NORD : IMPACTS DES BIOTECHNOLOGIES RECHERCHES Approches moléculaires de la qualité et du développement des graines

Developed countries: The impact of biotechnologies Research Molecular analysis of seed quality and development

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 8, Numéro 5, 487-95, Septembre - Octobre 2001, Dossier : Aspects des filières semencières Nord/Sud

Auteur(s) : Bertrand DUBREUCQ, Philippe GRAPPIN, Martine MIQUEL, Helen NORTH, Christine ROCHAT, Marc JULLIEN, UMR 204, Inra/INAPG, Biologie des semences Inra, route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France.

Résumé : Les semences constituent le maillon essentiel de la production végétale car elles sont à la fois le vecteur de la multiplication des plantes et la source de denrées alimentaires. L'agriculture moderne exige le respect des critères de qualité des semences qui ne sont évidemment pas les mêmes suivant que l'utilisation des semences sera alimentaire, industrielle ou de simple semis. Du point de vue alimentaire ou industriel, la qualité se définit en fonction de la nature et du rendement de l'extraction du produit d'intérêt. Lorsque la graine est utilisée comme semence, la qualité est appréciée suivant des critères qui sont la conformité génétique, l'état sanitaire et la capacité germinative. Les normes qualitatives alors retenues concourent à l'obtention de peuplements homogènes et vigoureux. La semence idéale doit évidemment combiner ces différents critères de qualité. Les bases biologiques qui sous-tendent la plupart des critères de qualité sont encore très mal connues et leur élucidation demeure un défi scientifique majeur.

Summary : Seeds are essential for plant propagation and crop production and must satisfy the increasingly diverse requirements of both modern agriculture and the agro-industry. The biological bases of seed quality are still poorly understood. Progress in this area will no doubt emerge from the identification of genes that control quality parameters, through the tremendous advances made using genomic based techniques. In this way, the use of 50,000 *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant lines, developed in France, at the Inra Versailles has enabled us to isolate genes whose functions are essential for seed development and maturation, e.g. storage compound synthesis and deposition, and tegument composition. Mutants have been isolated that are either strongly impaired in protein glycosylation (glycosidase I mutant) or whose lipid composition is modified (diacylglycerol acyltransferase: DGAT mutant). The corresponding cloned genes should prove useful in biotechnological applications for the reduction of the allergenicity of engineered proteins produced in plants and for modifying seed lipid composition respectively. New Transparent Testa genes have also been obtained that play a role in the control of pigment deposition in the seed testa. Engineering the composition of seed coats is a real challenge for the improvement of the nutritional value of seeds for animal feeding. The zeaxanthin epoxidase gene has been cloned, as this is required for the biosynthesis of the hormone abscisic acid (ABA). Using this gene it has been possible to

engineer ABA levels and seed dormancy in transgenic plants. To identify other genes playing a role in dormancy control, a systematic screen is being employed to identify genes differentially expressed between dormant (D) and non-dormant (ND) seeds of *Nicotiana plumbaginifolia* using "cDNA-AFLP". Six hundred genes have been identified in this way and their expression analysed by macro arrays. Most of them can be classified in four groups based on their functions, from imbibition through to germination: cellular repair genes; signal transduction genes; housekeeping genes; storage compound degradation genes. A reverse genetic screen for knockout mutants in the T-DNA mutant collection is in progress for some of these genes, in order to confirm their role in the control of seed dormancy and germination.

Keywords : seed, storage compounds, lipids, seed coat, germination, dormancy, abscisic acid, Arabidopsis, gene function identification.

ARTICLE

Chez les Angiospermes, la graine est le produit de la reproduction sexuée. Elle est constituée à maturité d'un embryon, destiné à donner la nouvelle plante, de tissus de réserves (externes ou internes à l'embryon suivant les espèces) et d'enveloppes protectrices (téguments) d'origine maternelle [1]. Le développement de la graine sur la plante mère suit trois étapes chronologiques (*figure 1*). L'embryon se forme tout d'abord pendant une phase de morphogenèse précoce. La phase suivante, dite de synthèse des réserves, voit l'accumulation de lipides, de protéines et de glucides en proportion variable selon les espèces. Ces réserves constituent les nutriments qui seront nécessaires au développement de la jeune plante lors de la future germination. La graine subit ensuite une phase de maturation caractérisée *in fine* par une forte déshydratation précédée par la mise en place de la dormance (incapacité temporaire de la graine à germer) et l'acquisition d'une tolérance à la dessiccation. La graine récoltée dans cet état (et subissant éventuellement un séchage complémentaire) peut être conservée et utilisée en tant que produit agro-alimentaire ou comme unité de multiplication. Dans ce dernier cas, après une durée de conservation variable, elle va servir à assurer une nouvelle génération de plantes. Pour cela, la graine est semée, c'est-à-dire placée dans des conditions d'environnement favorables à sa germination (disponibilité d'eau, de lumière et d'oxygène, températures adaptées). La première étape de la germination est la reprise d'eau par la graine sèche. Cette phase d'imbibition est suivie par la germination *stricto sensu* définie comme le moment où la radicule émerge au travers des téguments de la graine. Cependant, la graine semée n'est pas toujours capable de germer immédiatement car elle peut avoir conservé tout ou partie de la dormance acquise sur la plante mère. La dormance des graines disparaît le plus souvent naturellement, au fil du temps, pendant le nécessaire stockage préalable aux semis et cet état est généralement peu marqué chez les plantes de grandes cultures. Une autre source de difficulté peut venir d'un vieillissement trop rapide des semences conservées qui leur fait perdre tout ou partie de leur capacité germinative.

