'environ 2,4 kb, ce qui suggère la présence d'introns dans le gène *PpBP80.1*. La présence du transcrit de ce gène est détectée par RT-PCR dans le protonema et dans les gamétophores (résultats non présentés).

Des expériences de *Southern Blot* à faible stringence ont suggéré l'existence de plusieurs membres dans la famille *PpBP80* (figure 46A). Au printemps 2003, l'analyse des nouvelles EST générées par le programme PHYSCObase a permis de repérer cinq EST qui correspondent à des gènes *BP80* différents (figure 46B). Ces données confirment que *PpBP80.1* appartient à une famille multigénique.

La protéine *PpBP80.1* présente toutes les caractéristiques des protéines BP80 des angiospermes. Pour étudier le rôle des protéines BP80 *in planta*, il était envisageable d'inactiver ce gène par recombinaison homologue chez la mousse.

2.3. Obtention de mutants knock-out bp80.1

2.3.1. Obtention de mousses transformées

Les mousses transformées sont obtenues en transformant la souche sauvage de *P. patens* avec une construction linéaire provenant du vecteur de remplacement. Cette construction comprend le fragment 5' de l'ADNc de *PpBP80.1*, le gène *NptII* sous contrôle du promoteur 35S, et le fragment 3' de l'ADNc.

Plusieurs essais de transformation ont été nécessaires pour obtenir des mutants *bp80.1*. Le premier essai n'a pas permis d'isoler de mutant *knock-out* parmi les sept transformants obtenus (tableau 1). A la suite de cet essai, un nouveau vecteur de remplacement a été construit dans le but d'améliorer la stratégie de disruption (voir détails dans 'Matériel et méthodes'). A l'issue d'un troisième essai, 26 transformants stables ont été isolés, parmi lesquels des mutants *knock-out* ont été repérés.

2.3.2. Identification des mutants *bp80.1* parmi les transformants

L'intégration spécifique de la construction dans le gène *PpBP80.1* a été analysée par PCR en utilisant l'ADN génomique de 10 transformants (K1-K10), d'un témoin (T) transformé avec le vecteur pJIT161 et d'une lignée sauvage (WT). La position des amorces utilisées est présentée à la figure 47. Les amorces Pp1s et Pp1459as s'hybrident sur des régions de l'ADN génomique qui n'ont pas été utilisées pour la construction.

Les PCR réalisées avec les amorces Pp1s et Pp1459as ne donnent pas de produits d'amplification correspondant au gène sauvage pour cinq transformants (K4, K5, K7, K8 et K9) sur les dix analysés (figure 47E). Par contre, une amplification du gène sauvage à la taille attendue est observée pour la lignée témoin T et la lignée sauvage. Les amorces NptII_s et Pp1459as permettent l'amplification d'un produit PCR pour les lignées K2, K4, K5, K7, K8, K9 et K10. Ce produit n'est amplifié que si la construction s'est intégrée par recombinaison homologue dans le gène *PpBP80.1*. Seuls les transformants répondant correctement aux deux tests PCR sont considérés comme positifs : les lignées K4, K5, K7, K8 et K9 ont intégré spécifiquement la construction dans le gène *PpBP80.1*. Les résultats montrent que les lignées K2 et K10 ont intégré la construction au bon locus. Comme l'amplification du gène sauvage est toujours possible, ces lignées sont éliminées.

Afin de vérifier l'absence de transcrite du gène *PpBP80.1* chez les cinq lignées retenues, une analyse d'expression par RT-PCR avec les amorces Pp1s et Pp1459as a été entreprise à partir d'ARN extraits de jeunes gamétophores. Un transcrite est détecté chez la lignée sauvage et la lignée T. Aucune amplification n'est obtenue pour les cinq lignées retenues précédemment ce qui montre l'absence de transcrite (figure 47E). L'amplification du gène *NptII* dans les mêmes lignées sert de témoin positif pour l'efficacité de la RT-PCR.

Ces données montrent que la construction s'est intégrée spécifiquement dans le locus ciblé et que le gène *PpBP80.1* est inactivé pour cinq transformants (K4, K5, K7, K8 et K9) sur les dix analysés.

2.4. Analyse préliminaire des mutants

Les lignées K4, K5, K7, K8 et K9 ainsi que le témoin T et la lignée sauvage ont été repiqués sur milieu BCD et cultivés dans les conditions standard. Tous les mutants développent un protonema puis des gamétophores indiquant que la disruption du gène *PpBP80.1* est viable. Cependant, les colonies mutantes de gamétophores ont une taille inférieure aux colonies sauvages et témoins, ce qui indique que la vitesse de croissance des mutants est affectée (figure 48). Afin de confirmer ces observations, des analyses complémentaires sont actuellement conduites dans le groupe de C. Knight à Leeds. Le

phénotype des cinq lignées mutantes est comparé au phénotype de lignées sauvages dans différentes conditions de culture. Les cultures sont initiées à partir de protoplastes pour que la croissance soit parfaitement comparable entre les lignées. L'importance des conditions de culture pour révéler un phénotype chez *P. patens* a été montrée (Egener et al., 2002) et différentes conditions de culture sont actuellement utilisées en vue de révéler des altérations physiologiques et morphologiques des mutants. Ces tests constituent un moyen d'accentuer les caractéristiques de croissance de ces mutants. Ils peuvent également révéler d'autres caractéristiques phénotypiques.

2.5. Etude de l'adressage vers la vacuole

Le rôle proposé pour les protéines BP80 est de permettre l'adressage de protéines à la vacuole lytique. Les mutants *knock-out* pour le gène *PpBP80.1* peuvent se révéler des outils pertinents pour montrer que PpBP80.1 assure le rôle de protéine-cargo.

La protéine de fusion « Aleu-GFP » a été utilisée pour étudier l'adressage des protéines à la vacuole (Humair et al., 2001). Cette protéine de fusion comprend le signal d'adressage NTPP de la proaleuraine de pétunia ou d'orge fusionnée à la GFP. Le signal d'adressage permet le transport de cette protéine de fusion jusqu'à la vacuole lytique. La localisation de cette protéine est déterminée *via* la fluorescence de la GFP. Chez les mutants *knock-out* pour le gène *PpBP80.1*, cette protéine de fusion peut être mal adressée et s'accumuler à l'extérieur de la cellule, montrant ainsi le rôle de la protéine PpBP80.1 dans l'adressage des protéines à la vacuole.

Une autre approche pour démontrer le rôle de protéine-cargo de la protéine PpBP80.1 est la recherche de protéines vacuolaires mal adressées. En effet, la voie par défaut du système sécrétoire est l'adressage des protéines vers la membrane plasmique (pour les protéines membranaires) ou l'espace extracellulaire (pour les protéines solubles). Ainsi, chez un mutant de mousse déficient pour l'adressage à la vacuole, les protéines vacuolaires vont être excrétées et se retrouver dans le milieu de culture. Chez un mutant pour le gène *PpBP80.1*, certaines protéines normalement adressées à la vacuole peuvent être excrétées. Ces protéines pourraient être isolées en analysant le contenu protéique du milieu de culture du mutant en comparaison avec le milieu de culture d'une lignée sauvage. Les protéines isolées seraient ensuite identifiées par MALDI-TOF/Q-TOF, ce qui permettrait de déterminer si elles correspondent à des protéines vacuolaires mal adressées. Ce type d'expérience permettrait de mettre en évidence le rôle de la protéine PpBP80.1 mais aussi d'établir une liste des protéines vacuolaires adressées par la protéine PpBP80.1.

L'expression d'un gène dans un système hétérologue est une méthode efficace pour définir la fonction de la protéine produite. Le modèle levure est couramment utilisé pour étudier des gènes végétaux comme dans le cas de la protéine AtHK1 (Urao et al., 1999). En ce qui concerne l'étude des BP80, le modèle « levure » a été utilisé pour montrer que la protéine PsBP80a pouvait assurer la fonction de récepteur d'adressage à la vacuole chez un mutant de levure déficient pour l'adressage à la vacuole (Humair et al., 2001).

Il est envisageable d'utiliser *P. patens* comme une « levure verte » (Schaefer, 2002) pour réaliser des expériences de complémentation fonctionnelle. Les différents membres de la famille *AtBP80* peuvent être exprimés chez un mutant pour le gène *PpBP80.1* en vue de restaurer le phénotype sauvage. Deux cas de figure sont envisageables : (i) toutes les protéines *AtBP80* sont capables de restaurer le phénotype sauvage chez le mutant *ppbp80.1* ; (ii) seulement certaines protéines sont capables de restaurer le phénotype sauvage. Ce type d'expérience peut se révéler utile pour comprendre les points communs et les différences entre les protéines *AtBP80*.

Plusieurs motifs caractéristiques ont été repérés dans les protéines BP80. Ces motifs sont modifiables par mutagenèse dirigée (substitution ou délétion). L'expression de ces protéines modifiées dans un mutant pour le gène *PpBP80.1* est un moyen de définir la fonction de ces motifs et comprendre comment les protéines BP80 fonctionnent *in vivo*.

2.6. Conclusions

Les gènes *BP80* existent chez la mousse *P. patens* et constituent une famille multigénique comme chez *Arabidopsis*. La forte conservation entre les deux familles suggère que ces protéines ont la même fonction dans les deux espèces. La viabilité des mutants *knock-out* pour le gène *PpBP80.1* laisse penser que le gène *PpBP80.1* n'est pas indispensable au développement ou que son rôle est assuré par un autre membre de la famille. L'analyse du phénotype de ces mutants, en particulier l'adressage à la vacuole, permettra d'apporter des informations quant au rôle individuel de la protéine *PpBP80.1* et également sur la redondance fonctionnelle dans la famille *PpBP80*.



Discussion Générale

En 2000, les résultats accumulés sur les protéines BP80 (interactions *in vitro* et étude de localisation) indiquaient que cette famille de protéines jouaient le rôle de récepteurs d'adressage à la vacuole lytique. Cependant, certaines données de localisation étaient contradictoires : les protéines BP80 avaient été détectées au niveau du Golgi et des prévacuoles, de vésicules de type PAC (*Precursor-ACcumulating*) et de la membrane plasmique (Kirsch et al., 1994; Ahmed et al., 1997; Paris et al., 1997; Shimada et al., 1997; Laval et al., 1999). De plus, le rôle de récepteur d'adressage à la vacuole des protéines BP80 n'avait pas été montré *in planta* et aucune donnée n'était disponible sur les rôles des différents membres de la famille BP80. Au cours de ce travail, différents systèmes de génétique inverse (génération de lignées sens, antisens et RNAi, isolement de mutants d'insertion ADN-T chez *A. thaliana* et obtention de mutants par recombinaison homologue chez la mousse) ont été utilisés en vue de déterminer le rôle *in planta* des protéines BP80 ainsi que les liens entre les différents membres de la famille.

Alors que les lignées sens, sur-exprimant le gène *AtBP80b*, n'ont pas apporté d'information sur le rôle *in planta* des protéines BP80, les lignées antisens ont permis de mettre en évidence un premier rôle de la famille AtBP80 dans la germination sans toutefois apporter des précisions sur chaque membre individuellement.

La mutagenèse par ADN-T ou par transposons est certainement la méthode d'analyse fonctionnelle de gène la plus utilisée chez *A. thaliana*. Le principal avantage est que l'insertion génère le plus souvent un mutant nul, et ce, de façon stable. Les transposons et les ADN-T s'intègrent au hasard dans le génome de la plante. Malgré les nombreuses collections de mutants disponibles, il peut parfois être difficile d'isoler un véritable mutant *knock-out* pour le gène d'intérêt. Dans le cas des gènes *AtBP80*, seulement quatre mutants ont pu être identifiés au cours de ce travail. Le mutant *vsr-c* contient un ADN-T dans la région promotrice du gène *AtBP80a'* et cette insertion n'entraîne ni l'extinction du gène, ni de phénotype détectable. Les mutants *vsr-d* et *vsr-f* présentent un *silencing* du gène *nptII*, éventuellement dû à des insertions multiples d'ADN-T. En ce qui concerne le mutant *vsr-a'*, bien qu'il ait permis des avancées sur la compréhension du rôle de la protéine AtBP80a', il présente un phénomène épigénétique qui complique son étude. De façon générale, l'ADN-T ne peut pas être considéré comme un fragment d'ADN inerte dans le génome de la plante. En effet, un ADN-T est capable de modifier l'expression de gènes adjacents, d'induire des mécanismes de type PTGS et des phénomènes de méthylation de l'ADN (Kumapatta et al., 1998; Meza et al., 2002; Dietz-Pfeilstetter et al., 2003). Dans le cas du mutant *vsr-a'*, il n'est pas exclu que les phénomènes épigénétiques engendrés par l'ADN-T affectent le gène *AtBP80a'* mais également les autres gènes *AtBP80* par la propagation du *silencing* liés au PTGS. Même si la partie codante d'un gène est interrompue par un ADN-T, il demeure

possible qu'une protéine tronquée, mais toujours fonctionnelle, soit produite. Ces différents points montrent la nécessité cruciale d'étudier plusieurs mutants indépendants pour le gène d'intérêt. En ce qui concerne les gènes *AtBP80*, plusieurs mutants sont à présent disponibles dans les collections de mutants. De nouveaux mutants potentiels, avec une insertion d'ADN-T dans la séquence codante, seraient disponibles pour tous les gènes exceptés pour les gènes *AtBP80a'* et *AtBP80f* dans les collections utilisées au cours de ce travail. Très récemment, le groupe de Hara-Nishimura a décrit l'analyse d'un mutant nommé *atvsr1* (insertion dans le gène *AtBP80b*) et a indiqué que des mutants sont également disponibles pour tous les gènes *AtBP80* dans la collection *Arabidopsis Knockout Facility of Wisconsin University* (Krysan et al., 1999; Shimada et al., 2003).

La difficulté à isoler des mutants pour les gènes *AtBP80* a conduit à utiliser le modèle mousse *P. patens*. La mousse est actuellement la seule plante pour laquelle il est possible d'obtenir des mutants d'insertion spécifiques par recombinaison homologue. Elle est simple à manipuler et offre une gamme d'outils de plus en plus développés. Les analyses de séquences EST révèlent qu'au moins deux tiers des gènes d'*Arabidopsis* ont des homologues chez la mousse (c'est le cas pour la famille *BP80*), ce qui montre que le système peut être utilisé pour étudier les gènes des plantes supérieures. La mousse est majoritairement haploïde et ceci peut être un inconvénient lors de la génération de mutant. En effet, l'étude des lignées antisens a montré que les protéines BP80 avaient un rôle important dans le développement. Il était donc possible que la disruption du gène *PpBP80.1* chez la mousse entraîne la létalité et empêche la récupération de lignées mutantes.

Ce désavantage n'existe pas chez *A. thaliana* avec les mutants d'insertion car la mutation, si elle est récessive, peut être maintenue à l'état hétérozygote (ou hémizygote). Par contre, une mutation affectant un gène essentiel peut générer un phénotype difficile à analyser comme dans le cas du mutant *vsr-a'* qui présente un blocage du processus de germination : les graines non germées constituent un matériel difficile à analyser.

Le RNAi est une méthode alternative dont l'avantage est de pouvoir contrôler le moment où le gène d'intérêt doit être inhibé. Cette approche dérive de l'approche « antisens » mais présente une plus grande efficacité et une plus grande spécificité. Le système peut être contrôlé avec des promoteurs inductibles ou spécifiques d'un tissu. Le RNAi peut être dirigé contre un seul gène ou contre tous les gènes d'une famille multigénique. Cependant le RNAi ne produit pas un mutant complètement nul : le *silencing* du gène ciblé peut parfois être insuffisant pour inhiber la fonction.

Dans le cas de l'étude des protéines BP80, ces différentes stratégies ont apporté des informations complémentaires sur le rôle biologique et la fonction biochimique de ces

protéines. Elles ont notamment révélé l'implication des protéines AtBP80 dans le processus de germination.

- **Intervention des protéines AtBP80 dans le processus de germination**

Les lignées exprimant le gène *AtBP80b* en orientation antisens présentent une réduction du taux de germination due au *silencing* de la famille *AtBP80*. Une inhibition de la germination de type dormance est observée chez le mutant d'insertion *vsr-a'*. En ce qui concerne le mutant *atvsr1 (atbp80b)*, il n'a pas été reporté qu'il présentait un défaut de germination (Shimada et al., 2003). Cependant, les auteurs indiquent qu'un traitement de stratification est appliqué en routine sur les graines. Ce traitement pourrait lever la dormance des graines comme dans le cas du mutant *vsr-a'*. Il n'est donc pas possible de conclure quant à l'implication de la protéine AtBP80b dans la dormance des graines.

D'après les données obtenues par l'analyse des lignées antisens et du mutant *vsr-a'*, les protéines AtBP80 semblent jouer un rôle crucial dans le processus de germination. Tous les gènes *AtBP80* peuvent potentiellement être impliqués dans le processus de germination car ils sont tous exprimés dans les stades de développement aboutissant à la formation de la graine (stade floraison, stade silique). Il reste donc à déterminer si toutes les protéines AtBP80 sont nécessaires à la germination et ceci pourra être réalisé par l'étude de mutants d'insertion pour chacun des sept gènes. Cependant, il est important de remarquer que les lignées RNAi et les mutants *knock-out* de mousse sont parfaitement viables, ce qui montre l'importance d'inactiver plusieurs membres à la fois pour déterminer leur rôle.

Le rôle supposé des protéines BP80 est de permettre l'adressage des protéines à la vacuole. La germination est la réactivation de la croissance de l'embryon et nécessite une forte mobilisation des réserves de la graine. Au cours de la germination, les vacuoles de stockage, qui contiennent les réserves, fusionnent avec les vacuoles lytiques, permettant la reprise de croissance de l'embryon (Paris et al., 1996). Si l'adressage des protéines aux vacuoles est perturbé, le processus de mobilisation des réserves peut se trouver fortement modifié, réduisant l'aptitude à la germination. Ce phénomène peut expliquer la déficience de germination des lignées antisens et du mutant *vsr-a'*.

Dans le cas du mutant *atvsr1*, il a été montré que les graines présentent une déficience dans l'adressage des protéines de réserve. Ces protéines normalement adressées à la vacuole de réserve se retrouvent alors dans l'espace extracellulaire car elles suivent la voie par défaut du système sécrétoire. Dans le cas d'un dysfonctionnement similaire de l'adressage à la vacuole lytique chez le mutant *vsr-a'*, certaines enzymes hydrolytiques vacuolaires pourraient emprunter la voie par défaut, se retrouver dans l'espace

extracellulaire et y altérer certains composants, comme des récepteurs nécessaires à la germination.

- **Rôle des différents membres de la famille AtBP80**

La protéine PsBP80a est le premier récepteur potentiel d'adressage à la vacuole lytique qui a été isolé chez les plantes. La protéine PsBP80a appartient à une famille de protéines chez le pois (*Pisum sativum*). D'un point de vue phylogénétique, dans la famille AtBP80 chez *A. thaliana*, les protéines AtBP80a et AtBP80a' sont les plus proches de la protéine PsBP80a (figure 49). Le rôle de récepteur d'adressage vacuolaire *in vivo* a été montré chez la levure : la protéine PsBP80a et la protéine AtBP80a sont capables d'adresser une protéine-reporter (Aeu-GFP) à la vacuole chez un mutant de levure déficient pour son propre adressage vacuolaire (Humair et al., 2001; Paris and Neuhaus, 2002). L'étude du mutant *atvsr1* montre que la protéine AtBP80b assure, quant à elle, l'adressage de protéines non pas à la vacuole lytique mais à la vacuole de réserve dans la graine (Shimada et al., 2003). Des travaux antérieurs avaient par ailleurs montré qu'une protéine du potiron, CsPB80 (ou PV72) semblait impliquée dans l'adressage vers la vacuole de réserve (Shimada et al., 1997; Shimada et al., 2002). Ces résultats montrent que certaines protéines BP80 jouent le rôle de transporteurs vers la vacuole lytique et d'autres vers la vacuole de réserve (figure 50). Les protéines AtBP80a' et AtBP80b n'ont donc pas un rôle équivalent dans la cellule. Enfin, les données obtenues dans l'équipe montre que des protéines BP80 peuvent également être retrouvées au niveau de fractions membranaires associées à la membrane plasmique (Laval et al., 1999; Laval, 2000), ce qui suggère que des protéines BP80 pourraient intervenir dans l'endocytose de protéines extracellulaires.

Chez *Arabidopsis*, le séquençage du génome a révélé que beaucoup de gènes appartiennent à une famille multigénique (AGI, 2000). Une famille multigénique peut présenter une redondance fonctionnelle totale, c'est-à-dire que tous les gènes codent des protéines ayant la même fonction et le même rôle. A l'opposé, une famille multigénique peut être composée de gènes ayant une fonction et un rôle qui leur sont propres, ne donnant pas possibilité de compensation lorsqu'un des gènes est muté. Plusieurs exemples ont été rapportés chez *A. thaliana*. La famille *SHATTERPROOF* est composée de deux gènes à boîte MADS impliqués dans la déhiscence du fruit. Lorsqu'un seul des deux gènes est muté, aucun phénotype n'est observable au niveau de la déhiscence du fruit. Par contre, chez un double mutant, la déhiscence du fruit est complètement abolie (Liljegren et al., 2000). La famille *SHATTERPROOF* présente une redondance fonctionnelle totale. La famille *stt3* est aussi composée de deux gènes qui codent pour des oligosaccharyltransférases. La mutation du gène

stt3a entraîne une sensibilité accrue aux stress salins et osmotiques alors que la mutation du gène *stt3b* n'entraîne qu'une sensibilité accrue au stress osmotique (Koiwa et al., 2003). La famille *stt3* présente donc une redondance partielle puisque les deux gènes sont impliqués dans la tolérance au stress osmotique mais seul le gène *stt3a* confère une tolérance au stress salin.

Les analyses d'expression de la famille *AtBP80* ont montré que chaque membre possédait un profil d'expression spécifique en fonction de l'organe considéré et du stade de développement (tableau 2). Ces résultats laissent penser que chaque protéine *AtBP80* a un rôle particulier au cours du développement : **plusieurs protéines pourraient intervenir dans l'adressage de protéines à la vacuole mais leur recrutement pourrait être lié à une spécificité tissulaire.**

Chez les eucaryotes non végétaux, l'adressage au compartiment vacuolaire est assuré par une protéine produite par un gène unique : le récepteur mannose 6-phosphate chez les mammifères (Kornfeld, 1992) et la protéine Vps10p chez la levure (Marcusson et al., 1994). Il peut paraître surprenant que, chez les végétaux, un récepteur d'adressage à la vacuole existe sous plusieurs isoformes (7 membres chez *Arabidopsis*). Toutefois, une caractéristique des végétaux est l'existence d'au moins deux types de vacuoles : la vacuole de réserve et la vacuole lytique. Le système vacuolaire végétal est très complexe car les vacuoles accumulent différents composés et interviennent dans des processus variés comme la coloration des pétales, l'accumulation de réserves variées, la protection contre les herbivores grâce à l'accumulation de lectines,... (Wink, 1993). Cette complexité n'est pas retrouvée chez la levure et chez les mammifères où il n'existe qu'un seul type de compartiment vacuolaire. Il est ainsi envisageable que la diversité des vacuoles chez les plantes nécessite une diversité de récepteurs d'adressage.

Chez la mousse, la disruption du gène *PpBP80.1* n'entraîne pas la létalité. Chez *A. thaliana*, le mutant *atvsr1* ainsi que les lignées RNAi pour les gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'* sont capables d'effectuer un cycle de développement complet. **Ces résultats suggèrent qu'il existe au sein de la famille BP80 une redondance fonctionnelle.** Plusieurs membres pourraient être impliqués dans l'adressage à la vacuole lytique, d'autres à la vacuole de réserve, d'autres encore pourraient participer à l'adressage vers d'autres vacuoles (comme les vacuoles marquées par α -TIP) ou à l'endocytose (figure 50). Chez la levure, la protéine Vps10p intervient dans l'adressage vers la vacuole, mais aussi dans le « contrôle-qualité » des protéines (Jorgensen et al., 1999). A la différence du modèle levure où la protéine Vps10p assure plusieurs rôles, chacune des protéines BP80 pourrait assurer un rôle qui lui est propre.

Au cours de ce travail, différents outils ont été mis en place en vue de procéder à l'analyse fonctionnelle des protéines BP80 chez *A. thaliana* et la mousse *P. patens*. Le rôle des différents membres de la famille AtBP80 pourra être étudié grâce à l'analyse de mutants d'insertion spécifiques pour chaque gène chez *A. thaliana*. Les approches RNAi inductibles seront également utiles pour définir le rôle des protéines AtBP80, notamment dans les stades les plus avancées du développement et les mutants *knock-out*, générés par intégration ciblée chez *P. patens*, constituent un système modèle intéressant car l'accès aux phénotypes cellulaires est facilité dans cet organisme au développement simplifié.



Matériel et Méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel végétal et conditions de culture

1.1.1. *Arabidopsis thaliana*

Les deux écotypes Col-0 (Columbia) et WS-4 (Wassilevskiya, INRA de Versailles) de la plante modèle *A. thaliana* ont été utilisés pour ce travail. Les mutants d'insertion *vsr-a'* (DEI168) et *vsr-c* (DUL20) proviennent de la collection de mutants ADN-T de FLAGdb/FST (Samson et al., 2002). Cette collection a été générée dans le fonds génétique WS-4. Les mutants d'insertion *vsr-d* (N544991) et *vsr-f* (N505830) sont issus de la collection de mutants du *SALK institute* (Alonso et al., 2003) générée dans le fonds génétique Col-0.

Les conditions de culture décrite dans ce paragraphe sont les conditions standard. Les conditions particulières nécessaires pour certaines applications (tests de germination, tests de dormance) seront décrites dans des paragraphes appropriés.

Les graines peuvent être semées directement sur papier filtre imbibé en boîte de Pétri si aucune sélection antibiotique n'est nécessaire. Trois feuilles de papier (Whatman n° 4, Ø 70 mm) sont imbibées avec 3 mL d'eau et la boîte est scellée avec du parafilm (American National Can). Pour une sélection antibiotique, les graines sont stérilisées 10 min dans un volume d'hypochlorite de sodium 0,4° chlorométrique dilué avec 5 volumes d'éthanol 95 % ; puis trois lavages rapides dans de l'éthanol 95 % sont effectués. Elles sont ensuite réparties sur la paroi du tube pour permettre un séchage rapide de l'éthanol. Une fois l'éthanol évaporé, elles sont semées en conditions stériles sur du milieu MS avec agar contenant 75 µg/mL de kanamycine. Les semis sont placés en salle de culture à une température de 23°C avec une hygrométrie de 40 % et une photopériode lumière/obscurité 16 h/8 h.

Les plantules sont repiquées sur de la tourbe (Jiffy®, France) ou du terreau (H4, Tref) et cultivées en chambre climatisée à une température de 22°C/20°C et une hygrométrie de 70 % et avec une photopériode 16 h/8 h. A l'apparition de la hampe florale, un système de récolte des graines (Aracon, Lehle Seeds) est mis en place. Les plantes sont ensuite transférées en serre où elles sont cultivées pendant environ un mois avant d'interrompre l'arrosage. Les graines sont finalement récoltées et stockées dans des microtubes à 4°C.

1.1.2. *Physcomitrella patens*

La souche sauvage *Physcomitrella patens* ssp. *patens* (Ashton and Cove, 1977) est cultivée en conditions axéniques sur des milieux gélosés en boîte de Pétri à 23°C avec 40 % d'humidité et une photopériode lumière/obscurité 16 h/8 h. Les compositions des milieux sont présentées en annexe 1. Le milieu BCDN (avec complément azoté) permet la production

rapide et en masse de matériel de type protonema. Ce milieu coulé en boîte de Pétri est recouvert d'une fine feuille de cellophane (University of Leeds, Angleterre) qui permet de récupérer facilement les tissus. Le milieu BCD (sans complément azoté) est utilisé pour obtenir le développement de tiges feuillées.

La propagation de *P. patens* se fait selon deux méthodes : la *spot-inoculation* qui consiste à prélever avec une pince un fragment du végétal et à le placer sur un nouveau milieu ; la propagation par broyage qui consiste à prélever stérilement toute la biomasse produite en sept jours sur un milieu BCDN et à la placer dans 15 mL d'eau. Un broyage avec un Polytron PT10-35 (Kinematica, Suisse) de 30 s à une min permet de fractionner les filaments. Le broyat est ensuite réparti sur quatre ou cinq nouvelles boîtes de BCDN. Lorsque la souche doit être conservée pour une longue période (jusqu'à plusieurs années), le broyat est maintenu à 4°C à l'obscurité.

1.2. Souches bactériennes

1.2.1. *Escherichia coli* DH5α

Cette souche est utilisée au cours des étapes de clonage ou pour amplifier des constructions. Parmi ses caractéristiques, on peut noter la présence du gène *endA1* qui améliore la qualité de l'ADN plasmidique lors des mini-préparations et la présence du gène *recA1* qui augmente la stabilité des constructions. Cette bactérie est compatible avec la sélection « blanc/bleu » qui peut être employée lors de criblage avec certains vecteurs. Elle est cultivée à 37°C en milieu liquide sous agitation ou sur milieu solide en boîte de Pétri (LB, annexe 1).

1.2.2. *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90

Cette souche, qui est appelée aussi C58C1 RifR::pMP90, est utilisée pour la transformation génétique d'*Arabidopsis* (Koncz and Schnell, 1986). Elle est résistante à la rifampicine (50 µg/mL) grâce à un marqueur chromosomal et à la gentamicine (20 µg/mL) grâce au marqueur du plasmide Ti. Le plasmide Ti porte les composants qui assurent le transfert de l'ADN-T des vecteurs de transformation. Cette bactérie est cultivée à 28°C en milieu liquide sous agitation ou sur milieu solide en boîte de Pétri (YEP, annexe 1).

Le vecteur binaire (pGREEN0029) dans lequel sont intégrées les constructions d'intérêt fait partie du système pGREEN (Hellens et al., 2000). Le vecteur auxiliaire pSOUP possède les éléments permettant le maintien du vecteur pGREEN dans la bactérie.

2. Techniques générales de biologie moléculaire

Le détail de la plupart des méthodes classiques de biologie moléculaire peut être trouvées dans (Sambrook et al., 1989). Les méthodes spécifiques ou ayant fait l'objet d'améliorations seront décrites dans cette partie.

2.1. Extraction de l'ADN génomique d'*Arabidopsis*

La procédure standard pour obtenir de l'ADN génomique de bonne qualité est une extraction au CTAB adaptée de (Rogers and Bendich, 1988). Environ 200 mg de jeunes feuilles sont broyées dans l'azote liquide. Le broyat est transféré dans un microtube de 2 mL contenant 1 mL de TamponCTAB (annexe 1). Le mélange est incubé à 65°C pendant 20 min. Après incubation, le mélange est réparti dans deux microtubes de 2 mL contenant chacun 300 µL de TamponCTAB. Les microtubes sont incubés à 65°C pendant 10 min. Puis, 600 µL de chloroforme sont ajoutés dans chaque microtube. Les microtubes sont maintenus à température ambiante pendant 15 min avec une agitation manuelle toutes les 5 min. Après une centrifugation de 10 min à 17000g, la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et 600 µL d'isopropanol sont ajoutés. Après agitation modérée, le tube est centrifugé pendant 2 min à 17000g. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé deux fois à l'éthanol 80 %. Le culot est séché pendant 15 min. Puis il est repris dans 60 µL de TE pH=8.0 additionnés de 1 µL de RNase 10 mg/mL.

Pour les criblages de plantes comme le génotypage, l'ADN est extrait en suivant un protocole rapide (Parker et al., 2003). Ce type d'extraction n'est appliqué que pour des fragments à amplifier de moins de 1 kb et n'est pas recommandé si l'ADN doit être conservé. Une plantule ou une jeune feuille (0,25 - 0,5 cm²) est récupérée dans un microtube froid et broyée rapidement à l'aide d'un micropilon dans 30 µL de NaOH 0,25 M refroidis sur glace. Puis 7 µL du broyat sont rapidement prélevés et ajoutés dans 150 µL de Tris pH=8 0,3 M. Après un mélange bref et immédiat par pipetage, 7 µL de cette solution sont prélevés et ajoutés dans le mélange PCR déjà préparé et conservé dans la glace.

L'ADN destiné à l'analyse de méthylation est extrait avec le kit *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, France) pour obtenir une pureté optimale.

2.2. Extraction d'ARN

Cent mg de tissus végétaux sont placés dans un microtube puis congelés dans l'azote liquide. Une bille de tungstène est ajoutée dans le tube pour permettre le broyage avec l'appareil Qiagen MM300 (2 fois 30 secondes, fréquence 1/30). Les ARN sont extraits avec le

kit *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, France) en suivant les recommandations du fournisseur. Ils sont élués à deux reprises par 30 µL d'eau. L'ADN restant est éliminé par un traitement de 20 min à 37°C avec 1 µL de *DNase Rnase free* (Promega, France). Les ARN sont ensuite précipités pendant une nuit avec 200 µL d'éthanol et 6 µL d'acétate de sodium 3 M, pH=4,8. Ils sont finalement repris dans 20 µL. Ils sont dosés au spectrophotomètre et leur intégrité est vérifiée sur gel d'agarose.

2.3. Rétrotranscription (RT)

La synthèse du premier brin d'ADNc est effectuée avec le kit Superscript II (Invitrogen, France), à partir de 2 µg d'ARN totaux, selon les indications du fournisseur. Les ADNc obtenus sont conservés en aliquotes à -80°C. L'amplification de l'ADN par PCR est réalisée à partir de 2 µL d'ADNc.

2.4. Dosage des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont généralement dosés par mesure de l'absorbance à 260 nm au biophotomètre (Eppendorf, France). L'ADN peut être dosé également par la technique de Saran / BET (Sambrook et al., 1989).

2.5. Amplification d'ADN par PCR

De 1 ng (plasmides) à 50 ng (ADN génomique) d'ADN servent de matrice pour la PCR. La *Taq* polymérase et son tampon sont utilisés selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen, France). Les réactions sont conduites dans un volume final de 50 µL contenant 20 pmol de chaque primer. Le thermocycleur est un Mastercycler Personal (Eppendorf, France).

2.6. Clonage des produits PCR

Les produits PCR sont clonés dans le vecteur pGEM-T_{easy} (Promega, France) en suivant les recommandations du fournisseur. De façon générale, 8 µL de produit PCR sont utilisés pour un volume final de réaction de 20 µL. La réaction de ligation est conduite sur la nuit à 4°C. Les bactéries compétentes sont ensuite transformées avec 10 µL de mélange de ligation.

2.7. Mini-préparation de plasmides

Les plasmides sont préparés en utilisant la procédure standard de lyse alcaline (Sambrook et al., 1989) ou, lorsqu'une pureté optimale est nécessaire (séquençage, clonage), en utilisant les kits Plasmid Mini kit ou Plasmid Midi kit (Qiagen, France).

2.8. Séquençage

L'ADN est séquencé suivant la méthode de terminaison en chaîne (Sanger et al., 1977; Prober et al., 1987) en interne (Francis Carbonne, service commun de l'UMR 5546) sur un séquenceur ABI 3700. Le séquençage est réalisé à partir de 400 ng d'ADN plasmidique et avec cinq pmoles d'amorce.

2.9. Préparation de bactéries *E. coli DH5α* compétentes

Ce protocole, adapté de (Inoue et al., 1990), permet d'obtenir des bactéries hautement compétentes (10^7 - 10^8 colonies/ μ g ADN). Les bactéries sont cultivées sur une boîte de LB agar à 37°C pendant une nuit. Une dizaine de colonies bien développées sont repiquées dans 250 mL de SOB dans un erlen de 1 L et cultivées à 20°C sous agitation jusqu'à obtenir une $DO_{600}=0,5$ (24 h environ). L'erlen est placé 10 min sur glace puis les cellules sont centrifugées à 4000 rpm pendant 10 min et à 4°C (rotor Beckman JA-20). Le culot bien égoutté est repris délicatement dans 80 mL de solution UTB gardée sur glace et stocké sur glace pendant 10 min. les bactéries sont ensuite centrifugées à 4000 rpm pendant 10 min et à 4°C. Le culot est repris délicatement dans 20 mL de solution UTB froide additionnés de 1,4 mL de DMSO (l'aliquote de DMSO doit être stocké à -20°C pendant une nuit avant l'utilisation). Les cellules sont réparties en microtubes (300 μ L par tube), congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

2.10. Transformation des bactéries *DH5α* compétentes

Les bactéries compétentes décongelées (200 μ L) et l'ADN à transformer sont placées dans un tube de culture à fond rond, mélangées délicatement et maintenues sur glace pendant 30 min. Un choc thermique à 42°C est appliqué pendant 45 s, puis Le tube est remplacé immédiatement sur glace. Un mL de milieu SOC est ajouté et les bactéries sont incubées à 37°C sous agitation douce pendant 1 h. A la suite de l'incubation, 200 μ L de liquide sont étalés sur milieu LB agar contenant l'antibiotique approprié. Les bactéries restantes sont rassemblées par une centrifugation modérée, reprises dans un petit volume de

liquide (environ 100 μ L) et étalées sur milieu LB agar. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 16 à 20 h.

2.11. Préparation d'Agrobactéries compétentes

La souche d'agrobactéries GV3101::pMP90 est cultivée dans 5 mL de milieu YEP avec antibiotiques adéquats (gentamicine, 20 μ g/ml et rifampicine, 50 μ g/ml) à 28°C sous agitation sur la nuit. Un volume de 2 mL de cette culture est ajouté dans 50 mL de milieu YEP avec antibiotiques dans un erlen de 250 mL. Cette nouvelle culture est placée à 28°C sous agitation vigoureuse (250 rpm) jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} de 0,5 à 1. La culture est alors refroidie sur glace pendant 10 min. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 3000g pendant 5 min à 4°C. Le culot bien égoutté est repris avec 1 mL de $CaCl_2$ 20 mM froid. Des aliquotes de 100 μ L sont réparties dans des microtubes maintenus sur glace. Les tubes sont ensuite congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

2.12. Transformation des Agrobactéries compétentes

Un aliquote de 100 μ L de cellules compétentes est décongelé sur glace. A 100 μ L de la suspension de cellules sont ajoutés 1 μ g de vecteur binaire pGREEN portant la construction d'intérêt et 1 μ g de vecteur pSOUP. Les cellules sont plongées dans l'azote liquide pendant 1 min. Elles sont ensuite placées dans un bain-marie à 37°C pendant 5 min. Puis 1 mL de milieu YEP est ajouté et les cellules sont incubées à 28°C sous agitation modérée pendant 4 h. Elles sont ensuite centrifugées brièvement et le culot est repris avec 100 μ L de milieu YEP. Les cellules sont étalées sur des boîtes YEP-agar avec la sélection antibiotique appropriée (gentamicine, 20 μ g/ml, rifampicine, 50 μ g/ml et kanamycine, 50 μ g/mL). Les boîtes sont incubées à 28°C jusqu'à l'apparition des colonies (environ 3 jours).

