



**HAL**  
open science

## Study of sucrose synthase in arabdopsis seed : lacialization, regulation and function

Juan Gabriel Angeles Núñez

► **To cite this version:**

Juan Gabriel Angeles Núñez. Study of sucrose synthase in arabdopsis seed : lacialization, regulation and function. Sciences of the Universe [physics]. AgroParisTech, 2009. English. NNT : 2008AGPT0065 . pastel-00005164

**HAL Id: pastel-00005164**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00005164>**

Submitted on 27 May 2009

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

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

## THÈSE

pour obtenir le grade de

**Docteur**

de

**l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement  
(Agro Paris Tech)**

Spécialité : Biologie végétale

*présentée et soutenue publiquement  
par*

**Juan Gabriel ANGELES NÚÑEZ**

**le 4 novembre 2008**

### **ETUDE DE LA SACCHAROSE SYNTHASE DANS LA GRAINE D'ARABIDOPSIS THALIANA : LOCALISATION, REGULATIONS ET FONCTIONS**

*Directeur de thèse : Christine ROCHAT*

*INRA/AgroParisTech, UMR204, Laboratoire de Biologie des Semences, Institut Jean-Pierre Bourgin,  
RD10, 78026 Versailles Cedex, France*

Devant le jury :

**M. Marc JULLIEN, Professeur, AgroParisTech.....Président**  
**M. Philippe RAYMOND, Directeur de Recherche, INRA.....Rapporteur**  
**M. Jean VIDAL, Directeur de Recherche, CNRS.....Rapporteur**  
**Mme. Françoise CORBINEAU, Professeur, Université Paris VI.....Examineur**

## RÉSUMÉ

La saccharose synthase (SUS), une enzyme clé du métabolisme du saccharose catalyse la conversion réversible du saccharose et UDP en fructose et UDP-glucose qui sont utilisés dans différentes voies métaboliques. Le génome d'*Arabidopsis* contient six gènes de saccharose synthase. Un membre de cette famille (*SUS2*), est fortement et spécifiquement exprimé pendant la phase de synthèse majeure des lipides de réserve. L'activité totale de la saccharose synthase dans la graine atteint un pic à mi-maturation (15 jour après floraison). Ce profil d'activité est compatible avec l'accumulation des niveaux de transcrits du gène *SUS2*, bien que nous ne puissions pas exclure la présence des activités des autres isoformes de SUS, telles que *SUS3* dans la phase de maturation tardive de la graine. En utilisant des anticorps spécifiques, nous avons montré que la protéine *SUS2* se localise dans l'embryon, l'albumen et le tégument durant la phase de maturation, et est fortement associée, aux membranes de plastes (leucoplastes) dans l'embryon pendant cette période. Ce résultat suggère que cette association de la protéine *SUS2* aux plastes peut jouer un rôle dans l'acheminement des métabolites pour la synthèse des produits de réserves dans ce compartiment cellulaire. Une approche physiologique de réponse aux sucres sur des siliques âgées de 15 JAF nous a permis de montrer que l'expression du promoteur *SUS2* est modifiée de façon positive *in planta* par le glucose, le saccharose et le tréhalose. En utilisant une approche de biologie moléculaire, nous avons prouvé que deux gènes de cette famille de saccharose synthase (*SUS2* et *SUS3*) sont régulés par les facteurs de transcription *LEC2*, *FUS3* et *ABI3* pendant la phase de maturation de la graine. Finalement à partir d'une caractérisation biochimique complète y compris une analyse du profil métabolique par GC-TOF-MS sur des allèles nuls pour 3 gènes de saccharose synthase présents aussi dans la graine (*SUS1*, *SUS2* et *SUS3*), nous avons montré l'importance de ces gènes dans le métabolisme carboné durant le développement de la graine d'*Arabidopsis*.

