

### **3.3. Étude de la régulation des gènes *AtSUS2* et *AtSUS3* par le facteur de transcription ABI3**

Chez *Arabidopsis* et chez d'autres espèces, le développement de la graine implique une phase de maturation où les produits de réserve s'accumulent. Les facteurs de transcription, LEC2, FUS3 et ABI3 sont des régulateurs-clés de la maturation des graines (Parcy *et al.*, 1997).

Des mutations, dans ces facteurs de la maturation (LEC2, FUS3 et ABI3) empêchent l'accomplissement de la maturation de la graine et affectent le métabolisme carboné (papier 2 de ce travail; Gutierrez *et al.*, 2007 ; Santos-Mendoza *et al.*, 2008). Les gènes *SUS2* (At5g49190) et *SUS3* (At4g02280) étant exprimés durant la phase de la maturation de la graine correspondant à la phase d'accumulation de protéines et lipides de réserves, il nous a semblé important d'étudier leur régulation par le facteur de la maturation ABI3 pour compléter l'étude précédemment décrite (papier 2). Pour étudier l'effet de l'allèle nul (i.e. *abi3*) sur *SUS2* et *SUS3* nous avons utilisé des approches de biochimie et de biologie moléculaire.

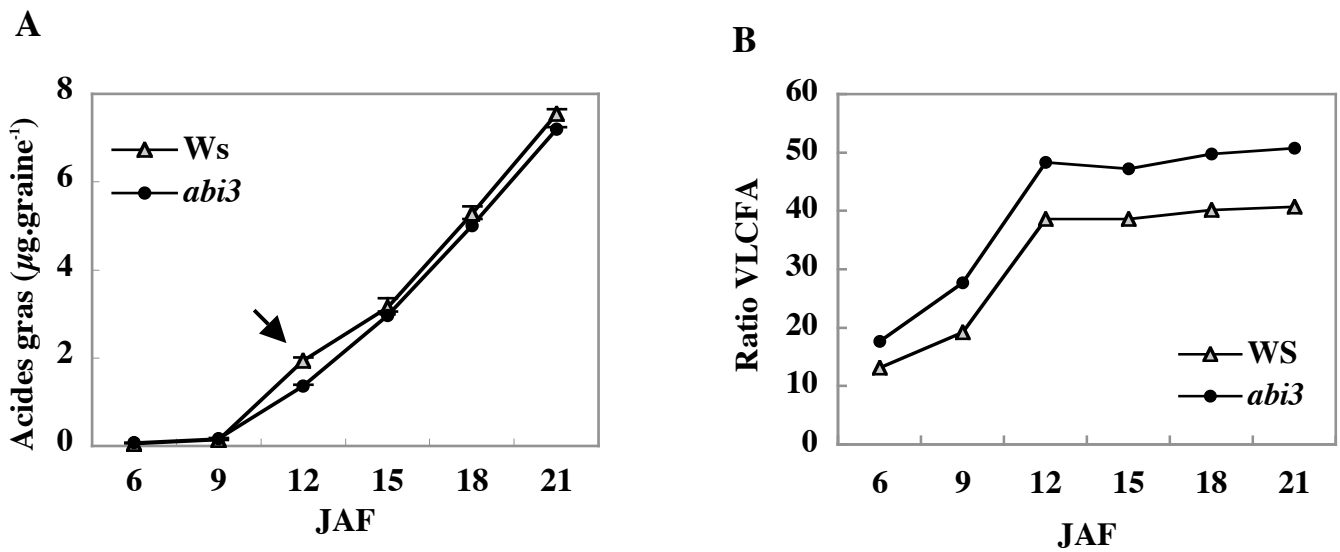
#### **3.3.1. Résultats**

##### **3.3.1.1. Analyse métabolique de l'accumulation des réserves dans la graine du mutant *ABA-INSENSITIVE 3 (abi3)* d'*Arabidopsis*.**

Notre objectif était d'obtenir une caractérisation biochimique complète des graines en développement pour un mutant *abi3* d'*Arabidopsis* (l'allèle utilisé dans cette étude (A141a), est un allèle nul et homozygote en fond *Ws*). Notre analyse montre que le métabolisme carboné du mutant *abi3* a été perturbé durant le développement de la graine d'*Arabidopsis*.