3. Transformation d'*Arabidopsis*

La transformation des plantes d'*Arabidopsis thaliana* est basée sur le protocole « *Floral Dip* » proposé par (Clough and Bent, 1998). Les agrobactéries contenant la construction d'intérêt sontensemencées dans 500 mL de milieu YEP contenant rifampicine, kanamycine et gentamicine et incubées à 28°C pendant une nuit jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} égale à 0,8. La culture est ensuite centrifugée à 2500g pendant 10 min et le culot repris par 1/3 du volume initial de milieu de transformation (milieu MS additionné de 50 g/L de saccharose et

de 0,04 % (v/v) Silwet L77 (Lehle Seed), pH 5,7). Les hampes florales en bourgeons des plantes d'*Arabidopsis* (T0) sont immergées 30 s dans un bac contenant le milieu de transformation puis égouttées. Elles sont ensuite placées à l'obscurité dans une enceinte fermée pour assurer une humidité suffisante. Après 24 h, le système Aracon est mis en place et les plantes sont cultivées en serre jusqu'à la récolte des graines.

Les graines T1 obtenues, sont récoltées, stérilisées et semées sur un milieu MS additionné de 8 g/L d'agar et de 75 µg/mL de kanamycine. Au bout de 10 jours de culture, les plantules résistantes à l'antibiotique sont identifiables et peuvent être repiquées.

4. Conditions pour les tests de germination

Les tests de germination sont réalisés dans les conditions standard (salle de culture à 23°C, humidité 40 %, photopériode 16 h/8 h) sauf si une modification est spécifiée. Ils sont réalisés en boîte de Pétri contenant du milieu MS avec agar ou du papier filtre imbibé. Les boîtes sont scellées avec du parafilm (American National Can) pour éviter la déshydratation des milieux.

Pour le traitement de stratification, les semis sont incubés pendant 48 h à une température de 4°C dans une chambre froide. Suite à ce traitement, les semis sont placés dans les conditions standard.

Pour l'expérience de retrait du tégument, les graines sont d'abord imbibées pendant deux heures. Ensuite, les graines sont placées sous loupe binoculaire. Le tégument est retiré à l'aide de deux pinces à bouts fins. Puis, l'intégrité de l'embryon est vérifiée. Les embryons intacts sont placés sur papier filtre imbibé dans une boîte de Pétri et incubés pendant 5 jours dans les conditions standard.

L'incubation des graines dans une atmosphère enrichie en éthylène a été réalisée au laboratoire INP/ENSAT (UMR990) avec l'aide d'A. Latché. Les graines sont semées sur papier filtre imbibé en boîtes de Pétri (avec ergots) non scellées. Les boîtes sont placées dans une enceinte étanche et l'éthylène est ajouté à une concentration finale de 50 ppm. L'atmosphère enrichie en éthylène est renouvelée toutes les 24 h pendant cinq jours.

La solution de GA 10 mM est préparée en dissolvant directement la poudre dans l'eau. La solution de saccharose est préparée en dissolvant le saccharose directement dans l'eau. La solution d'acides aminés 1X est réalisée à partir d'un mélange d'acides aminés 50X (RPMI 1640 Amino Acid solution, Sigma, R-7131). Pour la solution de nitrate de potassium, une solution aqueuse 1 M est préparée. Chaque solution est ajoutée directement au milieu de culture pour obtenir la concentration finale adéquate.

Le fluridone ne se dissout pas très bien dans l'eau. La quantité nécessaire pour un volume donné de milieu est dissoute dans du méthanol pur (100 µL-200 µL). Ce mélange est directement ajouté au milieu de culture en agitation.

5. Tests de dormance

La première étape consiste à obtenir des plantes ayant poussées strictement dans les mêmes conditions. Pour cela, des graines de la lignée sauvage (WS), de descendants d'hétérozygotes et d'homozygotes sont stérilisées et semées sur milieu de culture *in vitro*. Les plantules obtenues sont repiquées sur terreau. Les pots sont répartis de façon aléatoire dans un bac de culture. Les plantes sont cultivées jusqu'à l'apparition des premières siliques jaunes. Des siliques au même stade (vert-jaune, avec graines encore jaunes) sont alors récupérées sur chaque plante. Les siliques sont vidées et les graines obtenues sont mélangées pour chaque lignée. Les graines sont divisées en 4 lots : un lot semé extemporanément et trois lots semés respectivement après cinq jours de conservation, dix jours et 21 jours. Les graines sont conservées dans les conditions suivantes : température de 23°C, hygrométrie de 40 %. Les graines sont semées sur des boîtes de Pétri (diamètre 14 cm) contenant deux feuilles de papier filtre imbibées (diamètre 13 cm) avec 18 mL d'eau. Une centaine de graines de chaque lignée est semée sur un tiers de la boîte. Les boîtes sont scellées par du parafilm (American National Can). Chaque boîte est préparée en trois exemplaires. Les boîtes sont placées dans une salle de culture (23°C, luminosité : 25 µE.m⁻².s⁻¹, photopériode 16 h/8 h hygrométrie : 40 %). Le comptage des graines germées est réalisé deux fois par jour (matin et soir) pendant 10 jours.

6. Préparation des graines pour observation

6.1. Microscopie électronique à balayage

Les graines non germées ou imbibées sont fixées dans une solution cacodylate de sodium 0,05 M (pH=7,2) additionnée de glutaraldéhyde 2,5 % pendant une nuit à 4°C. Elles sont ensuite rincées à l'eau osmosée et déshydratées dans des solutions d'alcool éthylique 20, 40, 60, 80, 95 % (2 bains de 15 min par solution) et 100 %. L'alcool est substitué par du CO₂ dans un appareil à point critique dans lequel le solvant est évaporé sans déformation de la structure. Les graines sont ensuite placées sur des plots et métallisées avec un mélange or-palladium (e=200 nm, métalliseur JEOL JFC 1100).

Les graines sèches sont directement placées sur des plots et métallisées comme les graines non germées ou imbibées.

Les graines métallisées sont ensuite observées avec un microscope électronique à balayage Hitachi C450 à 15 kV. Les microphotographies sont réalisées sur film Illford 125 ISO.

6.2. Microscopie optique

Les graines imbibées ou non germées sont coupées selon l'axe longitudinal ou l'axe transversal. Les échantillons de graines sont fixés dans une solution de cacodylate de sodium 0,05 M (pH=7,2) additionnée de glutaraldéhyde 2 % pendant plusieurs jours à 4°C. Une post-fixation est réalisée ensuite avec du tétroxyde d'osmium à 1 % dans une solution de cacodylate de sodium 0,05 M (pH=7,2) pendant 1 h à température ambiante. Après 15 min de lavage à l'eau osmosée, les graines sont déshydratées par une série de concentrations croissantes en éthanol (20 %, 40 %, 60 %, 70 %, 80 %, deux fois 15 min pour chaque concentration). Deux bains de 30 min dans l'alcool absolu sont finalement réalisés. Les graines sont ensuite infiltrées par de la résine Spurr de façon graduelle (mélange résine/alcool pur : 1/4, 1/3, 2/3) jusqu'à 100 % de résine. Elles sont ensuite mises en gélules et chauffées à 70°C pendant 24 h. Des coupes de 1 µm sont ensuite réalisées avec un microtome Ultracut E Reichert et colorées avec du bleu de toluidine 0,5 % avant observation.

6.3. Coloration au rouge de ruthénium

Les graines sèches sont imbibées pendant 24 h dans de l'eau. L'eau est remplacée avec précaution par une solution aqueuse de rouge de ruthénium 0,45 mg/mL. Après 10 min sous agitation très douce, la solution est retirée et trois lavages à l'eau sont effectués avec précaution. Les graines sont ensuite transférées sur une lame et observées sous loupe binoculaire.

7. Caractérisation moléculaire du mutant *vsr-a'*

7.1. Evaluation du nombre de copies d'ADN-T (Southern Blot)

Pour chacune des quatre enzymes utilisées (*EcoRI*, *EcoRV*, *PstI* et *BamHI*), dix µg d'ADN extraits d'une plante hémizygote pour l'insertion sont digérés dans un volume de 100 µL en suivant les recommandations du fournisseur (Promega, France). L'ADN est précipité avec de l'éthanol et de l'acétate de sodium pendant 4 h à 20°C. L'ADN lavé et repris dans 20 µL est séparé sur gel d'agarose 0,8 % (m/v) dans du tampon Tris-Acétate. Après migration,

l'intégrité des acides nucléiques est contrôlée par coloration au BET. L'ADN est ensuite transféré sur membrane de nylon (Hybond N+, Schleicher & Schuell) par capillarité en conditions dénaturantes. Puis l'ADN est fixé sur la membrane par chauffage pendant 2 heures dans un four à 80°C ou à l'aide d'un *crosslinker* UV (70000 µjoules/cm², 40 s ; Amersham Life Science).

La sonde est préparée en mélangeant en même quantité trois fragments provenant de la digestion enzymatique du plasmide pGKB5 : un correspondant à la bordure gauche de l'ADN-T, un correspondant à la partie centrale du gène *nptII* et un correspondant à la bordure droite de l'ADN-T. Elle est marquée en utilisant le kit *Nonaprimer labelling kit* (Q-biogen).

La membrane est préhybridée 2 heures à 65°C sous agitation dans un tampon composé de 1,25 ml de Denhardt's 100X, 6,25 ml de SSPE 20X, 1,25 ml de SDS 10%, 3,75 ml d'eau et 1 mg d'ADN de sperme de saumon soniqué (préalablement dénaturé 5 minutes à 100°C). La sonde d'ADN marquée est ajoutée au tampon utilisé pour la préhybridation. L'hybridation moléculaire s'effectue à 65°C sous agitation pendant environ 18 heures. Après récupération de la sonde, la membrane est lavée deux fois pendant 15 minutes avec du SSPE 2X, SDS 0,1% à température ambiante. Un troisième lavage de 15 minutes avec du SSPE 1X, SDS 0,1% à 65°C est finalement effectué. La membrane est placée au contact d'un film autoradiographique à -80°C ou dans une cassette *phosphorimager*.

7.2. Analyse de l'insertion / génotypage

La position de l'insertion d'ADN-T a été vérifiée en utilisant l'amorce Tag5 spécifique de la bordure droite (RB) de l'ADN-T et l'amorce BPa'-AP-2 spécifique de la région du gène *AtBP80a'* en amont du codon ATG. La séquence des amorces et les conditions PCR utilisées sont présentées dans le tableau 3. Le produit PCR obtenu à partir de l'ADN d'une lignée hémizygote a été cloné dans le vecteur pGEM-T_{easy} et séquencé.

Le génotypage des plantule est réalisé en utilisant deux couples d'amorces : le couple Tag5 / BPa'-AP-2 qui est spécifique de l'allèle muté par insertion de l'ADN-T et le couple BPa'-AV-3 / BPa'-AP-2 qui est spécifique de l'allèle sauvage. Les amorces et les conditions PCR sont présentées dans le tableau 3.

8. Analyses d'expression chez le mutant *vsr-a'*

8.1. RT-PCR standard

Les RT-PCR sont réalisées à partir d'ARN totaux de plantules en utilisant le kit Superscript II (cf. paragraphe 2.3.). Les différents couples d'amorces utilisés pour les analyses d'expression chez le mutant *vsr-a'* sont présentés dans le tableau 4.

8.2. RT-PCR quantitative

Les ARN totaux extraits de plantules sont dosés plusieurs fois. Une quantité de 2,5 µg d'ARN totaux est mélangée avec 50.10⁻³ ng d'ARNm de *nébuline*. La *nébuline* est un ARNm témoin humain qui permet de contrôler l'efficacité de la RT-PCR quantitative. Les ADNc sont préparés en utilisant le kit Superscript II (cf. paragraphe 2.3.). Les ADNc sont dilués dans un volume final de 400 µL d'eau UHQ *RNase-free*. Chaque réaction de PCR quantitative est réalisée à partir d'un µL d'ADNc. Les réactions sont conduites sur un système Roche LightCycler en suivant les recommandations du fournisseur.

L'analyse est conduite sur des plantules homozygotes et hémizygotés du mutant *vsr-a'* avec le couple d'amorces At2a'S et At2a'AS (séquences présentées dans le tableau 4). Des réactions sont aussi réalisées avec des amorces spécifiques de la *β-tubuline* (contrôle interne) : 5'-GAGGGAGCCATTGACAACATCTT-3' et 5'-GCGAACAGTTCACAGCTATGTTCA-3'. Les réactions réalisées avec des amorces spécifiques de la *nébuline* (contrôle externe) permettent de confirmer l'efficacité de la rétrotranscription : 5'-GTCCCGAAGCTTACACATGA-3' et 5'-GCCATACATCCAGCCTTCATCA-3'. Les résultats sont reportés sous forme de graphique après standardisation avec les valeurs obtenues pour la *nébuline*.

9. Analyse de la méthylation de l'ADN

La méthode retenue pour cette analyse repose sur un traitement de l'ADN au bisulfite de sodium. Cette méthode consiste à modifier l'ADN, puis à l'amplifier par PCR, pour révéler ensuite par séquençage quelles sont les cytosines méthylées (figure 51). Le traitement au bisulfite entraîne la transformation des cytosines non méthylées en uraciles tandis que les cytosines méthylées restent non modifiées. L'ADN modifié est amplifié par PCR ; les brins synthétisés comprennent des thymines à la place des uraciles. Le produit PCR est ensuite cloné et séquencé. Lorsqu'une thymine est retrouvée à une position normalement occupée par une cytosine, cela signifie qu'une cytosine non méthylée occupait cette position.

9.1. *Traitement de l'ADN au bisulfite de sodium*

La méthode décrite est adaptée de (Grunau et al., 2001). Une quantité de 500 ng d'ADN génomique à analyser sont mélangés avec 1 µg d'ADN de sperme de saumon (*carrier*), 25 µL de tampon (tampon D, Promega) et de 2 µL d'enzyme de restriction *Xho*I dans un volume final de 250 µL. L'ADN digéré est précipité avec 500 µL d'éthanol et 25 µL d'acétate de sodium 3 M pendant 4 h à -20°C et finalement repris par 35 µL d'eau UHQ. Ensuite 35 µL de NaOH 0,6 M fraîchement préparé sont ajoutés et le mélange est incubé 20 min à 37°C pour permettre la dénaturation. La solution de bisulfite est préparée en mélangeant lentement 5,2 g de bisulfite de sodium (S9000, Sigma, France) dans 20 mL d'eau. Le pH est ajusté à 5 avec NaOH 2,5 M, puis 1,5 mL d'hydroquinone 10 mM sont ajoutés et le volume est complété à 25 mL. La solution est dégazée sous agitation lente pendant 15 min et 400 µL de cette solution fraîchement préparée sont ajoutés à l'ADN dénaturé, suivis de 2 gouttes d'huile minérale pour protéger le mélange de l'oxydation. Le mélange est incubé dans un thermocycleur en suivant le programme (55°C 3 h, 94°C 30 s) X 5. L'ADN est ensuite purifié avec le kit Qiaex II (Qiagen, France). La solution d'ADN (40 µL) est additionnée de 40 µL de NaOH 0,6 M, puis incubée pendant 15 min à 37°C pour permettre la complétion de la réaction. La neutralisation du mélange est faite en ajoutant 40 µL d'acétate d'ammonium 10 M, puis l'ADN est précipité par 300 µL d'éthanol. Après centrifugation, lavage et séchage, l'ADN est repris dans 40 µL de Tris-HCl 1 mM, pH=8.

9.2. *Amplification de l'ADN traité*

L'ADN modifié est amplifié par PCR. Le traitement entraîne une dégradation importante de l'ADN, ce qui oblige à utiliser 20 µL pour une réaction. Deux couples d'amorces ont été utilisés pour les amplifications : le couple Met-Tag et Met-AP qui permet d'amplifier l'ADN d'un brin mutant et le couple Met-AV et Met-AP qui permet d'amplifier l'ADN d'un brin sauvage. Les conditions PCR sont présentées dans le tableau 5.

9.3. *Analyse des séquences*

L'ADN amplifié est cloné dans le vecteur pGEM-T_{easy}. Les clones possédant la construction d'intérêt sont séquencés avec les amorces -20 (5'-GTAAACGACGGCCAGT-3') et reverse (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'). Les résultats sont ensuite reportés en dessous de la séquence de l'ADN modifié : un cercle ouvert est utilisé pour chaque cytosine non méthylée et un cercle plein pour chaque cytosine méthylée.

10. Génération des constructions RNAi

L'intron utilisé pour construire ce système est l'intron n°11 du gène PDS en raison de sa petite taille (442 pb). Cet intron a été amplifié par PCR à partir d'ADN génomique avec les amorces Int11PDSsens et Int11PDSas (tableau 6). Il a été cloné dans le vecteur pGEM-T_{easy}, séquencé, puis sous cloné dans le vecteur pBluescript II aux sites *EcoRI* et *HindIII*. Ce vecteur est appelé pBluescriptII + intron n°11-PDS.

Le vecteur pSR01 correspond au vecteur pGREEN0029 (vecteur binaire pGREEN avec une cassette d'expression 35S-polyA).

Le promoteur inductible à la chaleur *pHsp18.2* provient du vecteur pTT101 aimablement fourni par T. Takahashi (Matsuhara et al., 2000). Le vecteur pTT101 a été digéré par le couple d'enzymes *HindIII/BamHI* et le fragment correspondant au promoteur *pHsp18.2* a été récupéré. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pSR01 dont le promoteur 35S a été éliminé par une double digestion *HindIII/BamHI*. Cette construction correspond au vecteur pGind01.

Les fragments 3' UTR des gènes *PDS*, *AtBP80a* et *AtBP80a'* ont été amplifiés par PCR à partir d'ADNc avec des amorces spécifiques (tableau 6). Chaque produit PCR a été cloné dans le vecteur pGEM-T_{easy}, puis a été séquencé pour vérifier qu'aucune erreur n'est présente dans la séquence. La génération de chaque construction est réalisée de façon identique pour chaque gène. Deux fragments ont été obtenus en digérant le vecteur pGEM-T_{easy} contenant le produit PCR respectivement avec les enzymes *HindIII* et *Sall* et les enzymes *EcoRI* et *SpeI*. Ces deux fragments ont été sous cloné de part et d'autre de l'intron dans le vecteur pBluescriptII + intron n°11-PDS. Le premier fragment a d'abord été cloné aux sites *HindIII* et *XhoI*. Puis le deuxième fragment a été sous cloné aux sites *EcoRI* et *XbaI*. Les vecteurs obtenus présentent donc le 3'UTR des gènes *PDS*, *AtBP80a*, *AtBP80a'* en répétition inverse séparée par un intron.

Chaque construction en répétition inverse a été transférée dans les vecteurs binaires pSR01 et pGind01. Pour cela, la construction en répétition inverse a été libérée du vecteur pBluescriptII par une digestion avec l'enzyme *BamHI*. Le fragment obtenu est cloné dans les deux vecteurs pSR01 et pGind01 linéarisés par une digestion avec l'enzyme *BamHI*.

11. Induction des constructions RNAi

Le premier type d'induction est l'induction du promoteur *pHsp18.2* pour des plantules ou des graines en boîte de Pétri. Les boîtes de Pétri sont incubées pendant 2 heures dans un incubateur à 37°C. Suite à ce traitement, les boîtes sont replacées dans les conditions standard.

Le deuxième type d'induction est l'induction du promoteur *pHsp18.2* pour des plantes cultivées sur tourbe. Les plantes et leur support sont placés dans une enceinte en polystyrène placée au dessus d'un bain-marie à environ 60°C. La température de l'enceinte est maintenue à environ 38°C en modifiant la température du bain-marie. Les plantes sont incubées dans ces conditions pendant 30 à 45 min, puis elles sont replacées dans les conditions standard.

12. Méthodes relatives à l'utilisation de la mousse *P. patens*

12.1. Extraction des acides nucléiques de mousse

12.1.1. Extraction d'ADN

50 mg de tissus sont récupérés sur des boîtes récentes, écrasés rapidement 2 fois dans un papier filtre pour enlever l'excès d'eau, placés dans un microtube puis congelés dans l'azote liquide. Une bille de tungstène est ajoutée dans le tube pour permettre le broyage avec l'appareil Qiagen MM300 (2 fois 30 s, fréquence 1/30). Puis 300 µL de tampon MossDNAextraction et 1 µL de RNase A 10 mg/mL sont ajoutés et le mélange est incubé 5 min à 65°C. Le mélange est additionné de 300 µL de chloroforme/alcool isoamylique et vortexé brièvement. Les 2 phases sont séparées par une centrifugation de 10 min à 17000g. La phase supérieure est prélevée et additionnée de 250 µL d'isopropanol, puis centrifugée 5 min à 17000g. Le culot est lavé avec de l'éthanol 80 %, séché brièvement sous cloche à vide, puis finalement repris dans 30 µL de TE pH=8,0. Pour obtenir une plus grande quantité d'ADN (*Southern blot*), la même procédure est employée sur une boîte entière de tissus (protonema) en multipliant tous les volumes par 10.

12.1.2. Extraction d'ARN

Les 100 mg de tissus récupérés sont traités et broyés comme pour l'extraction d'ADN. Les ARN sont extraits avec le kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, France) en suivant les recommandations du fournisseur. Ils sont élués à deux reprises par 30 µL d'eau. L'ADN restant est éliminé par un traitement de 20 min à 37°C avec 1 µL de DNase Rnase free (Promega). Les ARN sont ensuite précipités pendant une nuit avec 200 µL d'éthanol et 6 µL d'acétate de sodium 3 M, pH=4,8. Ils sont finalement repris dans 20 µL. Ils sont dosés au spectrophotomètre et leur intégrité est vérifiée sur gel d'agarose.

12.2. Construction des vecteurs de remplacement

L'EST du gène *PpBP80.1* (n° accession GenBank : AW509740) clonée dans le vecteur pBluescript a été séquencée et déposée dans les bases de données (n° accession GenBank : AY017377). Une cassette *p35S-NptII* a été isolée à partir du plasmide pMBL6 par digestion avec l'enzyme *Bam*HI. Cette cassette purifiée a été clonée au milieu de la séquence de l'ADNc partiel au site *Bam*HI (figure 52). Cette construction, appelée vecteur de remplacement pKO1, comprend donc un fragment de l'ADNc de 590 pb, le gène *NptII* sous contrôle du promoteur 35S, suivi d'un fragment de l'ADNc de 953 pb. Ce vecteur est produit en grande quantité avec le kit *Plasmid Midi kit* (Qiagen, France) qui assure une pureté optimale. Dix µg sont ensuite digérés successivement avec les enzymes *Bst*XI et *Spe*I pour libérer la construction linéaire du reste du vecteur. Cette construction a été utilisée pour le premier essai de transformation.

Des problèmes de criblage des transformants ont eu lieu à cause des fragments d'ADNc restants sur ce vecteur après la double digestion par *Bst*XI et *Spe*I. Afin d'éviter ce problème, un deuxième vecteur de remplacement pKO2 a été généré à partir du premier vecteur : une PCR avec les amorces Pp-KOs et PpKOas a permis d'amplifier une construction linéaire qui a été clonée dans le vecteur pGEM-T_{easy} (figure 52). Pour être libérée du vecteur, la construction linéaire est directement amplifiée par PCR à partir du vecteur pKO2 avec les amorces Pp-KOs et PpKOas. Les conditions PCR sont présentées dans le tableau 7. Plusieurs produits PCR sont purifiés et mélangés pour obtenir 10 µg d'ADN. Ce vecteur de remplacement a été utilisé pour le deuxième et le troisième essai de transformation.

12.3. Transformation de la mousse *P. patens*

12.3.1. Obtention des protoplastes

Une solution enzymatique est préparée en mélangeant 0,14 g de Driselase (Sigma, France) dans 10 mL de D-mannitol 8 %. Ce mélange est incubé 15 min à température ambiante, puis centrifugé à 2500 g pendant 10 min. Le surnageant est ensuite stérilisé par passage dans un filtre de 0,2 µm. La mousse est prélevée sur 3 boîtes de pétri 9 cm avec cellophane âgées de 7 jours. Elle est ajoutée au filtrat et ce mélange est incubé 30 min à température ambiante avec plusieurs agitations douces. Les protoplastes sont récupérés en filtrant la suspension avec un filtre 100 µm qui retient les débris non digérés. Les protoplastes sont ensuite centrifugés à 100-200g pendant 5 min (sans frein). Le surnageant est éliminé délicatement et le culot est repris doucement avec 10 mL de D-mannitol 8 %. La suspension est centrifugée à 100-200g pendant 5 min (sans frein). Ce lavage des protoplastes est répété 2 fois. Avant la dernière centrifugation, la densité de protoplastes est évaluée avec un

hémocytomètre. Le culot est repris dans un volume de solution MMM (D-mannitol, MgCl_2 , MES - voir annexe) permettant d'avoir une densité de protoplastes de $1,6 \times 10^6$ protoplastes/mL.

12.3.2. Transformation des protoplastes

Dix μg d'ADN dans un volume de 30 μL sont placés au fond d'un tube stérile de 10 mL. 300 μL de suspension de protoplastes sont ajoutés suivi de 300 μL de solution de PEG (fondue et refroidie à température ambiante). Le mélange est incubé 5 min à 45°C puis refroidi 5 min à température ambiante (20°C). Après l'ajout de 300 μL de D-mannitol 8 %, le tube est inversé délicatement pour mélanger et laissé 3 min à température ambiante. Ce lavage au mannitol est répété 5 fois. A nouveau, un mL de D-mannitol 8 % est ajouté, le tube est inversé délicatement pour mélanger et laissé 3 min à température ambiante. Cette étape est également répétée cinq fois. La suspension est centrifugée à 100-200g pendant 5 min (sans frein). Le culot est repris dans 5 mL de milieu BMCG. La suspension est incubée à 25°C, à l'obscurité pendant 24 h. Les protoplastes sont centrifugés et repris dans 500 μL de D-mannitol 8 %. Un volume de 2,5 mL de milieu PRMT (maintenu à 42°C) est ajouté. Ce mélange est répandu sur des boîtes de PRMB (avec 0,5 % de D-glucose) recouvertes d'une feuille de cellophane (1 mL par boîte). Les boîtes sont placées en salle de culture.

Un vecteur possédant le gène *nptII* sous contrôle du promoteur 35S (vecteur pJIT161) est utilisé comme contrôle de transformation. Ce vecteur va s'intégrer par recombinaison illégitime dans le génome. Il permet de vérifier l'efficacité de la transformation. Les protoplastes sont transformés avec 10 μg de vecteur pJIT161.

12.3.3. Sélection des transformants stables

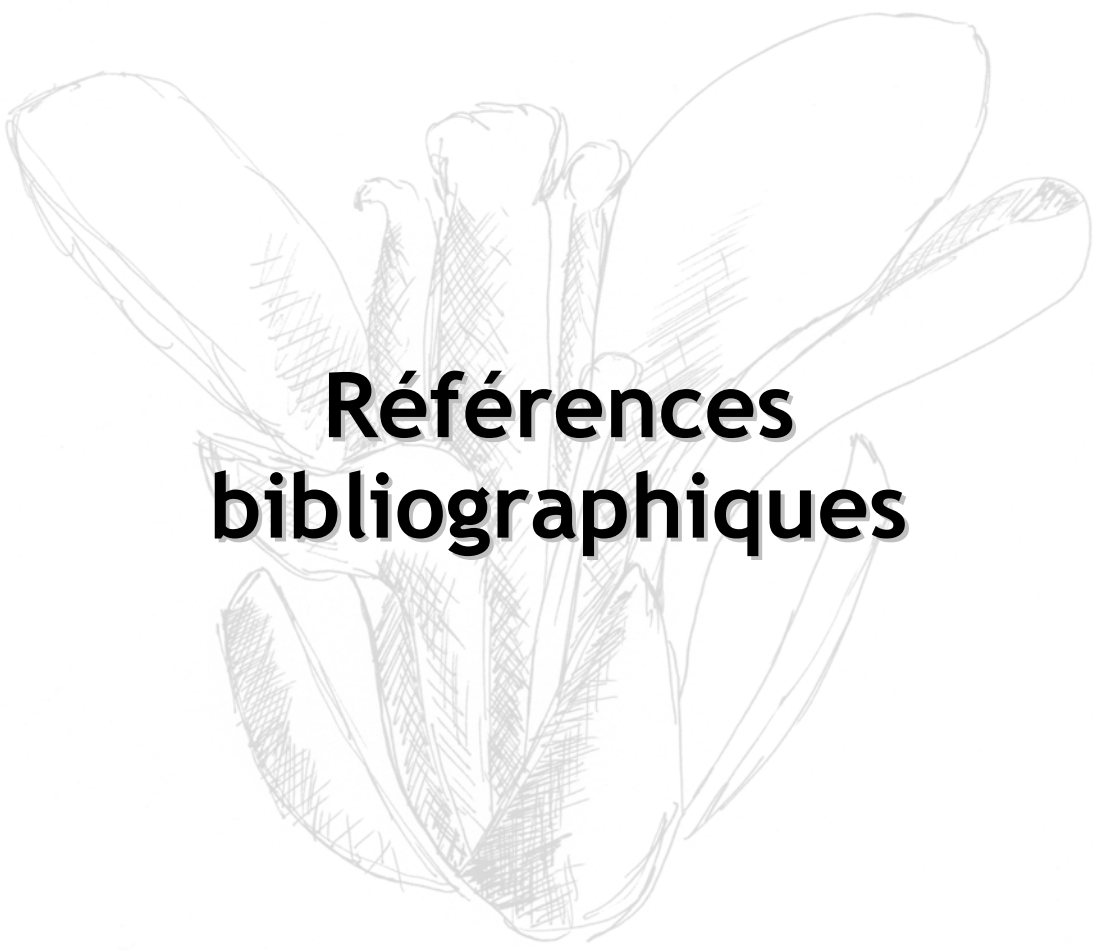
Les transformants stables sont isolés en réalisant une première étape de sélection sur milieu BCDN additionné de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G-418 (antibiotique, inactivé par le produit du gène *nptII*, Sigma, France) pendant 2 semaines, suivie d'une deuxième étape sur milieu BCDN sans sélection pendant 2 semaines et d'une nouvelle étape de sélection sur milieu BCDN avec G-418 pendant 2 semaines. Le transfert sur un nouveau milieu est facilité par la présence de la feuille de cellophane qui peut être saisie à l'aide de pinces. Ces différentes étapes permettent d'éliminer les transformants dits instables qui n'ont pas intégré l'ADN exogène dans leur génome. Les transformants stables sont ensuite propagés par *spot-inoculation*.

12.3.4. Analyse moléculaire des transformants

L'intégration correcte de la construction par recombinaison homologue dans le gène *PpBP80.1* est analysée par PCR. Les ADN extraits des différentes lignées sont dilués au

dixième et 1 µL est utilisé pour chaque réaction d'amplification. La présence du transgène est tout d'abord confirmée par PCR avec des amorces spécifiques du gène *nptII* (NptII_s et NptII_{as}). Les couples d'amorces Pp1s et Pp1459as et NptII_s et Pp1459as sont ensuite employés pour caractériser les lignées. Les conditions utilisées pour les PCR sont présentées dans le tableau 7.

L'absence d'expression du gène *PpBP80.1* est analysée par RT-PCR à partir de 2 µg d'ARN extraits de jeunes gamétophores. La PCR avec le couple d'amorces Pp1s et Pp1459as permet de vérifier l'absence d'expression du gène. Le couple d'amorces NptII_s et NptII_{as} est utilisé pour confirmer l'efficacité de la RT-PCR. Les conditions utilisées pour les PCR sont présentées dans le tableau 7.



Références bibliographiques

- AGI. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Ahmed, S.U., Bar-Peled, M., and Raikhel, N.V. (1997). Cloning and subcellular location of an *Arabidopsis* receptor-like protein that shares common features with protein-sorting receptors of eukaryotic cells. *Plant Physiol.* **114**, 325-336.
- Ahmed, S.U., Rojo, E., Kovaleva, V., Venkataraman, S., Dombrowski, J.E., Matsuoka, K., and Raikhel, N.V. (2000). The plant vacuolar sorting receptor AtELP is involved in transport of NH(2)-terminal propeptide-containing vacuolar proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell Biol.* **149**, 1335-1344.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and J.D., W. (1994). *Molecular Biology of the Cell* - 3rd edition. (New York & London: Garland Publishing).
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., and Ecker, J.R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Alonso-Blanco, C., Bentsink, L., Hanhart, C.J., Blankestijn-de Vries, H., and Koornneef, M. (2003). Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **164**, 711-729.
- Arnaud, P., Goubely, C., Pelissier, T., and Deragon, J.M. (2000). SINE retroposons can be used in vivo as nucleation centers for de novo methylation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3434-3441.
- Ashton, N.W., and Cove, D.J. (1977). The isolation and preliminary characterization of auxotrophic and analogue resistant mutants in the moss *Physcomitrella patens*. *Mol. Gen. Genet.* **154**, 87-95.
- Bassham, D.C., and Raikhel, N.V. (1998). An *Arabidopsis* VPS45p homolog implicated in protein transport to the vacuole. *Plant Physiol.* **117**, 407-415.
- Bassham, D.C., and Raikhel, N.V. (2000). Unique features of the plant vacuolar sorting machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 491-495.
- Baulcombe, D.C. (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 109-113.
- Bentsink, L., and Koornneef, M. (2002). Seed Dormancy and Germination. In *The Arabidopsis Book*, C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, eds (Rockville, MD: American Society of Plant Biologists), pp. doi/10.1199/tab.0009.
<http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>.
- Bewley, J.D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* **9**, 1055-1066.
- Bewley, J.D., and Black, M. (1994). *Seeds: Physiology of Development and Germination*. (New York: Plenum Press).
- Bourque, J.E. (1995). Antisense strategies for genetic manipulations in plants. *Plant Science* **105**, 125-149.
- Brandizzi, F., Frangne, N., Marc-Martin, S., Hawes, C., Neuhaus, J.M., and Paris, N. (2002). The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain. *Plant Cell* **14**, 1077-1092.

- Buchanan, B., Gruissem, W., and Jones, R. (2000). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. (American Society of Plant Physiologists).
- Burn, J.E., Bagnall, D.J., Metzger, J.D., Dennis, E.S., and Peacock, W.J. (1993). DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 287-291.
- Cao, X., Rogers, S.W., Butler, J., Beevers, L., and Rogers, J.C. (2000). Structural Requirements for Ligand Binding by a Probable Plant Vacuolar Sorting Receptor. *Plant Cell* **12**, 493-506.
- Chuang, C.F., and Meyerowitz, E.M. (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4985-4990.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.
- Cogoni, C. (2002). Unifying homology effects. *Nat. Genet.* **30**, 245-246.
- Cove, D.J., Knight, C.D., and Lamparter, T. (1997). Mosses as model systems. *Trends in Plant Science* **2**, 99-105.
- Debeaujon, I., and Koornneef, M. (2000). Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiol.* **122**, 415-424.
- Debeaujon, I., Leon-Kloosterziel, K.M., and Koornneef, M. (2000). Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **122**, 403-414.
- Derkx, M.P.M., and Karssen, C.M. (1993). Variability in light-gibberellin-and nitrate requirement of *Arabidopsis thaliana* seeds due to harvest time and conditions of dry storage. *J. Plant Physiol.* **141**, 574-582.
- Dietz-Pfeilstetter, A., Arndt, N., Kay, V., and Bode, J. (2003). Molecular structure and regulatory potential of a T-DNA integration site in petunia. *Transgenic Res.* **12**, 83-99.
- Downie, A.B., Zhang, D., Dirk, L.M., Thacker, R.R., Pfeiffer, J.A., Drake, J.L., Levy, A.A., Butterfield, D.A., Buxton, J.W., and Snyder, J.C. (2003). Communication between the maternal testa and the embryo and/or endosperm affect testa attributes in tomato. *Plant Physiol.* **133**, 145-160.
- Dubreucq, B., Grappin, P., and Caboche, M. (1996). A new method for the identification and isolation of genes essential for *Arabidopsis thaliana* seed germination. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 42-50.
- Egener, T., Granado, J., Guitton, M.C., Hohe, A., Holtorf, H., Lucht, J.M., Rensing, S.A., Schlink, K., Schulte, J., Schween, G., Zimmermann, S., Duwenig, E., Rak, B., and Reski, R. (2002). High frequency of phenotypic deviations in *Physcomitrella patens* plants transformed with a gene-disruption library. *BMC Plant Biol* **2**, 6.
- Fabbri, M., Fumagalli, L., Bossi, G., Bianchi, E., Bender, J.R., and Pardi, R. (1999). A tyrosine-based sorting signal in the beta2 integrin cytoplasmic domain mediates its recycling to the plasma membrane and is required for ligand-supported migration. *EMBO J.* **18**, 4915-4925.
- Finnegan, E.J. (2002). Epialleles - a source of random variation in times of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 101-106.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.

- Fojtova, M., Van Houdt, H., Depicker, A., and Kovarik, A. (2003). Epigenetic switch from posttranscriptional to transcriptional silencing is correlated with promoter hypermethylation. *Plant Physiol.* **133**, 1240-1250.
- Fraser, A.G., Kamath, R.S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., and Ahringer, J. (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* **408**, 325-330.
- Gallardo, K., Job, C., Groot, S.P., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., and Job, D. (2002). Proteomics of Arabidopsis seed germination. A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiol.* **129**, 823-837.
- Garcia, D., Saingery, V., Chambrier, P., Mayer, U., Jurgens, G., and Berger, F. (2003). Arabidopsis haiku mutants reveal new controls of seed size by endosperm. *Plant Physiol.* **131**, 1661-1670.
- Girke, T., Schmidt, H., Zahringer, U., Reski, R., and Heinz, E. (1998). Identification of a novel delta 6-acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. *Plant J.* **15**, 39-48.
- Girod, P.A., Fu, H., Zryd, J.P., and Vierstra, R.D. (1999). Multiubiquitin chain binding subunit MCB1 (RPN10) of the 26S proteasome is essential for developmental progression in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* **11**, 1457-1472.
- Grappin, P., Bouinot, D., Sotta, B., Miginiac, E., and Jullien, M. (2000). Control of seed dormancy in *Nicotiana glauca*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta* **210**, 279-285.
- Grunau, C., Clark, S.J., and Rosenthal, A. (2001). Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* **29**, E65-65.
- Hadlington, J.L., and Denecke, J. (2000). Sorting of soluble proteins in the secretory pathway of plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 461-468.
- Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature* **418**, 244-251.
- Hara-Nishimura, I.I., Shimada, T., Hatano, K., Takeuchi, Y., and Nishimura, M. (1998). Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell* **10**, 825-836.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M. (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **42**, 819-832.
- Hohl, I., Robinson, D.G., Chrispeels, M.J., and Hinz, G. (1996). Transport of storage proteins to the vacuole is mediated by vesicles without a clathrin coat. *J. Cell Sci.* **109** (Pt 10), 2539-2550.
- Humair, D., Hernandez Felipe, D., Neuhaus, J.M., and Paris, N. (2001). Demonstration in yeast of the function of BP-80, a putative plant vacuolar sorting receptor. *Plant Cell* **13**, 781-792.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Jarvis, P., and Soll, J. (2002). Toc, tic, and chloroplast protein import. *Biochim. Biophys. Acta* **1590**, 177-189.
- Jarvis, P., Chen, L.J., Li, H., Peto, C.A., Fankhauser, C., and Chory, J. (1998). An Arabidopsis mutant defective in the plastid general protein import apparatus. *Science* **282**, 100-103.