## SUMMARY

Sucrose synthase (SUS) is a key enzyme in sucrose metabolism. This enzyme catalyses the reversible conversion of sucrose and UDP to UDP-glucose and fructose, which are both used in multiple biochemical pathways. The *Arabidopsis* genome contains six sucrose synthase genes. A member of this family (*SUS2*) is strongly and specifically expressed in *Arabidopsis* seeds during the maturation phase, corresponding to reserve accumulation period. Total SUS activity reached a peak during seed maturation, at about 15 days after flowering (DAF), which corresponds approximately to the middle of this stage. This activity pattern fitted well with *SUS2* mRNA abundance, although we cannot exclude the presence of other SUS isoform activities, such as *SUS3*, in seeds at late maturation. Using specific antibodies we have shown that, *SUS2* is localised in the embryo, endosperm and seed coat with differential patterns. During the maturation phase, the *SUS2* protein was mainly co-localised with plastids in the embryo. This result is consistent with the hypothesis that *SUS2* association with the plastid may play a role in channelling of sucrose metabolism to G-6-P or PEP, both carbon compounds which enter the plastids enabling starch or lipid synthesis. Indeed, the regulation of *SUS2* and *SUS3* expression was investigated during seed development for wild type (WT) and for seed maturation mutants (i.e. *lec2-4*, *fus3-4* and *abi3*). The accumulation patterns of *SUS* mRNA and protein, as well as total activity, were strongly affected in these mutants during seed development. We showed that the expression of the *SUS2* promoter was induced *in planta* by sugar (glucose, sucrose and trehalose) and that the expressions of *SUS2* and *SUS3* promoters are redundantly regulated by *LEC2* and *FUS3* during the maturation phase. Last, a functional analysis was carried out in developing seeds, using biochemical characterisation and metabolite profiling of one *sus1*, two *sus2* and two *sus3* alleles. The results obtained outlined the importance of these SUS isoforms for sucrose metabolism in developing seeds of *Arabidopsis*.

## REMERCIEMENTS

Ce manuscrit de thèse concrétise ma période de travail au sein du Laboratoire de Biologie des semences de l'INRA de Versailles. Cependant, il ne rend pas compte de l'environnement humain dont j'ai bénéficié. C'est donc avec beaucoup de plaisir que je profite de ces lignes pour remercier toutes les personnes qui ont, d'une manière ou d'une autre, contribué à la bonne réalisation de ce travail. Je tiens avant tout à remercier Madame la Directrice Annie Marion-Poll de m'avoir permis d'évoluer dans son laboratoire où j'ai pu bénéficier d'un environnement scientifique et technique important. Je tiens à remercier aussi, le Conseil National des Sciences et Technologies du Mexique (CONACYT-MEX) qui a assuré le soutien financier de ce travail.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir si gentiment accepté de participer à l'évaluation de ce travail. Marc JULLIEN (Président) ; Philippe RAYMOND (Rapporteur) ; Jean VIDAL (Rapporteur) ; Françoise CORBINEAU (Examinatrice).

Je sais que chacune des personnes citées ci-dessous connaît son rôle dans ce travail de thèse et est pleinement assurée de ma reconnaissance.

Pédagogie, qualité, patience, rigueur, confiance, sont des éléments, que Christine Rochat a utilisés tout au long de la formation que j'ai suivie à ses côtés dans l'équipe de maturation de la graine. Ses qualités humaines ont fait que cette période professionnelle restera toujours gravée dans mes pensées. Christine je te suis très reconnaissante pour tes qualités de chef d'équipe à la fois scientifiques et humaines, merci beaucoup d'avoir partagé avec moi tes connaissances et ton bonne humeur.

Dès mon arrivée en France, un de mes objectifs a été d'apprendre la langue ainsi que la culture de ce pays, et pour cela, tout au long de mon séjour, j'ai rencontré des personnes qui m'ont aidé à accomplir cette mission. L'une d'entre elle a été Sylvie Wuillème qui m'a fait bénéficier de ses connaissances, et qui a eu la patience et la bonne volonté de m'aider à aller plus loin dans la compréhension du français. Je tiens à te remercier, Sylvie, puisqu'à chaque fois que je m'exprimerai en français, il y aura dans mes mots quelque chose de toi.

Pendant ma formation dans le laboratoire de biologie des semences, il y a eu des étapes qui personnellement, resteront gravées dans mes pensées pour toujours, l'une d'entre elles est la dernière étape de mon stage, qui a été accompagné du soutien de beaucoup de personnes. Fabrice P. m'a aidé, inconditionnellement, apportant à la fois son excellente aide technique ainsi que son soutien moral, deux éléments qui reflètent sa personnalité. Pour tout cela et également pour toutes ces années où nous avons partagé, travail, amitié et séries de rigolades, merci beaucoup Fabrice.