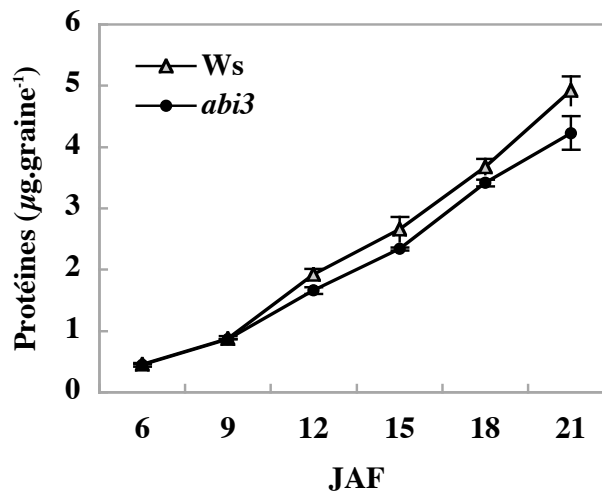
##### **3.3.1.2. Développement de la graine**

Aucune différence sensible dans la masse de matière sèche des graines n'a été détectée durant la phase de la morphogenèse de l'embryon (6 et 9 JAF) entre le mutant (*abi3*) et le sauvage (*Ws*). En revanche, une diminution significative de 12 à 20% de la masse de graines apparaît chez le mutant *abi3* pendant la phase de maturation (12 à 21 JAF) par rapport au sauvage (Figure 3.7). Cette diminution de la masse de matière sèche de graines est accompagnée de modifications en composés des réserves.



**Figure 3.9.** Effet de la mutation *abi3* sur la synthèse des acides gras au cours du développement de la graine d'Arabidopsis pour l'écotype sauvage (Ws) et le mutant (*abi3*).

(A) Accumulation d'acides gras totaux (B) Ratio VLCFA. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  ES de trois répétitions techniques.



**Figure 3.10.** Effet de la mutation *abi3* sur la synthèse des protéines au cours du développement de la graine d'Arabidopsis pour l'écotype sauvage (Ws) et le mutant (*abi3*). Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  ES de trois répétitions techniques.

### 3.3.1.3. Évolution de la teneur en hydrates de carbone

Afin de déterminer l'impact de la mutation d'*ABI3* sur la teneur en hydrates de carbone dans la graine au cours du développement, plusieurs paramètres ont été mesurés en utilisant des graines lyophilisées en développement pour l'écotype sauvage (Ws) et le mutant (*abi3*). La quantité d'amidon chez le mutant *abi3* n'est pas significativement différente par rapport au sauvage durant le développement de la graine (Figure 3.8A).

La teneur en saccharose chez le mutant *abi3* est augmentée de 2.5-fois par rapport au sauvage pendant la maturation tardive (18 à 21 DAF). Cependant, lors de la maturation précoce, aucune différence significative n'a été détectée (Figure 3.8B).

### 3.3.1.4. Synthèse des acides gras pendant le développement de la graine

Le profil d'accumulation des acides gras totaux dans le mutant *abi3* est perturbé au début de la phase de maturation (12 JAF). Pendant cette période, la teneur en acides gras est en baisse de 30% par rapport au sauvage, cependant hors de cette période, aucune différence significative n'a été détectée (Figure 3.9A). Le mutant présente une augmentation de l'accumulation relative en acides gras à très longues chaînes, (rapport VLCFA)/(C16-C18) de 20 à 25% tout au long du développement de la graine (Figure 3.9B).