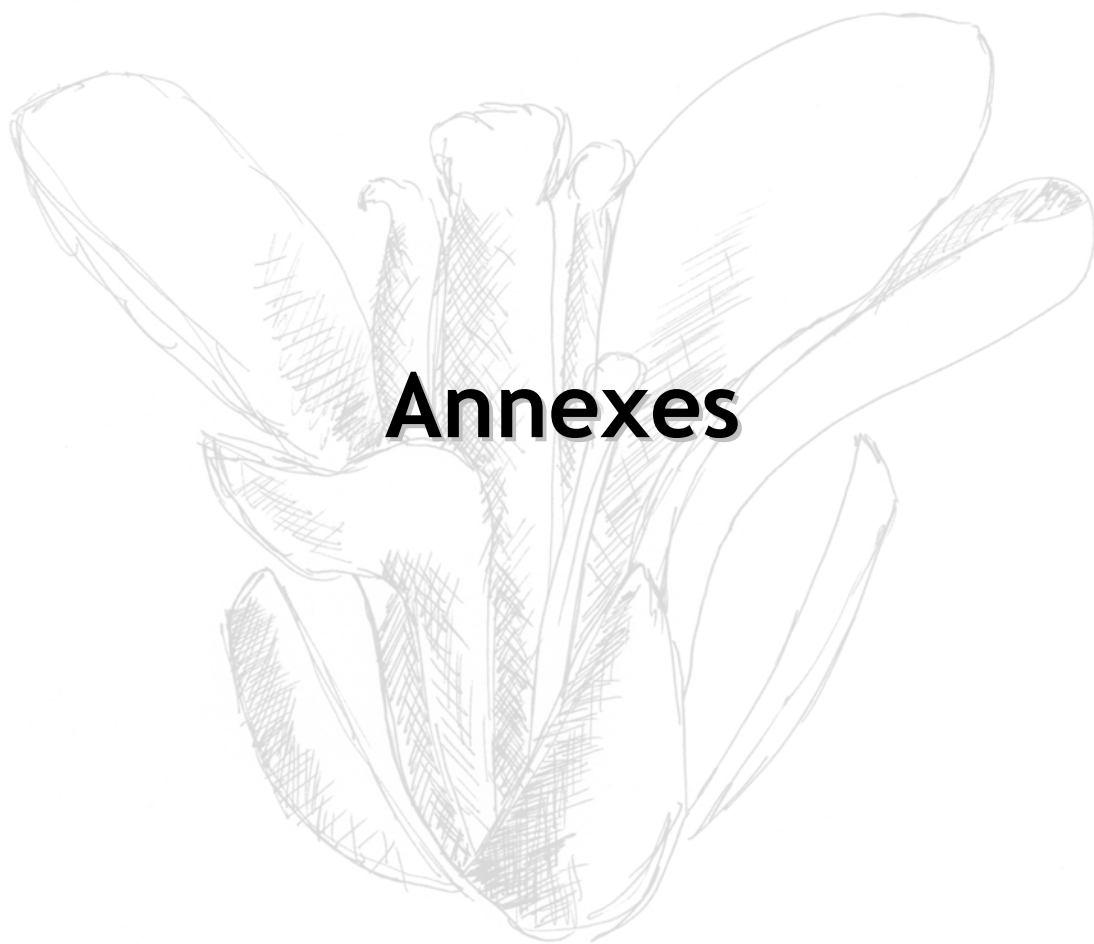
- Jauh, G.Y., Phillips, T.E., and Rogers, J.C. (1999). Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell* **11**, 1867-1882.
- Jauh, G.Y., Fischer, A.M., Grimes, H.D., Ryan, C.A., Jr., and Rogers, J.C. (1998). delta-Tonoplast intrinsic protein defines unique plant vacuole functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12995-12999.
- Jorgensen, M.U., Emr, S.D., and Winther, J.R. (1999). Ligand recognition and domain structure of Vps10p, a vacuolar protein sorting receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **260**, 461-469.
- Jurgens, G., and Geldner, N. (2002). Protein secretion in plants: from the trans-Golgi network to the outer space. *Traffic* **3**, 605-613.
- Keegstra, K., and Cline, K. (1999). Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell* **11**, 557-570.
- Kirsch, T., Paris, N., Butler, J.M., Beevers, L., and Rogers, J.C. (1994). Purification and initial characterization of a potential plant vacuolar targeting receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 3403-3407.
- Koiwa, H., Li, F., McCully, M.G., Mendoza, I., Koizumi, N., Manabe, Y., Nakagawa, Y., Zhu, J., Rus, A., Pardo, J.M., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M. (2003). The STT3a subunit isoform of the Arabidopsis oligosaccharyltransferase controls adaptive responses to salt/osmotic stress. *Plant Cell* **15**, 2273-2284.
- Koncz, C., and Schnell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396.
- Kornfeld, S. (1992). Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 307-330.
- Krysan, P.J., Young, J.C., and Sussman, M.R. (1999). T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**, 2283-2290.
- Krysan, P.J., Young, J.C., Tax, F., and Sussman, M.R. (1996). Identification of transferred DNA insertions within *Arabidopsis* genes involved in signal transduction and ion transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8145-8150.
- Kumpatla, S.P., Chandrasekharan, M.B., Iyer, L.M., Li, G., and Hall, T.C. (1998). Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing. *Trends in Plant Science* **3**, 97-104.
- Laval, V. (2000). Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de récepteurs membranaires chez *Arabidopsis thaliana* présentant des analogies avec les intégrines. Thèse (Toulouse: Paul Sabatier), pp. 103.
- Laval, V., Chabannes, M., Carriere, M., Canut, H., Barre, A., Rouge, P., Pont-Lezica, R., and Galaud, J. (1999). A family of *Arabidopsis* plasma membrane receptors presenting animal beta-integrin domains. *Biochim. Biophys. Acta* **1435**, 61-70.
- Law, R.D., and Suttle, J.C. (2003). Transient decreases in methylation at 5'-cCGG-3' sequences in potato (*Solanum tuberosum* L.) meristem DNA during progression of tubers through dormancy precede the resumption of sprout growth. *Plant Mol. Biol.* **51**, 437-447.
- Leon-Kloosterziel, K.M., Keijzer, C.J., and Koornneef, M. (1994). A Seed Shape Mutant of *Arabidopsis* That Is Affected in Integument Development. *Plant Cell* **6**, 385-392.
- Liljegren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J.L., and Yanofsky, M.F. (2000). SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* **404**, 766-770.

- Marcusson, E.G., Horazdovsky, B.F., Cereghino, J.L., Gharakhanian, E., and Emr, S.D. (1994). The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell* **77**, 579-586.
- Marty, F. (1999). Plant Vacuoles. *Plant Cell* **11**, 587-600.
- Matsuhara, S., Jingu, F., Takahashi, T., and Komeda, Y. (2000). Heat-shock tagging: a simple method for expression and isolation of plant genome DNA flanked by T-DNA insertions. *Plant J.* **22**, 79-86.
- Merkle, T. (2001). Nuclear import and export of proteins in plants: a tool for the regulation of signalling. *Planta* **213**, 499-517.
- Meza, T.J., Stangeland, B., Mercy, I.S., Skarn, M., Nymoen, D.A., Berg, A., Butenko, M.A., Hakelien, A.M., Haslekas, C., Meza-Zepeda, L.A., and Aalen, R.B. (2002). Analyses of single-copy Arabidopsis T-DNA-transformed lines show that the presence of vector backbone sequences, short inverted repeats and DNA methylation is not sufficient or necessary for the induction of transgene silencing. *Nucleic Acids Res* **30**, 4556-4566.
- Moriyasu, Y., Hattori, M., Jauh, G.Y., and Rogers, J.C. (2003). Alpha tonoplast intrinsic protein is specifically associated with vacuole membrane involved in an autophagic process. *Plant Cell Physiol.* **44**, 795-802.
- Nebenfuhr, A. (2002). Vesicle traffic in the endomembrane system: a tale of COPs, Rabs and SNAREs. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 507-512.
- Neuhaus, J.M., and Rogers, J.C. (1998). Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol. Biol.* **38**, 127-144.
- Neumann, U., Brandizzi, F., and Hawes, C. (2003). Protein transport in plant cells: in and out of the Golgi. *Ann Bot (Lond)* **92**, 167-180.
- Nishiyama, T., Fujita, T., Shin, I.T., Seki, M., Nishide, H., Uchiyama, I., Kamiya, A., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K., Kohara, Y., and Hasebe, M. (2003). Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: implication for land plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8007-8012.
- Parinov, S., Sevugan, M., Ye, D., Yang, W.C., Kumaran, M., and Sundaresan, V. (1999). Analysis of flanking sequences from dissociation insertion lines: a database for reverse genetics in Arabidopsis. *Plant Cell* **11**, 2263-2270.
- Paris, N., and Neuhaus, J.M. (2002). BP-80 as a vacuolar sorting receptor. *Plant Mol. Biol.* **50**, 903-914.
- Paris, N., Stanley, C.M., Jones, R.L., and Rogers, J.C. (1996). Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell* **85**, 563-572.
- Paris, N., Rogers, S.W., Jiang, L., Kirsch, T., Beevers, L., Phillips, T.E., and Rogers, J.C. (1997). Molecular cloning and further characterization of a probable plant vacuolar sorting receptor. *Plant Physiol.* **115**, 29-39.
- Parker, G., Schofield, R., Sundberg, B., and Turner, S. (2003). Isolation of COV1, a gene involved in the regulation of vascular patterning in the stem of Arabidopsis. *Development* **130**, 2139-2148.
- Pelissier, T., Thalmeir, S., Kempe, D., Sanger, H.L., and Wassenegger, M. (1999). Heavy de novo methylation at symmetrical and non-symmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Res* **27**, 1625-1634.
- Pimpl, P., and Denecke, J. (2002). Protein-protein interactions in the secretory pathway, a growing demand for experimental approaches in vivo. *Plant Mol. Biol.* **50**, 887-902.

- Prober, J.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zagursky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M.A., and Baumeister, K. (1987). A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* **238**, 336-341.
- Rayner, J.C., and Pelham, H.R. (1997). Transmembrane domain-dependent sorting of proteins to the ER and plasma membrane in yeast. *EMBO J.* **16**, 1832-1841.
- Reski, R. (1999). Molecular genetics of *Physcomitrella*. *Planta* **208**, 301-309.
- Robinson, C., Thompson, S.J., and Woolhead, C. (2001). Multiple pathways used for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts. *Traffic* **2**, 245-251.
- Rogers, S.O., and Bendich, A.J. (1988). Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Mol. Biol. Manual* **A6**, 1-10.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (New York: 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Samson, F., Brunaud, V., Balzergue, S., Dubreucq, B., Lepiniec, L., Pelletier, G., Caboche, M., and Lecharny, A. (2002). FLAGdb/FST: a database of mapped flanking insertion sites (FSTs) of *Arabidopsis thaliana* T-DNA transformants. *Nucleic Acids Res* **30**, 94-97.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* **24**, 104-108.
- Schaefer, D.G. (2002). A new moss genetics: targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 477-501.
- Schaefer, D.G., and Zryd, J.P. (2001). The moss *Physcomitrella patens*, now and then. *Plant Physiol.* **127**, 1430-1438.
- Sheldon, C.C., Finnegan, E.J., Rouse, D.T., Tadege, M., Bagnall, D.J., Helliwell, C.A., Peacock, W.J., and Dennis, E.S. (2000). The control of flowering by vernalization. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 418-422.
- Shi, H., Djikeng, A., Mark, T., Wirtz, E., Tschudi, C., and Ullu, E. (2000). Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. *RNA* **6**, 1069-1076.
- Shimada, T., Kuroyanagi, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (1997). A pumpkin 72-kDa membrane protein of precursor-accumulating vesicles has characteristics of a vacuolar sorting receptor. *Plant Cell Physiol.* **38**, 1414-1420.
- Shimada, T., Watanabe, E., Tamura, K., Hayashi, Y., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2002). A vacuolar sorting receptor PV72 on the membrane of vesicles that accumulate precursors of seed storage proteins (PAC vesicles). *Plant Cell Physiol.* **43**, 1086-1095.
- Shimada, T., Fuji, K., Tamura, K., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2003). Vacuolar sorting receptor for seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Shiu, P.K., and Metzenberg, R.L. (2002). Meiotic silencing by unpaired DNA: properties, regulation and suppression. *Genetics* **161**, 1483-1495.
- Shiu, P.K., Raju, N.B., Zickler, D., and Metzenberg, R.L. (2001). Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell* **107**, 905-916.
- Sieburth, L.E., Drews, G.N., and Meyerowitz, E.M. (1998). Non-autonomy of AGAMOUS function in flower development: use of a Cre/loxP method for mosaic analysis in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 4303-4312.

- Smith, H.M., and Raikhel, N.V. (1998). Nuclear localization signal receptor importin alpha associates with the cytoskeleton. *Plant Cell* **10**, 1791-1799.
- Smith, M.D., and Schnell, D.J. (2001). Peroxisomal protein import. the paradigm shifts. *Cell* **105**, 293-296.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G., and Waterhouse, P.M. (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**, 319-320.
- Soll, J. (2002). Protein import into chloroplasts. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 529-535.
- Strepp, R., Scholz, S., Kruse, S., Speth, V., and Reski, R. (1998). Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homolog of the bacterial cell division protein FtsZ, an ancestral tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4368-4373.
- Subramani, S. (1998). Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiol. Rev.* **78**, 171-188.
- Takahashi, T., Naito, S., and Komeda, Y. (1992). The Arabidopsis HSP18.2 promoter/GUS gene fusion in transgenic Arabidopsis plants: a powerful tool for the isolation of regulatory mutants of the heat-shock response. *Plant J.* **2**, 751-761.
- Tavernarakis, N., Wang, S.L., Dorovkov, M., Ryazanov, A., and Driscoll, M. (2000). Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat. Genet.* **24**, 180-183.
- Tissier, A.F., Marillonnet, S., Klimyuk, V., Patel, K., Torres, M.A., Murphy, G., and Jones, J.D. (1999). Multiple independent defective suppressor-mutator transposon insertions in Arabidopsis: a tool for functional genomics. *Plant Cell* **11**, 1841-1852.
- Truscott, K.N., Brandner, K., and Pfanner, N. (2003). Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr. Biol.* **13**, R326-337.
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., and Shinozaki, K. (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *Plant Cell* **11**, 1743-1754.
- Walter, P., and Johnson, A.E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 87-119.
- Waterhouse, P.M., and Helliwell, C.A. (2003). Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet* **4**, 29-38.
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W., and Wang, M.B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13959-13964.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.B., and Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**, 834-842.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., and Waterhouse, P.M. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* **27**, 581-590.
- Western, T.L., Burn, J., Tan, W.L., Skinner, D.J., Martin-McCaffrey, L., Moffatt, B.A., and Haughn, G.W. (2001). Isolation and characterization of mutants defective in seed coat mucilage secretory cell development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **127**, 998-1011.
- Windsor, J.B., Symonds, V.V., Mendenhall, J., and Lloyd, A.M. (2000). Arabidopsis seed coat development: morphological differentiation of the outer integument. *Plant J.* **22**, 483-493.

- Wink, M. (1993). The Plant Vacuole: a multifunctional compartment. *J. Exp. Bot.* **44**, 231-246.
- Wolffe, A.P., and Matzke, M.A. (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science* **286**, 481-486.
- Zhu, J., Gong, Z., Zhang, C., Song, C.P., Damsz, B., Inan, G., Koiwa, H., Zhu, J.K., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A. (2002). OSM1/SYP61: a syntaxin protein in *Arabidopsis* controls abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress. *Plant Cell* **14**, 3009-3028.



Annexes

Annexe 1 : Milieux et solutions

Solution UTB (bactéries ultracompétentes)	
PIPES	10 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
pH ajusté à 6,7 (KOH / HCl)	
MnCl ₂	55 mM
Stérilisée par filtration	Conservation 4 °C

Milieu SOB	
Extrait de levure	0,5 %
Tryptone	2 %
KCl	2,5 mM
NaCl	10 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
autoclavé	

Milieu SOC	
Extrait de levure	0,5 %
Tryptone	2 %
KCl	2,5 mM
NaCl	10 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM
autoclavé	

Milieu LB	
Extrait de levure	5 g/L
Tryptone	10 g/L
NaCl	10 g/L
Agar (optionnel)	12 g/L
autoclavé	

Milieu YEP	
Extrait de levure	10 g/L
Tryptone	10 g/L
NaCl	5 g/L
Agar (optionnel)	12 g/L
autoclavé	

TamponCTAB	
Tris-HCl pH=8,0	0,1 M
NaCl	1,4 M
Na ₂ EDTA pH=8,0	20 mM
CTAB	2 %
autoclavé	
Le jour même :	(Pour 10 ml)
β-mercaptoéthanol	50 µL
Préchauffé à 65 °C	

Tampon MossDNAextraction	
Tris-HCl pH=8,0	0,1 M
NaCl	1,42 M
Na ₂ EDTA pH=8,0	20 mM
PVP-40	2 %
autoclavé	
Le jour même :	(Pour 10 ml)
β-mercaptoéthanol	7 µL
acide ascorbique	10 mg
Préchauffé à 65 °C	

Solutions stock (pour mousse)	
Solution B - 100X	
MgSO ₄ .7H ₂ O	25 g
H ₂ O UHQ	qsp 1 L
Conservée à 4 °C	
Solution C - 100X	
KH ₂ PO ₄	25 g
H ₂ O UHQ	qsp 500 mL
pH ajusté à 6,5 (KOH 4 M)	
H ₂ O UHQ	qsp 1 L
Conservée à 4 °C	
Solution D - 100X	
KNO ₃	101 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,25 g
H ₂ O UHQ	qsp 1 L
Conservée à 4 °C	
Solution N - 100X	
di-ammonium tartrate	920 mg
H ₂ O UHQ	qsp 1 L
Conservée à 4 °C	
Solution TES - 1000X (Hoagland's A-Z)	
H ₃ BO ₃	614 mg
Al ₂ (SO ₄) ₃ .K ₂ SO ₄ .24H ₂ O	55 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	55 mg
KBr	28 mg
LiCl	28 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	389 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	55 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	55 mg
KI	28 mg
SnCl ₂ .2H ₂ O	28 mg
H ₂ O UHQ	qsp 1 L
Conservée à 4 °C	

Milieu BCD (pour mousse)	
Solution B	10 mL
Solution C	10 mL
Solution D	10 mL
Solution TES	1 mL
H ₂ O UHQ	qsp 1L
Agar Sigma A9799 optionnel	10 g
autoclavé	
CaCl ₂ 500 mM	2 mL (1 mM)

Milieu BCDN (pour mousse)	
Solution B	10 mL
Solution C	10 mL
Solution D	10 mL
Solution N	10 mL
Solution TES	1 mL
H ₂ O UHQ	qsp 1L
Agar Sigma A9799 optionnel	10 g
autoclavé	
CaCl ₂ 500 mM	2 mL (1 mM)

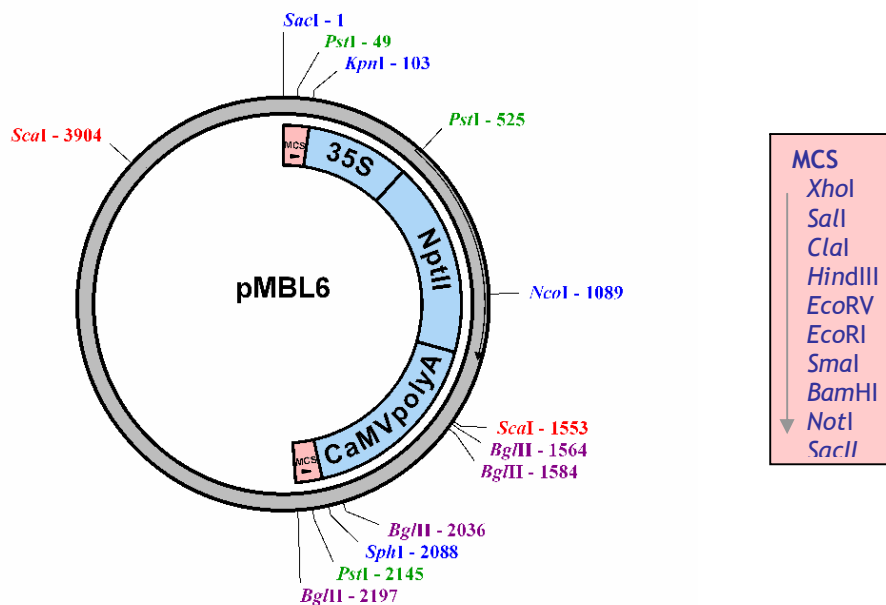
Milieu BMCG	
Solution BCD liquide	1 X
D-mannitol	8 %
CaCl ₂	10 mM
D-glucose	0,5 %
Préparée extemporanément	
En conditions stériles	

Solution MMM	
D-mannitol	910 mg
H ₂ O UHQ	8,85 mL
autoclavée	
MgCl ₂ 1M	150 µL
MES 1 % pH=5,6	1 mL

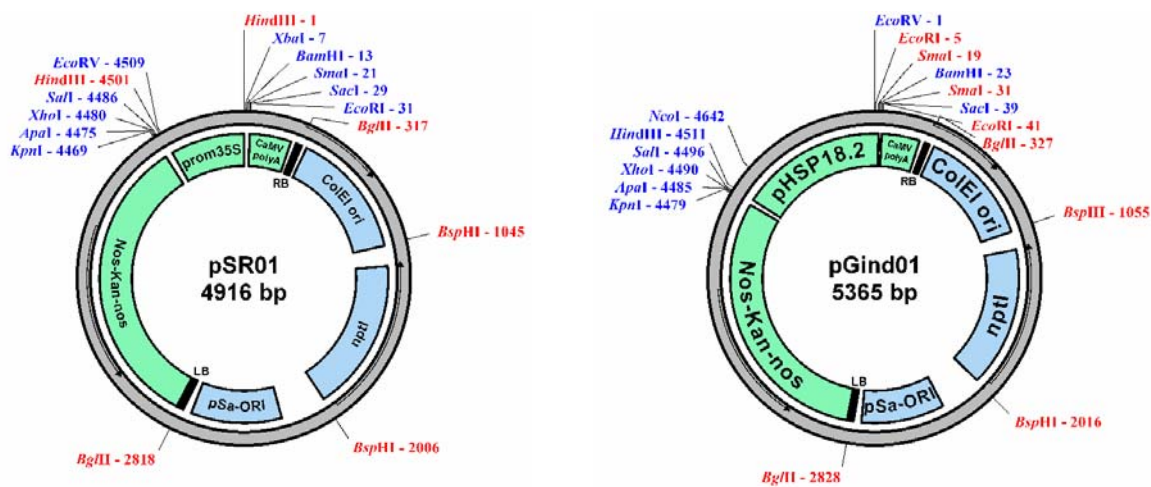
Solution MC		Milieu PRMB (couche inférieure)	
D-mannitol 8 %	9 mL	Solution BCD liquide	1 L
Ca(NO ₃) ₂ 1 M (gardé à 4 °C)	1 mL	D-mannitol	60 g
Tris-HCl 1 M pH=8,0	100 µL	di-ammonium tartrate	920 mg (5 mM)
Préparée le jour même		Agar Sigma A9799	8 g
Stérilisée par filtration		autoclavé	
		CaCl ₂ 1 M	10 mL (10 mM)
Solution PEG		Milieu PRMT (couche supérieure)	
PEG 6000	5 g	Solution BCD liquide	1 L
CaCl ₂ 50 mM	10 mL	D-mannitol	80 g
autoclavée		di-ammonium tartrate	920 mg (5 mM)
Le jour même :		Agar Sigma A9799	5 g
fondue dans micro-onde		autoclavé	
Ajout de solution MC	5 ml	CaCl ₂ 1 M	10 mL (10 mM)
2 h à température ambiante			

Annexe 2 : Vecteurs plasmidiques

Vecteur pMBL6

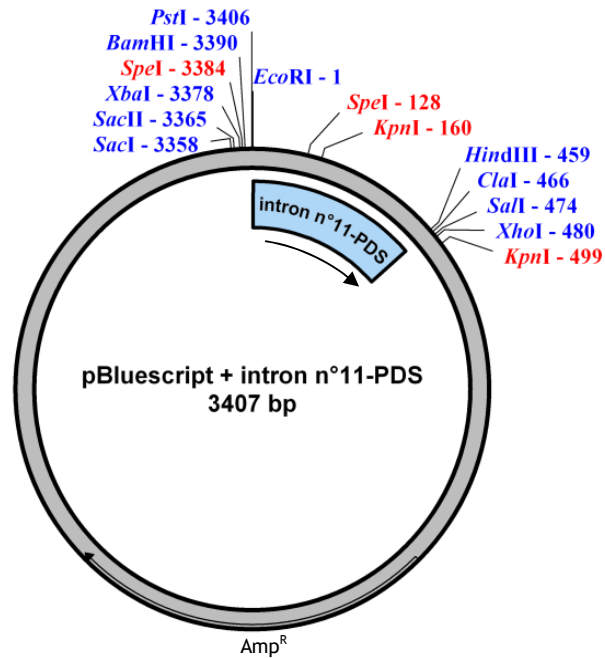


Vecteurs binaires

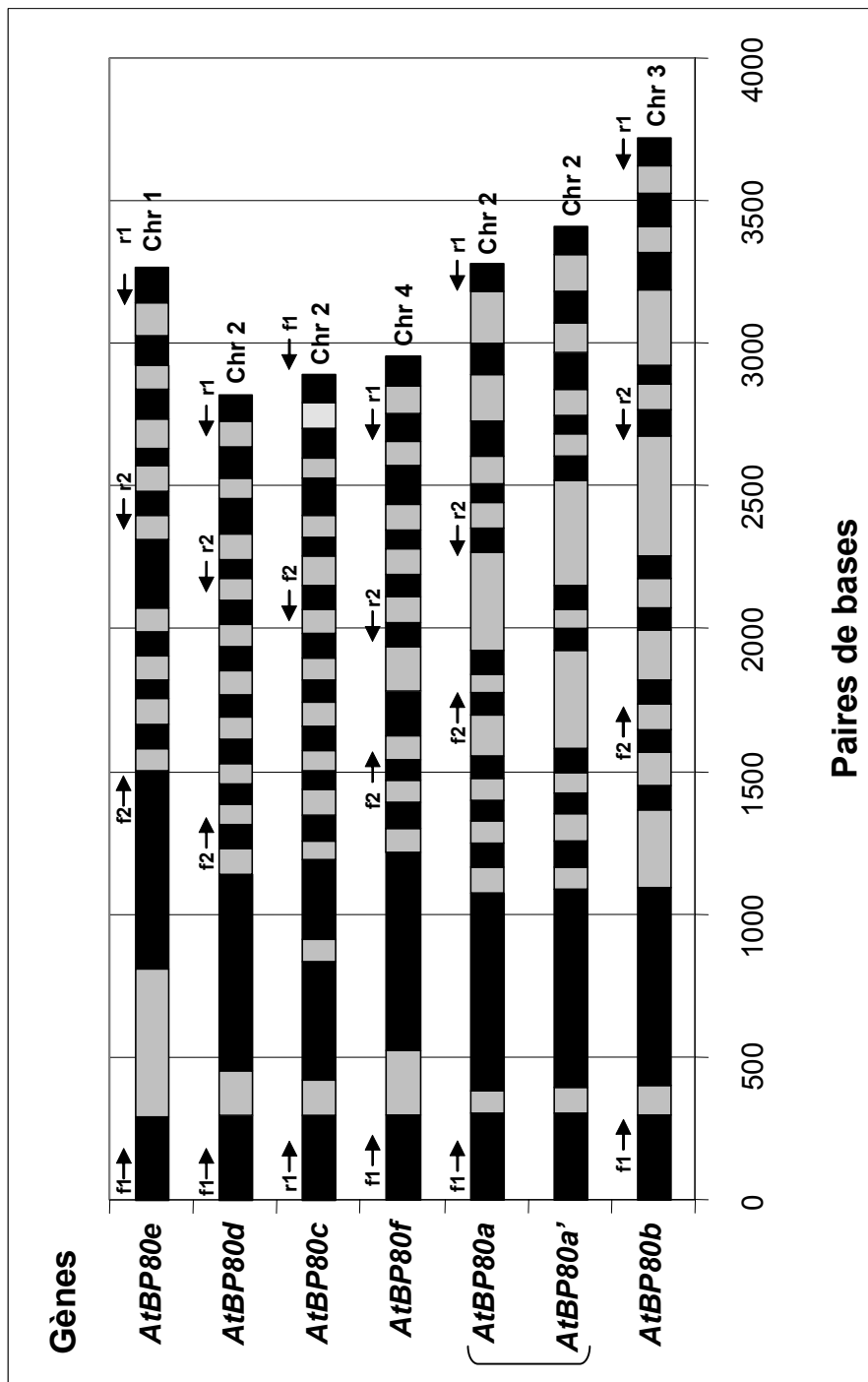


Vecteur pBluescript II + intron n° 11 PDS

Ce vecteur contient l'intron n° 11 du gène *PDS* cloné aux sites *EcoRI* et *HindIII*. L'orientation de l'intron pour permettre un épissage correct est indiquée par une flèche.



Annexe 3 : Positions des amorces pour le criblage de la collection de mutants d'insertion ADN-T de l'INRA de Versailles



Chaque gène *AtBP80* est représenté du codon 'ATG' au codon 'Stop'. Les rectangles noirs correspondent aux exons et les rectangles gris correspondent aux introns. La représentation des exons et des introns tient compte de leur taille. Les positions des amorces utilisées pour le criblage sont indiquées par des flèches. Les mêmes amorces ont été utilisées pour les gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'* à cause de la forte homologie existant entre ces deux gènes.

Annexe 4 : Alignement de la protéine PsBP80a et des protéines AtBP80

```

AtBP80a      1 --MKQLLCYLPWLLLLLSLVSPFNEARFVVEKNSLSVTSPEISIKGTHDSAIGNFGIPQYG
AtBP80a'     1 --MKQLLCYLPWLLLLLTLLVSPINDARFVVEKNSLSVTSPEISIKGTHDSAIGNFGIPQYG
PsBP80a      1 ----MKCWRLSAILFLIGFMTLSSTARFVVEKNSLSVTSPEIKIGKHDSAIGNFGIPQYG
AtBP80b      1 -----MKLGLFTLSFLLTLNLAMGRFVVEKNNLKVTSPDISIKGIYECAIGNFGVPQYG
AtBP80c      1 ---MRTTNVWLVIIVWVTVGWSSCTGRFVVEKNNLRVTSPESIRGVYECALGNFGVPQYG
AtBP80d      1 MSPSNKGTVLALILALTMVVVNGFSSRFVEKSSLTVLNSWEMGAKHDAIANFGLPKYK
AtBP80e      1 MSLIHKGATLALFLALTMVVN-GVFGRFIVEKSSVTILNPLAMRSKHDAAIANFVGPNYK
AtBP80f      1 MGLVNGRASITFLLAALTITIAMVBARFVVEKESISVLNPEEMRSKHDGSIANFGLPDYK

```

```

AtBP80a      59 GSMAGTVVYPKENQKSCKEFSDFSSISFKSQPGALPTFLLVDRGDCFFALKVWNAQKAGAS
AtBP80a'     59 GSMAGTVVYPKENQKSCKEFSDFSSISFKSQPGALPTFLLVDRGDCFFALKVWNAQKAGAS
PsBP80a      57 GSMAGNVVYPKDNKSGCKDFDSS---FKSRPGALPTILLDRGSCFFALKVWNAQKAGAS
AtBP80b      54 GTLVGTVVYPKSNQKACKSYSDFDISFKSKPGRLPFTVLVDRGDCYFTLKAWIAQQAGAA
AtBP80c      58 GSMGSAVVYPKTNQKACKNFDDEISFSRVRAGLPFTVLVDRGDCYFTLKAWNARAGAA
AtBP80d      61 GFMIGSVVYAGQDAYGCNSFNKT----FNTKSPYKILLDRGVCNFAALKIWNQQSGAA
AtBP80e      60 GYMIGSVVYAGQDAYGCDSFDKT----FKPKFPRPTILLDRGECYFALKVWNGQQSGVA
AtBP80f      61 GFLIGSVVYHDSKTDGCSAFGKT----FKPKFPRPTILLDRGGCYFALKAWHAQQAGAA

```

```

AtBP80a      119 AVLVDNVDEPLITMDTPEEDVSSAKYIENITIPSALVTKEGFEKLLKKAISGGDMVNLNL
AtBP80a'     119 AVLVDNVDEPLITMDTPEEDVSSAKYIENITIPSALVTKEGFEKLLKKAISGGDMVNLNL
PsBP80a      114 AVLVADDIEPLITMDTPEEDVSSAKYIENITIPSALICKSFEKLLKDAISGGDMVNLNL
AtBP80b      114 AILVADSKAEPLITMDTPEEDKSDADYLQNIITIPSALITKTLGDSIKSALS GGDMVNMKL
AtBP80c      118 TILVADNRPEQLITMDAPEDETSDADYLQNIITIPSALVSRSLGSAIKTAIAHGDPVHISL
AtBP80d      117 AVLVDNIVEPLITMDTPQD--EDEDIDKVKIPSALILRSFGDSLKKALKRGEEVILKM
AtBP80e      116 AVLVDNVDEPLITMDSPEESKEADDFIEKLNIPSALIDESFANTLKQALKKGEEVVLKI
AtBP80f      117 AVLVDNVDEPLITMDSPEESKDADGFEIEKLTIPSVLIDKSFGDDLRLQGFQKGNIVIKL

```

```

AtBP80a      179 DWREAVPHPPDRVEYELWTNSNDECGVKCDMLMEFVKDFKGAAQILEKGGFTQFRPHYIT
AtBP80a'     179 DWREAVPHPPDRVEYELWTNSNDECGVKCDMLMEFVKDFKGAAQILEKGGFTQFRPHYIT
PsBP80a      174 DWREAVPHPPDRVEYELWTNSNDECGVKCDMLIEFLKDFKGAAQILEKGGYTFQFRPHYIT
AtBP80b      174 DWTESVPHPPDRVEYELWTNSNDECGKKCDTQIEFLKNFKGAAQILEKGGHTQFRPHYIT
AtBP80c      178 DWREALPHPNDRVAYELWTNSNDECGSKCDAQIRFLKRFKGAAQILEKGGYTRFPHYIT
AtBP80d      175 DWSESLPNPDRVEYELWANTNDECGVHCDKQIDFIKNFKGMAQILEKGGYTFRPHYIS
AtBP80e      176 DWSESLPHPPDRVEYELWNTNDECGARCDEQMFVNFKGHAQILEKGGYSLFPHYIT
AtBP80f      177 DWRESVPHPPDRVEYELWTNSNDECGARCDEQMDFVNFKGHAQILEKGGYTAFTPHYIT

```

```

AtBP80a      239 WYCPHAFTLSRQCKSQCINKGRYCAPDPEQDFSSGYDGKDVVVENLRQLCVYKVANETGK
AtBP80a'     239 WYCPHAFTLSRQCKSQCINKGRYCAPDPEQDFSSGYDGKDVVVENLRQLCVYKVANETGK
PsBP80a      234 WYCPHAFTLSRQCKSQCINHGRYCAPDPEQDFNTGYDGKDVVVENLRQLCVFKVAKETEK
AtBP80b      234 WYCPHAFTLSRQCKSQCINHGRYCAPDPEQDFTKGYDGKDVVVENLRQACVYRVMDTGTGK
AtBP80c      238 WYCPHAFTLSRQCKTQCINGGRYCAPDPEQDFSRGYNGKDVLTQNLQACFFRVTNESGK
AtBP80d      235 WYCPKELLLSKQCRTOCINQRYCALDTKQEFEDGYNGKDVVVENLRQLCVHKVAKENNT
AtBP80e      236 WFCPKDQVSSNOCKSQCINQRYCAPDPEQDFGDGYDGKDVVVENLRQLCVHKVAKENNR
AtBP80f      237 WFCPFQFINSPHCKSQCINHGRYCAPDPEDNFREGEYEGKDVVVENLRQLCVHVRANESSR

```

```

AtBP80a      299 PWVWWDYVTDFQIRCPMKEKKYNKCAESVIKSLGIDSRKIDKCMGDPDADLDNPVLKEE
AtBP80a'     299 PWVWWDYVTDFQIRCPMKEKKYNKECADSVIKSLGIDSKIDKCMGDPDADLDNPVLKEE
PsBP80a      294 SWVWWDYVTDFQIRCPMKEKKYNKECANSVIKSLGLDVEKIDKCMGDPNADTENSILKEE
AtBP80b      294 PWVWWDYVTDFAIRCPMKEKKYNKECADGIIKSLGIDLKKVDKICIGDPEADVENPVLKAE
AtBP80c      298 PWLWWDYVTDFAIRCPMKEKKYNKCADQVIQSLGVDVKKIDKICIGDIDANAENPVLKEE
AtBP80d      295 SWVWWDYVTDFNIRCSMKEKKYSRECAETIVESLGLSLEKIKKICIGDPDADVENEVLKAE
AtBP80e      296 SWVWWDYVTDFHIRCSMKEKKYSKECAERVVESLGLPLDKIKKICIGDPDANVENEVLKAE
AtBP80f      297 PWVWWDYVTDFHSRCSMKEKKYSIDCAESVIKSLNLPDKIKKICIGDPEADTENQVLRTE

```

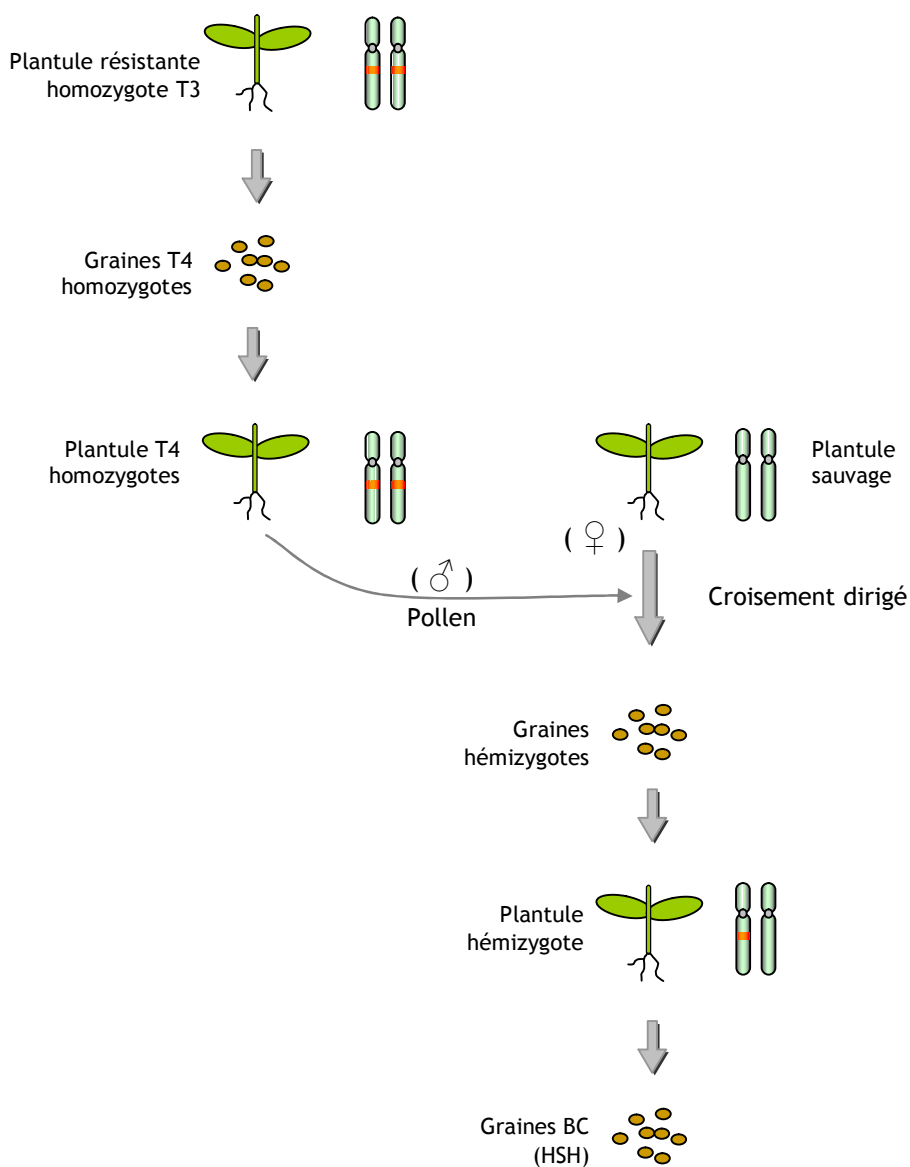
.....