Il est toujours enrichissant d'avoir des avis sur son travail et pour cela j'ai bénéficié tout au long de mon séjour au sein du laboratoire de biologie des semences des discussions avec Loïc L., Martine M., et Bertrand D. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance, merci pour ces conseils, qui m'ont aidé à améliorer le travail présenté sous la forme de posters ou d'articles.

Un grand merci à Sébastien B. qui m'a fait bénéficier de ses connaissances avec politesse et gentillesse, deux qualités qui le caractérisent.

Mon travail de thèse a été un projet, nécessitant, la mise en place de diverses approches techniques ; pour cela j'ai bénéficié de la connaissance de spécialistes en la matière. Donc, je tiens à remercier l'excellente collaboration de Jocelyne K. et Gilles C., avec qui j'ai partagé travail, et conversations toujours remplies de gaîté et d'optimisme.

Merci beaucoup à Julie D. et Olivier B. qui sont venus partager mes travaux en été, et avec qui j'ai partagé une sincère amitié.

Un grand merci, à Jean-Pierre B., pour son aide et son soutien tout au long de mon stage ainsi que pour tous les moments divers et particuliers que nous avons partagés pendant cette période.

Dans la vie de l'être humain, il y a des gestes qui resteront gravés pour toujours, comme les gestes que Jean Marc R., a eu envers ma personne, merci beaucoup Jean Marc.

Je tiens à remercier Michelle C. pour les corrections apportées à ce manuscrit de thèse et aussi pour les bons moments que nous avons partagés autour des repas au sein du centre.

Je tiens à remercier Stéphane R., Maria de Jésus L. et Joseph T. pour les multiples services administratifs et informatiques dont j'ai bénéficié.

Toute ma reconnaissance à Michaël A., pour l'excellent suivi de mes plantes en serre.

Je tiens à remercier Hélène N. pour ses corrections en anglais.

Je tiens à remercier tous les membres de l'unité de Biologie des Semences et de Nutrition Azoté des plantes pour leur disponibilité, et la bonne volonté dont ils ont fait preuve envers moi.

Un travail de thèse est aussi, une opportunité de partager de sympathiques moments avec son entourage, et pour cela, j'ai toujours trouvé, des personnes avec qui j'ai partagé des excellents moments. Je remercie sincèrement Akira S. pour la disponibilité, le partage, la politesse ainsi que la gentillesse qu'il a montré envers moi pendant toutes ces années que nous avons vécu ensemble au sein de l'I.J.P.B.

Toute ma reconnaissance à David V. et Lucy B. pour son amitié inconditionnelle, et pour leur complicité et les bons moments que j'ai passé en leur compagnie.

Un grand merci à Audrey M., Antoine B., Stephen L., Mohamed D., Catherine M., Hoai Nam, Eloise C., Thomas R., Thomas G., Raphaël C., Sylvie F., Zoraya F., Mitsunori S., Ayoko S., Sasha, Béatrice G., Magali D., Alessandro A., Sabine C., Christian D., Adeline B., Théodoros M., Céline M., Maud L. et Marie-Hélène V. avec qui j'ai partagé plus qu'un Bonjour.

THANK YOU VERY MUCH  
MERCİ BEAUCOUP  
MUCHAS GRACIAS  
DANKE  
GRAZIE  
σας ευχαριστούμε  
muito obrigado