Les mécanismes de contrôle de la maturation, de la dormance, de la germination et du vieillissement des graines sont encore mal connus, mais on s'accorde généralement sur le fait que deux phytohormones, l'acide abscissique (ABA) et les gibbérellines (GA), jouent un rôle important dans la plupart de ces mécanismes. L'ABA est reconnu responsable de l'induction de la dormance et de la tolérance à la dessiccation lors du développement de la graine sur la plante mère, alors que les GA stimulent la germination [2, 3].

Les graines et leurs qualités sont depuis longtemps un sujet d'étude pour des généticiens, des agronomes, des physiologistes, des nutritionnistes ou des chimistes. Cependant, particulièrement en France, assez peu de travaux systématiques portent sur l'analyse moléculaire de la qualité des graines. Pourtant, il est évident que de telles connaissances permettront à la fois de mieux comprendre le déterminisme génétique des composantes de la qualité, de rendre plus efficace la sélection classique, d'améliorer les critères de qualité et, à plus long terme, d'améliorer cette qualité grâce aux biotechnologies. Pour notre part, nous travaillons principalement avec *Arabidopsis thaliana* (l'arabette) qui est une petite crucifère de la famille des Brassicacées comme le colza ou la moutarde. Depuis plus d'une dizaine d'années, cette espèce s'est peu à peu imposée comme modèle pour les études de génétique moléculaire. En effet, *Arabidopsis* présente de nombreux avantages : petit génome (10^8 paires de bases, 5 chromosomes, 24 000 gènes), temps de génération très court (deux à trois mois), grand nombre de descendants (plus de 10 000 graines par plante). Des cartes génétiques et physiques précises ont été établies et des collections de mutants générées. La séquence de son génome est disponible [4]. Enfin, en ce qui concerne la biologie des graines, *Arabidopsis* est un bon modèle : en effet, l'embryogenèse et la maturation des graines ont fait l'objet de nombreux travaux [5, 6]. Par ailleurs, on sait que la plupart des données moléculaires obtenues chez *Arabidopsis* sont utilisables pour rechercher des séquences homologues chez d'autres espèces végétales [7]. Nous utilisons donc les outils de la génomique disponibles chez *Arabidopsis* pour identifier les gènes impliqués dans l'établissement et le contrôle de la qualité des semences. Nous nous intéressons ainsi à différents aspects du contrôle, d'une part, de la maturation de la semence et de la synthèse des réserves et, d'autre part, de la germination.

Maturation des graines et synthèse des réserves

La graine mature d'*Arabidopsis* est de petite taille et se compose de cinq couches de cellules compactées constituant les téguments, d'une couche résiduelle d'albumen et de l'embryon avec ses deux cotylédons, dont les cellules sont chargées de réserves (*figure 2 A et B*). Les composés stockés dans la graine mature sont principalement des lipides (30 à 35 % environ de la masse sèche) et des protéines de réserve (30 à 35 % également). C'est donc une graine de type oléoprotéagineuse.

Les trois phases du développement de la graine d'*Arabidopsis* sont caractérisées par un métabolisme spécifique. La phase de division cellulaire lors de la morphogenèse embryonnaire se distingue par une synthèse d'amidon et une forte teneur en hexoses. Lors de la phase d'accumulation des réserves, les lipides et les protéines sont synthétisés très activement dans les cotylédons. En fin de phase de maturation, du saccharose et, dans une moindre mesure, du raffinose et du stachyose sont synthétisés (*figure 1*). Ces sucres pourraient jouer un rôle dans l'acquisition par la graine de la tolérance à la déshydratation. Les lipides de réserve de la graine sont stockés, sous la forme de triacylglycérols (TAG), dans des corps lipidiques [8]. Les triacylglycérols sont des esters de glycérol sur lesquels des acides gras sont estérifiés à chacun des trois groupements hydroxyles. Huit acides gras

(de 16 à 18 atomes de carbone et de 1 à 3 double-liaisons) sont fréquemment présents dans les lipides de réserve de la plupart des graines oléagineuses. Bien que la composition des TAG varie largement selon les espèces, les acides gras à 18 atomes de carbone et les acides gras polyinsaturés dominent généralement. Néanmoins, des centaines d'autres acides gras ont été décrits et sont spécifiques d'une famille particulière, comme l'acide ricinoléique (18:1 12-OH) chez le ricin [9]. Si de nombreuses étapes (enzymes, gènes) du métabolisme lipidique sont connues chez les végétaux, la compartimentation des réactions ainsi que leur régulation restent toutefois à élucider. Les protéines de réserve chez *A. thaliana* appartiennent, comme pour le colza, à deux familles de protéines majeures, les globulines et les albumines. La fraction globuline est principalement constituée par une protéine de type 12S, la cruciférine. La fraction majeure des albumines est une protéine de type 2S, l'arabine, proche de la napine du colza [10].