AtBP80a	359	QDAQVGKGRGDVTILPTLVNNRQYRGKLEKSAVLKALCSGFEEESTEPAPICLSTDMETN
AtBP80a'	359	QDAQVGKGRGDVTILPTLVNNRQYRGKLEKSAVLKALCSGFEEETTEPAICLSTDMETN
PsBP80a	354	QDAQVGKGRGDVTILPTLVNNRQYRGKLEKSAVLKALCSGFEEETDPAVCLSNQVETN
AtBP80b	354	QESQVGKGRGDVTILPTLVNNRQYRGKLEKSAVLKALCSGFQESTEPAPICLSTEDLETN
AtBP80c	358	QVAQVGKGRGDVTILPTLVNNRQYRGKLEKSAVLKALCSGFRETTEPPICLSTEDLETN
AtBP80d	355	EAFQVGKGRGDVTILPTLVNNRQYRGKLEKSAVLKALCSGFRETTEPPICLSTEDLETN
AtBP80e	356	QALQVGKGRGDVTILPTLVNNRQYRGKLEKSAVLKALCSGFRETTEPPICLSTEDLETN
AtBP80f	357	QVSQVGKGRGDVTILPTLVNNRQYRGKLEKSAVLKALCSGFRETTEPPICLSTEDLETN
AtBP80a	419	ECLDNNGGCWQDKSANITACKDTFRGKVCVCPVVDGVRFKGDGYSHCPEPSGPGRCITNNG
AtBP80a'	419	ECLDNNGGCWQDKSANITACKDTFRGRVCECPTVDGVQFKGDGYSHCPEPSGPGRCITNNG
PsBP80a	414	ECLTNNGGCWQDKTANITACKDTFRGRVCECPLVDGVQFKGDGYTTCCEVSGHGRCITNNG
AtBP80b	414	ECLTNNGGCWQDKANITACKDTFRGRVCECPTVQGVKFGDGYPHCKASGALHCGITNNG
AtBP80c	418	ECLTNNGGCWQDKTANITACKDTFRGRVCECPTVQGVKFGDGYPHCKASGALHCGITNNG
AtBP80d	415	ECLTNNGGCWQDKRSNVTACKDTFRGRVCECPTVVDGVQFKGDGYTSCCKPYGPARCSMNNG
AtBP80e	416	ECLTNNGGCWQDKRSNVTACKDTFRGRVCECPTVVDGVQFKGDGYTSCCKPYGPARCSMNNG
AtBP80f	417	ECLTNNGGCWQDKTANITACKDTFRGRVCECPTVVDGVQFKGDGYTSCCKPYGPARCSMNNG
AtBP80a	479	GCWHEERDGHAFSACVDKDSVKCECPPGFKGDGVKKCEDINECKEKKACQCPECSCKNTW
AtBP80a'	479	GCWHEERDGHAFSACVDKDSVKCECPPGFKGDGVKKCEDINECKEKKACQCPECSCKNTW
PsBP80a	474	GCWHEERDGHAFSACLDGGVKKCECPPGFKGDGVKKCEDINECKEKKACQCPECSCKNTW
AtBP80b	474	GCWHEERDGHAFSACVDKDSVKCECPPGFKGDGVKKCEDINECKEKKACQCPECSCKNTW
AtBP80c	478	GCWHEERDGHAFSACVDKDSVKCECPPGFKGDGVKKCEDINECKEKKACQCPECSCKNTW
AtBP80d	475	GCWHEERDGHAFSACVDKDSVKCECPPGFKGDGVKKCEDINECKEKKACQCPECSCKNTW
AtBP80e	476	GCWHEERDGHAFSACVDKDSVKCECPPGFKGDGVKKCEDINECKEKKACQCPECSCKNTW
AtBP80f	477	GCWHEERDGHAFSACVDKDSVKCECPPGFKGDGVKKCEDINECKEKKACQCPECSCKNTW
AtBP80a	539	GSYECSCSGDLLYMRDHDTCIS-KTGSQVKSAAVWLIMLSLGLAAAGAYLVYKYRLRQ
AtBP80a'	539	GSYECSCSGDLLYMRDHDTCIS-KTGAQVRSAAVWLIMLSLGLAAAGAYLVYKYRLRQ
PsBP80a	534	GSYECSCSGDLLYMRDHDTCIS-KTASQAKSTAAFWVVLIALAMAGGGFLVYKYRLRQ
AtBP80b	534	GSYECSCSGDLLYMRDHDTCIS-GSGKVGTTKLSWSFLWILICGVGVAGLSGYAVYKYRLRS
AtBP80c	538	GSYECSCSGDLLYMRDHDTCIS--RDARGDFSWGVWIIIMGLGAAALGAYTVYKYRLRT
AtBP80d	534	GSYECSCSGDLLYMRDHDTCIS--RDARGDFSWGVWIIIMGLGAAALGAYTVYKYRLRT
AtBP80e	535	GSYECSCSGDLLYMRDHDTCIS--RDARGDFSWGVWIIIMGLGAAALGAYTVYKYRLRT
AtBP80f	536	GSYECSCSGDLLYMRDHDTCIS--RDARGDFSWGVWIIIMGLGAAALGAYTVYKYRLRT
AtBP80a	598	YMDSEIRAIMAQYMPPLDSQPEVPHNTERA-----
AtBP80a'	598	YMDSEIRAIMAQYMPPLDSQPEIPNHVNDERA-----
PsBP80a	593	YMDSEIRAIMAQYMPPLDSQEEGPNHVNDERG-----
AtBP80b	594	YMDSEIRAIMAQYMPPLDSQPEVPHNTERA-----
AtBP80c	596	YMDSEIRAIMAQYMPPLDSQPEVPHNTERA-----
AtBP80d	592	YMDSEIRAIMAQYMPPLDSQPEVPHNTERA-----
AtBP80e	592	YMDSEIRAIMAQYMPPLDSQPEVPHNTERA-----
AtBP80f	593	YMDSEIRAIMAQYMPPLDSQPEVPHNTERA-----

(Alignement réalisé avec ClustalW et mis en forme avec BoxShade 3.21)

Annexe 5 : Principe de réalisation du *back-cross* pour le mutant *vsr-a'*

Une plante, homozygote pour l'insertion, de génération T4, qui ne présente plus le phénotype « défaut de germination », est croisée avec une plante sauvage. Ce croisement produit des graines hémizygotes pour l'insertion. Les plantes hémizygotes obtenues à partir de ces graines produisent des graines HSH. Le génotype est représenté à droite des plantules.



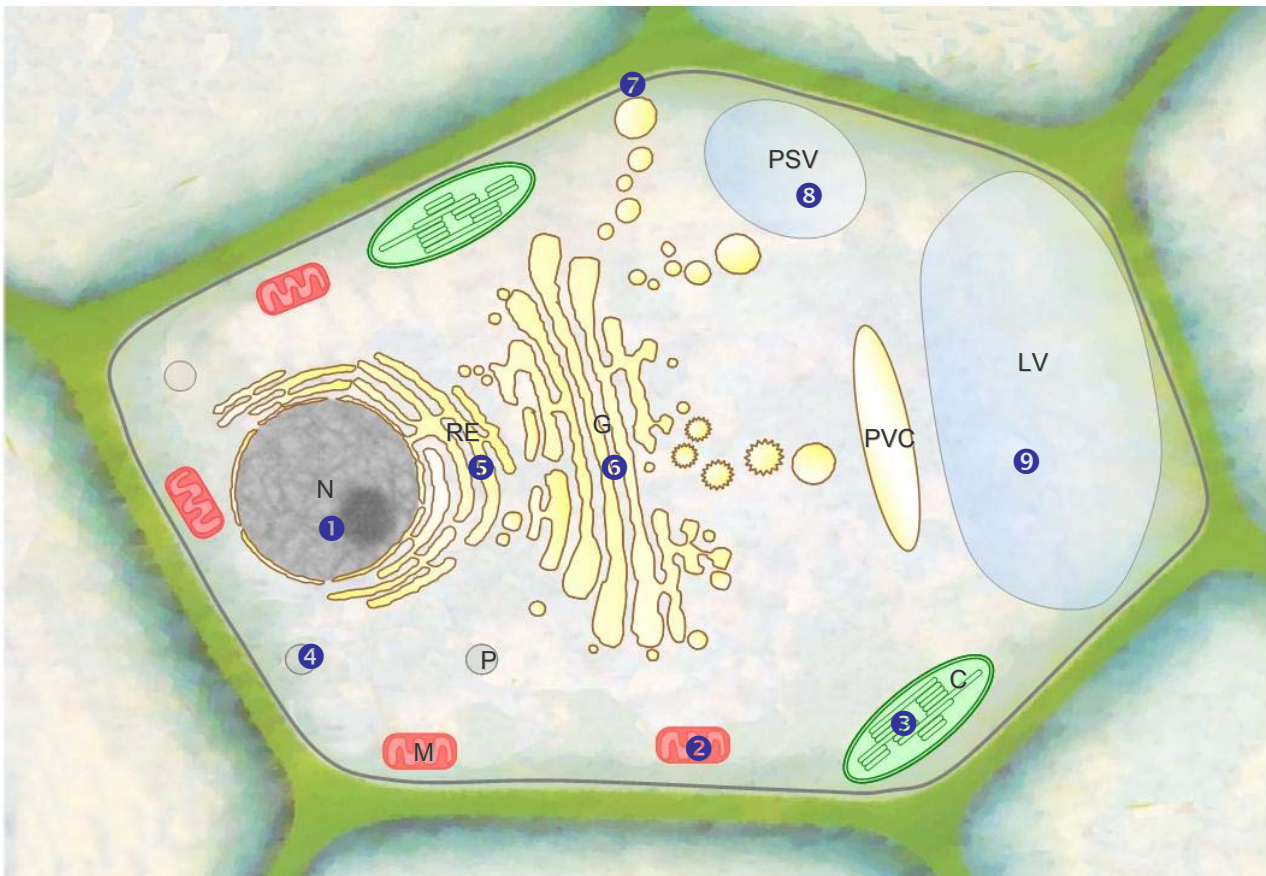


Figure 1 : Présentation schématique des différentes destinations possibles pour une protéine nouvellement synthétisée dans le cytosol

❶, noyau (N) ; ❷, mitochondrie (M) ; ❸, chloroplaste (C) ; ❹, péroxyssome (P) ; ❺, réticulum endoplasmique (RE) ; ❻, Golgi (G) ; ❼, membrane plasmique ou paroi ; ❽, vacuole de réserve (PSV) ; ❾ vacuole lytique (LV).

‘PVC’ correspond au compartiment prévacuolaire ou prévacuole.

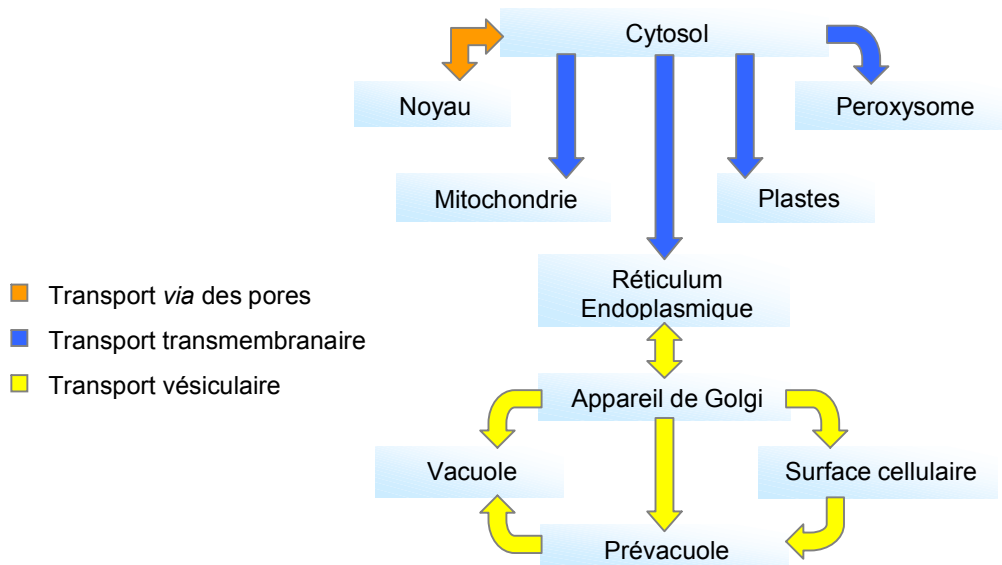


Figure 2 : Le trafic des protéines entre les différents compartiments cellulaires

Les flèches indiquent le sens des transports de protéines entre deux compartiments. Une couleur est attribuée à chaque flèche en fonction du type transport qu'elle représente. (Adapté d'après Buchanan et al., 2000)

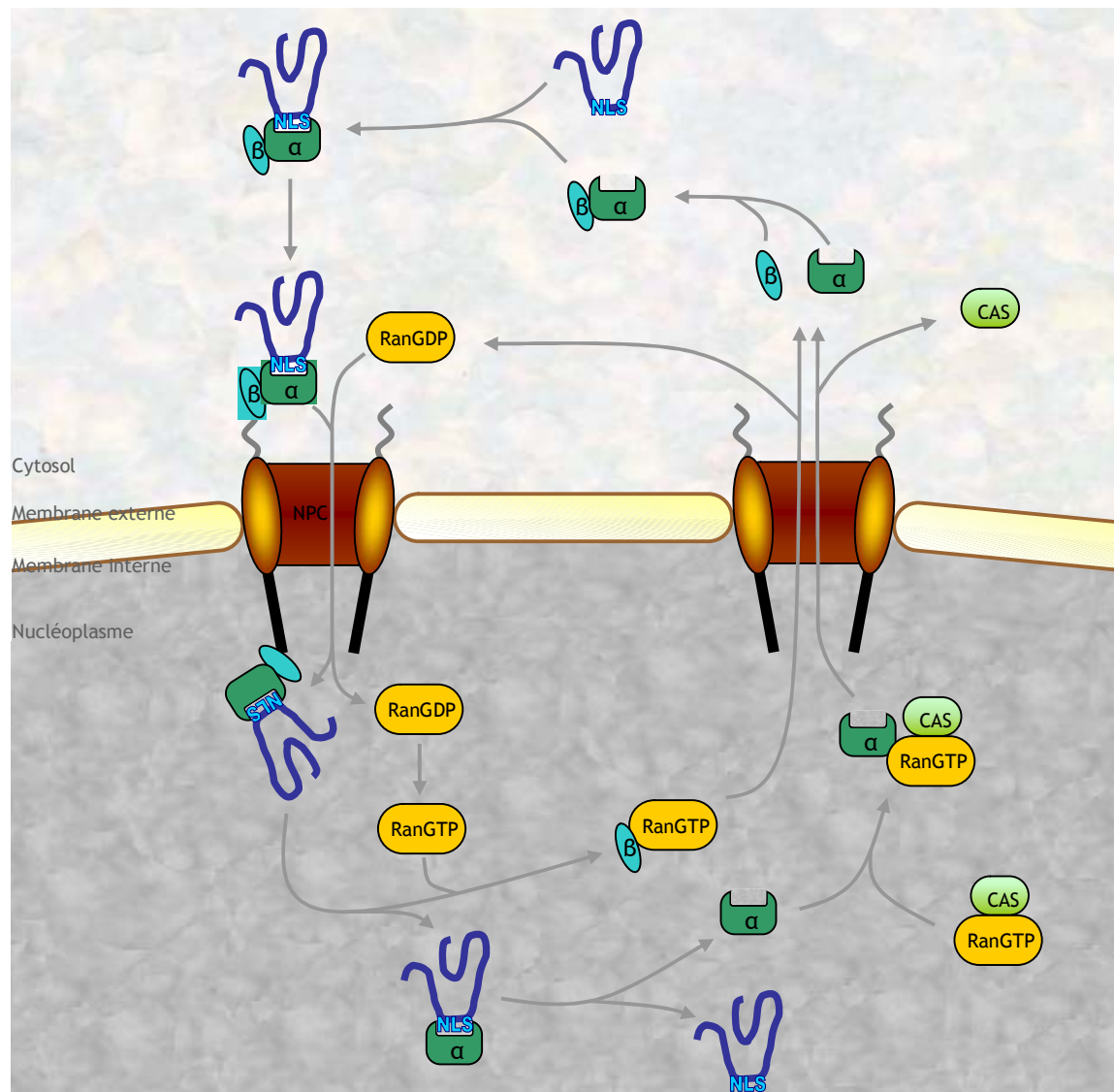


Figure 3 : Représentation schématique de l'import dans le noyau des protéines à motif NLS.

La première étape de l'import nucléaire d'une protéine est la fixation de l'hétérodimère d'importines α et β sur le motif NLS de cette protéine. L'importine β permet la fixation de ce complexe trimérique au complexe du pore nucléaire (NPC). La translocation nécessite une petite GTPase, appelée 'Ran', et du GTP. Après translocation, le complexe trimérique se fixe à la face nucléoplasmique du NPC. Dans le noyau, RanGTP se lie à l'importine β et libère le complexe dimérique formé par l'importine α et la protéine possédant un NLS. L'importine α se sépare de la protéine possédant le NLS et retourne vers le cytoplasme grâce au complexe CAS/RanGTP via un pore nucléaire. L'importine β est recyclée vers le cytoplasme grâce à la protéine RanGTP. Une fois dans le cytoplasme, les importines α et β s'associent afin de permettre l'import de nouvelles protéines à NLS.

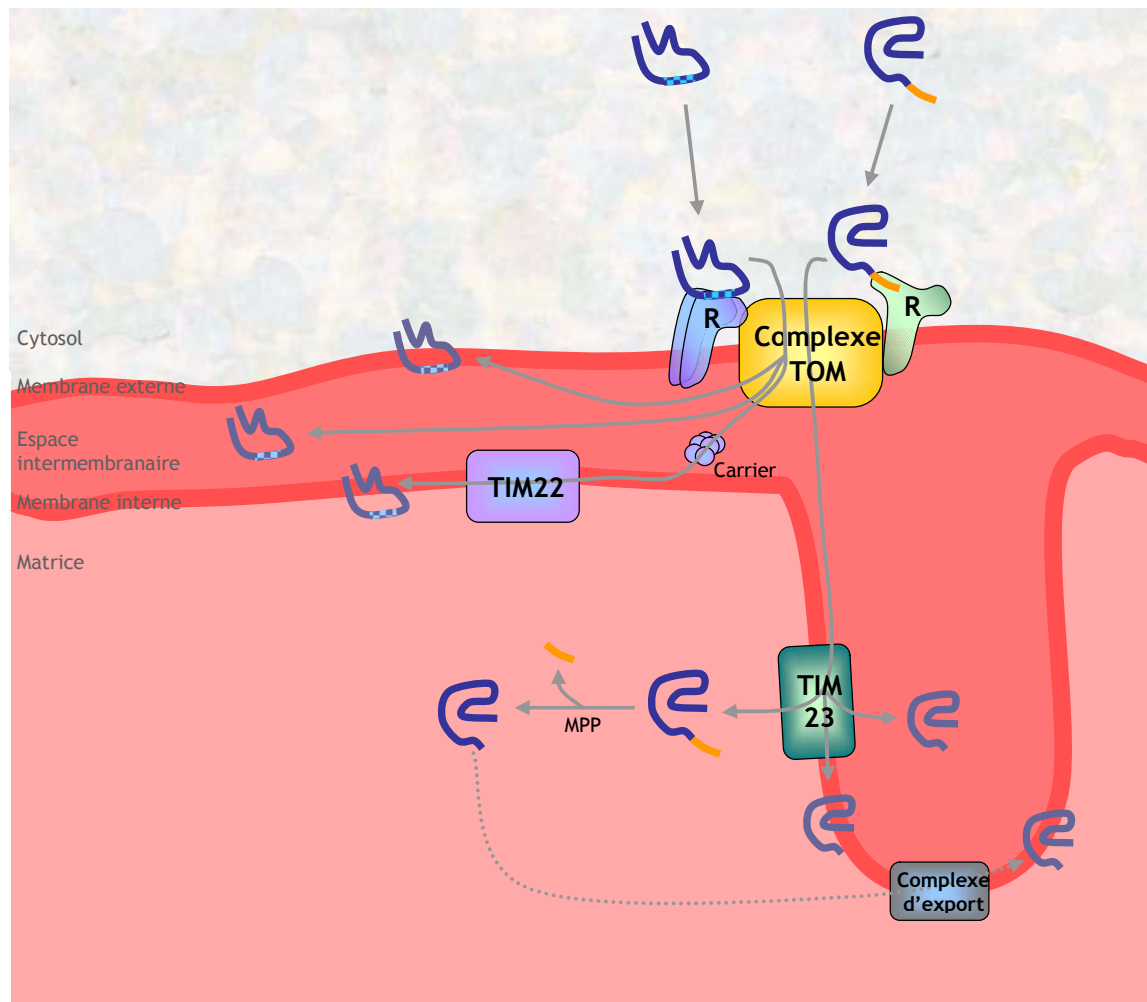


Figure 4 : Représentation schématique de l'import des protéines dans la mitochondrie

Quatre types de complexe de translocation existent dans la mitochondrie : le complexe TOM, le complexe TIM22, le complexe TIM23 et le complexe d'export. Le complexe TOM, possède des protéines récepteurs (notées R) qui vont se lier aux protéines cytosoliques à importer.

Les protéines possédant des signaux internes sont dirigées vers la membrane externe ou l'espace intermembranaire par le complexe TOM. Pour atteindre la membrane interne, la protéine est d'abord prise en charge dans l'espace intermembranaire par un complexe transporteur appelé 'carrier'. Le complexe transporteur transporte la protéine jusqu'au complexe de translocation TIM22 qui permet à la protéine d'être incluse dans la membrane interne.

Les protéines possédant une pré-séquence sont transmises au complexe TIM23 par le complexe TOM. Le complexe TIM23 peut les libérer dans l'espace intermembranaire, les inclure dans la membrane interne ou les libérer dans la matrice. Une fois dans la matrice, la pré-séquence est clivée par l'enzyme MPP. D'autres peptidases interviennent pour couper la pré-séquence de protéines libérées dans l'espace intermembranaire.

Certaines protéines libérées dans la matrice possèdent des signaux internes qui leur permettent d'être redirigées vers la membrane interne. Ceci est réalisé par le complexe d'export dont le rôle principal est d'adresser à la membrane des protéines codées par le génome mitochondrial.

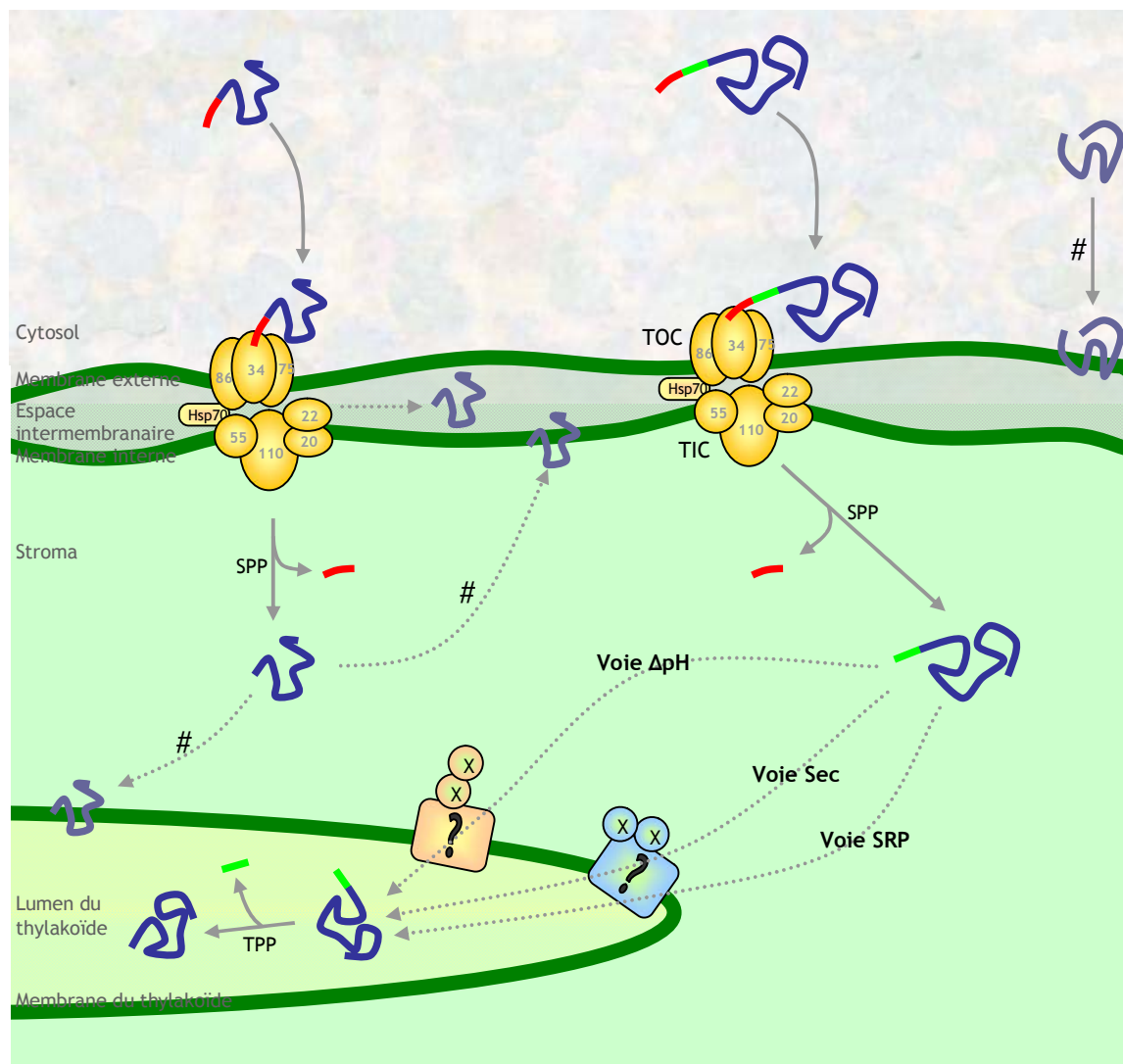


Figure 5 : Représentation schématique de l'import des protéines dans le chloroplaste

Les protéines possédant un peptide de transit simple sont reconnues et importées via les complexes de translocation TOC et TIC. Certaines protéines possèdent des signaux leur permettant de rester dans l'espace intermembranaire après translocation par le complexe TOC. Les protéines qui franchissent la double membrane pour atteindre le stroma sont reconnues par l'enzyme SPP qui clive le peptide de transit.

Les protéines possédant un peptide de transit bipartite sont importées de la même façon que les protéines possédant un peptide de transit simple. Une fois dans le stroma, la SPP élimine la première partie du signal d'adressage, ce qui permet l'exposition du deuxième signal nécessaire pour l'importation dans le thylakoïde. Trois voies existent pour l'importation dans le thylakoïde mais ne sont pas encore bien connues. La première voie, la voie dépendante du ΔpH , fait intervenir un complexe de translocation appelé Tat qui existe également chez *Escherichia coli*. La deuxième voie est la voie Sec qui ressemble au système de sécrétion des bactéries et qui nécessite un complexe de translocation similaire au complexe de translocation bactérien SecYEP. La troisième voie est la voie SRP qui fait intervenir une protéine SRP comme chez les bactéries et qui pourrait utiliser le complexe de translocation de type SecYEP.

Certaines protéines possèdent des signaux de type interne qui permettent d'affiner leur localisation sans traverser un complexe de translocation (#).

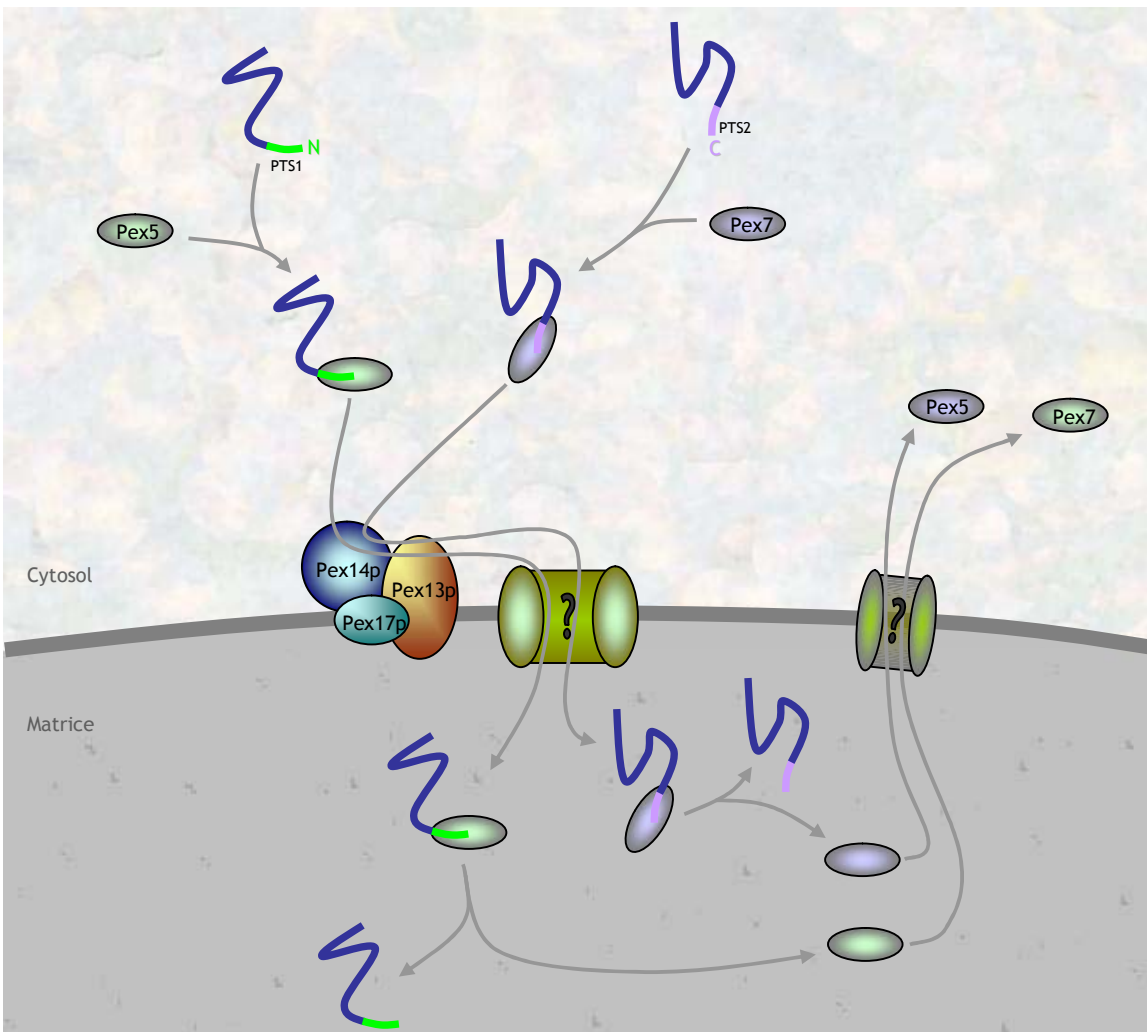


Figure 6 : Représentation schématique de l'import des protéines solubles dans le peroxysome

Deux types de protéines peuvent être importées dans le peroxysome : les protéines possédant un signal de type PTS1 et les protéines possédant un signal de type PTS2 (PTS pour *Peroxisomal Targeting Signal*)

La protéine Pex5 se lie aux protéines possédant PTS1 et ce dimère se fixe sur le complexe associé à la membrane et composé notamment des protéines Pex13p et Pex14p. Le complexe transfère le dimère à une structure de type pore nucléaire (non connue) qui permet au dimère de traverser la membrane. Une fois dans la matrice du peroxysome, la protéine Pex5 libère la protéine transportée, puis est recyclée vers le cytosol par un mécanisme inconnu.

Les protéines possédant PTS2 sont pris en charge par la protéine Pex7 et sont importées de la même façon. L'adressage des protéines membranaires n'est pas représenté.

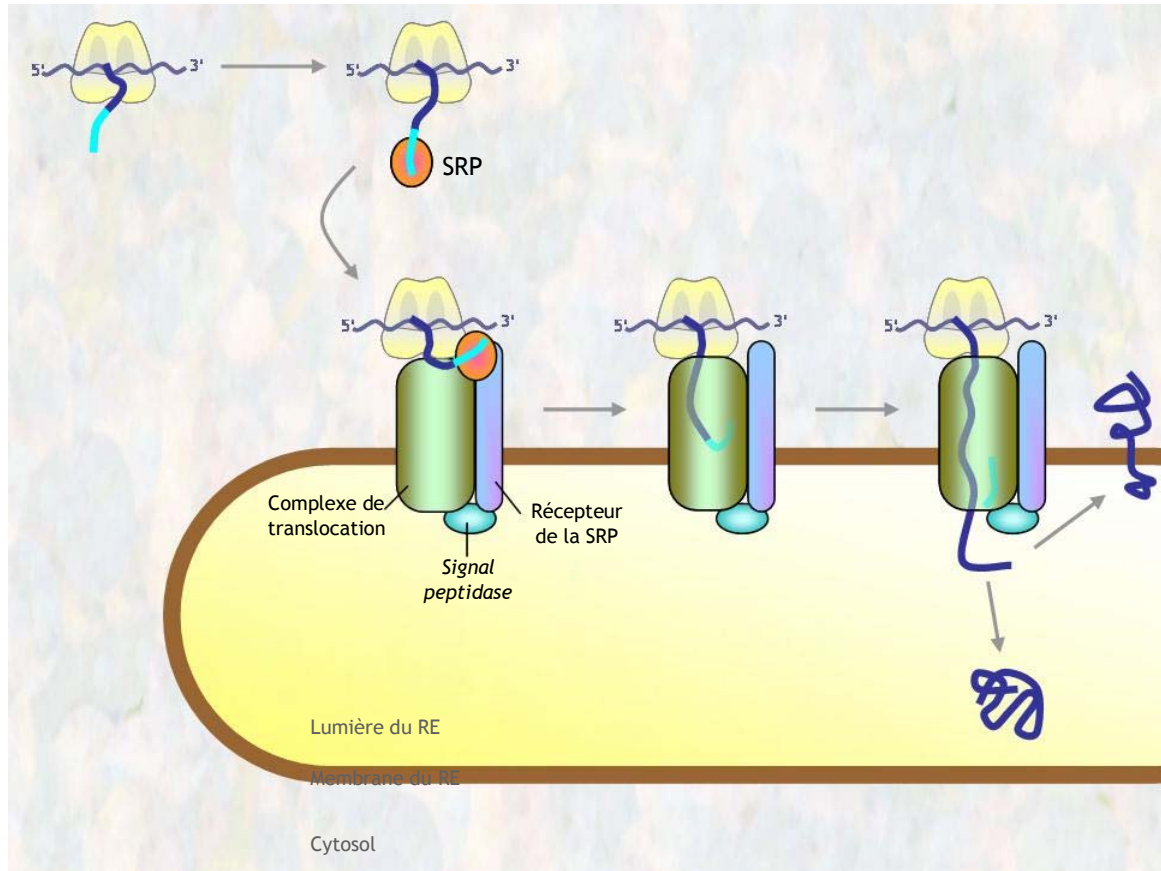


Figure 7 : Représentation schématique de l'import des protéines dans le réticulum endoplasmique (RE)

Au cours de la traduction, lorsque la protéine naissante comporte 70 acides aminés, la protéine SRP (*signal recognition particle*) se lie au peptide signal et bloque la traduction. La protéine SRP se lie ensuite à son récepteur sur la membrane du RE et transfère le complexe de traduction (protéine et ribosome) au complexe de translocation. La traduction reprend et la protéine naissante est insérée dans le canal de translocation. Le peptide signal est coupé par l'enzyme '*signal peptidase*'. La protéine est finalement libérée dans la lumière du RE, ou incluse dans la membrane si elle possède un ou plusieurs domaines transmembranaires.

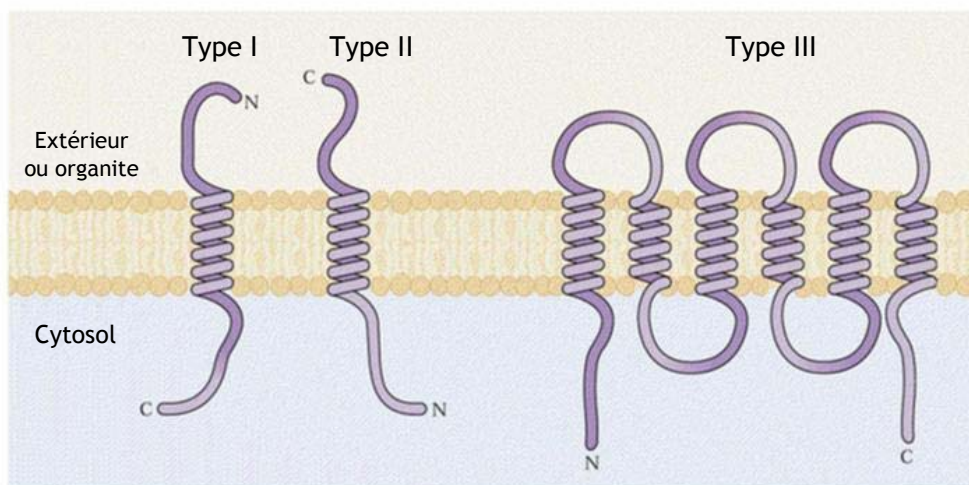


Figure 8 : Orientation des protéines membranaires

Les protéines membranaires de type I sont les protéines qui possèdent un domaine transmembranaire unique et dont l'extrémité C-terminale se trouve dans le cytosol. Les protéines membranaires de type II sont les protéines qui possèdent un domaine transmembranaire unique et dont l'extrémité N-terminale se trouve dans le cytosol. Les protéines membranaires de type III sont les protéines qui possèdent plusieurs domaines transmembranaires.