<b>1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>1</b>
1.1. LE DÉVELOPPEMENT DE LA GRAINE CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	2
1.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> , espèce modèle.....	2
1.1.2. Développement et maturation de la graine d'Arabidopsis.....	3
1.1.3. Mises en réserves dans la graine.....	3
1.1.3.1. Glucides.....	4
1.1.3.2. Lipides.....	4
1.1.3.3. Protéines.....	4
1.2. LE TRANSPORT DU SACCHAROSE.....	5
1.2.1. Les relations source-puits.....	5
1.2.2. La production et le chargement du saccharose.....	5
1.2.3. Le mouvement des assimilats dans le phloème.....	6
1.2.4. Le déchargement et l'utilisation du saccharose par les organes puits.....	6
1.2.5. Le métabolisme du saccharose dans les organes puits.....	7
1.3. SACCHAROSE SYNTHASE.....	8
1.3.1. Activité de la saccharose synthase.....	8
1.3.2. La saccharose synthase: candidate au contrôle de la force des puits.....	9
1.3.3. Une famille de gènes.....	9
1.3.4. Les mutants SUS.....	10
1.4. LE CONTRÔLE DE L'EXPRESSION DE LA SACCHAROSE SYNTHASE.....	12
1.4.1. Perception des sucres et signalisation par les hexoses et le saccharose .....	12
1.4.1.1. Régulation des gènes SUS par des signaux sucres.....	14
1.4.2. Facteurs de transcription LEC1, LEC2, ABI3 et FUS3.....	15
1.4.2.1. Structure des gènes <i>LEC2</i> , <i>FUS3</i> et <i>ABI3</i> .....	15
1.4.2.2. Expression des gènes <i>LEC1</i> , <i>LEC2</i> , <i>FUS3</i> et <i>ABI3</i> .....	15
1.4.2.3. Les mutants sur les facteurs de transcription.....	16
1.4.2.4. Un réseau de régulation complexe.....	17
<b>2. LOCALISATION DE LA PROTEINE SUS2.....</b>	<b>19</b>
2.1. Résumé.....	20

2.2. Article : Study of AtSUS2 localization in seeds reveals a strong association with plastids .....	22
---	----

### **3. RÉGULATION DE *SUS2* ET *SUS3* PAR DES FACTEURS DE LA TRANSCRIPTION..... 33**

3.1. Résumé .....	34
3.2. Article: Comprehensive analysis of <i>SUS2</i> and <i>SUS3</i> regulation in Arabidopsis seed..36	
3.2.1. Abstract .....	37
3.2.2. Introduction.....	38
3.2.3. Materials and Methods.....	40
3.2.4. Results.....	43
3.2.4.1. Functional analysis of <i>SUS2</i> and <i>SUS3</i> promoter.....	43
3.2.4.2. Regulation of <i>SUS2</i> expression by sugar.....	44
3.2.4.3. Regulation of <i>SUS2</i> and <i>SUS3</i> by LEC2 and FUS3.....	45
3.2.4.4. Localisation of <i>SUS2</i> protein in <i>lec2-4</i> and <i>fus3-4</i> mutants.....	46
3.2.5. Discussion.....	47
3.2.5.1. The <i>SUS2</i> and <i>SUS3</i> expression patterns are concomitant with the storage phase in Arabidopsis seeds.....	47
3.2.5.2. <i>Pro<sub>SUS2</sub>:uidA</i> is regulated by glucose, trehalose and sucrose.....	47
3.2.5.3. Decrease in total SUS activity correlated with storage reserves modifications in regulatory mutants ( <i>lec2-4</i> and <i>fus3-4</i> ).....	48
3.2.5.4. The accumulation of <i>SUS2</i> protein were affected in <i>fus3-4</i> and <i>lec2-4</i> mutants.....	49
3.2.5.5. <i>SUS2</i> and <i>SUS3</i> genes are differentially regulated by LEC2 and FUS3.....	49
3.2.6. Acknowledgment.....	50
3.2.7. References .....	51
3.3. Étude de la régulation des gènes <i>AtSUS2</i> et <i>AtSUS3</i> par le facteur de transcription ABI3.....	57
3.3.1. Résultats.....	57
3.3.1.1. Analyse métabolique de l'accumulation des réserves de la graine dans le mutant <i>ABA-INSENSITIVE 3 (abi3)</i> d'Arabidopsis.....	57
3.3.1.2. Développement de la graine.....	57
3.3.1.3. Évolution de la teneur en hydrates de carbone.....	58