Si de nombreuses enzymes participant à telle ou telle voie métabolique sont connues au niveau tant biochimique que moléculaire, il reste de nombreux points à élucider pour comprendre les mises en réserve dans les graines, qui concernent notamment les régulations de ces chaînes métaboliques. Les mécanismes mis en jeu sont probablement complexes et nécessitent de nombreux contrôles. Une étude de génétique moléculaire systématique de la qualité des graines, utilisant les outils disponibles à l'heure actuelle en biologie végétale, a été mise en place. Nous recherchons des mutants modifiés pour la morphologie (couleur, taille, forme) ou la physiologie des graines qui peuvent être affectés dans des processus fondamentaux, comme le développement embryonnaire ou la maturation de la graine. Pour trouver ces types de mutants, nous avons utilisé la collection de mutants d'insertion d'*A. thaliana* (écotype Wassilevskija), créée à la station de génétique et d'amélioration des plantes (INRA, Versailles). L'inactivation des gènes est réalisée par insertion *in planta* d'un ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens* [11]. L'ADN-T comporte, entre autres, deux gènes marqueurs : le gène *BAR* qui confère la résistance à l'herbicide BASTA (phosphinothricine), utilisé pour la sélection des transformants primaires en serres, et le gène *NPTII* dont le produit, la néomycine phosphatidyltransférase, détoxifie un antibiotique (la kanamycine), permettant la sélection *in vitro* des descendants. La collection compte actuellement 50 000 transformants primaires, amplifiés par autofécondations, ce qui, donne en théorie, une insertion toutes les 2 kilobases.

Nous avons isolé de la collection une centaine de mutants visiblement affectés dans le remplissage et la maturation des graines. Ces mutants sont étudiés aux niveaux biochimique (nature et quantité des lipides, des protéines et des glucides), physiologique (conséquence sur la viabilité et la vigueur germinative de la graine) et moléculaire (clonage du gène impliqué, caractérisation de son produit et de la régulation de son expression).

Mutant de glucosidase I et rôle de la N-glycosylation dans le développement de la graine

Le mutant *gcs1-1* a été isolé sur son incapacité à germer et le phénotype ridé de ses graines (*figure 2 A*). Un test de viabilité montre que les embryons ne sont pas morts, même si leur activité métabolique est faible. La morphogenèse de l'embryon est bloquée au stade dit « cœur » bien qu'il continue à grossir et finisse par remplir la graine. Les cellules de l'embryon sont plus grosses et moins nombreuses que celles du sauvage, en particulier dans les couches cellulaires les plus externes (*figure 2 B*). Des analyses biochimiques montrent que les lipides ne sont pas affectés mais que la quantité de protéines de réserve est très réduite chez le mutant.

Le gène inactivé chez ce mutant, *AtGCS1*, code une alpha-1,2-glucosidase membranaire du réticulum endoplasmique [12]. Des analyses ont montré une absence totale de glycanes complexes chez le mutant, confirmant ainsi qu'un gène codant une glucosidase I végétale avait bien été identifié. Le gène *AtGCS1* est donc le premier gène codant pour une glucosidase I végétale caractérisée. Il est exprimé de façon constitutive dans tous les organes et tissus testés et la protéine joue un rôle essentiel [13]. Chez les plantes, comme chez tous les eucaryotes, la N-glycosylation consiste en la liaison covalente d'un sucre plus ou moins complexe sur une protéine, au niveau d'un site de glycosylation. Les glycanes jouent un rôle important dans de nombreux mécanismes. Ils permettent notamment le maintien de la structure de protéines dans une conformation biologiquement active, ils assurent une protection de la chaîne peptidique vis-à-vis de l'attaque des enzymes protéolytiques ou interviennent dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire. En particulier, il a été établi que le bon fonctionnement de la glucosidase I est essentiel pour l'acquisition d'une conformation normale des protéines [14]. La mutation du gène *AtGCS1* pourrait entraîner une malformation généralisée des glycoprotéines indispensables au développement normal de l'embryon mais non à sa viabilité. Certains résidus des glycoprotéines végétales sont par ailleurs connus pour provoquer des allergies. Dans ce cadre, la caractérisation d'un tel mutant ouvre des perspectives biotechnologiques importantes pour la production, dans les plantes, de protéines d'intérêt thérapeutique, dénuées d'allergénicité.

Mutant de téguments

Les téguments (testa) interviennent dans différents aspects déterminant la qualité de la graine. Les plus importants sont la nutrition de l'embryon [15] et la taille de la graine [16, 17]. En outre, des mutants de forme ou de couleur des téguments (mutants *transparent testa*, *tt*) (*figure 2 D*) montrent une dormance et une viabilité réduite ainsi qu'une perméabilité aux solutés augmentée [18]. Un crible visuel de recherche de mutants de coloration de la graine a été mené dans la collection de mutants d'insertion.

Vingt-deux mutants de pigmentation ont été isolés qui se répartissent en 13 groupes de complémentation. Les proanthocyanidines (PA ou tannins condensés) sont les pigments majoritaires des graines chez *A. thaliana* et s'accumulent dans l'endothélium (la couche tégumentaire la plus interne) durant les phases très précoces de l'embryogenèse, sous la forme de précurseurs incolores. En s'oxydant au cours des phases de maturation et de dessiccation, les PA confèrent à la graine sa couleur brune caractéristique. Le contenu en PA dans l'endothélium des graines des mutants est très altéré. Les mutants isolés ressemblent aux mutants *tt*, dont la composition et/ou la teneur en flavonoïdes dans les téguments des graines sont modifiées [19-21].

Les mutations étudiées sont toutes monogéniques, nucléaires, récessives et à effet maternel [22]. Quatre des gènes impliqués n'étaient pas encore connus et ont été clonés (*TT2*, *TT8*, *TT15* et *TT16*). Une fonction a pu être assignée pour deux d'entre eux (*TT8* et *TT2*) qui codent respectivement pour des facteurs de transcription de type betaHLH et MYB. Les produits de ces gènes participeraient à la formation d'un complexe activateur pour la transcription des gènes des enzymes de biosynthèse des flavonoïdes (*DFR* et *BAN*) [23, 24]. Un troisième partenaire (*TTG1*) déjà connu, qui code également pour une fonction de régulation, pourrait lui aussi être présent dans ce complexe.