(Buchanan et al., 2000)

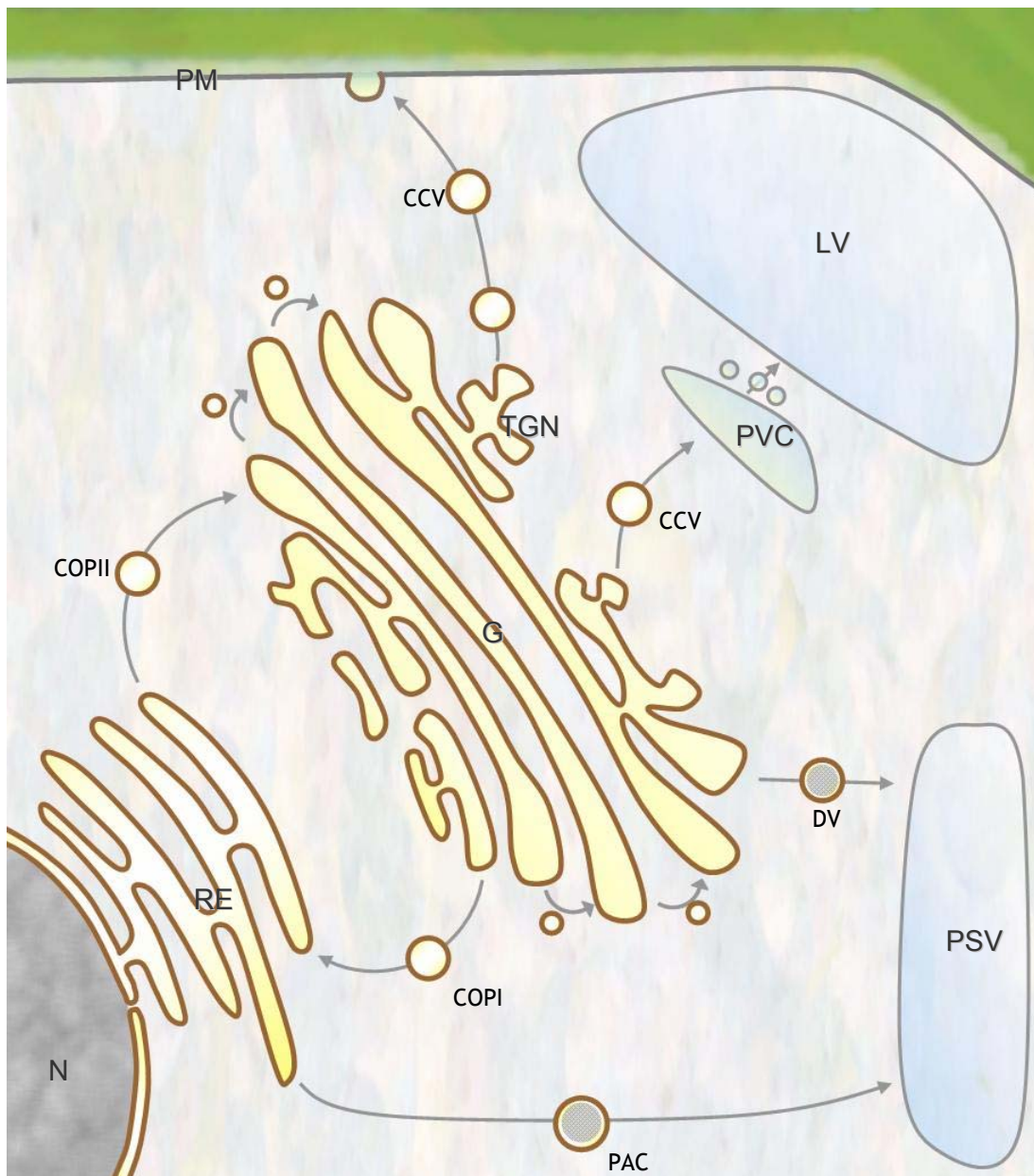


Figure 9 : Représentation schématique des voies d'adressage des protéines dans le système sécrétoire

N, noyau ; RE, réticulum endoplasmique ; G, Golgi ; TGN, réseau *trans*-golgien ; PVC, prévacuole ; LV, vacuole lytique ; PSV, vacuole de réserve ; PM, membrane plasmique ; PAC, *Precursor-Accumulating* ; DV, vésicule dense ; CCV, vésicule à manteau de clathrine ; COPI, vésicules à manteau de protéines I ; COPII, vésicules à manteau de protéines II.

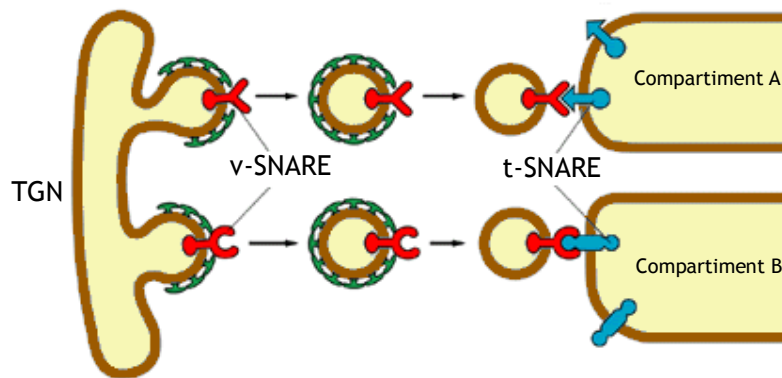


Figure 10 : Fonctionnement des SNARE qui permettent aux vésicules de fusionner spécifiquement avec la membrane du compartiment adéquat.

Chaque type de vésicule possède une protéine SNARE (v-SNARE) qui lui est propre. Les vésicules ne peuvent fusionner avec une membrane que si la protéine v-SNARE interagit avec une protéine t-SNARE de cette membrane. Ce système permet aux vésicules d'apporter spécifiquement leur contenu au compartiment adéquat.

(Adapté d'après Buchanan et al., 2000)

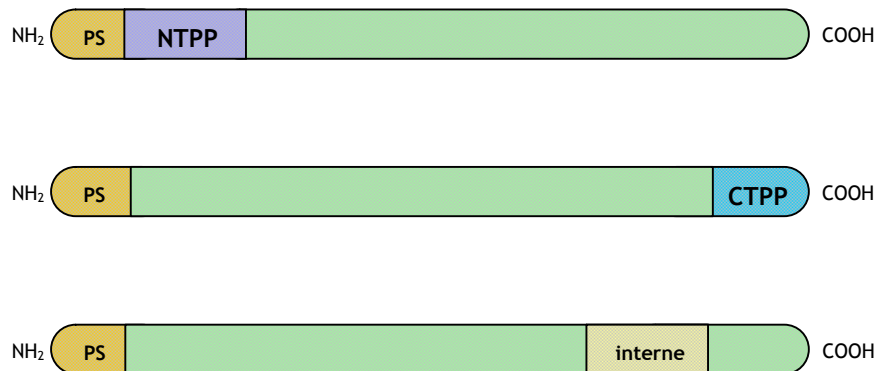


Figure 11 : Présentation schématique des différents signaux permettant l'adressage de protéines à la vacuole

Le NTPP ou *N-terminal propeptide* est un signal d'adressage vacuolaire (ou VSD pour *Vacuolar Sorting Determinants*) qui est retrouvé à l'extrémité N-terminale, juste après le peptide signal, et qui contient le motif NPIR. Le CTPP ou *C-terminal propeptide* est un VSD retrouvé à l'extrémité C-terminale de la protéine. Un troisième type de VSD dont les caractéristiques ne sont pas encore définies est un signal interne.

Par définition, un VSD doit être à la fois suffisant et nécessaire pour permettre l'adressage d'une protéine à la vacuole.

(Adapté d'après Buchanan et al., 2000)



Figure 12 : Structure schématisée de la protéine PsBP80a

La protéine PsBP80a possède un peptide signal (PS), une grande région N-terminale, un domaine transmembranaire unique (TM), et une région C-terminale courte. La région C-terminale présente un motif tyrosine (une tyrosine suivie de deux résidus quelconques et d'un acide aminé hydrophobe volumineux (YxxΦ)). Chez les mammifères, ce motif permet l'internalisation de plusieurs récepteurs de la membrane plasmique, dont certaines intégrines par exemple (Fabbri et al., 1999).

La région N-terminale de la protéine PsBP80a possèdent 3 motifs riches en cystéines de type EGF et également un domaine PA (protease-associated), qui pourrait être impliqué dans la reconnaissance du ligand (Cao et al., 2000).

A

N° d'accension	Nom utilisé	Autres noms	Expression connue (fin 2000)
At2g14720	<i>AtBP80a</i>	<i>AtELP2b</i> , <i>AtVSR4</i>	oui
At2g14740	<i>AtBP80a'</i>	<i>AtELP2a</i> , <i>AtVSR3</i>	-
At3g52850	<i>AtBP80b</i>	<i>AtELP1</i> , <i>AtVSR1</i>	oui
At2g30290	<i>AtBP80c</i>	<i>AtELP4</i> , <i>AtVSR2</i>	
At2g34940	<i>AtBP80d</i>	<i>AtELP5</i> , <i>AtVSR5</i>	-
At1g30900	<i>AtBP80e</i>	<i>AtELP6</i> , <i>AtVSR6</i>	-
At4g20110	<i>AtBP80f</i>	<i>AtELP3</i> , <i>AtVSR7</i>	oui

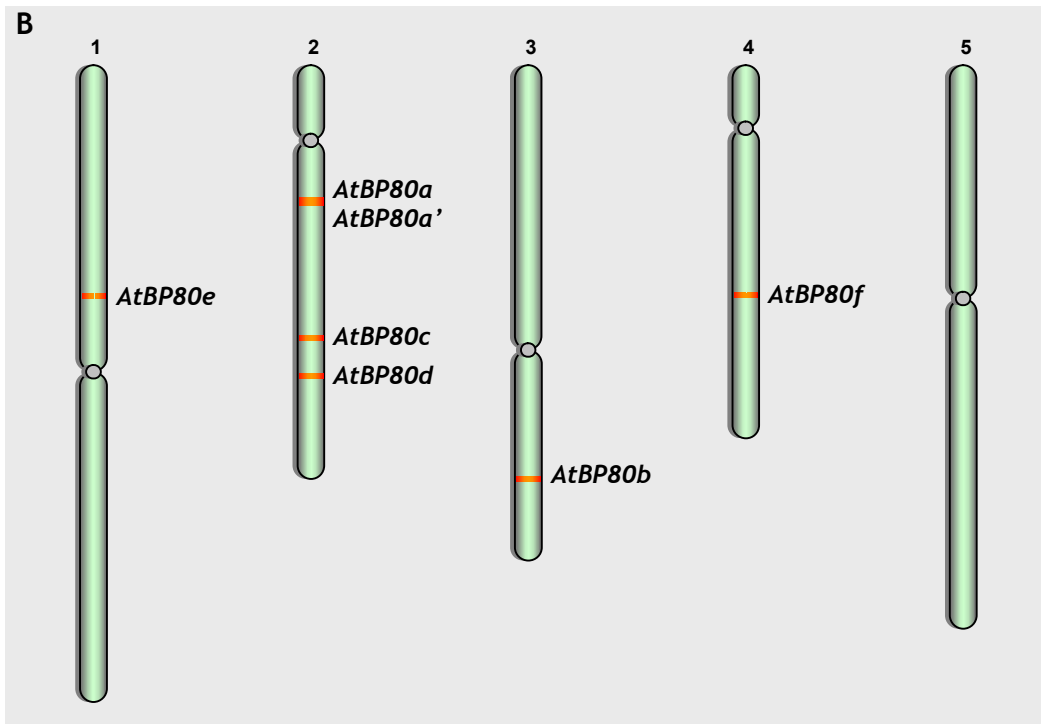


Figure 13 : Nomenclature et organisation des gènes de la famille *AtBP80*

(A) Nomenclature des gènes *AtBP80*. Aucune nomenclature n'ayant été définie au départ, plusieurs noms ont été attribués aux protéines BP80 (ELP, VSR, PV72). Dans ce mémoire de thèse, la nomenclature utilisée est basée sur celle proposée par Hadlington et Denecke, 2000. Ainsi, BP80 du pois sera désigné par PsBP80a. Les BP80 d'*Arabidopsis* seront suivis d'une lettre de 'a' à 'f' en fonction de leur classement phylogénétique. Pour la plupart des espèces, le nombre total de membres dans la famille n'est pas connu et il n'est donc pas possible de tous les classer phylogénétiquement. Dans ce cas, un numéro sera utilisé : par exemple HaBP80.1 chez *Helianthus annuus*.

(B) Répartition des gènes *AtBP80* dans le génome d'*Arabidopsis*.

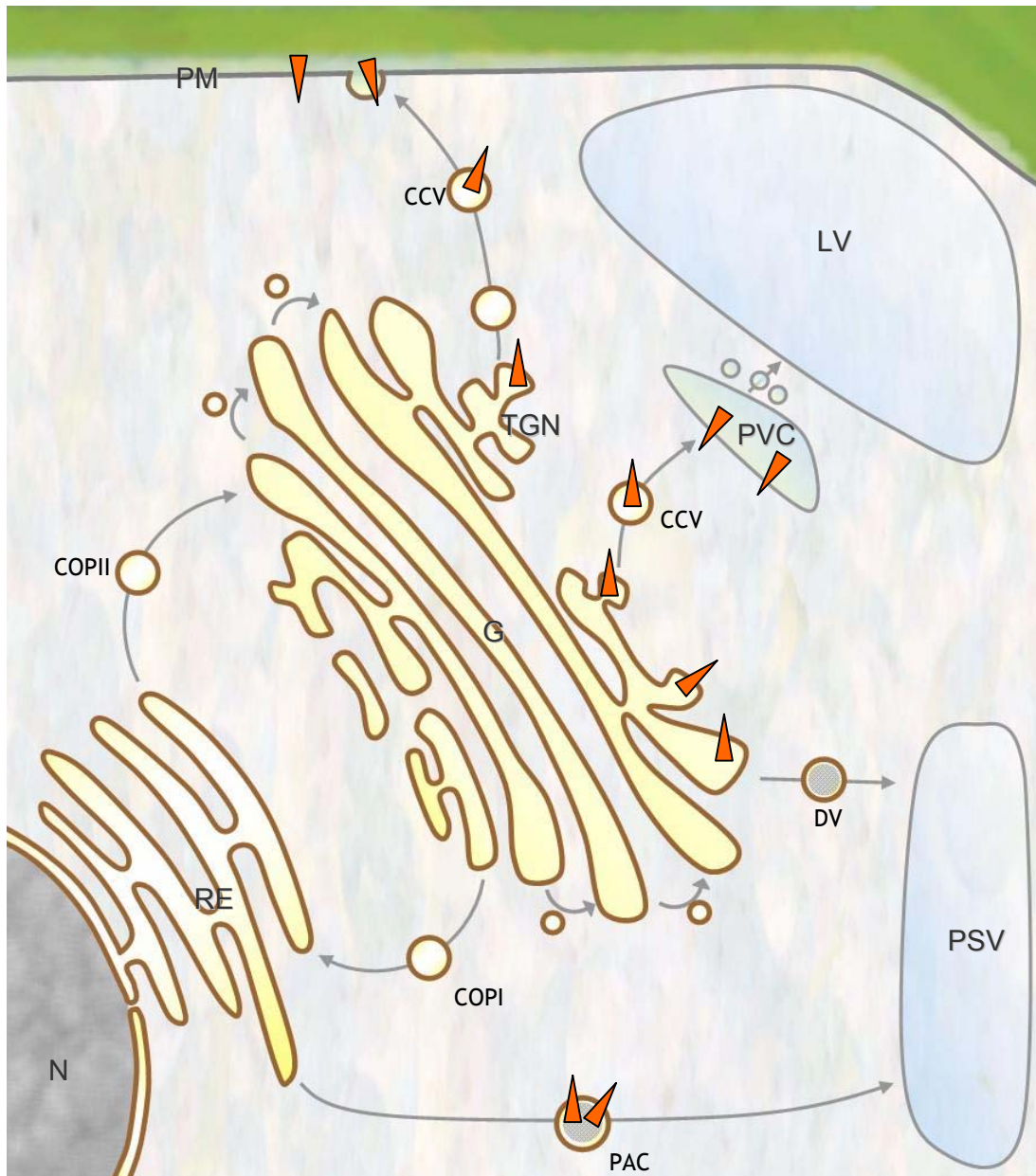
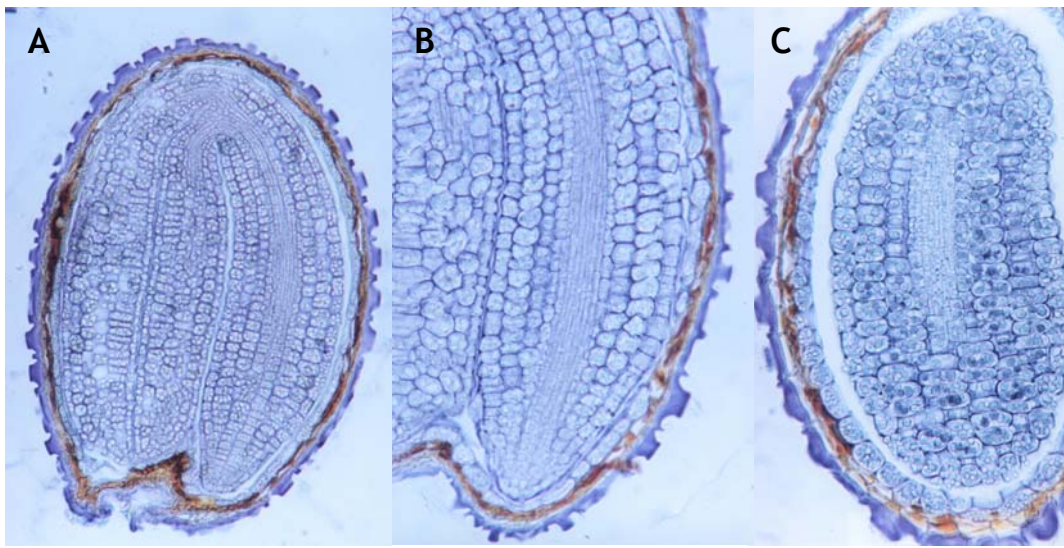


Figure 14 : Bilan des localisations sub-cellulaires des protéines BP80.

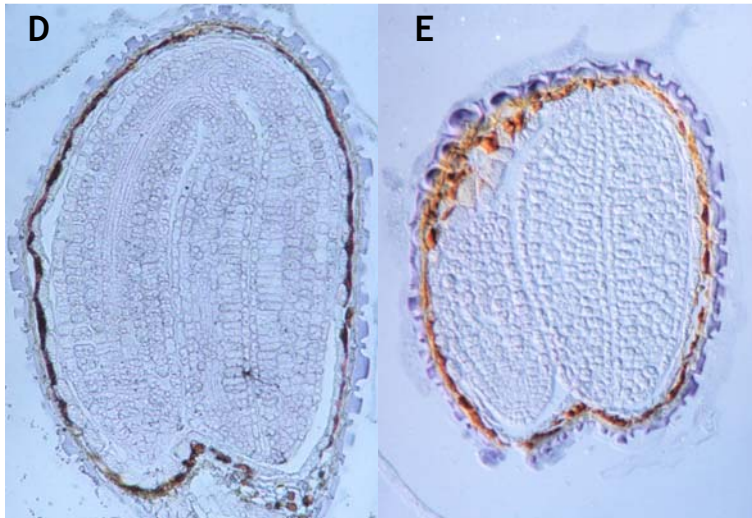
Ce bilan est réalisé en considérant les résultats obtenus pour différentes protéines BP80. Les protéines BP80 sont représentées par un triangle orange. Les protéines BP80 sont retrouvées dans trois voies différentes : sur les vésicules PAC qui assurent le transport des protéines de réserve du RE vers la PSV ; sur les CCV et la PVC qui appartiennent à la voie d'adressage des protéines à la LV ; sur les CCV et la PM qui appartiennent à la voie de sécrétion.

N, noyau ; RE, réticulum endoplasmique ; G, Golgi ; TGN, réseau *trans*-golgien ; PVC, prévacuole ; LV, vacuole lytique ; PSV, vacuole de réserve ; PM, membrane plasmique ; PAC, *Precursor-Accumulating* ; DV, vésicule dense ; CCV, vésicule à manteau de clathrine ; COPI, vésicules à manteau de protéines I ; COPII, vésicules à manteau de protéines II.

Sonde antisens permettant la
détection des transcrits des
gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'*



Sonde contrôle sens



Sonde antisens permettant
la détection du transcrit du
gène contrôle (*Albumine 2S*)

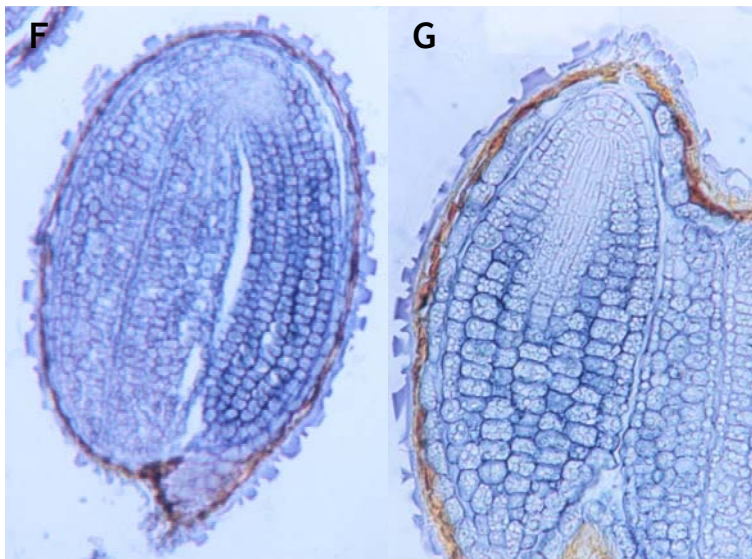


Figure 15 : Analyse d'expression par hybridation *in situ* sur des coupes de graines sauvages sèches

(A), (B) et (C) Détection des transcrits des gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'* avec une sonde antisens correspondant au 3' UTR du gène *AtBP80a*. Cette sonde n'est pas spécifique du gène *AtBP80a* et permet la détection des deux gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'*. (A) et (B) Coupe longitudinale. (C) Coupe transversale. (D) et (E) Hybridation avec une sonde antisens correspondant au 3' UTR du gène *AtBP80a* sur des coupes transversales (contrôle négatif). (F) et (G) Détection du transcrit d'un gène contrôle *Albumine 2S* (contrôle positif) sur des coupes transversales avec une sonde antisens spécifique. Les sondes sont marquées à la digoxigénine qui apparaît de couleur bleue en champ clair. Travail réalisé en collaboration avec le groupe de Martine Devic, UMR 5545 - Perpignan.

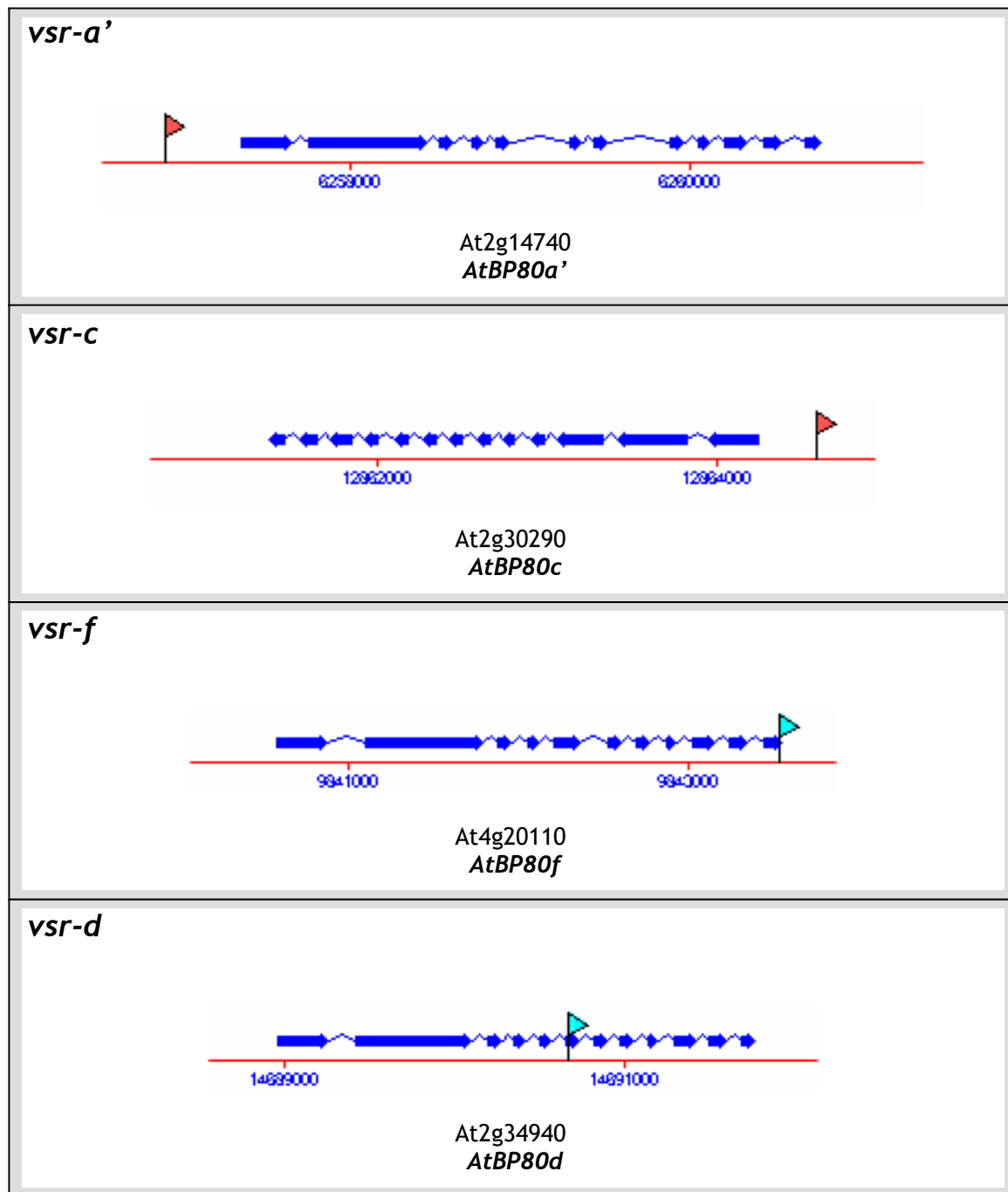


Figure 16 : Représentation schématique de la position des insertions ADN-T pour les mutants potentiels chez *Arabidopsis*.

Pour chaque mutant, le gène *AtBP80* est représenté en bleu. Les flèches bleues représentent les exons. Elles sont reliées par des traits bleus désignant les introns. La position de l'insertion d'ADN-T est représentée par un drapeau coloré. Schémas générés par FLAGdb++/FST.

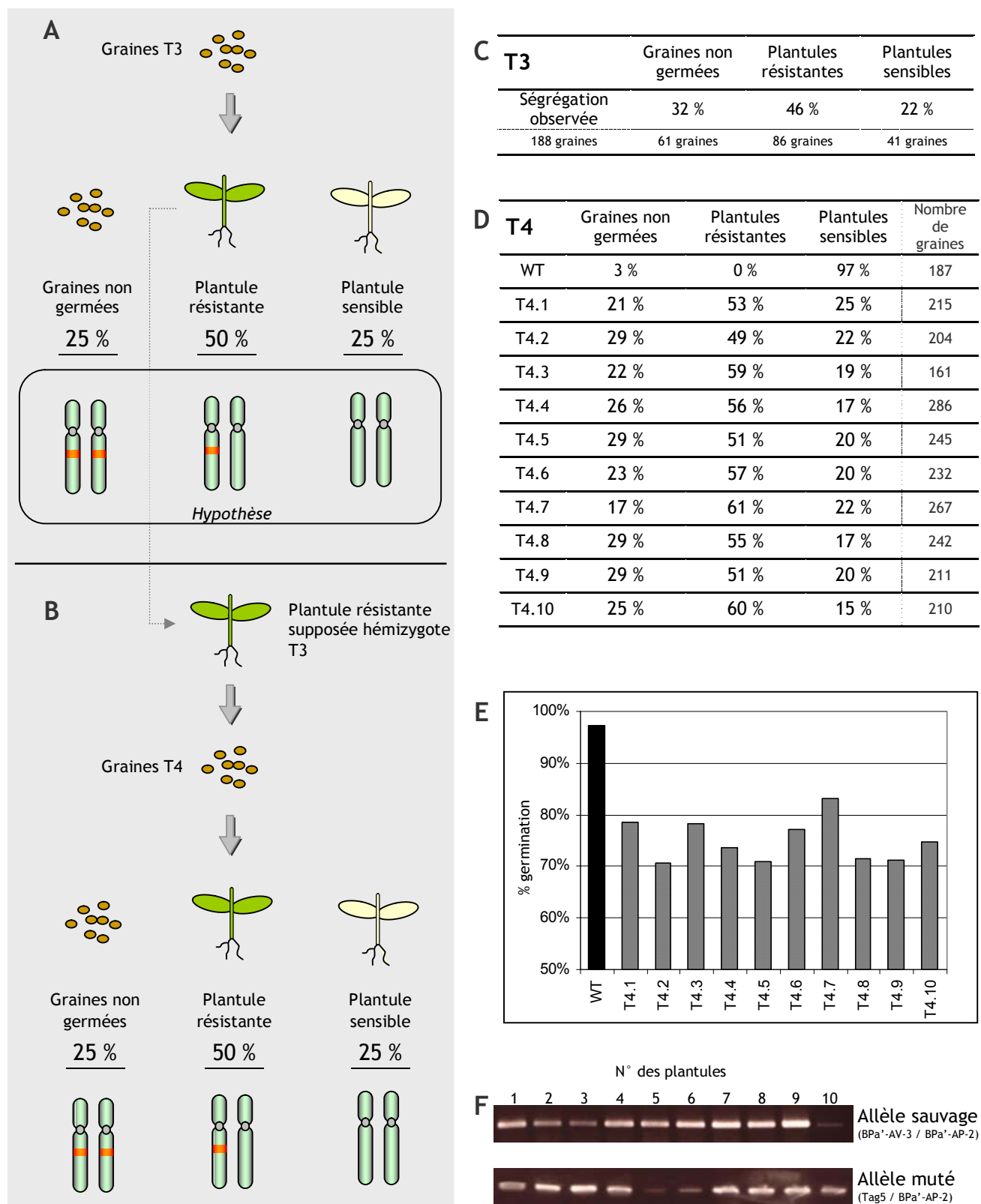


Figure 17 : Analyse de ségrégation et analyse moléculaire du mutant *vsr-a'*

(A) Hypothèse proposée pour expliquer la ségrégation du lot de graines de génération T3. L'ADN-T est représenté par un segment orange sur les chromosomes. Pour chaque paire de chromosomes, seule une chromatide du chromosome est représentée. (B) Schéma des ségrégations des graines de génération T4. (C) Données de ségrégation des graines de génération T3. (D) Données de ségrégation des graines de génération T4. (E) Représentation graphique du taux de germination des graines de génération T4. (F) Génotypage par PCR de 10 plantules résistantes pour la lignée T4.1 (voir figure 18A pour la position des amorces).

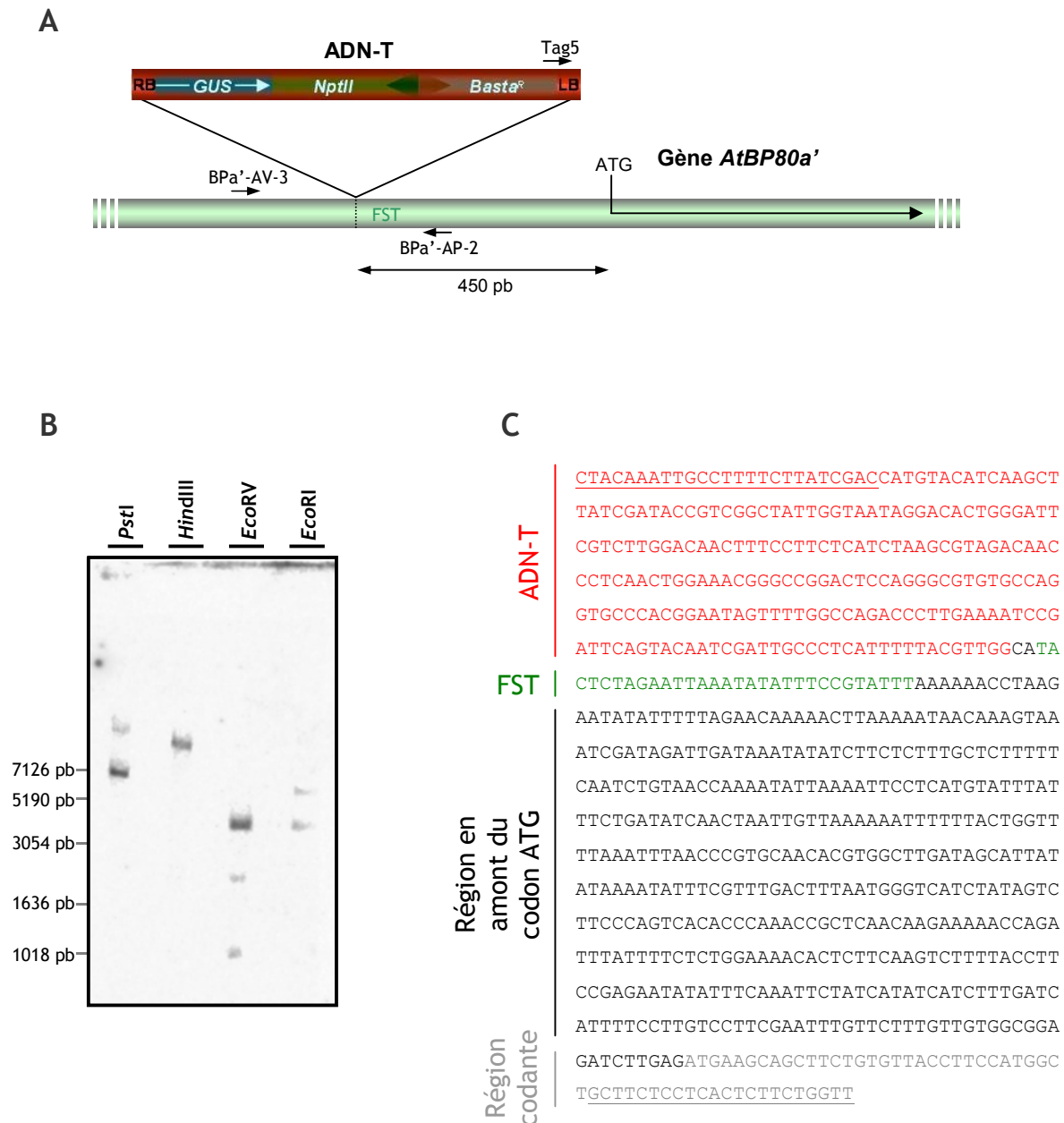


Figure 18 : Caractérisation moléculaire de l'insertion chez le mutant *vsr-a'*

(A) Représentation schématique de l'insertion d'ADN-T dans le gène *AtBP80a'*. Dans ce schéma, 'LB' désigne la bordure gauche de l'ADN-T et 'RB' la bordure droite. La position des amorces utilisées pour le génotypage ou pour l'amplification de la région de l'insertion est représentée par des flèches. (B) Evaluation du nombre de copie d'ADN-T chez le mutant *vsr-a'*. L'hybridation est réalisée avec une sonde complexe correspondant à l'ADN-T. Pour chaque enzyme, le profil théorique a été déterminé à partir des données génomiques de l'écotype Columbia. Deux bandes sont retrouvées dans la piste *PstI* (théorique : 25248 pb, 6491 pb), une bande unique est retrouvée dans la piste *HindIII* (théorique : 9940 pb), trois bandes sont retrouvées dans la piste *EcoRV* (théorique : 4374 pb, 1342 pb, 916 pb) et deux bandes sont retrouvées dans la piste *EcoRI* (théorique : 6290 pb, 3221 pb). (C) Séquence du produit PCR obtenu avec les amorces Tag5 et BPa'-AP-2 à partir de l'ADN d'une plante mutante *vsr-a'* hémizygote. La position des amorces est soulignée. Les différentes régions identifiées sont annotées à gauche de la séquence.

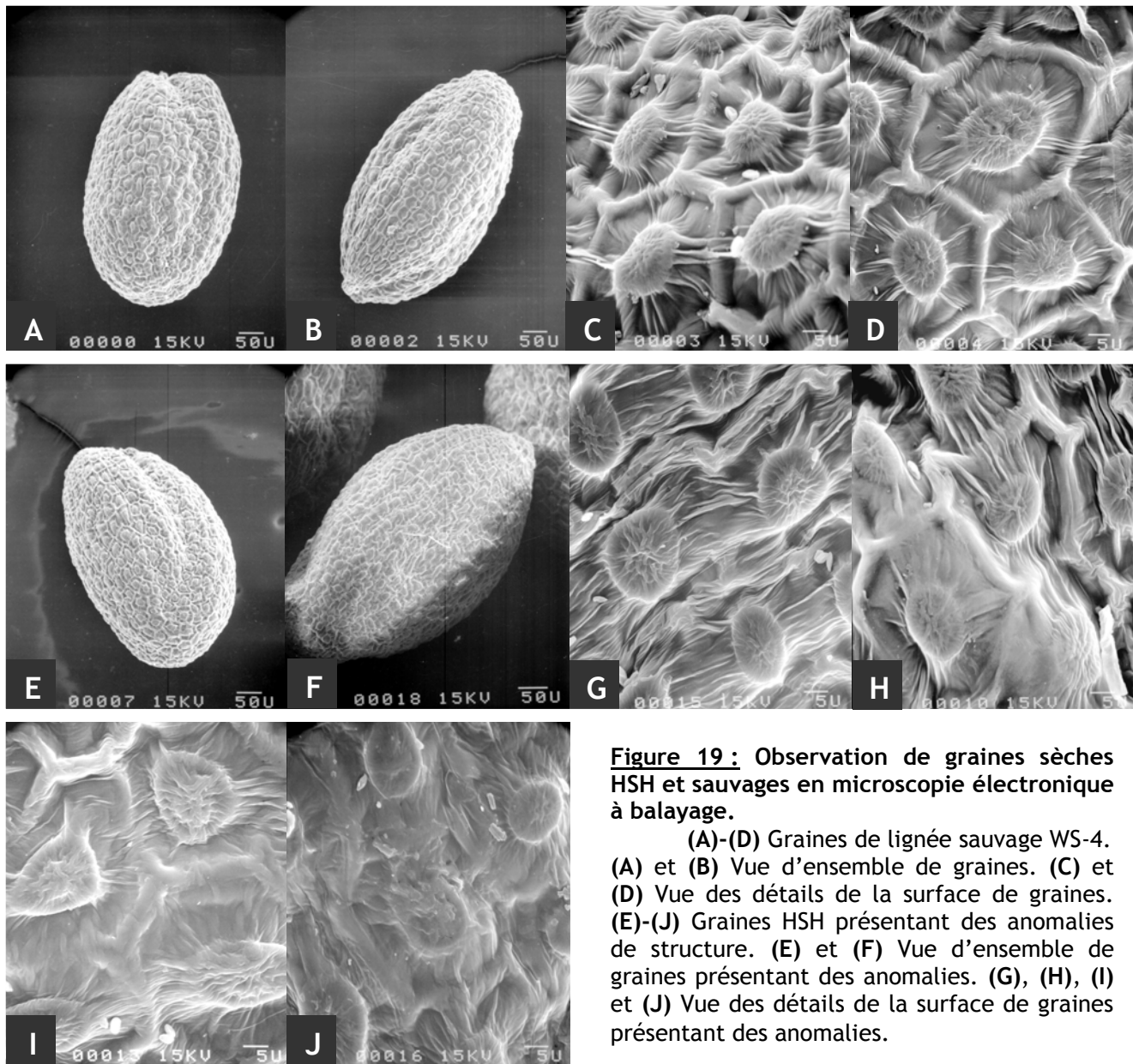


Figure 19 : Observation de graines sèches HSH et sauvages en microscopie électronique à balayage.