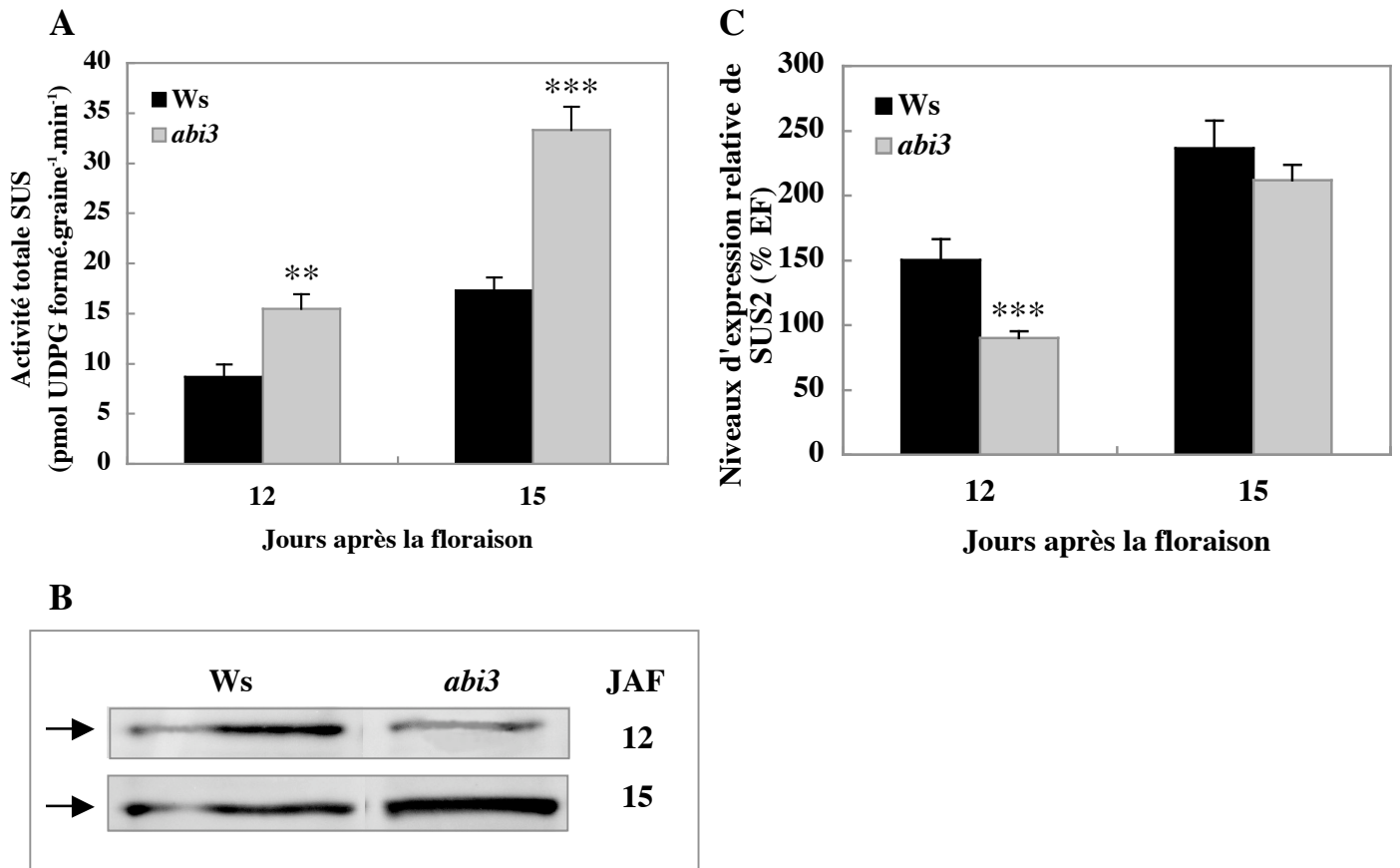
### 3.3.1.5. Synthèse des protéines totales pendant le développement de la graine

Aucune différence significative dans la teneur en protéines totales dans les graines *abi3* n'a été détectée tout au long du développement de la graine par rapport au sauvage (Figure 3.10).

### 3.3.1.6. Régulation de *SUS2* et *SUS3* par *ABI3* durant la phase de la maturation de la graine

#### 3.3.1.6.1. Activité totale SUS

Afin d'évaluer l'importance de l'enzyme saccharose synthase pendant le développement de la graine d'*Arabidopsis*, nous avons mesuré cette activité *in vitro* en utilisant des extraits de protéines préparés à partir de graines isolées pour l'écotype sauvage (Ws) et l'allèle nul (*abi3*). L'activité totale SUS chez le mutant *abi3* est augmentée de 2-fois par rapport au sauvage tout au long du développement de la graine (Figure 3.11A).