3.3.1.4. Synthèse des acides gras pendant le développement de la graine.....	58
3.3.1.5. Synthèse des protéines totales pendant le développement de la graine.....	58
3.3.1.6. Régulation de <i>SUS2</i> et <i>SUS3</i> par <i>ABI3</i> durant la phase de la maturation de la graine.....	58
3.3.1.6.1. Activité totale SUS.....	58
3.3.1.6.2. Quantification relative de la protéine <i>SUS2</i> .....	59
3.3.1.6.3. Étude de l'expression de <i>SUS2</i> par RT-PCR quantitative.....	59
3.3.1.7. Localisation de <i>SUS2</i> dans le mutant <i>abi3</i> .....	59
3.3.1.7.1. Immunolocalisation de la protéine <i>SUS2</i> chez le mutant <i>abi3</i> .....	59
3.3.1.7.2. Expression des <i>Pro<sub>SUS2</sub> :uidA</i> et <i>Pro<sub>SUS3</sub> :uidA</i> en fond mutant <i>abi3</i> ....	59
3.3.2. Discussion.....	60
3.3.2.1. L'expression des <i>SUS2</i> et <i>SUS3</i> a été perturbée pendant la phase de la maturation chez le mutant <i>abi3</i> .....	60
3.4. Analyse fonctionnelle du promoteur .....	62
3.4.1. Analyse <i>in silico</i> du promoteur <i>SUS2</i> .....	62
3.4.2. Taille du promoteur minimum <i>SUS2</i> .....	63
3.4.3. Discussion.....	63

#### **4. IMPLICATION DES SACCHAROSE SYNTHASES DANS LE MÉTABOLISME CARBONÉ..... 65**

4.1. Résumé.....	66
4.2. Article : <i>SUS2</i> and <i>SUS3</i> genes are implicated in sucrose metabolism in Arabidopsis seed.....	68
4.2.1. Summary.....	68
4.2.2. Introduction.....	69
4.2.3. Material and methods.....	71
4.2.4. Results.....	73
4.2.4.1. Isolation and molecular characterisation of sucrose synthase mutants.....	73
4.2.4.2. Activity of sucrose metabolising-enzymes during seed development.....	73
4.2.4.3. Seed development.....	74
4.2.4.4. Evolution of the carbohydrate content during seed development.....	74
4.2.4.5. Synthesis of fatty acids during seed development.....	75
4.2.4.6. Synthesis of total protein during seed development.....	75

4.2.4.7. Metabolite profiling during seed development.....	75
4.2.4.7.1. TCA cycle metabolites.....	75
4.2.4.7.2. Free amino acids.....	76
4.2.5. Discussion.....	76
4.2.5.1. Decreased SUS activity leads to important decrease of starch accumulation in developing seed of Arabidopsis.....	77
4.2.5.2. Decreased SUS activity leads to decreased hexoses/sucrose ratio in developing seeds of Arabidopsis that could be responsible of changes in seed development time course.....	78
4.2.5.3. Decreased SUS activity leads to increased lipid accumulation in developing seed of Arabidopsis.....	79
4.2.5.4. Decreased SUS activity leads to perturbed TCA intermediates and amino acid abundance in developing seed of Arabidopsis.....	79
4.2.6. Conclusion.....	81
4.2.7. Acknowledgements.....	81
4.2.8. References.....	81
4.3. Le mutant <i>Atsus1</i> présente un métabolisme carboné perturbé au cours du développement de la graine.....	88
4.3.1. Résultats.....	88
4.3.1.1. Isolement et caractérisation moléculaire du mutant <i>sus1</i> .....	88
4.3.1.2. Développement de la graine.....	88
4.3.1.3. Activité saccharose synthase.....	88
4.3.1.4. Évolution de l'accumulation en hydrates de carbone pendant le développement de la graine.....	89
4.3.1.5. Synthèse des acides gras pendant le développement de la graine.....	89
4.3.1.6. Synthèse de protéines totales pendant le développement de la graine.....	90
4.3.1.7. Profil métabolique durant le développement de la graine.....	90
4.3.2. Discussion.....	90
4.3.2.1. La diminution de la quantité d'amidon chez le mutant <i>sus1</i> est corrélée avec la diminution d'activité totale SUS pendant la maturation.....	91
4.3.2.2. Le changement de l'activité totale de SUS observée dans le mutant <i>sus1</i> mène à la modification du rapport hexoses/saccharose dans les graines d'Arabidopsis au cours du développement.....	92