(A)-(D) Graines de lignée sauvage WS-4. (A) et (B) Vue d'ensemble de graines. (C) et (D) Vue des détails de la surface de graines. (E)-(J) Graines HSH présentant des anomalies de structure. (E) et (F) Vue d'ensemble de graines présentant des anomalies. (G), (H), (I) et (J) Vue des détails de la surface de graines présentant des anomalies.

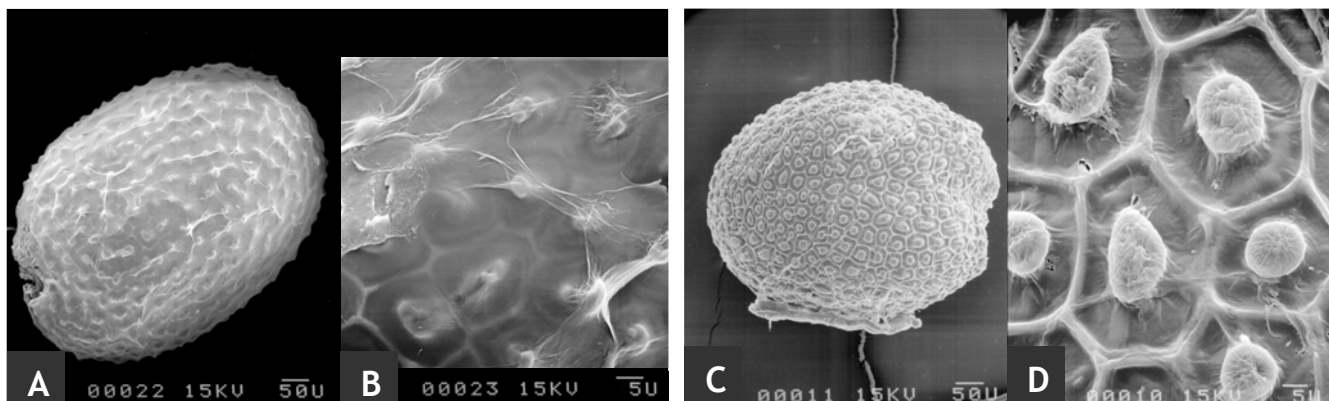


Figure 20 : Observation de graines imbibées issues de plantes hémizygotes et sauvages en microscopie électronique à balayage.

(A) et (B) Graines de lignée sauvage WS-4 imbibées pendant 36 h. (A) Vue d'ensemble d'une graine. (B) Vue des détails de la surface de la graine. (C) et (D) Graine du mutant *vsr-a'* n'ayant pas germé. (C) Vue d'ensemble d'une graine. (D) Vue des détails de la surface de la graine.

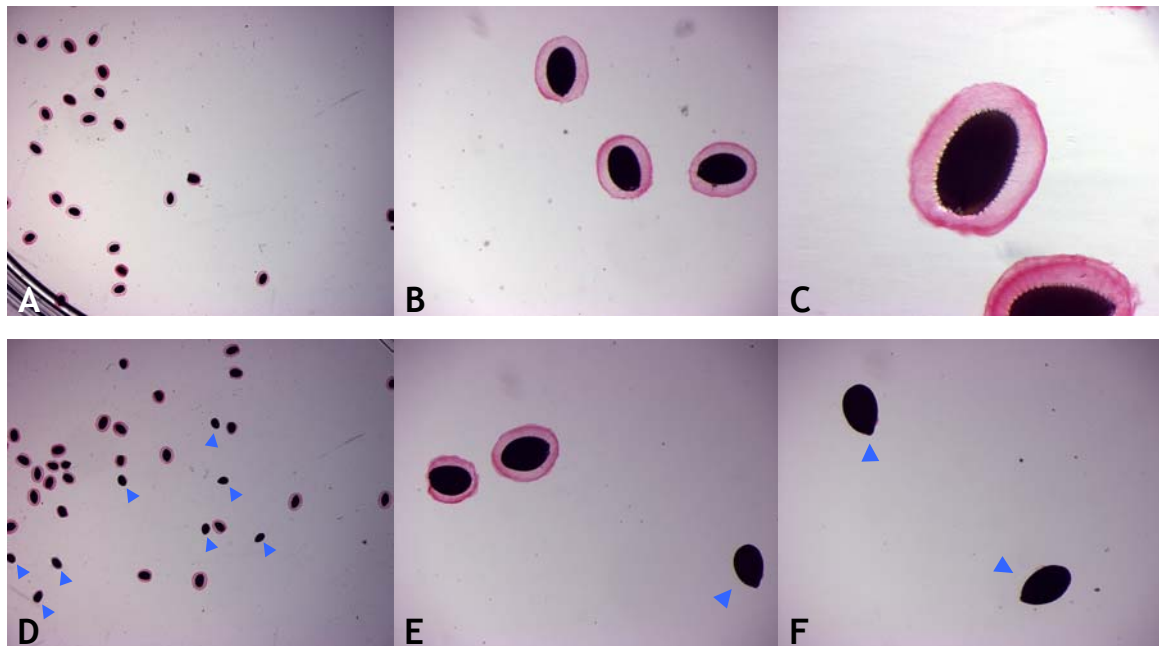


Figure 21 : Coloration de graines issues de plantes hémizygotes et sauvages avec du rouge de ruthénium

Les graines ont été imbibées pendant 24 h puis colorées avec une solution de rouge de ruthénium. (A), (B) et (C) Graines de lignée sauvage WS-4. (D), (E) et (F) Graines HSH de génération T4. Les triangles bleus indiquent les graines dépourvues de mucilage.

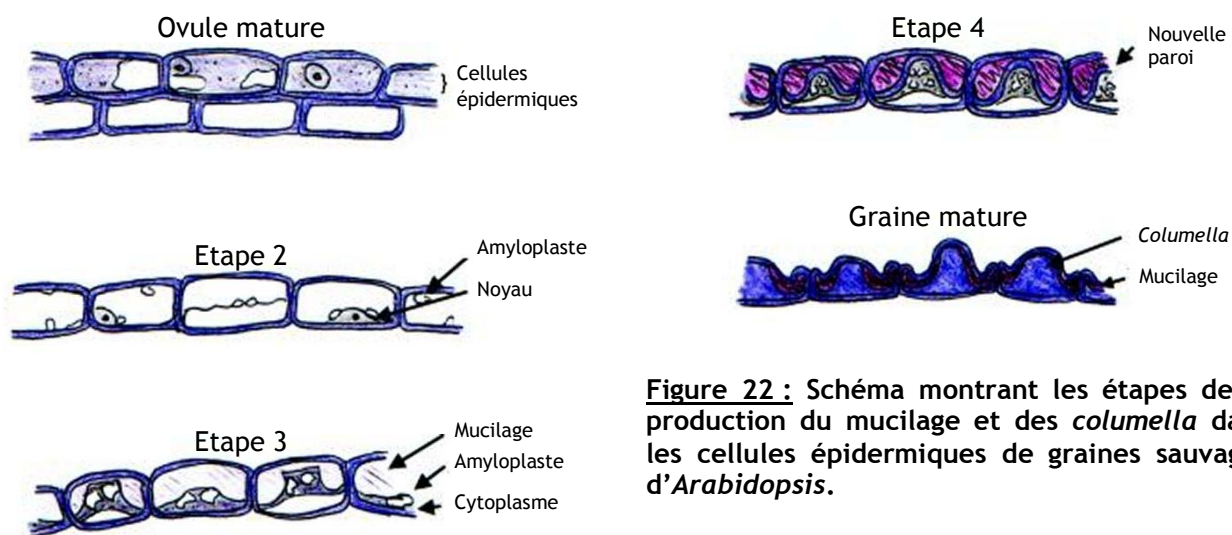


Figure 22 : Schéma montrant les étapes de la production du mucilage et des *columella* dans les cellules épidermiques de graines sauvages d'*Arabidopsis*.

Les commentaires sont donnés dans le texte.
(Adapté d'après Western et al., 2001)

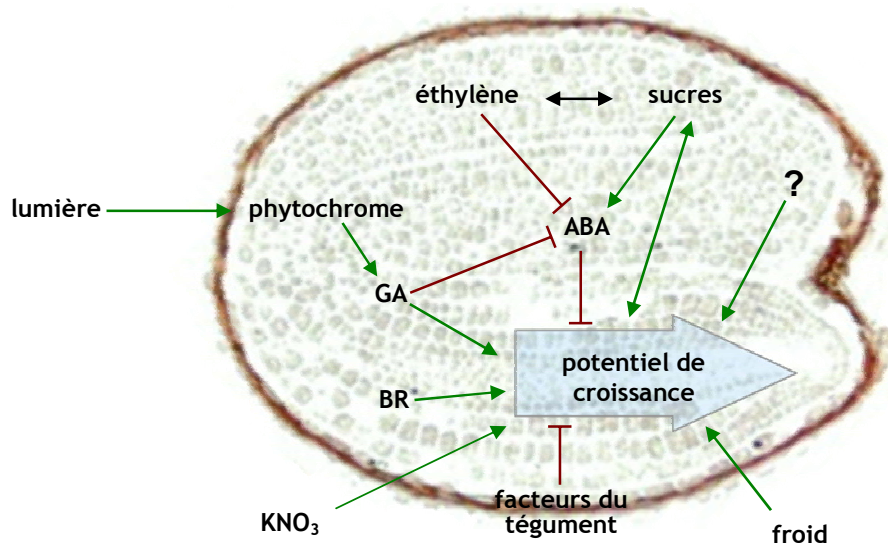


Figure 23 : Schéma des différents facteurs intervenant dans le contrôle de la germination chez *Arabidopsis*

BR=Brassinostéroïdes, GA=Acide gibbérellique, ABA=Acide abscissique, ?=Facteurs inconnus.

(Adapté d'après Bentsink et Koornneef, 2002)

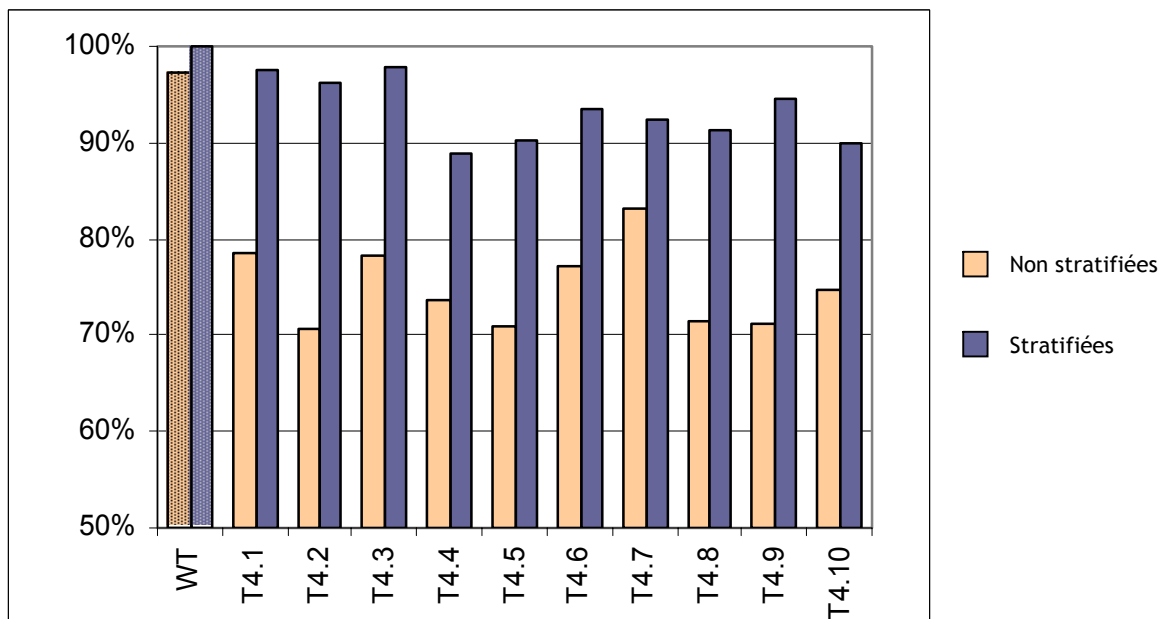


Figure 24 : Pourcentage de germination de graines HSH (T4) et de graines sauvages avec ou sans traitement de stratification des graines.

Le graphique présente le pourcentage de germination à 5 jours. Au moins 200 graines ont été analysées pour chaque lignée. Le traitement de stratification est réalisé en plaçant les semis pendant deux jours à 4°C.

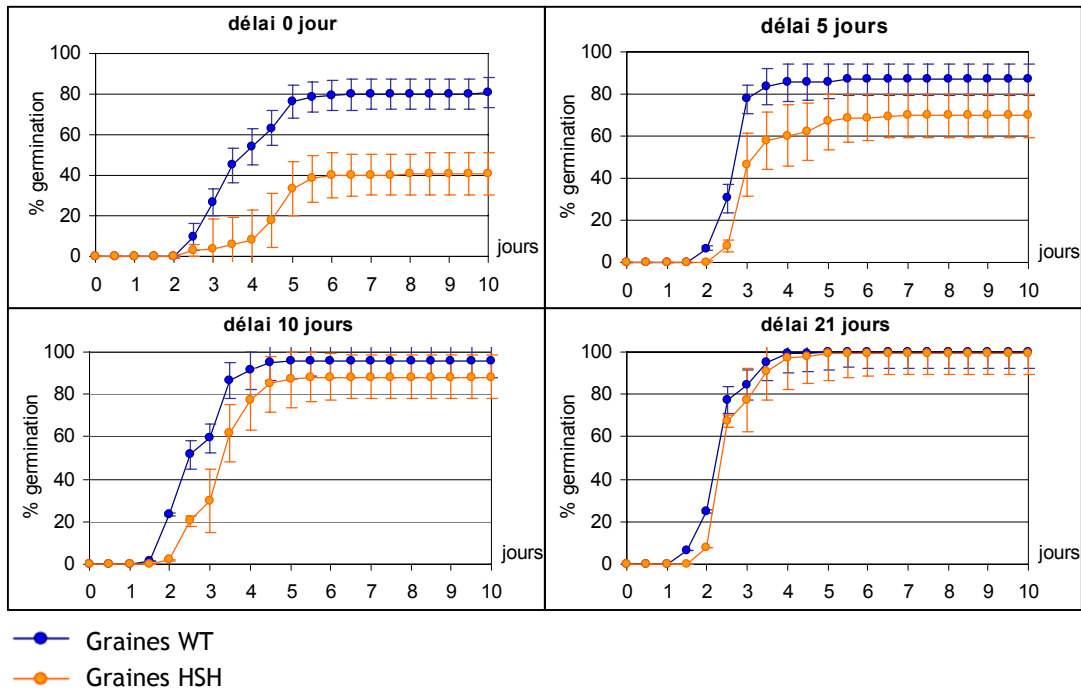


Figure 25 : Evaluation de la dormance de graines issues de plantes hémizygotes et de plantes sauvages.

Les graphiques présentent le pourcentage de germination de graines HSH et de graines sauvages en fonction du temps. Toutes les graines ont été récoltées en même temps. Le délai de conservation des graines avant semis est reporté au dessus de chaque graphique. Le nombre de graines germées est évalué toutes les 12 heures pendant 10 jours.

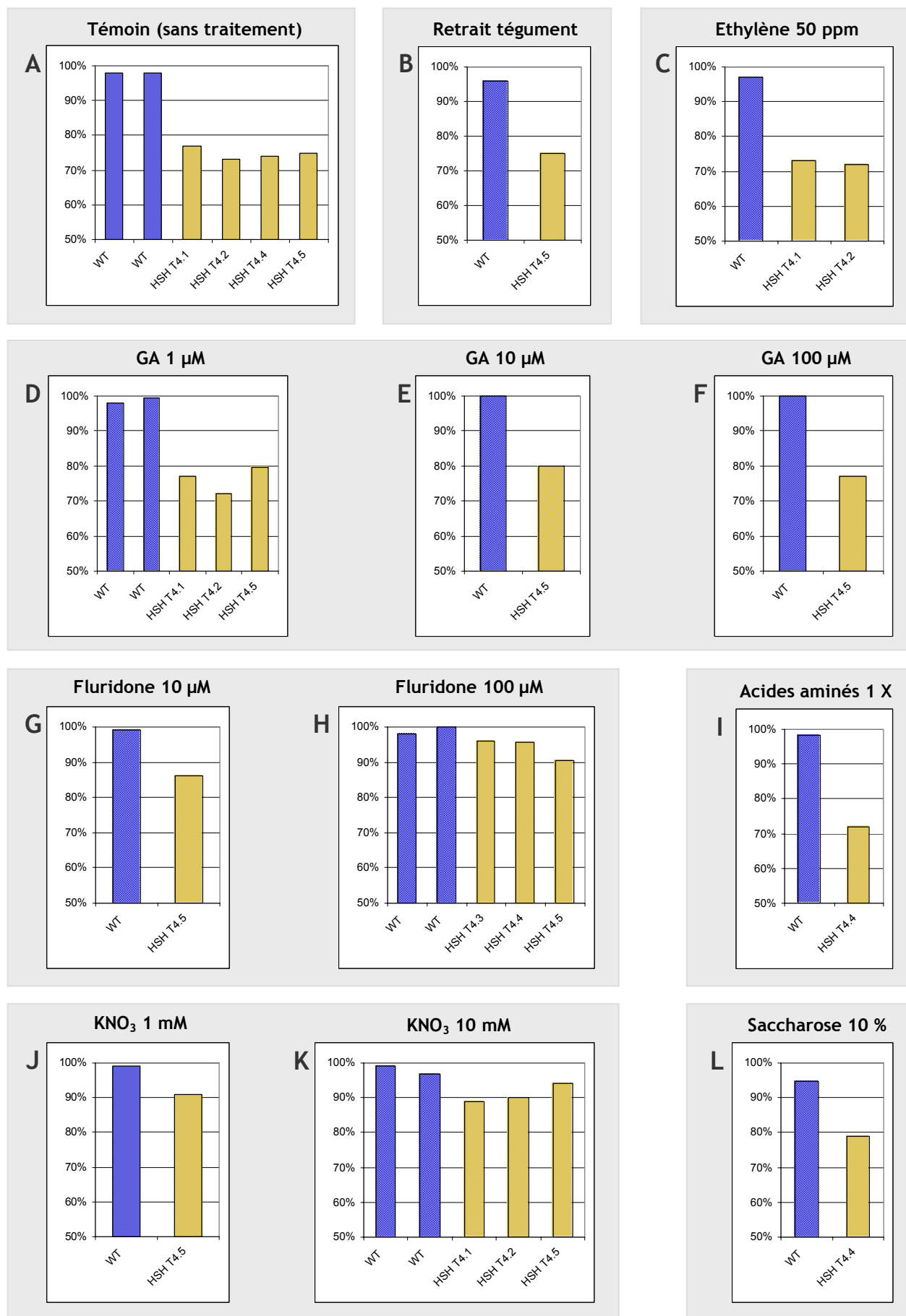


Figure 26 : Pourcentage de germination de graines HSH T4 du mutant *vsr-a'* et de graines sauvages dans différentes conditions.

Les graphiques présentent les pourcentages de germination à 5 jours. Au moins 200 graines sont analysées pour chaque lignée à chaque traitement.

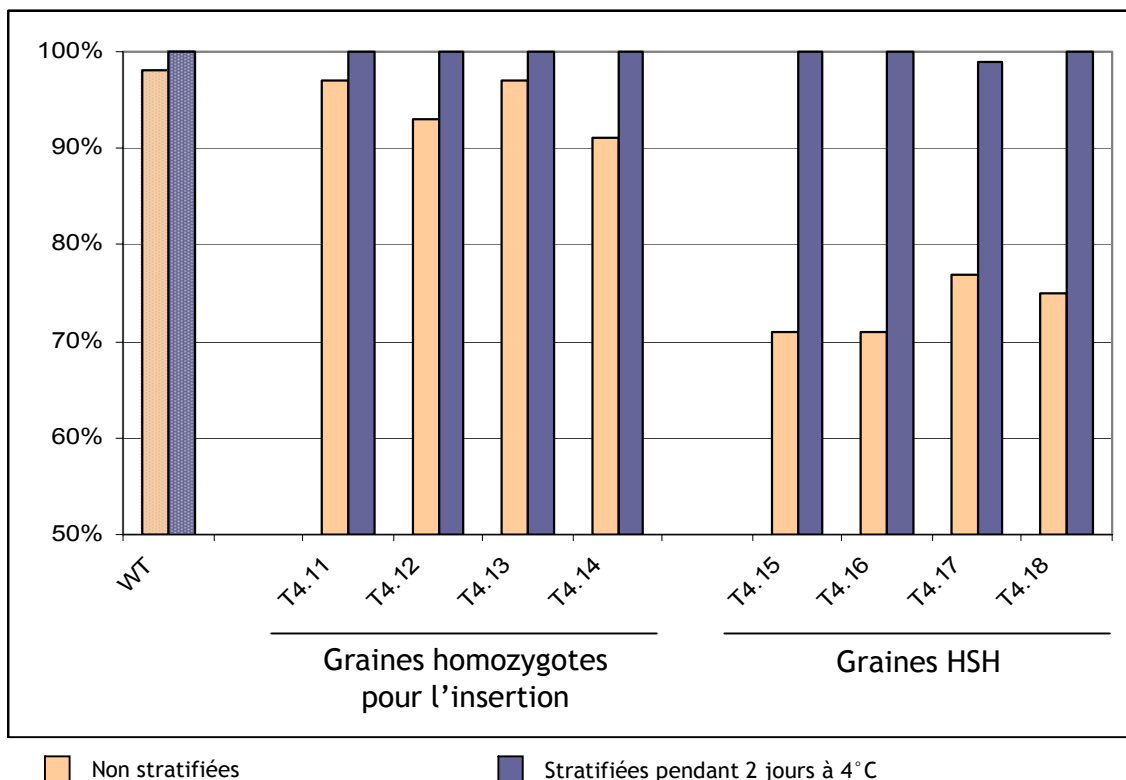


Figure 27 : Pourcentage de germination de graines homozygotes T4, de graines HSH T4 et de graines sauvages avec ou sans traitement de stratification des graines.

Les graines sont issues de parents obtenus à partir de graines stratifiées et cultivés dans les mêmes conditions. Elles sont semées sur milieu MS avec agar. Le traitement de stratification est réalisé en plaçant les semis pendant deux jours à 4°C. Les résultats sont obtenus à partir d'au moins 200 graines.

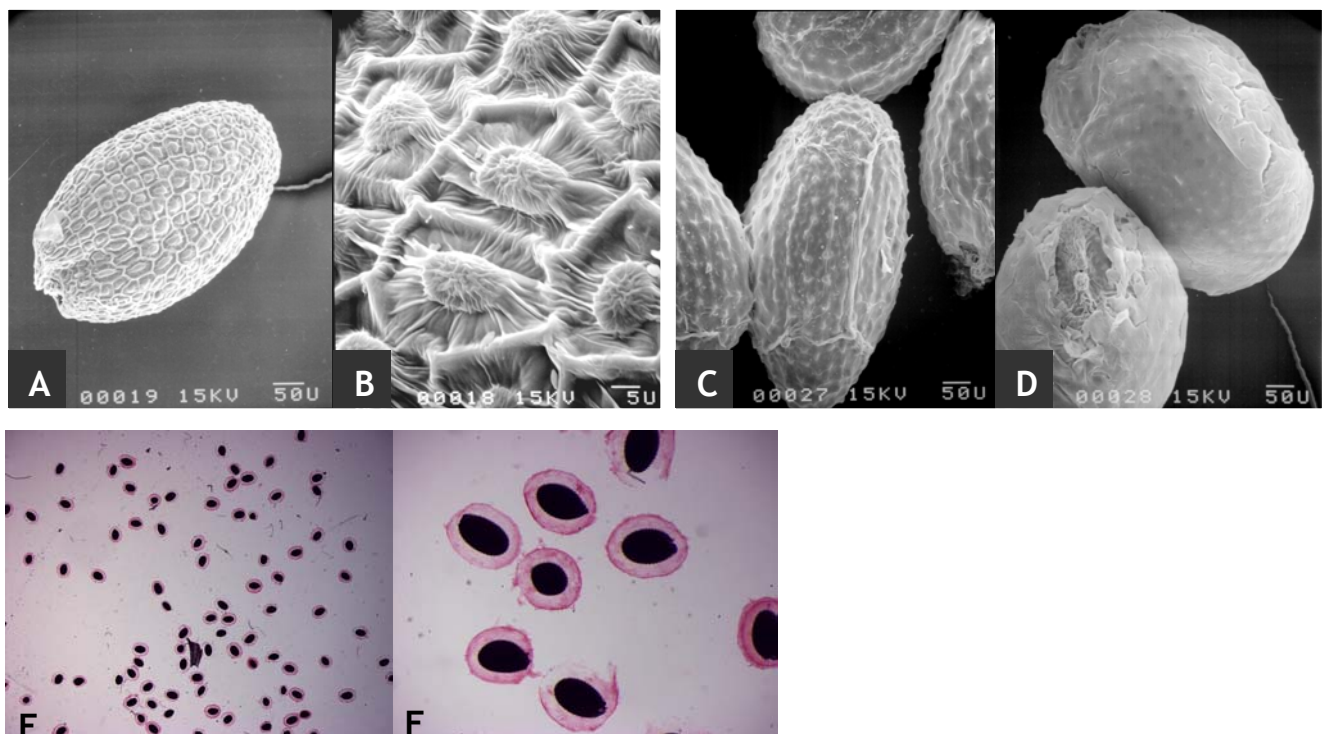


Figure 28 : Observation de graines homozygotes T4.11 produites par une plante homozygote *vsr-a'*

(A) Vue d'ensemble d'une graine homozygote sèche. (B) Vue des détails de la surface de la graine homozygote sèche. (C) et (D) Vue d'ensemble de graines homozygotes imbibées pendant 36 h. (E) et (F) Graines homozygotes imbibées pendant 24 h puis colorées avec une solution de rouge de ruthénium. (A comparer avec les figures 19,20 et 21)

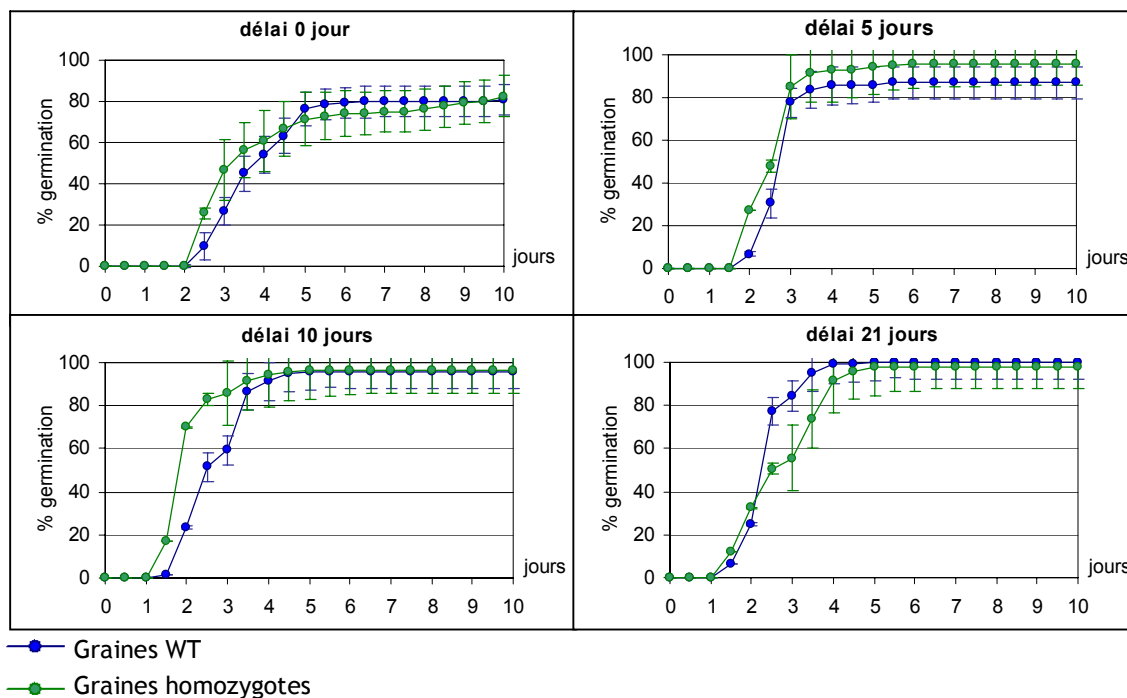


Figure 29 : Evaluation de la dormance de graines issues de plantes homozygotes *vsr-a'* et de plantes sauvages.

Les graphiques présentent le pourcentage de germination de graines HSH et sauvages en fonction du temps. Toutes les graines ont été récoltées en même temps. Le délai de conservation des graines avant semis est reporté au dessus de chaque graphique. Le nombre de graines germées est évalué toutes les 12 heures pendant 10 jours.

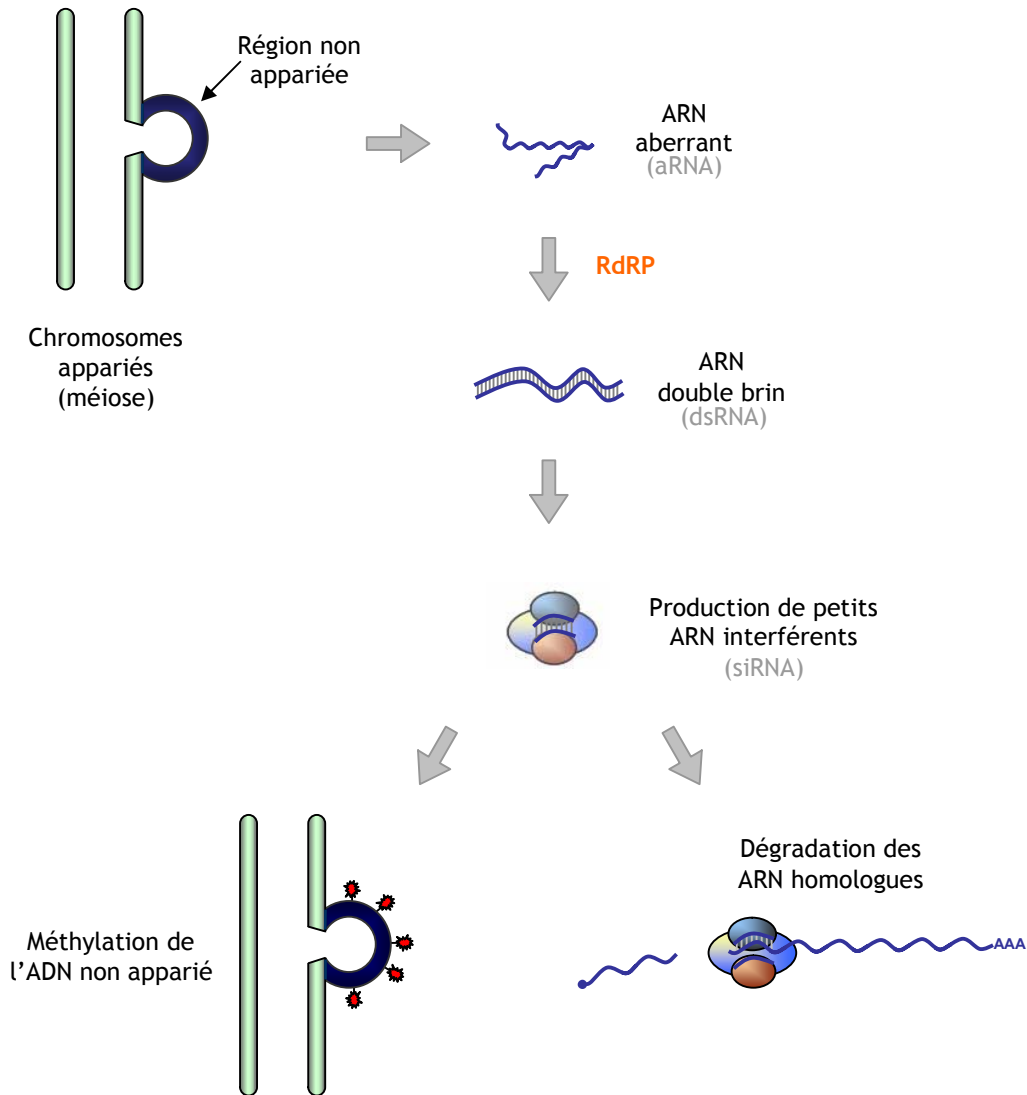


Figure 30 : Principe général de MSUD (*Meiotic silencing by unpaired DNA*)

Lors de l'appariement des chromosomes au cours de la méiose, une boucle d'ADN non appariée va se former, ce qui entraîne le déclenchement d'un mécanisme de *silencing*. Il a été montré que ce mécanisme de *silencing* nécessitait une ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRp). Ceci suggère que le MSUD fait intervenir un mécanisme de type PTGS (*Post-transcriptional gene silencing*) lié à la présence d'ARN aberrant ou double brin. En se basant sur les connaissances des mécanismes de *silencing* chez les plantes (voir figure 38 pour détail), le MSUD entraînerait la méthylation de la boucle d'ADN non appariée et/ou la dégradation des ARNm produits.

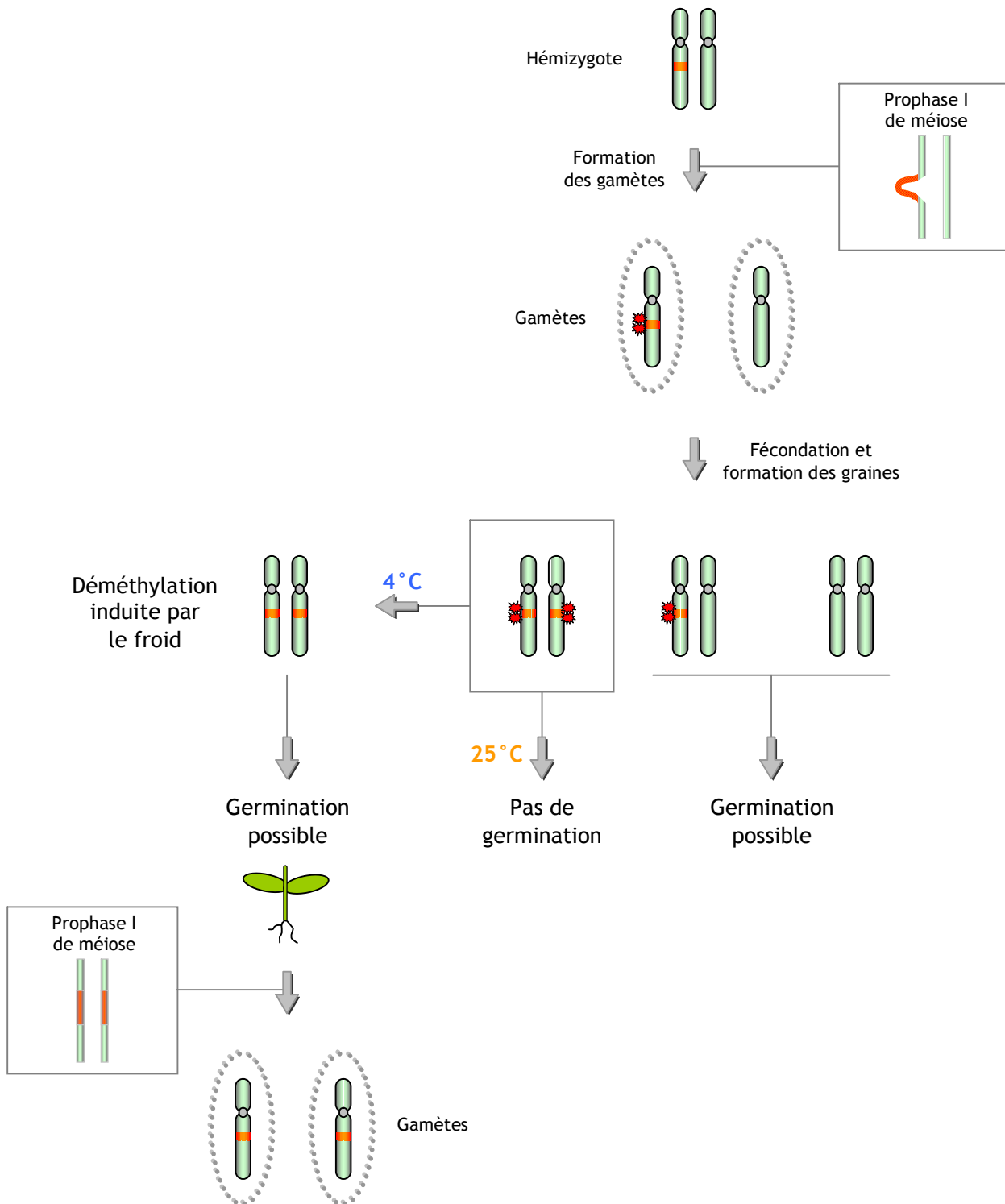


Figure 31 : Application théorique d'un modèle hypothétique de MSUD au mutant *vsr-a'*

Chez une plante hémizygote, à la méiose, l'ADN-T forme une boucle d'ADN non apparié. Cette boucle d'ADN est détectée par le mécanisme de MSUD qui entraîne une méthylation de la région (*). Deux types de gamètes sont formés : un gamète possédant un allèle sauvage du gène *AtBP80a'* et un gamète possédant un allèle muté portant une information épigénétique. Une graine homozygote possédant un allèle muté portant une information épigénétique ne peut pas germer. Un traitement de la graine à 4°C (stratification) supprime l'information épigénétique et permet à la graine de germer. Pour une plante homozygote, à la méiose, il n'y a pas de mésappariement et les gamètes formés ne possèdent pas d'information épigénétique. Ces gamètes produisent des graines homozygotes capables de germer.