**Figure 3.11.** AtSUS2 dans la graine du mutant dans le facteur de transcription ABI3.

(A) Analyses de l'activité totale SUS au cours du développement sur les graines de 3 siliques pour l'écotype sauvage (Ws) et le mutant *abi3*. Deux stades du développement ont été choisis (12 et 15 JAF). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  ES de trois mesures sur deux cultures indépendantes. (B) Accumulation de la protéine SUS2 dans la graine d'Arabidopsis. Les panneaux montrent des immunoblots de gels de polyacrylamide-SDS de protéines solubles de graines de 12 et 15 JAF pour le type sauvage (Ws) et pour le mutant (*abi3*). Pour chaque panneau, les lignes appartiennent au même gel et blot. La position des flèches représente la masse moléculaire de la protéine (92 kDa). Le blot a été développé en utilisant l'anticorps « Ab-SUS2 » et 20  $\mu$ g de protéine soluble. (C) Profil d'expression relative du gène *AtSUS2* dans le mutant *abi3*. Le niveau d'expression relative a été déterminé par RT-PCR quantitative et standardisé par l'expression constitutive du gène *EF1A4 $\alpha$*  (*EF*). L'ARNm a été obtenu des graines isolées au cours du développement. Les données représentent la moyenne et  $\pm$  ES de trois mesures sur deux cultures indépendantes. \*\*\*  $P < 0,001$  student T-test.

### 3.3.1.6.2. Quantification relative de la protéine *SUS2*

Les anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre un peptide N-terminal d'At*SUS2* ont été utilisés (Angeles-Nuñez *et al.*, 2008) pour déterminer la quantité relative de protéine *SUS2* au cours du développement de la graine pour le sauvage (Ws) et le mutant *abi3*, la protéine a été mesurée en utilisant le programme « ImageGauge ». Le mutant *abi3*, présente une diminution de 60% de la protéine *SUS2* par rapport au sauvage à 12 JAF, cependant à 15 JAF la quantité relative de la protéine *SUS2* est augmentée de 50% par rapport au sauvage (Figure 3.11B).

### 3.3.1.6.3. Étude de l'expression de *SUS2* par RT-PCR quantitative

Le profil d'expression relative obtenu en PCR quantitative pour le gène *SUS2* pendant la phase de maturation de la graine chez le mutant *abi3* est perturbé par rapport au sauvage : Si une diminution de 40% est détectée à 12 JAF en revanche, aucune différence significative n'est observée à 15 DAF (Figure 3.11C).

### 3.3.1.7. Localisation de *SUS2* dans le mutant *abi3*

#### 3.3.1.7.1. Immunolocalisation de la protéine *SUS2* chez le mutant *abi3*

La protéine *SUS2* est spécifique de la graine et est localisée dans l'embryon, l'albumen et le tégument. Des coupes fines de la graine d'*Arabidopsis* dans la paraffine (8  $\mu$ m) ont été réalisées sur des graines au cours du développement. L'immunolocalisation de la protéine *SUS2* réalisée chez le mutant *abi3* n'a pas montré de différence entre le mutant et le sauvage (Figure 3.12) page suivante.

#### 3.3.1.7.2. Expression des *Pro<sub>SUS2</sub> :uidA* et *Pro<sub>SUS3</sub> :uidA* en fond mutant *abi3*

Différentes lignées de plantes *Pro<sub>SUS2</sub> :uidA* et *Pro<sub>SUS3</sub> :uidA* dans le fond mutant (*abi3*) ont été obtenues par croisements et une analyse de l'expression du gène rapporteur *uidA* a été réalisée par histochimie pendant la phase de maturation de la graine (Figure 3.13). Le *Pro<sub>SUS2</sub> :uidA* chez le mutant *abi3* est exprimé de façon ubiquitaire dans l'embryon comme celui du sauvage de 12 à 15 JAF. Cependant l'expression du *Pro<sub>SUS3</sub> :uidA* chez *abi3* est perturbée à maturation (15 JAF). À cette période, l'expression du gène rapporteur *uidA* montre une expression très réduite, confinée à l'extrémité des cotylédons (Figure 3.13) page suivante.