La structure et la composition des téguments, en particulier la présence de flavonoïdes, sont des éléments importants de la valeur agro-industrielle des graines. En effet, bien que les polyphénols présentent des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes ou vitaminiques bénéfiques pour la santé, certains d'entre eux sont en partie responsables d'une diminution du rendement de l'extraction protéique des tourteaux et d'une réduction de la digestibilité des aliments. L'isolement des gènes contrôlant la composition chimique des téguments pourrait, à terme, fournir les outils biotechnologiques de leur modification.

Mutant de synthèse de réserves lipidiques

ABX45 est le premier mutant ridé étudié au laboratoire. Il possède une teneur réduite en huile et une composition modifiée en acides gras [25] (*figure 2 A et C*). La mutation est spécifique de la graine et ne change pas la composition en acides gras des membranes dans la partie aérienne de la plante ou dans les racines. Nous avons montré que ABX45 est allélique au mutant AS11 précédemment isolé et affecté pour l'activité DGAT (diacylglycérol acyltransférase EC 2.3.1.20). Le gène codant pour la DGAT humaine étant connu, nous avons identifié par homologie dans les bases de données, puis isolé, un gène putatif de DGAT d'*Arabidopsis* et l'ADNc correspondant. Le gène putatif *TAG1* est composé de 16 exons qui codent une protéine de 520 acides aminés dont la séquence est similaire à plus de 70 % à la protéine de la DGAT humaine. L'analyse moléculaire du gène DGAT chez les deux mutants ABX45 et AS11 a révélé une mutation dans chacun des gènes, confirmant ainsi que le gène DGAT putatif que nous avons identifié code bien une DGAT. La DGAT réalise la dernière étape de la synthèse des huiles. Elle catalyse l'acylation de la position sn-3 du diacylglycérol pour former les triglycérides.

La modification de l'abondance de cette enzyme dans les graines oléagineuses en cours de maturation pourrait conduire à des modifications intéressantes de la teneur en huile et/ou de la nature des huiles [26]. La caractérisation du gène codant pour la DGAT permet donc d'envisager son utilisation comme marqueur moléculaire ou transgène pour l'amélioration des plantes ou des micro-organismes, afin de produire des huiles dédiées aux différentes utilisations industrielles et alimentaires.

Contrôle de la germination et dormance

Pour un physiologiste, la germination débute au moment où la graine mature est semée dans des conditions favorables et se termine dès le début de l'élongation radiculaire qui conduira à la formation d'une nouvelle plante. L'agronome considérera, en pratique, la levée au champ comme le meilleur indice d'une germination efficace. La germination se caractérise par une première phase d'entrée d'eau dans la graine (l'imbibition) qui s'accompagne d'une reprise d'activité métabolique intense, puis d'une deuxième phase d'augmentation de la teneur en eau qui signe l'élongation radiculaire et l'accomplissement de la germination (*figure 1*). La dormance s'exprime dans la graine, au cours de la première phase, en bloquant ou en retardant l'induction de l'élongation radiculaire [2, 3]. Chez les espèces sauvages, la dormance apporte un avantage adaptatif. Cet état va en effet permettre à une graine, éventuellement hydratée, de rester viable dans le sol sans germer, jusqu'à ce que l'accomplissement de sa germination coïncide avec des conditions environnementales propices à la croissance et la survie de la nouvelle plante. Chez les espèces cultivées, ce caractère a toutefois été contre-sélectionné par les agriculteurs ancestraux soucieux d'obtenir une germination rapide de leurs semis. Cependant, des problèmes liés à la dormance persistent pour certaines espèces cultivées. Ainsi, chez la laitue, une dormance résiduelle peut compromettre la germination lorsque

les semences sont traitées par enrobage. À l'inverse, une dormance trop faible peut entraîner des germinations sur pied chez les céréales, ce qui conduit à des pertes de rendement et de qualité nutritionnelle. La capacité germinative d'un lot de semences peut donc être affectée par un état de dormance inadapté. Elle peut aussi être diminuée par une perte de viabilité des semences causée par les différentes manipulations qu'elles subissent et par leur vieillissement au cours des stockages.

Le fait qu'il existe assez souvent une corrélation entre la capacité de conservation d'une semence et son niveau de dormance après la récolte ([2] et nos observations) montre que ces deux aspects de la physiologie de la graine pourraient être gouvernés par des mécanismes communs. Dans ce contexte, une meilleure compréhension des mécanismes responsables de l'état de dormance devrait permettre de fournir des outils d'estimation de la qualité germinative et du potentiel de conservation des lots de semences.

Rôle de l'acide abscissique dans l'expression de la dormance des graines, biosynthèse de l'acide abscissique

Deux théories principales, hormonale et métabolique, ont été émises pour expliquer les mécanismes de la dormance des semences [2]. La théorie de la balance hormonale explique la dormance par les effets antagonistes d'hormones inhibant (l'acide abscissique) et stimulant la germination (principalement les gibbérellines). La théorie métabolique postule des perturbations de la respiration spécifiques aux graines dormantes.

Le rôle de l'ABA dans les étapes tardives de la maturation de la graine a été très étudié [3]. Le taux d'ABA augmente transitoirement pendant la mise en place des réserves et, en parallèle, la dormance et la tolérance à la dessiccation se mettent en place (*figure 1*). Certains mutants déficients en ABA produisent des graines vivipares (qui germent sur pied, mutants viviparous -vp- chez le maïs) ou qui présentent une dormance réduite et, parfois, des défauts dans l'accumulation des réserves et la tolérance à la dessiccation.