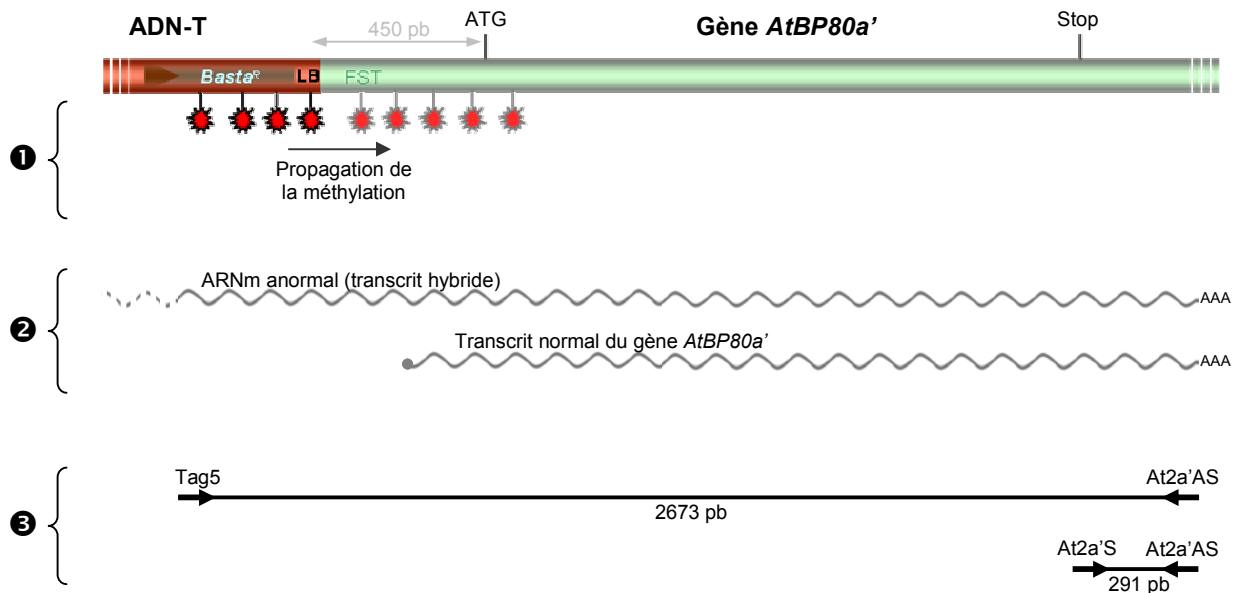


Figure 32 : Hypothèses et analyse de la région d'insertion de l'ADN-T chez le mutant *vsr-a'*
 ❶, la méthylation (✱) de l'ADN-T provoquée par le MSUD pourrait se propager au promoteur réduit du gène *AtBP80a'*, ce qui pourrait entraîner un blocage de l'expression du gène. ❷, les analyses d'expression ont mis en évidence l'existence d'un transcrit anormal qui correspond à une partie de l'ADN-T et de tout le gène *AtBP80a'*. Ce transcrit anormal pourrait provoquer un *silencing* de la région. ❸, amorces utilisées pour les analyses d'expression par RT-PCR. Les amorces Tag5 et At2a'AS permettent de détecter le transcrit anormal.

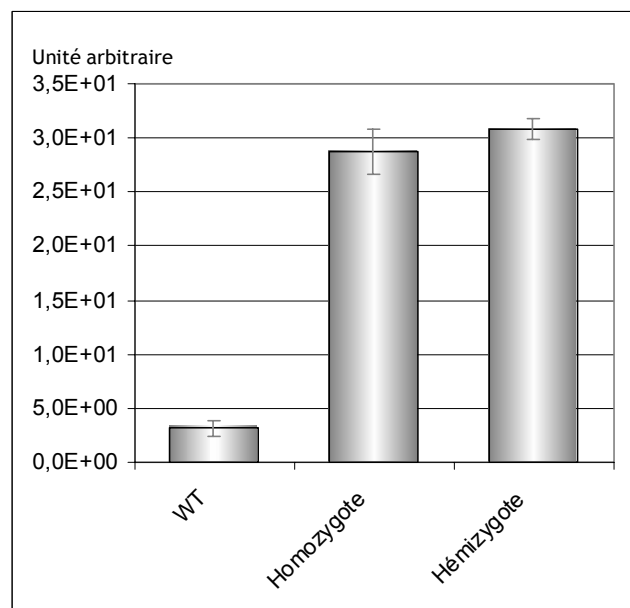


Figure 33 : Analyses d'expression chez des plantes mutantes *vsr-a'* et des plantes sauvages par RT-PCR quantitative

Les ARN totaux ont été extraits de jeunes plantes entières de lignées mutantes *vsr-a'* hémizygote et homozygote et de lignée sauvage. La quantité relative de transcrits du gène *AtBP80a'* a été évaluée par RT-PCR quantitative avec les amorces At2a'S et At2a'AS qui s'hybrident dans la région 3' du gène. Les résultats obtenus sont standardisés avec un contrôle externe (*nébuline*) et sont reportés sous forme de graphique. La quantité relative de transcrit du gène *AtBP80a'* est exprimée en unité arbitraire.

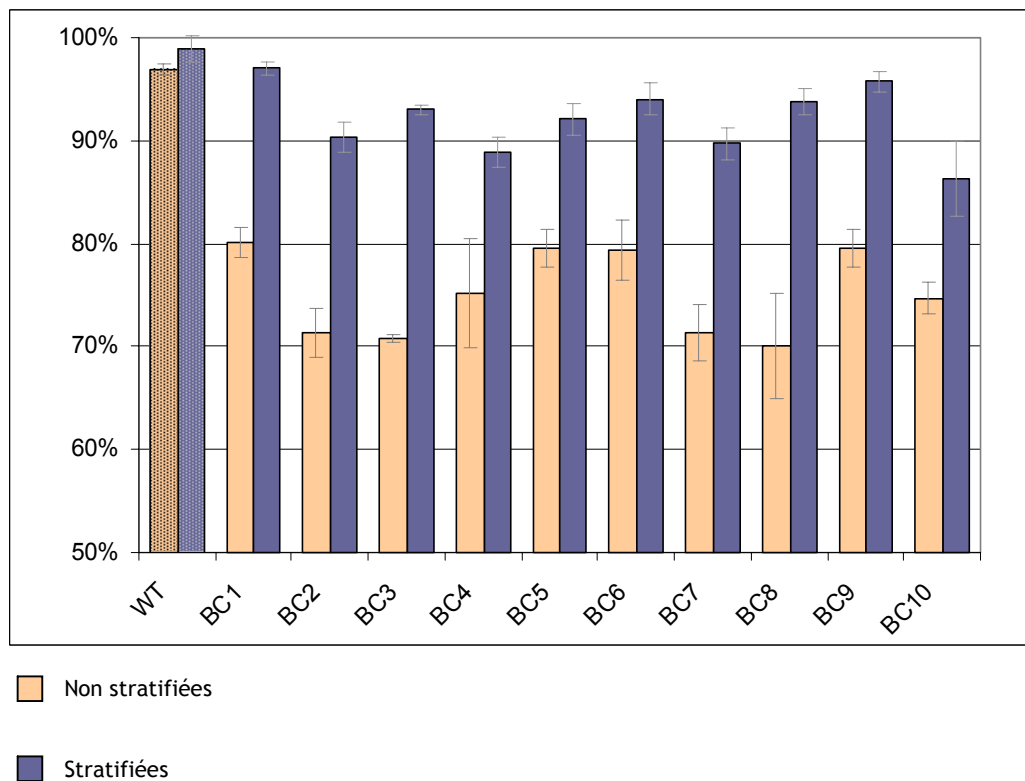


Figure 34 : Pourcentage de germination des graines BC (*back-cross*) et de graines sauvages avec ou sans traitement de stratification des graines.

Les résultats sont obtenus à partir d'environ 400 graines semées en trois essais indépendants. Le graphique présente le pourcentage de germination à 5 jours. Le traitement de stratification est réalisé en plaçant les semis pendant deux jours à 4 °C.

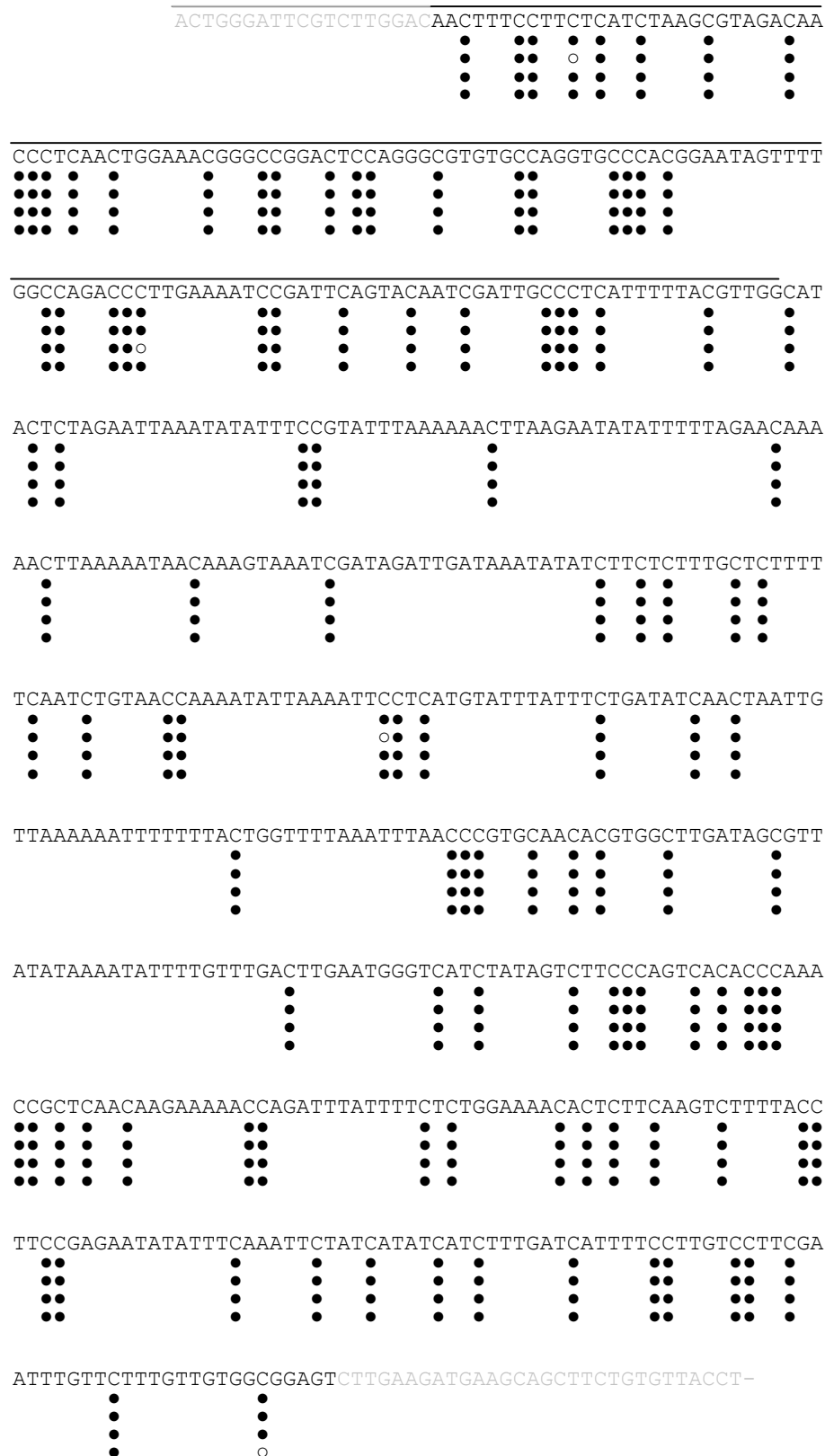
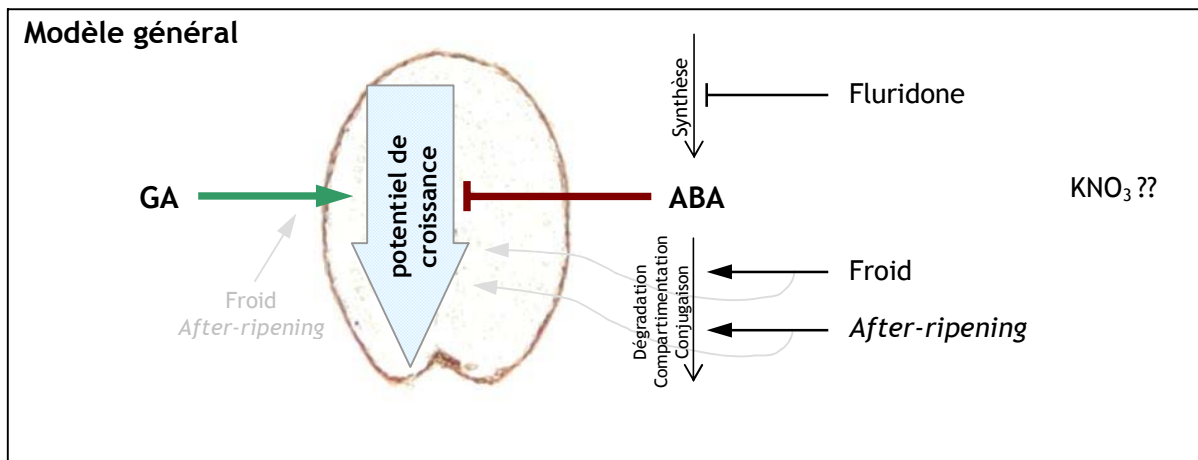
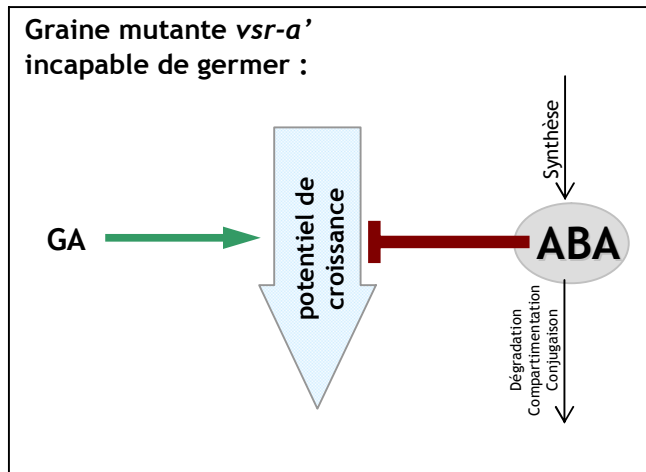


Figure 35 : Analyse de la méthylation au niveau de l'insertion de l'ADN-T chez des graines HSH.

La séquence correspondant à l'ADN-T est surlignée d'un trait. Les séquences en gris clairs correspondent aux amorces PCR. Un cercle plein indique une cytosine méthylée et un cercle vide une cytosine non méthylée. Chaque ligne présente les résultats correspondant à un clone séquencé.

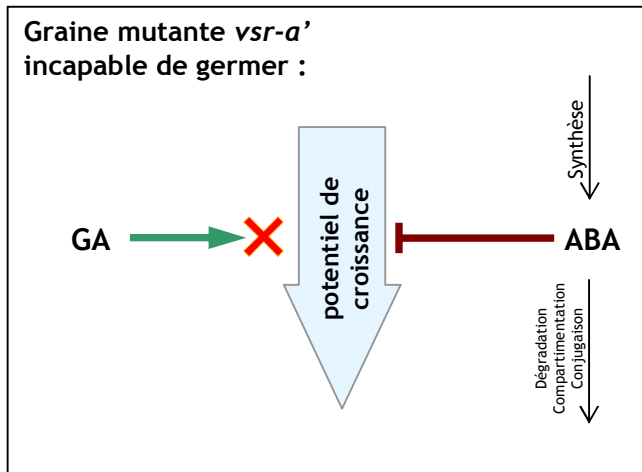


Hypothèse n°1
Accumulation d'ABA



Une forte accumulation d'ABA pourrait bloquer intensivement le processus de germination. L'ABA peut s'accumuler soit en raison d'une synthèse accrue, soit en raison du blocage des processus qui l'élimine (dégradation, compartimentation ou conjugaison). La forte accumulation d'ABA ne pourrait pas être contrebalancée par l'apport de GA exogènes

Hypothèse n°2
Diminution de la sensibilité aux GA



Une diminution de la sensibilité aux GA pourrait empêcher la germination. L'apport de GA exogènes ne permettrait pas de favoriser la germination à cause de cette insensibilité. Dans le cas où la quantité d'ABA est réduite par différents traitements (fluridone, froid, *after-ripening*), la balance hormonale pourrait être rééquilibrée permettant la germination. De plus, le froid et l'*after-ripening* améliorent la sensibilité aux GA.

Figure 36 : Bilan sur l'analyse de la dormance des graines du mutant *vsr-a'*

Le modèle général résume les éléments connus pour réguler la dormance et leurs interactions. Deux hypothèses sont proposées pour expliquer la dormance accrue des graines du mutant *vsr-a'*.

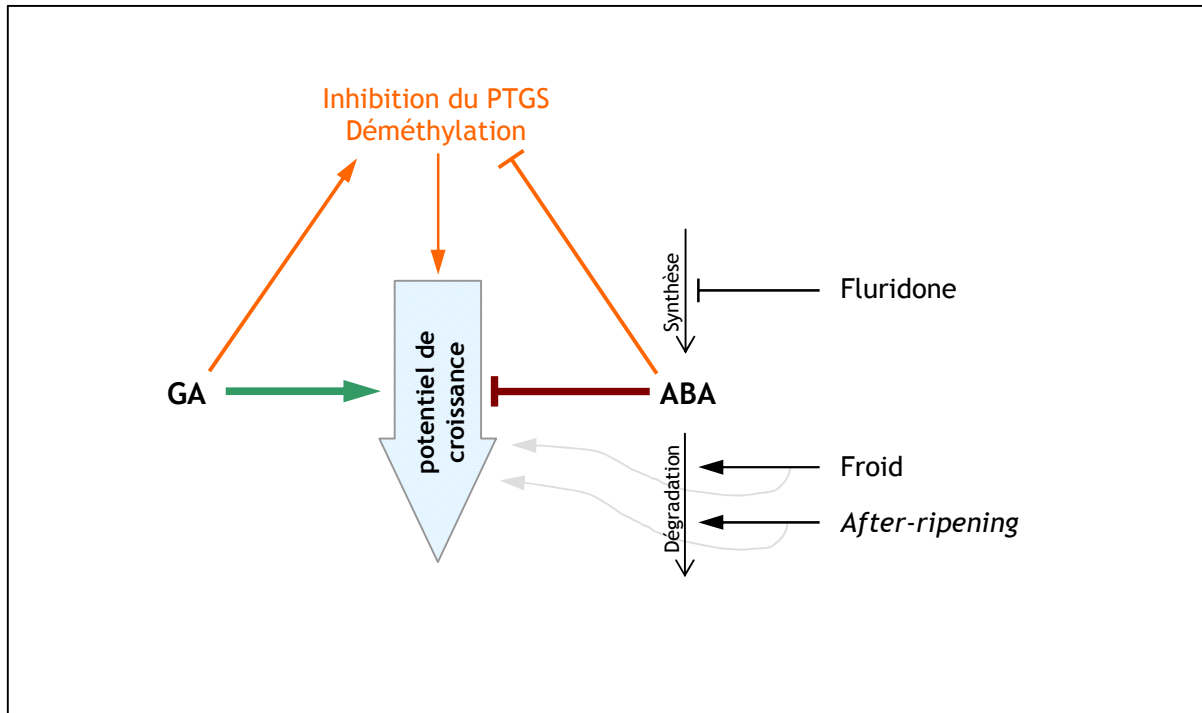


Figure 37 : Hypothèse d'un lien entre la dormance et le phénomène épigénétique chez le mutant *vsr-a'*

Ce modèle est basé sur le modèle de la figure 36 et inclut l'hypothèse de l'action de l'ABA et des GA sur les mécanismes de *silencing* que sont le PTGS et la méthylation. Les GA et l'ABA auraient un contrôle direct sur les mécanismes de *silencing* (PTGS et méthylation) : les GA favoriseraient la déméthylation et l'inhibition du PTGS tandis que l'ABA maintiendrait ces mécanismes.

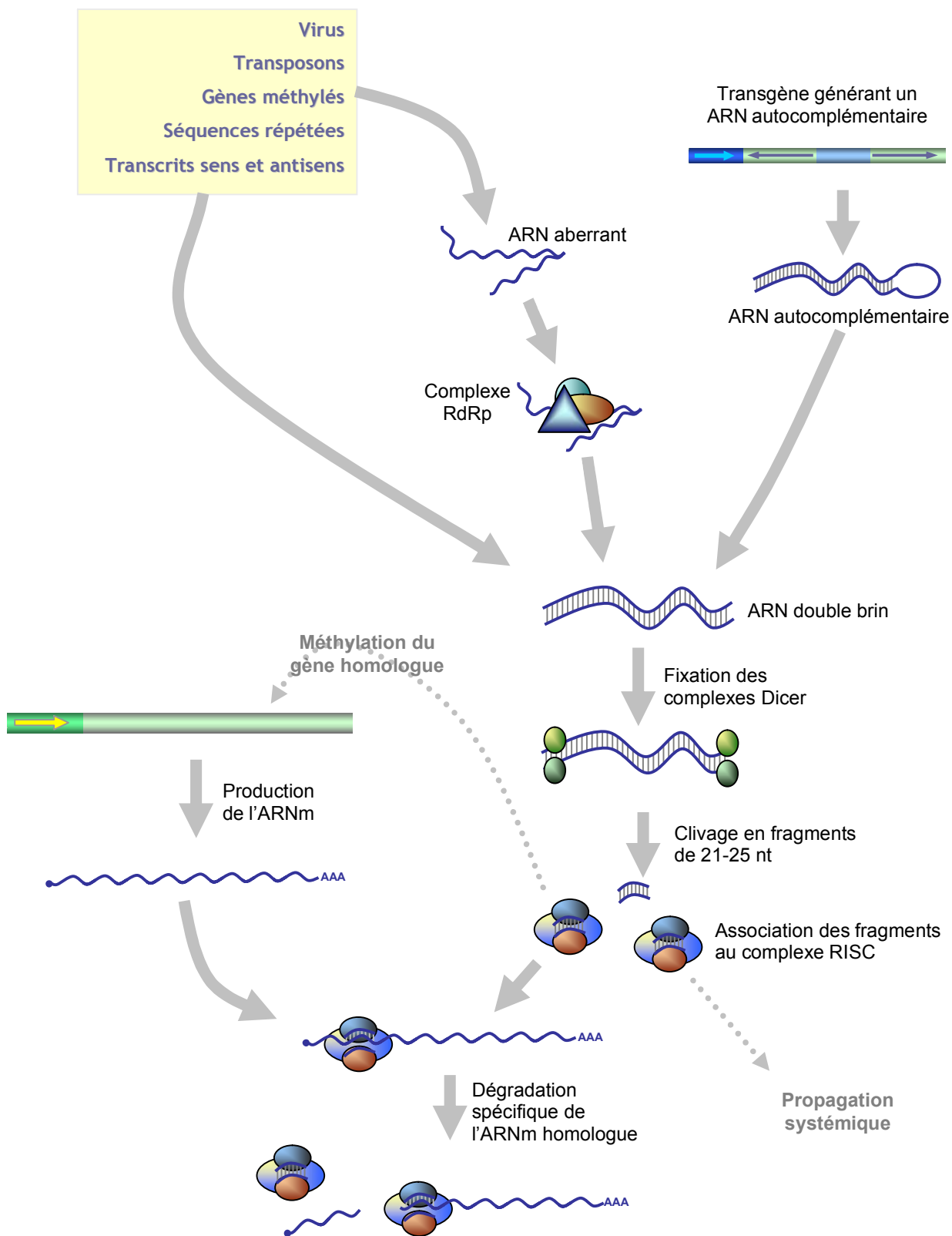


Figure 38 : Modèle pour l'initiation et l'action du PTGS

Dans certains cas, il peut y avoir dans la cellule production d'ARN aberrants ou d'ARN double brin (dsRNA). Un ARN aberrant est un ARN anormal qui va être détecté et transformé en dsRNA par le complexe RdRp (*RNA dependant RNA polymerase*). L'utilisation d'un transgène générant un ARN autocomplémentaire permet aussi d'obtenir un dsRNA. Le dsRNA est clivé par le complexe Dicer pour former les petits ARN interférants (siRNA, 21-25 nt). Ces siRNA associés au complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) vont dégrader tout ARNm qui présente une homologie avec les siRNA. Les siRNA associés au complexe RISC et à d'autres facteurs assurent aussi la propagation systémique du *silencing* et la méthylation du gène homologue. (Adapté d'après Hannon, 2002 et Waterhouse et al., 2001).

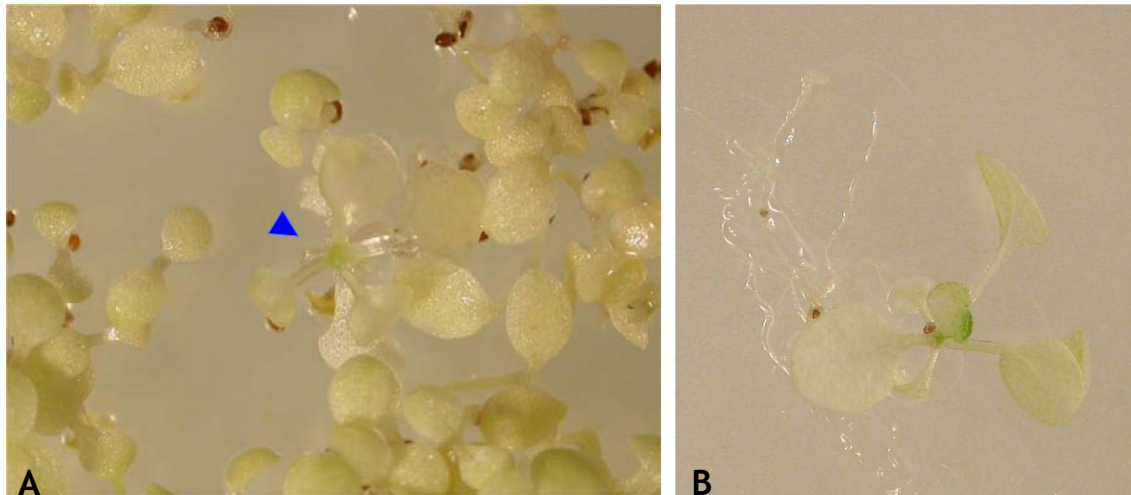


Figure 39 : Plantules p35S-⟨PDS⟩

(A) Plantule p35S-⟨PDS⟩ (flèche bleue) parmi les plantules non résistantes à la kanamycine. (B) Plantule p35S-⟨PDS⟩ isolée. Ces plantules n'ont quasiment pas de pigments et apparaissent de couleur blanche ou translucide.



Figure 40 : Plantules pHsp18.2-⟨PDS⟩ ayant reçu ou non un traitement d'induction

(A) Plantules pHsp18.2-⟨PDS⟩ (flèches bleues) qui n'ont pas reçu de traitement d'induction (B) Plantules pHsp18.2-⟨PDS⟩ (flèches bleues) qui ont reçu un traitement d'induction de 2 h à 37°C. Les plantules traitées développent des feuilles dépigmentées.

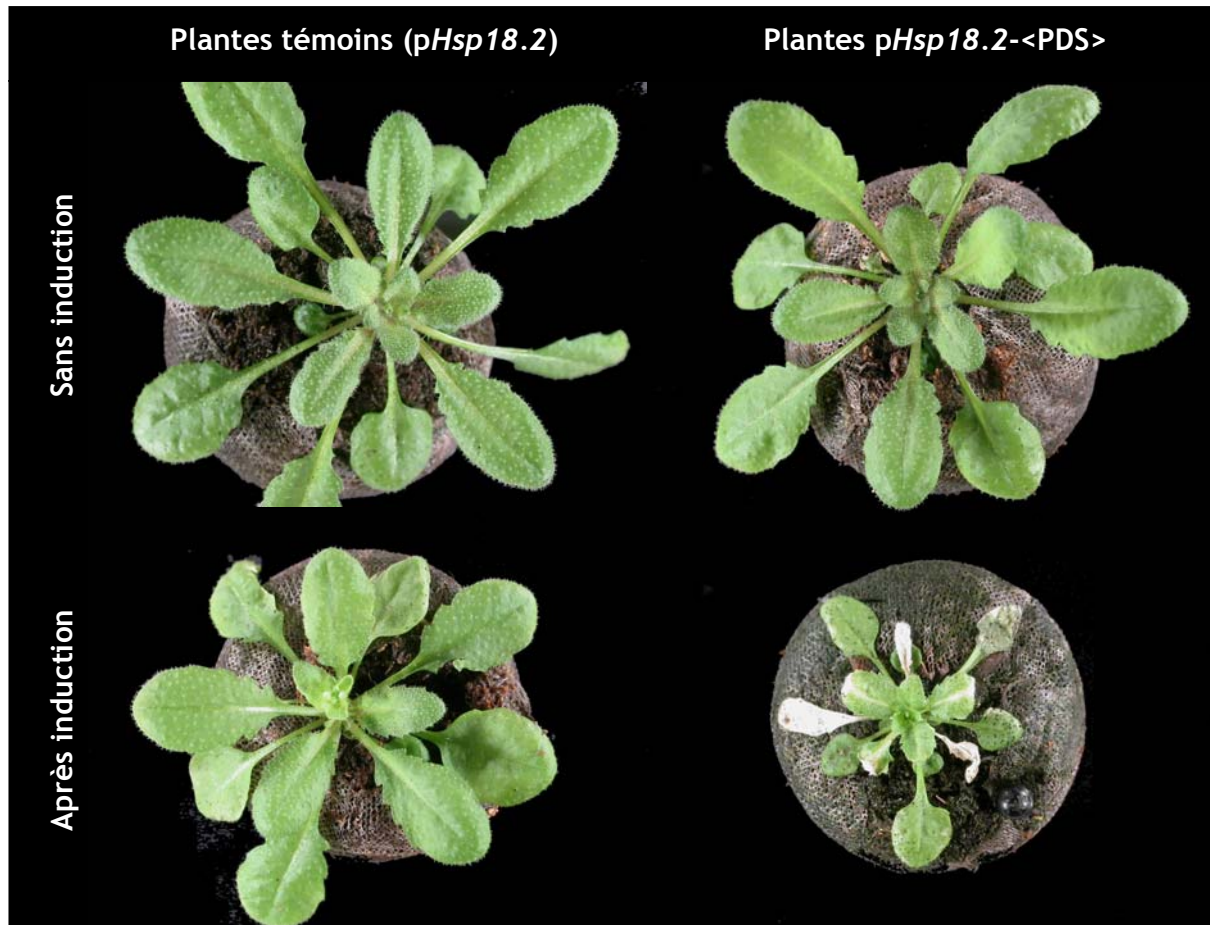


Figure 41 : Plantes *pHsp18.2-⟨PDS⟩* et plantes témoins (*pHsp18.2*) ayant reçu ou non un traitement d'induction

Ces plantes ont été cultivées sur tourbe dans les mêmes conditions. Le traitement d'induction consiste à placer les plantes pendant 2 h dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau à une température de 37°C. Les plantules sont ensuite placées dans les conditions standard.

```

AtBP80a      GACAGCCAACCCGAGGTCCCGAACCACACGAATGATGAACGTGCCTAAGAGAACGAAATG
               :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: :::: :::: ::::
AtBP80a'     GACAGCCAACCCGAGATCCCGAACCACGTGAATGATGAACGCGCCTGAGAAAGCAAAACA

AtBP80a      GTCCAAC TATTTATTCCCCGGAAGGAATCAATGCGAAGCGTCTTTTAATTGATGTGG
               ::::: :::::::::::::: :::: :::: :::: :::::::::::::: ::::::::::
AtBP80a'     GTCCATCTATTTATTCCCC-GGGAAGGACCCAAGGTGACACGTCTTTTAACTGATGTGG

AtBP80a      CCCTTGATGCCGGTGTCTTTTTTCGCATCTGTATCTCTGTAAC TCTTTGT-----A
               ::::: :::: :::: :::: :::: :::::::::::::: :::::::::::::: ::::
AtBP80a'     CCCTTAACGACGATGT--TTTCTCGCCTCTGTATCTTTGTAAC TCTTTTTTTTTTTT

AtBP80a      CCAA-ACAGTGATC-----CTATGT-----TCTTGTCAA
               :::: :::::::::::::: :::: :::: :::: ::::
AtBP80a'     CCATTACAGTGATTTTGCATACAAAAGAGGTTGAGTGACTTTGTGCTTTTTTTCTCAC

AtBP80a      TTGTGTCCATGTGACTTCTGTAATAGGGAAC TCGATGTAGCTTCGGAGAACTGGACAA
               :::::::::::::: :::::::::::::: ::::: ::::: :::::
AtBP80a'     TTGTGTCCATGGGACTTCTGTAATAGGAAACTCTGATGTAAGT-----A

AtBP80a      GCTAGTCAATAGAATCAAAACATCAAAGTGTTAAAGTAAAAAAAAAAAAAAAA
               :::: :::: :::: ::::
AtBP80a'     GCT--TCGGCTAA--CAAGACA-----

```

Figure 42 : Alignement des régions 3' des gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'* utilisées pour les constructions RNAi.

Les séquences comportent la fin de la région codante et la région 3' UTR des gènes *AtBP80a* et *AtBP80a'*. Le codon 'stop' est souligné.

Alignement réalisé avec ClustalW.

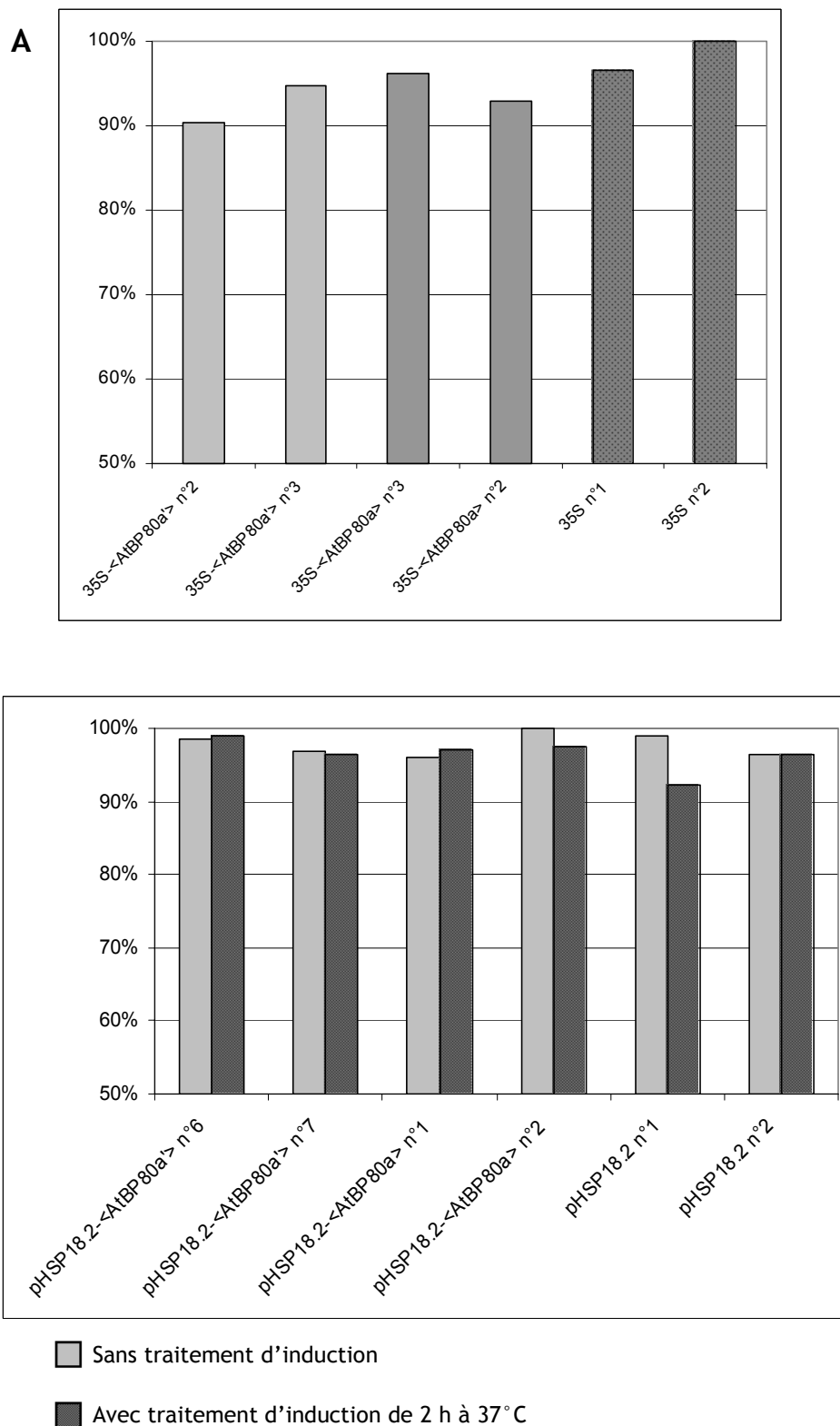


Figure 43 : Pourcentage de germination des graines RNAi et des graines témoins

(A) Pourcentage de germination des graines 35S-AtBP80a>, des graines 35S-AtBP80a'> et des graines 35S. (B) Pourcentage de germination des graines pHSP18.2-AtBP80a>, des graines pHSP18.2-AtBP80a'> et des graines pHSP18.2 avec ou sans traitement d'induction de 2 h à 37°C.

Deux lignées sont considérées pour chaque construction. Les résultats sont obtenus à partir de semis d'environ 250 graines.

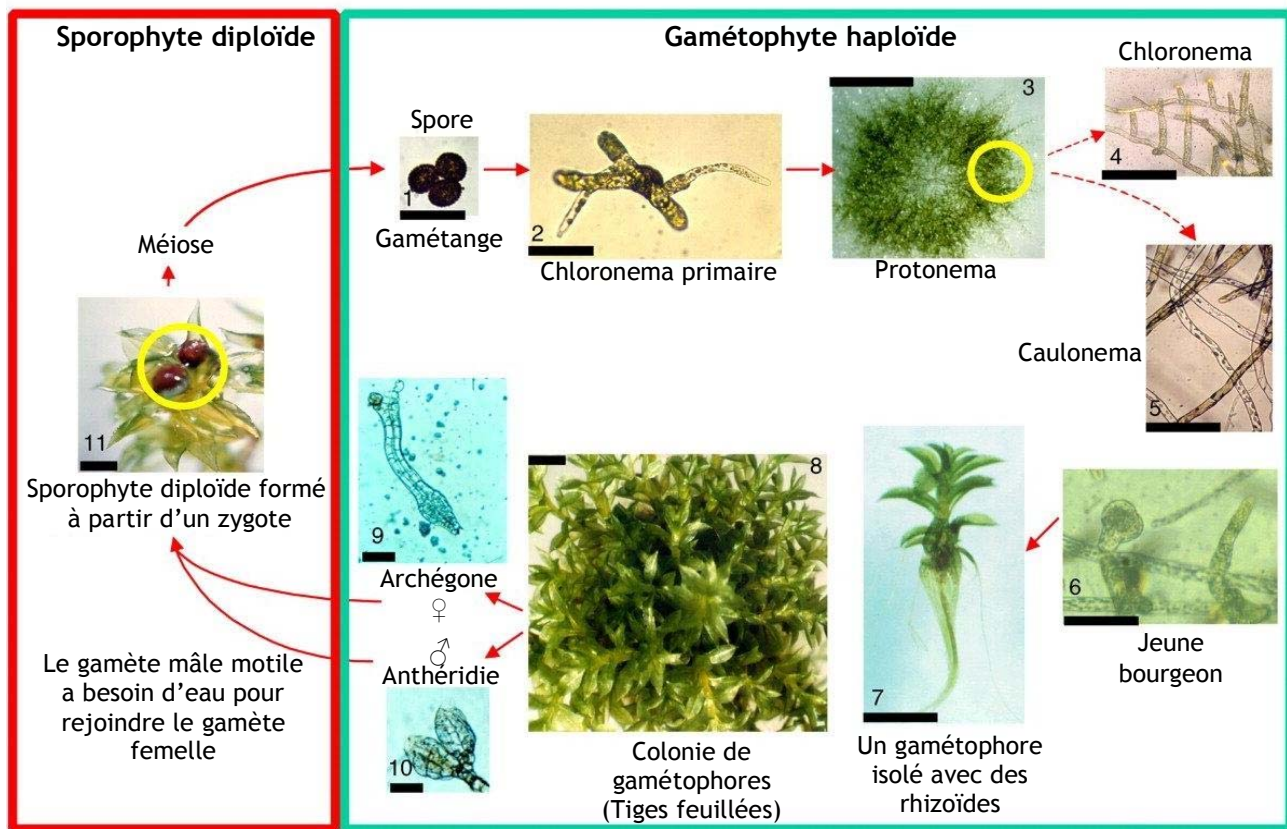


Figure 44 : Le cycle de vie de la mousse *Physcomitrella patens*

(1) Spores, (2) germination sous l'effet de la lumière d'une spore qui va générer le chloronema primaire, (3) colonie de protonema âgée de 15 jours, (4) Chloronema formant des branchements, (5) Cellules de caulonema caractérisées par une paroi oblique et un nombre réduit de chloroplastes, (6) formation d'un jeune bourgeon qui caractérise le passage de la structure filamenteuse bidimensionnelle à la structure tridimensionnelle, (7) formation de la tige feuillée à partir du bourgeon, (8) gamétophyte âgé de 4 semaines, (9) archégone isolé, (10) deux anthéridies isolées, (11) après fécondation par le spermatozoïde motile, la cellule œuf se développe en un sporophyte diploïde qui produira 5000 spores dans une capsule. Le cycle de développement complet est achevé en moins de 12 semaines. La barre d'échelle correspond à : 50 μ m pour 1, 2, 9 et 10 ; 0,5 mm pour 4, 5, 6 et 7 ; 1 mm pour 8 et 11 ; 1 cm pour 3. (Adapté de Schaefer et Zrýd, 2001).