4.3.2.3. La diminution de l'activité totale de SUS dans le mutant <i>sus1</i> mène à la diminution de la concentration en lipides au cours du développement de la graine...	92
4.3.2.4. La diminution de l'activité totale SUS dans le mutant <i>sus1</i> mène à la perturbation de l'abondance en acides organiques.....	93
<b>5. DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>94</b>
5.1. Étude de la protéine AtSUS2.....	95
5.2. Régulation de l'expression des gènes <i>AtSUS</i> .....	96
5.2.1. Analyse fonctionnelle du promoteur.....	96
5.2.2. Régulation de l'expression de <i>SUS2</i> par des solutions sucres.....	97
5.2.3. Régulation de l'expression de <i>SUS2</i> et <i>SUS3</i> par trois facteurs de transcription..	97
5.3. Analyse fonctionnelle de <i>SUS1</i> , <i>SUS2</i> et <i>SUS3</i> .....	98
5.4. Perspectives.....	100
<b>6. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>102</b>
6.1. Matériels .....	103
6.1.1. Matériel végétal.....	103
6.1.2. Souches bactériennes.....	103
6.1.3. Vecteurs.....	103
6.2. Méthodes.....	104
6.2.1. Manipulations du matériel Végétal .....	104
6.2.1.1. Germination <i>in vitro</i> .....	104
6.2.1.2. Culture en chambre de culture et suivi des plantes.....	105
6.2.1.3. Croisements .....	105
6.2.1.4. Transformation des plantes par <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	106
6.2.2. Analyses biochimiques.....	106
6.2.2.1. Dosage des glucides.....	106
6.2.2.2. Dosage des protéines hydrolysées.....	107
6.2.2.3. Analyses des lipides.....	107
6.2.2.4. Profil métabolique utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse en temps de vol (GC/TOF-MS).....	108
6.2.2.5. Dosage de l'activité saccharose synthase.....	110

6.2.3. Analyses moléculaires.....	110
6.2.3.1. Extraction d'acides nucléiques.....	110
6.2.3.2. Analyses par PCR.....	112
6.2.3.2.1. Principe.....	112
6.2.3.2.2. PCR classique non quantitative.....	112
6.2.3.2.3. Utilisation de polymérase « haute fidélité ».....	113
6.2.3.2.4. PCR en temps réel.....	113
6.2.3.3. Clonages moléculaires classiques.....	115
6.2.3.4. Clonages moléculaires de séquences promotrices par la technique Gateway	
6.2.3.5. Séquençage.....	116
6.2.4. Analyses physiologiques et cytologiques.....	117
6.2.4.1. Incubation des siliques en présence des solutions « sucrées ».....	117
6.2.4.2. Activité GUS.....	117
6.2.4.2.1. Détection par histochimie.....	117
6.2.4.2.2. Détection par fluorométrie .....	117
6.2.4.3. Immunoblot.....	118

<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>119</b>
---	------------

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE 1

Figure 1.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> (« Arabettes des Dames »)	p. 02
Figure 1.2	Structure d'une graine d' <i>Arabidopsis thaliana</i> à 6 JAF	p. 03
Figure 1.3	Graines d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	p. 04
Figure 1.4	Modèle du cheminement du saccharose	p. 06
Figure 1.5	Domaines symplastiques dans la graine d' <i>Arabidopsis</i> et voies nutritionnelles dans la graine	p. 07
Figure 1.6	Schéma simplifié du métabolisme central dans l'embryon d' <i>Arabidopsis</i>	p. 08
Figure 1.7	Comparaison des séquences d'acides aminés et des profils d'expression des saccharose synthases	p. 10
Figure 1.8	Les emplacements possibles pour la perception des signaux sucres par les hexokinase	p. 14
Figure 1.9	Spécificité tissulaire du réseau de régulation B3 dans le développement de l'embryon d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	p. 15
Figure 1.10	Un réseau complexe de régulations locales et redondantes	p. 17
Figure 1.11	Modèle des interactions génétiques et moléculaires des facteurs de transcription	p. 18

### CHAPITRE 2

Figure 2.1	<i>SUS2</i> in seeds	p. 25
Figure 2.2	<i>SUS2</i> protein immunolocalisation in developing <i>Arabidopsis</i> seeds	p. 25
Figure 2.3	<i>E37</i> protein immunolocalisation in developing <i>Arabidopsis</i> seeds	p. 26
Figure 2.4	Details of seed coat structure at 12 DAF	p. 27

### CHAPITRE 3

Figure 3.1	<i>SUS2</i> and <i>SUS3</i> in seeds	p. 43
------------	--------------------------------------	-------