En l'état actuel des connaissances, l'état de dormance des graines matures ne peut être évalué que par un test d'aptitude à la germination, conduit par définition dans un environnement favorable à un métabolisme actif de la semence. Ce test mesure donc le résultat, en termes de germination, d'un métabolisme spécifique aux graines dormantes, qui est l'expression de l'état de dormance. L'objectif essentiel de notre travail est de comprendre les mécanismes de cette expression et de son interaction avec le processus germinatif. Nous avons donc entrepris une analyse approfondie de la dormance sur un matériel biologique adapté à cet objet, c'est-à-dire la lignée PbH1D de *Nicotiana glauca* et l'écotype Cvi d'*A. thaliana* qui présentent une dormance marquée. Des études physiologiques et biochimiques menées sur ces deux plantes modèles nous ont permis d'analyser l'effet et le mode d'action de facteurs environnementaux (température, lumière, pression osmotique, etc.) et des phytohormones sur l'expression de la dormance pendant l'imbibition des graines. À partir de dosages immunochimiques après fractionnement en HPLC, il a été démontré que les graines dormantes (D) synthétisent et accumulent de l'ABA, contrairement aux graines non dormantes (ND), pendant les premières heures d'imbibition (*figure 1*) [27].

La suppression de cette synthèse par un inhibiteur spécifique de l'ABA lève la dormance. Ce résultat, associé à d'autres analyses physiologiques, nous a permis d'établir un modèle du contrôle de la germination où l'ABA, l'acide gibbérélique (GA) et d'autres facteurs interagissent en début d'imbibition pour programmer le moment où la graine sera compétente pour l'induction de la germination [28].

La voie de biosynthèse de l'ABA (*figure 3 A*) a été élucidée, depuis de nombreuses années, grâce à des études biochimiques et à l'analyse de mutants déficients. Toutefois, les gènes correspondants n'ont été que récemment identifiés et certains aspects de leur régulation restent encore à explorer. L'ABA est synthétisé à partir de caroténoïdes oxygénés comportant 40 atomes de carbone, appelés xanthophylles. Après époxydation et isomérisation, ils subissent une réaction de clivage qui donne naissance à la xanthoxine, précurseur de l'ABA, à 15 atomes de carbone. Le gène codant pour la zéaxanthine époxydase (ZEP) a été isolé en premier et cette enzyme convertit la zéaxanthine en violaxanthine [29]. L'étape de clivage de la violaxanthine et la néoxanthine est catalysée par la famille multigénique des 9-*cis*-époxy-dioxygénases (NCED), dont le premier membre a été identifié chez le maïs [30, 31]. Ensuite, la conversion de la xanthoxine en ABA-aldéhyde fait intervenir une déshydrogénase/ réductase à courte chaîne (ABA2) [32]. Enfin, l'ABA aldéhyde oxydase (ABA-AO) catalyse la dernière étape de synthèse de l'ABA [33, 34]. L'activité de cette enzyme nécessite la présence d'un cofacteur à molybdène (MoCo) rendu actif par une sulfurase (ABA3) [35, 36]. Le clonage de ces gènes a été facilité par l'isolement de mutants déficients après mutagenèse d'insertion ou mutagenèse chimique. Ces mutants ont pu être sélectionnés grâce à leur phénotype de dormance réduite ou de sensibilité au stress hydrique. De nouveaux cribles ont été entrepris au laboratoire pour identifier de nouveaux mutants d'*Arabidopsis* affectés dans les étapes restant encore à élucider. Par ailleurs, la disponibilité de la séquence complète du génome d'*Arabidopsis* offre aussi la possibilité de caractériser le rôle de gènes putatifs dans la synthèse de l'ABA par génétique inverse, en recherchant des mutants d'insertion dans les collections disponibles [37]. Enfin, des mutants et des gènes, intervenant dans les mécanismes de régulation de la synthèse d'ABA, n'ont jusqu'à ce jour pas encore été identifiés. Leur analyse serait particulièrement utile pour mieux comprendre la régulation de processus physiologiques tels que la dormance où l'ABA joue un rôle essentiel. Néanmoins, l'étude et la modification de l'expression de certains gènes de biosynthèse ont déjà contribué à une meilleure connaissance de l'effet de la synthèse de l'ABA sur le contrôle de la dormance. Nous avons en effet obtenu des plantes transgéniques de *N. plumbaginifolia* exprimant un ARNm ZEP antisens sous contrôle d'un promoteur constitutif, qui présentent une faible teneur en ABA dans les graines et une dormance réduite [38] (*figure 3 B*). Au contraire, l'expression d'un ARN sens ZEP chez *N. plumbaginifolia* [38] ou NCED chez la tomate [39] augmente la synthèse d'ABA et renforce la dormance (*figure 3 B*). Ces résultats ouvrent la voie à la manipulation d'ABA dans la plante et dans la graine. Ils permettent, en particulier, d'envisager l'adaptation du niveau de dormance d'espèces cultivées aux exigences agronomiques ou agro-industrielles. Dans ce but, il convient de modifier la synthèse d'ABA uniquement dans la graine, sans effet sur les tissus végétatifs. Nous testons donc actuellement, pour contrôler l'expression du gène ZEP, un certain nombre de promoteurs dont l'expression est spécifique des graines et qui permettraient de modifier la synthèse d'ABA à des stades différents du développement des graines.