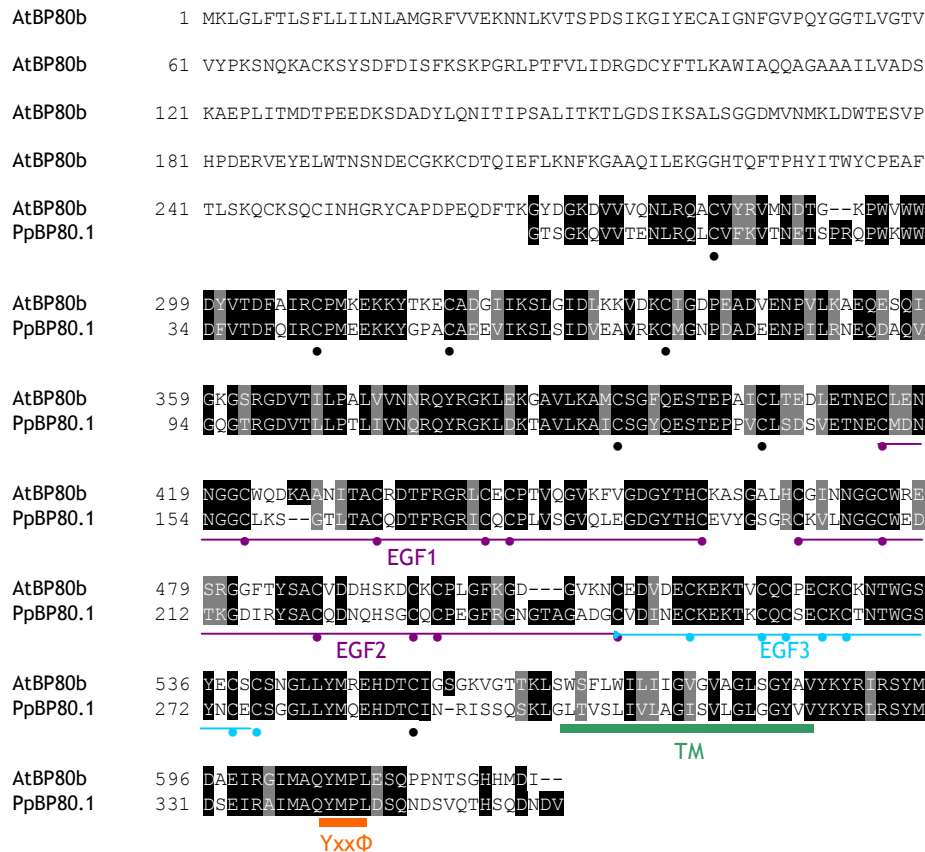


Figure 45 : Alignement entre la protéine AtBP80b et la séquence partielle de la protéine PpBP80.1

Les résidus qui sont identiques ou similaires dans les deux séquences sont respectivement représentés sur un fond noir ou gris. Les résidus Cys conservés sont indiqués par un point en dessous des deux séquences. Les motifs EGF sont marqués par un trait fin. Le domaine transmembranaire (TM) possible est marqué par un trait vert épais. Le motif d'internalisation YxxΦ est repéré par un trait orange épais. Alignement réalisé avec ClustalW et mis en forme avec BoxShade 3.21.

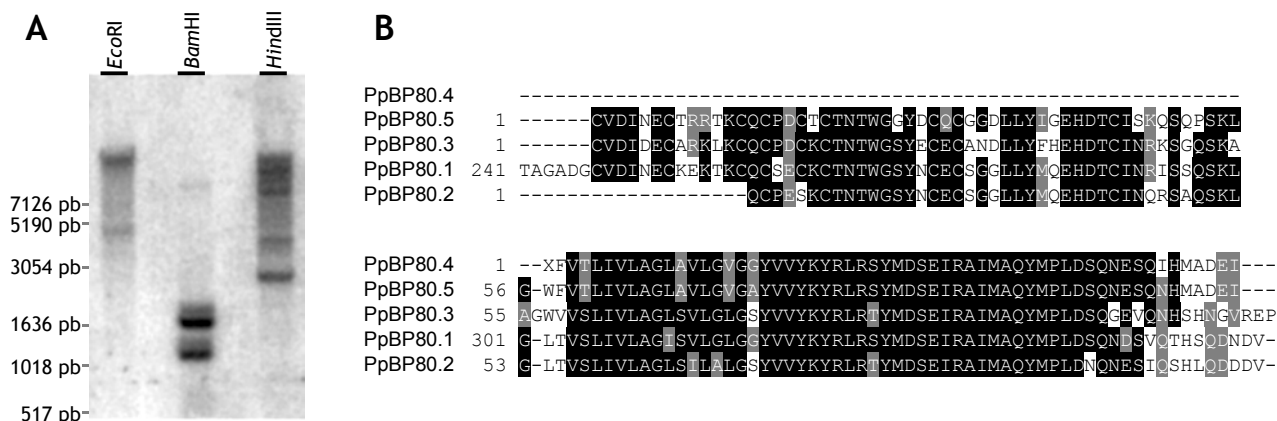


Figure 46 : Mise en évidence de l'existence de plusieurs membres *PpBP80* chez la mousse *P. patens*

(A) Hybridation de type *Southern blot* d'ADN génomique de *P. patens*. L'ADN génomique a été digéré avec *EcoRI*, *BamHI* et *HindIII* et hybridé avec le fragment d'ADNc de 1,4 kb amplifié par PCR avec les amorces Pp1s et Pp1459as. (B) Alignement des protéines PpBP80 déduites des EST du programme PHYSCObase avec la protéine PpBP80.1. Alignement réalisé avec ClustalW et mis en forme avec BoxShade 3.21.

N° essai	Nombre de transformants obtenus	Nombre de transformants analysés	Nombre de mutants <i>bp80.1</i>	Nombre de transformants pJIT161 (témoin)
1	7	7	0	3
2	0	-	-	0
3	26	10	5	7

Tableau 1 : Récapitulatif du nombre de lignées obtenues par essai de transformation et du nombre de mutants *knock-out* identifiés chez la mousse *P. patens*

Le nombre de transformants pJIT161 permet d'évaluer l'efficacité de transformation. Dans chaque essai, les transformants sont obtenus à partir de 10 µg d'ADN.

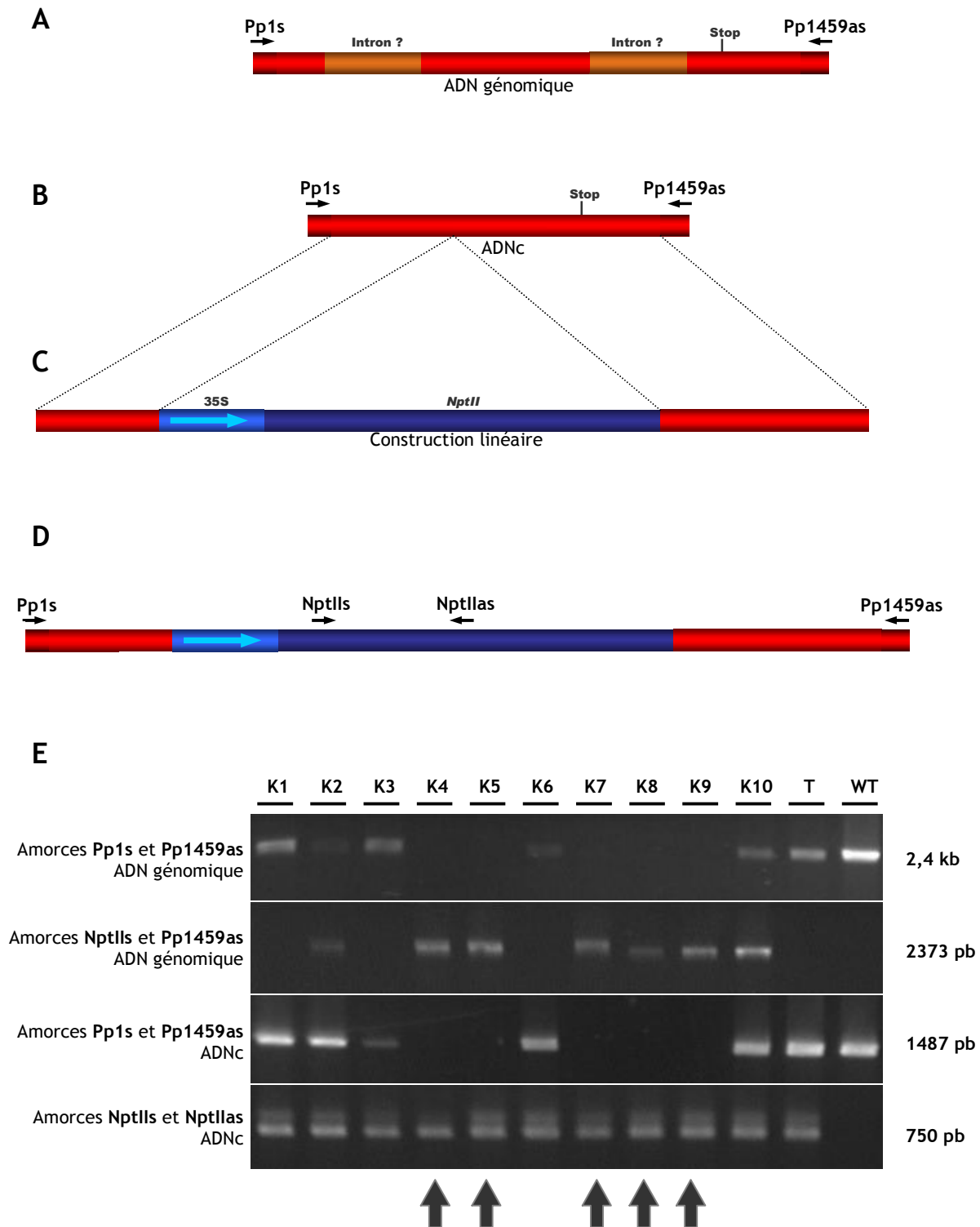
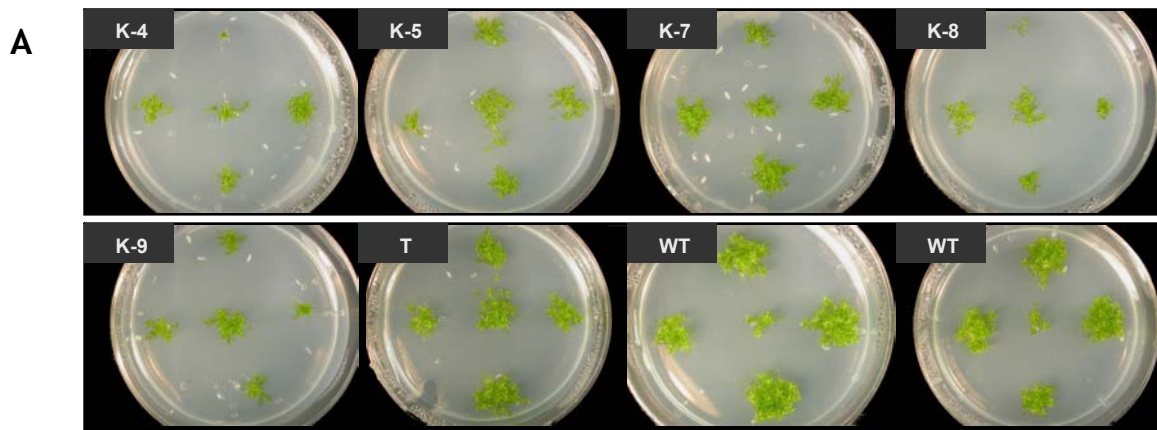


Figure 47 : Stratégie de disruption et analyse moléculaire des mousses transformées

(A) Partie connue du gène *PpBP80.1* avec position des amorces Pp1s et Pp1459as qui donnent un produit PCR d'environ 2,4 kb. Les introns putatifs sont reportés sur la figure. (B) Partie connue de l'ADNC avec position des amorces Pp1s et Pp1459as qui donnent un produit PCR de 1487 pb. Les traits fins noirs indiquent quelles portions sont utilisées pour générer la construction linéaire. (C) Construction linéaire. Les amorces Pp1s et Pp1459as ne s'hybrident pas sur cette construction. (D) Gène *PpBP80.1* après disruption. Les amorces NptIIs et Pp1459as donnent un produit PCR de 2373 pb et les amorces NptIIs et NptIIas un produit de 750 pb. (E) Analyse des produits PCR sur gel. 10 lignées indépendantes sont analysées (K1 à K10) ainsi qu'un témoin pJIT161 (T) et un sauvage (WT). Les flèches noires indiquent les lignées *knock-out* pour le gène *PpBP80.1*.



B

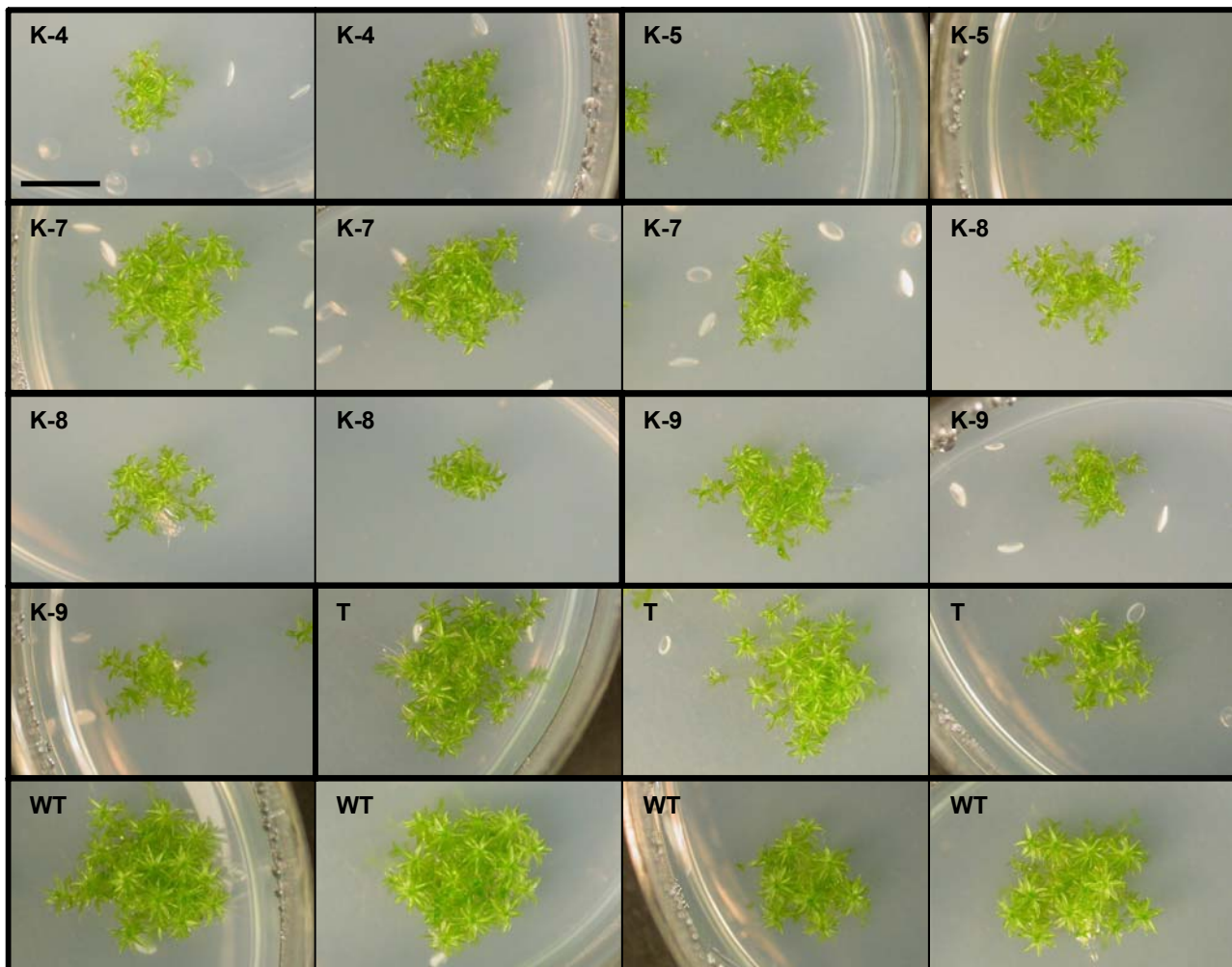


Figure 48 : Observation macroscopique des lignées mutantes et témoins de *P. patens* après 45 jours de culture.

(A) Observation du développement des lignées sur milieu BCD. Chaque lignée a été repiquée en cinq points sur le milieu. Cette observation permet d'avoir une idée sur la vitesse de croissance des lignées. Le diamètre d'une boîte est 52 mm.

(B) Zoom sur des colonies isolées pour chaque lignée. La barre noire dans la première image représente 1 cm.

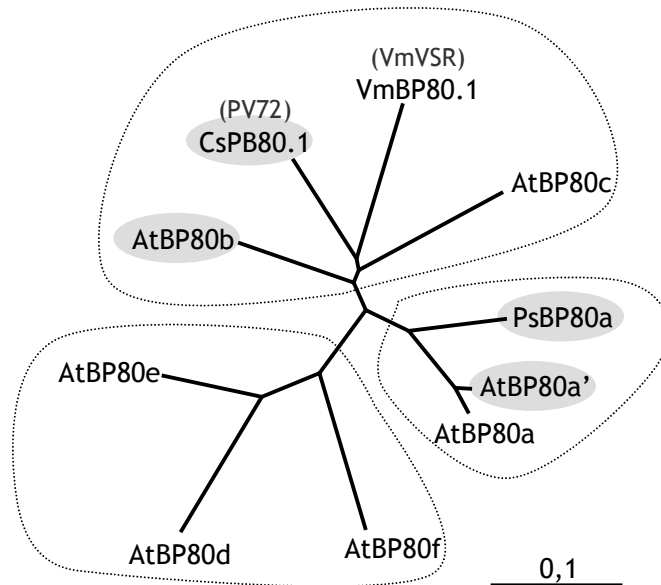


Figure 49 : Arbre phylogénétique de protéines BP80 d'*A. thaliana*, du pois, du potiron et de la légumineuse *Vigna*.

La région entre les acides aminés Asp176 et Gly508 de la protéine CsPB80 (PV72) a été alignée avec les régions correspondantes des autres protéines. L'échelle représente la distance évolutive qui correspond au nombre de substitutions par acide aminé. Trois groupes de protéines sont délimités par des traits pointillés. Les protéines dont le nom est sur fond gris sont celles qui bénéficient d'études approfondies.

Arbre généré avec ClustalW et Treeview.

(Adapté d'après Shimada et al., 2003)

	AtBP80a	AtBP80a'	AtBP80b	AtBP80c	AtBP80d	AtBP80e	AtBP80f
Graines sèches	●	●	●				
Graines imbibées 24 h	●	●	●				
Stade « cotylédons »	●	●	●		●	●	●
Racines	●	●	●		●	●	●
Feuilles jeunes	●	●	●		●	●	●
Feuilles vieilles	●	●	●		●	●	●
Bourgeons floraux	●	●	●		●	●	●
Fleurs	●	●	●	●	●	●	
Siliques immatures	●	●	●		●	●	●
Siliques pré-matures	●	●				●	

Tableau 2 : Bilan des analyses d'expression des gènes *AtBP80* chez une lignée sauvage WS-4
 Les traits pointillés séparent les groupes de gènes d'après l'arbre phylogénique (figure 49). Un rond noir indique la détection d'un transcrit d'un gène *AtBP80* dans l'organe considéré.

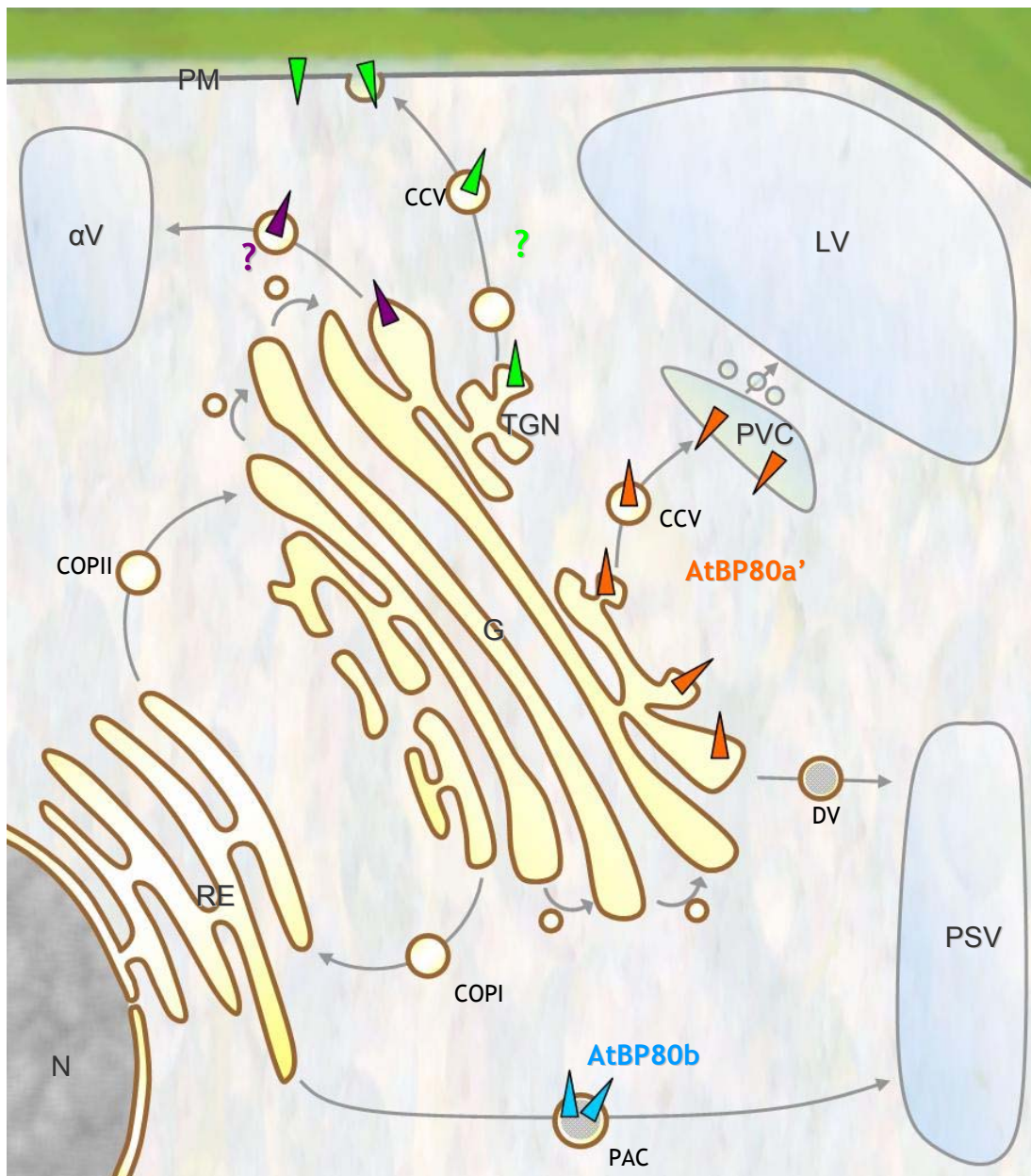


Figure 50 : Hypothèse proposant que chaque protéine BP80 ait un rôle particulier.

Une couleur différente est utilisée pour chaque type de protéine BP80. La protéine AtBP80b, en bleue, est impliquée dans le transport des protéines de réserve à la PSV. La protéine AtBP80a', en orange, serait impliquée dans l'adressage des protéines du TGN à la PVC. Deux autres voies de transport de protéines impliquant des protéines BP80 pourraient exister. Une protéine BP80, en violet, pourrait permettre l'adressage de protéines au troisième type de vacuole connu qui est marqué par les α -TIP (α V). Une autre protéine BP80, en vert, pourrait atteindre la membrane plasmique pour permettre l'endocytose de protéines solubles.

N, noyau ; RE, réticulum endoplasmique ; G, Golgi ; TGN, réseau *trans*-golgien ; PVC, prévacuole ; LV, vacuole lytique ; PSV, vacuole de réserve ; α V, vacuole possédant l'isoforme α -TIP, PM, membrane plasmique ; PAC, *Precursor-Accumulating* ; DV, vésicule dense ; CCV, vésicule à manteau de clathrine.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' vers 3')	Conditions PCR		
		Dénaturation	Cycles	Elongation finale
Tag5	CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC	94 °C 4 min	35 X	94 °C 1 min 55 °C 1 min 72 °C 1 min
BPα'-AV-3	TCACATGCATTCCATGAATGTG			
BPα'-AP-2	ATAACGCTATCAAGCCACGTG			

Tableau 3 : Amorces et conditions PCR pour l'analyse de la région d'insertion de l'ADN-T chez le mutant *vsr-a'*

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' vers 3')	Conditions PCR			
		Dénaturation		Cycles	Elongation finale
At2a'S	AAGTGAGATCAGCATGGGC	94° C 4 min	35 X	94° C 1 min	72° C 5 min
At2a'AS	AGGCGAGAAAACATCGTCGTT			55° C 1 min 72° C 1 min	
Tag5	CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC	94° C 4 min	35 X	94° C 1 min	72° C 5 min
BPa'-AP-2	ATAACGCTATCAAGCCACGTG			55° C 1 min 72° C 1 min	
Tag5	CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC	94° C 4 min	35 X	94° C 45 s	72° C 5 min
3' BPa' antisens	TATAGTCGACGGATCCACAAGTAACTCTCTTGTCTTG TTAGC			55° C 1 min 72° C 3 min	

Tableau 4 : Amorces et conditions PCR pour les analyses d'expression par RT-PCR chez le mutant *vsr-a'*

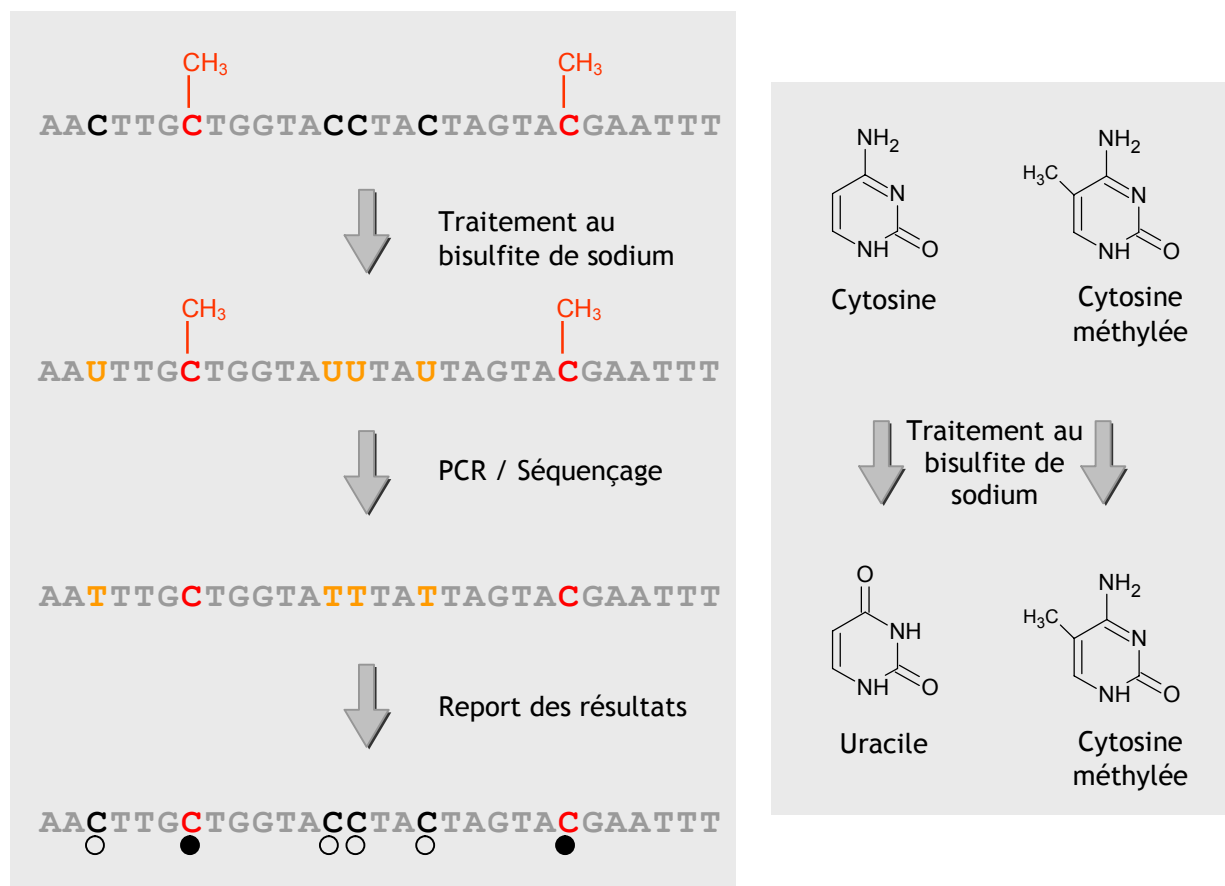


Figure 51 : Principe de l'analyse de méthylation par traitement de l'ADN au bisulfite de sodium

L'ADN à analyser est traité au bisulfite de sodium. Les cytosines méthylées (C) ne sont pas modifiées tandis que les cytosines non méthylées (C) sont converties en uraciles (U) par ce traitement. Cet ADN est ensuite amplifié par PCR, cloné puis séquencé. Si une thymine occupe l'emplacement d'une cytosine dans la séquence, cela signifie qu'une cytosine non méthylée occupait cette position. Si une cytosine est toujours présente à son emplacement dans la séquence, cela signifie qu'elle était méthylée. Les résultats sont portés en dessous la séquence : un cercle ouvert à chaque fois qu'une cytosine non méthylée a été trouvée et un cercle plein pour chaque cytosine méthylée.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' vers 3')	Conditions PCR		
		Dénaturation	Cycles	Elongation finale
Met-AV	AATTAATTGTTTTGTTATATGGAAGAGGT	94°C 2 min 80°C 30 s Ajout Taq	40 X 94°C 1 min 50°C 1 min 72°C 1,5 min	72°C 10 min
Met-AP	AAATAACACAGAACTGCTTCATCTTCAAA			
Met-Tag	GGTAATAGGATACTGGGATTCGTTTTGGAT	94°C 2 min 80°C 30 s Ajout Taq	40 X 94°C 1 min 50°C 1 min 72°C 1,5 min	72°C 10 min
Met-AP	AAATAACACAGAACTGCTTCATCTTCAAA			

Tableau 5 : Amorces et conditions PCR pour amplifier l'ADN traité au bisulfite de sodium

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' vers 3')	Conditions PCR		
		Dénaturation	Cycles	Elongation finale
Int11PDSsens	TATAGAATTCAAAGGTACTTTGATTGGTC	94° C 4 min	35 X	94° C 1 min 50° C 1 min 72° C 1,5 min
Int11PDSas	TATAAAGCTTAGCTATCTGGAGGAAGAC			
3' PDS sens	TATAGAATTCAAGCTTGAAGGATTCTACTTAGCTGGAG	94° C 4 min	40 X	94° C 45 s 65° C 1 min 72° C 1 min
3' PDS antisens	TATAGTCGACGGATCCCGTGAGATGTCAAATCTGTGAG			
3' BPa' sens	TATAGAATTCAAGCTTTGGACAGCCAACCCGAGATCC	94° C 4 min	40 X	94° C 45 s 65° C 1 min 72° C 1 min
3' BPa' antisens	TATAGTCGACGGATCCACAAGTAACCTCTCTTGTCTTG TTAGC			
3' BPa' sens	TATAGAATTCAAGCTTTGGACAGCCAACCCGAGATCC	94° C 4 min	40 X	94° C 45 s 65° C 1 min 72° C 1 min
3' BPa antisens	TATAGTCGACGGATCCAACTTTAAACACTTGATGTTTTG ATTCTATTGACTAGC			

Tableau 6 : Amorces et conditions PCR pour les constructions RNAi

Les sites de restriction ajoutés aux amorces sont soulignés. GAATTC=site *EcoRI*, AAGCTT=site *HindIII*, GTCGAC=site *Sall*, GGATCC=site *BamHI*.

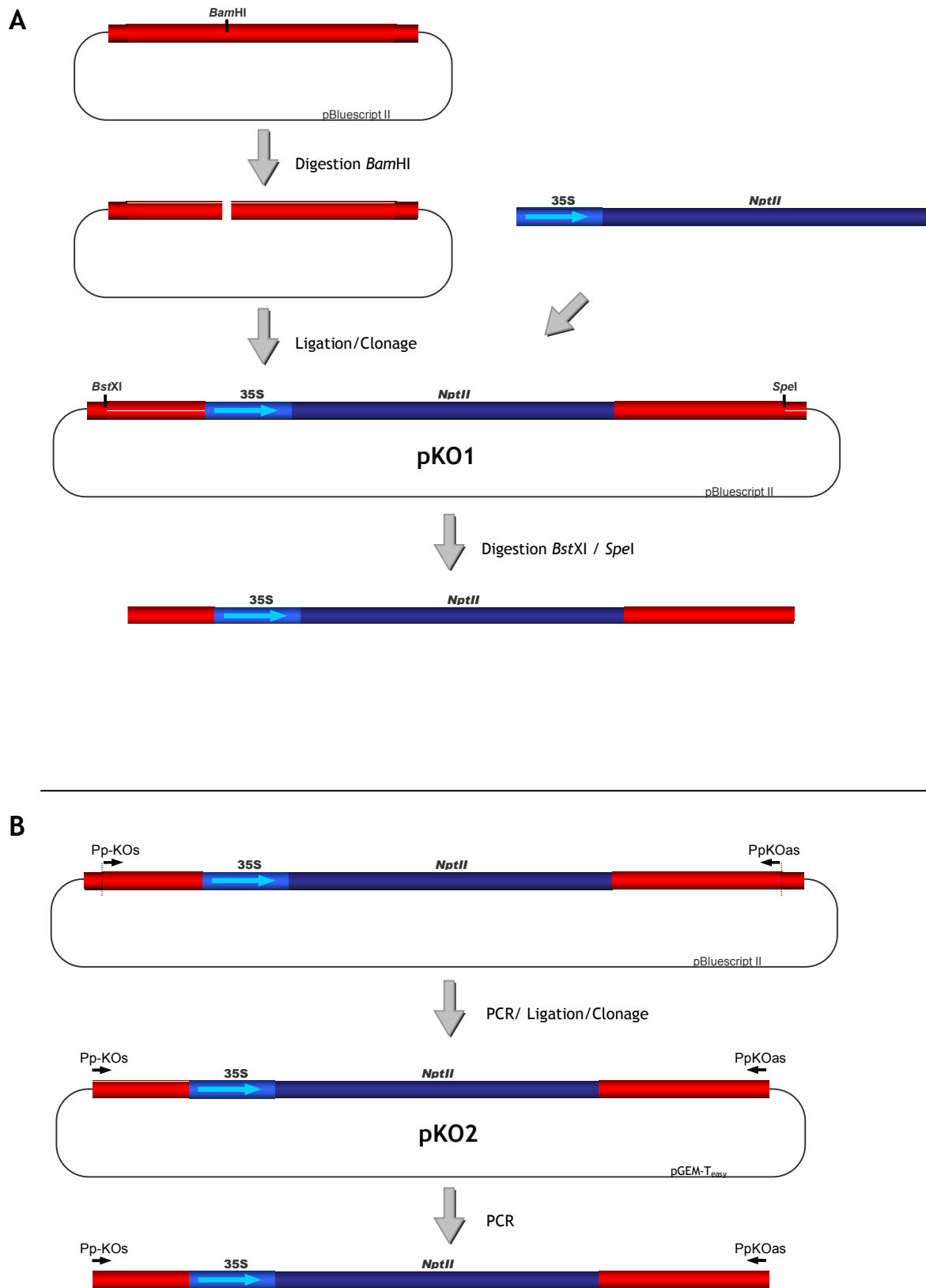


Figure 52 : Construction des vecteurs de remplacement

Les parties en rouge correspondent à l'ADNc et les parties en bleu à la cassette 35s-*NptII*. Les traits fins noirs représentent les vecteurs. **(A)** Construction du vecteur de remplacement pK01. La construction est faite dans le vecteur pBluescriptII. La construction linéaire est libérée par digestion avec les enzymes *Bst*XI et *Spe*I. **(B)** Construction du vecteur de remplacement pK02. La construction linéaire est amplifiée à partir du vecteur pK01 et clonée ensuite dans le vecteur pGEM-T_{easy}. Pour les transformations, la construction linéaire est libérée par PCR.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' vers 3')	Conditions PCR			
		Type d'ADN	Dénaturation	Cycles	Elongation finale
Pp-KOs	TATAGAGCTCATGGAAGTGGTGGCACTTCGTC	ADNc	94° C 4 min	35 X 94° C 45 s 55° C 1 min 72° C 3,5 min	72° C 10 min
Pp-KOas	TATAACTAGTACAACTAGTCACTGCAAGGAC				
Pp1s	CGGCACGAGCGGGAAGCAAGTGGTC	ADNc	94° C 4 min	40 X 94° C 1 min 55° C 1 min 72° C 2 min	72° C 10 min
Pp1459as	AAGGTGGATCGTGACAGGACAATAATG				
		ADN génomique	94° C 4 min	40 X 94° C 1 min 55° C 1 min 72° C 3,5 min	72° C 10 min
Pp1s	CGGCACGAGCGGGAAGCAAGTGGTC	ADN génomique	94° C 4 min	40 X 94° C 1 min 50° C 1 min 72° C 2,5 min	72° C 10 min
NptIIas	ATCGGGAGCGGCGATACCGTA				
NptIIIs	GAGGCTATTCGGCTATGACTG	ADN génomique ou ADNc	94° C 4 min	40 X 94° C 1 min 55° C 1 min 72° C 1 min	72° C 10 min
NptIIIs	ATCGGGAGCGGCGATACCGTA				

Tableau 7 : Amorces et conditions PCR pour l'analyse des transformants chez la mousse *P. patens*