### 3.3.2. Discussion

La mutation *abi3* est connue pour empêcher l'accomplissement de la maturation de la graine et affecter le métabolisme carboné (Gutierrez *et al.*, 2007 ; Santos-Mendoza *et al.*, 2008). Dans cette partie, nous avons étudié la régulation de *SUS2* et *SUS3* par ce facteur de transcription. Afin de mieux connaître le profil métabolique de ce mutant nous avons mis en place une caractérisation biochimique. Les résultats obtenus dans l'analyse biochimique montrent que le mutant *abi3* utilisé dans cette étude, présente un métabolisme carboné affecté durant la phase de la maturation : la masse de la graine, l'accumulation du saccharose et le rapport d'acides gras à longues chaînes (Figure 3.7, 3.8B, 3.9B) étant les plus affectés. Ces perturbations dans le métabolisme carboné sont accompagnées de modifications pour l'activité totale SUS pour la même période (Figure 3.11A). Ce résultat suggère que la saccharose synthase pourrait être liée à ce profil carboné perturbé, cette idée est conforme à la fonction attribuée aux gènes des saccharose synthases dans le métabolisme carboné (Zrenner *et al.*, 1995 ; Chourey et Nelson, 1976 ; Déjardin *et al.*, 1997 ; Weber *et al.*, 1997 ; Ruan *et al.*, 2003).

#### 3.3.2.1. L'expression des *SUS2* et *SUS3* a été perturbée pendant la phase de la maturation chez le mutant *abi3*

Pendant la phase de la maturation, l'accumulation de la protéine *SUS2* chez le mutant *abi3* a été perturbée. Au début de la maturation une diminution de l'accumulation de la protéine *SUS2* a été observée, alors que, lors de la mi-maturation la quantité de protéine *SUS2* augmente significativement. Ce résultat montre que dans le mutant *abi3*, il existe une corrélation entre la diminution de la protéine *SUS2* et la diminution en acides gras au début de la maturation (Figure 3.11B et 3.9A). Ce résultat suggère que la protéine *SUS2* peut être impliquée dans la synthèse de lipides, cette hypothèse étant cohérente avec la co-localisation de *SUS2* avec membranes de plastes (Angeles-Nuñez *et al.*, 2008). L'augmentation de l'accumulation de la protéine *SUS2* à mi-maturation pourrait elle, expliquer le peu de différence entre les composés de réserves détectés entre le mutant (*abi3*) et le sauvage (*Ws*). L'accumulation de la protéine *SUS2* est corrélée avec l'activité totale SUS, cependant elle n'est pas corrélée avec l'accumulation du niveau de transcrit *SUS2*. Ce résultat suggère que *SUS2* est régulé directement ou indirectement au niveau post-transcriptionnel chez le mutant *abi3*.

L'immunolocalisation de la protéine *SUS2* chez le mutant *abi3* ne présente pas de différences par rapport au sauvage. Ce résultat est cohérent avec l'expression du *Pro<sub>SUS2</sub> :uidA* chez le mutant (Figure 3.12 et 3.13). Ces résultats suggèrent donc que l'absence d'ABI3 ne modifie pas la localisation de la protéine *SUS2*. Cependant l'expression du *Pro<sub>SUS3</sub> :uidA* chez le mutant *abi3* est fortement perturbée à mi-maturation. Durant cette période, l'activité *GUS* est confinée à l'extrémité des cotylédons (Figure 3.13). Ce résultat suggère que *SUS3* est régulé (directement et/ou indirectement) pendant la phase de maturation par le facteur de transcription ABI3.

Ce travail sur la régulation des *SUS2* et *SUS3* par LEC2, FUS3 et ABI3 a montré que ces gènes sont régulés par ces facteurs de la maturation durant le développement de la graine. Étant donné que le gène *SUS2* est fortement et spécifiquement exprimé dans la graine d'Arabidopsis pendant la phase de maturation, nous avons mis en place une analyse fonctionnelle de son promoteur, afin de trouver le promoteur minimal fonctionnel. Cette étude est décrite dans la section suivante.