Analyse systématique de gènes impliqués dans l'expression de la dormance et de la qualité germinative, approche transcriptome

Nous avons recherché les gènes qui présentent une spécificité d'expression liée soit à l'état dormant (D), soit à l'état non dormant (ND), en développant chez *N. plumbaginifolia* l'approche de cDNA-AFLP (polymorphisme de longueur des fragments amplifiés d'ADNc) ciblée sur des graines D et ND sèches et en début d'imbibition, précisément au stade où les analyses physiologiques ont révélé qu'une néosynthèse d'ABA jouait un rôle clé dans l'expression de la dormance. Ces gènes sont potentiellement les acteurs essentiels des mécanismes qui contrôlent la germination et peuvent participer soit au contrôle de la synthèse de l'ABA et des GA, soit à la synthèse proprement dite de ces hormones, soit aux mécanismes d'induction ou de rétention de la germination sous le contrôle de ces deux hormones.

Dans notre cas, le cDNA-AFLP a permis d'identifier 600 séquences correspondant à des ARNm différenciellement accumulés dans des graines dormantes et non dormantes [40]. Afin de réaliser une analyse approfondie de l'ensemble de ces gènes et de déterminer lesquels jouent un rôle plus spécifique dans le contrôle de la germination, nous avons développé et adapté la technique des *macroarrays* (filtres haute densité, *figure 4*). Cette approche, fondée sur l'utilisation des outils de la génomique fonctionnelle, permet une caractérisation systématique et globale de l'expression et de la régulation de ces 600 gènes en corrélation avec la physiologie de la dormance. Des répliques de l'ensemble des clones sont déposées sur des filtres à l'aide d'un robot (Qbot, accessible au Génoscope d'Évry). Ces filtres sont analysés par des hybridations comparatives contre des populations d'ARN marquées, issues de graines dans différents états physiologiques relatifs à la germination (*figure 4*). Nous multiplions actuellement l'analyse de ces filtres pour recueillir plus d'informations sur le comportement d'expression de l'ensemble de ces gènes (effet du vieillissement, de la lumière, de la température, de l'oxygène, de la pression osmotique, de l'ABA, des GA). L'analyse des filtres haute densité permet également de détecter si plusieurs gènes sont soumis à une même régulation et de tester l'interaction de leur produit dans le contrôle de la germination.

Les résultats obtenus par cette approche globale et systématique confirment que ces mécanismes de contrôle sont très complexes et font intervenir l'expression d'un grand nombre de gènes. Ces gènes ont parfois été décrits dans la littérature et peuvent être classés en quatre catégories fonctionnelles potentiellement impliquées dans les mécanismes biochimiques et physiologiques déjà décrits sur le contrôle de la germination. Il est assez frappant de constater qu'une première catégorie de gènes décrits comme impliqués dans la réparation des dégâts occasionnés dans la graine au cours de sa déshydratation et de sa conservation [41] se révèlent amplifiés par le stress hydrique et oxydatif de l'imbibition (enzymes de détoxification des radicaux libres, de réparation de l'ADN, des protéines, etc.). Ces gènes doivent jouer un rôle très important dans la viabilité et la vigueur germinative. La deuxième catégorie regroupe essentiellement des gènes impliqués dans la transduction de signaux et la réponse cellulaire, à la lumière, aux facteurs de croissances ABA et GA et aux stress abiotiques imposés à la graine hydratée. La troisième catégorie de gènes concerne des fonctions de ménage, intervenant dans la respiration, la synthèse d'ARN, de protéines, etc. La quatrième catégorie concerne des fonctions impliquées dans l'accomplissement de la germination, à savoir des gènes codant pour des enzymes de mobilisation des réserves participant probablement à l'élongation des

cellules de la racine. Certains de ces clones sélectionnés sur les critères d'un profil d'expression intéressant ou d'homologies de séquences avec des fonctions originales déjà présentes dans les bases de données (phospholipase D ou kinase participant à la transduction de signal ABA, etc.) sont d'ores et déjà étudiés plus en détail afin de déterminer leur rôle fonctionnel dans le contrôle de la germination. Une recherche de mutants *knockout* (mutant qui ne produit plus la protéine correspondant au gène) pour ces gènes, en utilisant les approches de génétique inverse sur la collection des 50 000 lignées de mutants d'insertion ADN-T d'*Arabidopsis*, et la réalisation de plantes transgéniques modifiées pour l'expression du gène étudié devraient permettre de mieux comprendre le rôle fonctionnel de ces gènes dans le contrôle de la germination et d'évaluer la pertinence de leur utilisation pour diverses applications biotechnologiques.

CONCLUSION

Les approches de génomique fonctionnelles que nous développons permettent de définir la nature et la fonction d'un nombre grandissant de gènes qui jouent un rôle essentiel dans les différentes étapes du développement de la graine, de sa formation sur la plante mère à sa germination finale en passant par sa conservation. La découverte de la nature et de la fonction de ces gènes ouvre de larges perspectives d'applications en termes de biotechnologie et d'amélioration des plantes *via* la manipulation de leur niveau d'expression. Un autre potentiel d'application de ces connaissances réside dans la définition de marqueurs moléculaires d'états physiologiques (dormance, viabilité, vigueur) susceptibles de fournir les outils prédictifs fiables et d'usage commode que les semenciers recherchent désespérément depuis toujours.

REFERENCES

1. COME D, CORBINEAU F (1998). Semences et germination. In : MAZLIAK P, éd. *Physiologie végétale* II. Paris : Hermann ; 185-313.
2. BEWLEY, BLACK M (1994). *Seeds, Physiology of development and germination*. Second ed. New York, London : Plenum Press ; 445 p.
3. BEWLEY JD (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9 : 1055-66.
4. The Arabidopsis Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408 : 796-815.
5. JÜRGENS G (1994). Pattern formation in the embryo. In : *Arabidopsis*, MEYEROWITZ EM, SOMERVILLE CR, eds. New York : CHS Press ; 297-312.
6. MEINKE DW (1994). Seed development in *Arabidopsis thaliana*. In : *Arabidopsis*, MEYEROWITZ EM, SOMERVILLE CR, eds. New York : CHS Press ; 253-95.
7. PEREZ P (1994). Applications de la connaissance du génome d'*Arabidopsis thaliana* à l'amélioration des espèces cultivées : l'expérience d'un chercheur d'une firme de production de semences. *CR Acad Agric Fr*, 80 : 75-83.
8. TRÉMOLIERES A (1998). *Les lipides végétaux. Voies de biosynthèse des glycérolipides*. Paris, Bruxelles : De Boeck & Larcier ; 120 p.

9. MIQUEL M, BROWSE J (1995). Lipid biosynthesis in developing seeds. In : KIGEL J, GALILIG, eds. *Seed development and germination*. New York : Marcel Dekker ; 169-93.
10. GUÉGUEN L, LEMARIÉ J (1996). Composition, structure et propriétés physicochimiques des protéines de légumineuses et d'oléagineux. In : GORDON B, ed. *Protéines végétales*. Coll. Sciences et Techniques alimentaires. Paris : Tech Doc ; 665 p.
11. BECHTOLD N, ELLIS J, PELLETIER G (1993). In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Acad Sci Paris*, 316 : 1194-9.
12. BOISSON M, GOMORD V, AUDRAN C, *et al.* (2001). *Arabidopsis* glucosidase I mutants reveal a critical role of N-glycan trimming in seed development. *EMBO J*, 20 : 1010-9.
13. KHAN FA, VARMA GM, VIJAY IK (1999). Genomic organization and promoter activity of glucosidase I. *Glycobiology*, 9 : 797-806.
14. HERSCOVICS A (1999). Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1473 : 96-107.
15. WEBER H , BORISJUK L, WOBUS U (1996). Sugar import and metabolism during seed development. *Trends Plant Sci*, 2 : 169-74.
16. LÉON-KLOOSTERZIEL KM, KEIJZER CJ, KOORNNEEF M (1994). A seed shape mutant of *Arabidopsis* that is affected in tegument development. *Plant Cell*, 6 : 385-92.
17. ALONSO-BLANCO C, BLANKESTIJN-DE VRIES H, HANHART CJ, KOORNNEEF M (1999). Natural allelic variation at seed size loci in relation to other life history traits of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 : 4710-7.
18. DEBEAUJON I, LÉON-KLOOSTERZIEL KM, KOORNNEEF M (2000). Influence of testa on seed dormancy, germination and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 122 : 403-13.
19. KOORNNEEF M (1990). Mutations affecting the testa colour in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Inf Serv*, 27 : 1-4.
20. SHIRLEY BW, KUBASEK WL, STORZ G, *et al.* (1995). Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid synthesis. *Plant J*, 8 : 659-71.
21. WINKEL-SHIRLEY B (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol*, 126 : 485-93.
22. NESI N (2000). *Analyse génétique et moléculaire du métabolisme des flavonoïdes dans les graines d'Arabidopsis thaliana. Caractérisation de mutants et des gènes correspondants*. Thèse de Doctorat en Sciences, Ina PG ; 167 p.
23. NESI N, DEBEAUJON I, JOND C, PELLETIER G, CABOCHE M, LEPINIEC L (2000). The TT8 gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of DFR and BAN genes in *Arabidopsis* siliques. *Plant Cell*, 12 : 1863-78.

24. NESI N, JOND C, DEBEAUJON I, CABOCHE M, LEPINIEC L (2001). The *Arabidopsis* TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell*, 13 : 2099-114.
25. ROUTABOUL JM, BENNING C , BECHTOLD N, CABOCHE M, LEPINIEC L (1999). The TAG1 locus of *Arabidopsis* encodes for a diacylglycerol acyltransferase. *Plant Physiol Biochem*, 7 : 831-40.
26. JAKO C, KUMAR A, WEI Y, *et al.* (2001). Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. *Plant Physiol*, 126 : 861-74.
27. GRAPPIN P, BOUINOT B, SOTTA B, MIGINIAC M, JULLIEN M (2000). Control of seed dormancy in *Nicotiana glauca*: a post imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta*, 210 : 279-85.
28. JULLIEN M, BOUINOT D, ALI-RACHEDI S, GRAPPIN P (2000). Absciscic acid control of seed dormancy expression in *Nicotiana glauca* and *Arabidopsis thaliana*. In : VIEMONT JD, CRABBÉ, eds. *Dormancy in Plants*. CAB International Pub : 195-210.
29. MARIN H, NUSSAUME L, QUESEDA A, *et al.* (1996). Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana glauca*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J*, 15 : 2331-42.
30. TAN BC, SCHWARTZ SH, ZEEVAART JAD, MCCARTY DR (1997). Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94 : 12235-40.
31. SCHWARTZ SH, TAN CB, GAGE DA, ZEEVAART JAD, MCCARTY DR (1997). Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276 : 1872-4.
32. ROOK F, CORKE F, CARD R, MUNZ G, SMITH C, BEVAN M (2001). Impaired sucrose deficiency mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *Plant J*, 26 : 421-33.
33. SEKIMOTO H, SEO M, KAWAKAMI N, *et al.* (1998). Molecular cloning and characterization of aldehyde oxidases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 39 : 433-42.
34. SEO M, PEETERS AJM, KOIWAI H, *et al.* (2000). The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 : 12908-13.
35. XIONG L, ISHITANI M, LEE H, ZHU JK (2001). The *Arabidopsis* LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* 13 : 2063-83.
36. BITTNER F, OREB M, MENDEL RR (2001). ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 276 : 40381-84.

37. IUCHI S, KOBAYASHI M, TAJI T, *et al.* (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J*, 27 : 325-33.
38. FREY A, AUDRAN C, MARIN H, SOTTA B, MARION-POLL A (1999). Engineering seed dormancy by the modification of zeaxanthin epoxidase gene expression. *Plant Mol Bio*, 39 : 1267-74.
39. THOMPSON AJ, JACKSON AC, SYMONDS RC, *et al.* (2000). Ectopic expression of a tomato 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. *Plant J*, 23 : 363-74.
40. BOVE J (1999). *Adaptation et exploitation de l'outil Macro-array pour l'analyse des clones obtenus par cDNA-AFLP*. DEA Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Plantes, PVI/PXI/Ina PG.
41. PRIESTLEY DA (1986). *Seed aging*. Cornell University Press, Ithaca : Comstock Publishing Associates.

Illustrations

Figure 1. Les différentes étapes du développement des graines sur le modèle d' *A. thaliana*. Après la morphogenèse embryonnaire, la graine accumule des réserves essentiellement oléoprotéagineuses dans les cotylédons puis achève sa maturation par une phase de déshydratation pendant laquelle elle entre en dormance. Libérée de la plante mère, sa mise en conditions favorables à la germination se traduit par une réhydratation rapide et une reprise d'activité métabolique où l'état de dormance s'exprime éventuellement, ce qui peut conduire à une germination plus ou moins rapide. L'essentiel de la dégradation des réserves se produit après l'émergence radiculaire et permet la croissance initiale de la jeune plante.

Figure 2. Caractères principaux de quelques mutants présentant un phénotype « graine ».

A. Vue en microscopie à balayage du type sauvage et de deux mutants « graine ». WS : graine mature d' *A. thaliana* écotype WS (type sauvage). On distingue à la surface du tégument l'ornementation causée par les cellules à mucus et on voit distinctement la forme de l'embryon replié sous les téguments qui adhèrent à sa structure. *gcs1-1* : graine mature d'un mutant de glucosidase I. La forme irrégulière de la graine est liée à l'anomalie du développement embryonnaire. ABX45 : graine mature d'un mutant de diacylglycérol acyltransférase. La graine présente une surface irrégulière, « ridée ».

B. Structure interne de la graine mature du mutant glycosidase I. WS type sauvage, *gcs1-1* mutant. Chez la graine sauvage, on voit la structure de l'embryon (constitué des cotylédons, c, et de l'hypocotyle, h) replié sous les couches externes qui sont l'albumen résiduel à couche monocellulaire (a) et les téguments (t). Chez le mutant, la structure de l'embryon est très perturbée, la morphogenèse embryonnaire n'a pas dépassé le stade « cœur » et les cellules sont de très grande taille.

C. Composition en acides gras des lipides extraits des graines matures du mutant ABX45 déficient en activité diacylglycérol acyltransférase.

D. Graines matures de l'écotype sauvage WS (à gauche) et d'un mutant transparent testa (à droite). On remarque la couleur très pâle des graines mutantes dont les téguments sont appauvris en tannins.

Figure 3. Les bases biotechnologiques du contrôle de la dormance des semences.

A. La voie de biosynthèse de l'ABA. Sont indiquées les activités enzymatiques essentielles dont les gènes ont été clonés et les noms, chez diverses espèces, des mutants isolés correspondant à ces gènes.

B. Comportement germinatif des graines de plantes transgéniques de *N. plumbaginifolia* ayant intégré diverses constructions contenant le gène de la zéaxanthine époxydase (ZEP). Toutes les graines considérées sont fraîchement récoltées. WT : type sauvage, la cinétique de germination lente est caractéristique des graines dormantes chez cette espèce. *aba2-s1* : les graines de ce mutant dans le gène ZEP présentent une cinétique de germination très rapide, identique à celle de graines sauvages qui ne sont plus dormantes. Epox AS : l'introduction d'une construction antisens-ZEP dans le type sauvage conduit à l'obtention de plantes dont les graines sont très peu dormantes. Epox 35S : à l'inverse, l'introduction d'une construction 35S-ZEP dans le type sauvage conduit à l'obtention de plantes dont les graines présentent une dormance renforcée.

Figure 4. Analyse systématique de gènes impliqués dans l'expression de la dormance : approche de cDNA-AFLP couplée à l'approche de cDNA-arrays. Le cDNA-AFLP s'est montré efficace pour identifier et sélectionner les gènes dont l'expression est différentielle dans les graines dormantes, non dormantes, sèches ou hydratées. La constitution de filtres haute densité (arrays) avec les fragments d'ADNc correspondants et leur hybridation comparative avec des extraits d'ARNs de graines dans différents états physiologiques permettent de confirmer l'implication de ces gènes dans le contrôle de la germination et de caractériser globalement leur régulation dans différentes situations physiologiques relatives à la qualité germinative. Cette démarche constitue une première étape pour poser des hypothèses de travail pour la caractérisation fonctionnelle de ces gènes.