Figure 3.2	<i>Effects of sugars and on expression of Pro<sub>SUS2</sub>::uidA in 15 DAF siliques</i>	p. 44
Figure 3.3	<i>SUS2 and SUS3 in seeds of transcription factor mutants</i>	p. 45
Figure 3.4	<i>SUS2 protein immunolocalisation in Arabidopsis WT (Ws), lec2-4 and fus3-4 developing seeds</i>	p. 46
Figure 3.5	<i>GUS staining in Arabidopsis WT (Ws), lec2-4 and fus3-4 developing seeds</i>	p. 47
Figure 3.7	<i>Masse de la graine chez le mutant abi3</i>	p. 57
Figure 3.8	<i>Synthèse des hydrates de carbone dans la graine abi3</i>	p. 57
Figure 3.9	<i>Synthèse des acides gras dans la graine abi3</i>	p. 58
Figure 3.10	<i>Synthèse des protéines dans la graine abi3</i>	p. 58
Figure 3.11	<i>AtSUS2 dans la graine du mutant dans le facteur de transcription ABI3</i>	p. 59
Figure 3.12	<i>Immunolocalisation de la protéine AtSUS2 dans la graine d'Arabidopsis</i>	p. 60
Figure 3.13	<i>Activité GUS par histochimie dans les embryons abi3</i>	p. 61
Figure 3.14	<i>Diagramme schématique des constructions de délétions du promoteur AtSUS2</i>	p. 62
Figure 3.15	<i>Activité GUS du Pro<sub>SUS2</sub>::uidA (1470 pb) au cours du développement</i>	p. 63
Figure 3.16	<i>Activité GUS</i>	p. 64
Supplementary Figure 3.	<i>Spatial localization of GUS transcripts in transgenic Pro<sub>SUS2</sub>::uidA and Pro<sub>SUS3</sub>::uidA seeds at various developmental stages</i>	p. 49

## CHAPITRE 4

Figure 4.1	<i>Time course analysis of total SUS activity</i>	p. 73
Figure 4.2	<i>Effect of the sus mutations on growth parameters in developing Arabidopsis seeds for the wild type (Col-0) and sucrose synthase mutants (sus2-1, sus2-4, sus3-1 and sus3-2)</i>	p. 73
Figure 4.3	<i>Effect of the sus mutations on the evolution of carbohydrate content in developing Arabidopsis seeds for the wild type (Col-0) and sucrose synthase mutants (sus2-1, sus2-4, sus3-1 and sus3-2)</i>	p. 74
Figure 4.4	<i>Effect of the sus mutations on the synthesis of fatty acids in developing Arabidopsis seeds for the wild type (Col-0) and sucrose synthase mutants (sus2-1, sus2-4, sus3-1 and sus3-2)</i>	p. 75
Figure 4.5	<i>Effect of the sus mutations on the synthesis of total proteins in developing Arabidopsis seeds for the wild type (Col-0) and sucrose synthase mutants</i>	p. 75

Figure 4.6	Masse de la graine chez le mutant <i>sus1</i>	p. 88
Figure 4.7	Activité totale SUS dans la graine du mutant <i>sus1</i>	p. 88
Figure 4.8	Synthèse d'amidon dans la graine du mutant <i>sus1</i>	p. 89
Figure 4.9	Synthèse des hydrates de carbone dans la graine du mutant <i>sus1</i>	p. 90
Figure 4.10	Synthèse des acides gras dans la graine du mutant <i>sus1</i>	p. 92
Figure 4.11	Synthèse des protéines dans la graine du mutant <i>sus1</i>	p. 92

## **LISTE DE TABLEAUX**

### **CHAPITRE 3**

*Table 3.1. Summarised results obtained on the regulation of SUS2 and SUS3 genes by LEC2 and FUS3 during maturation phase of Arabidopsis seed* p. 50

*Supplementary Table 3.1. Biochemical characterisation of lec2-4 and fus3-4 during seed development* p. 48

### **CHAPITRE 4**

*Table 4.1. Normalized TCA cycle metabolites abundance in Arabidopsis seeds for the wild type (Col-0) and sucrose synthase mutants (sus2-1 and sus2-4) at 12 DAF* p. 76

*Table 4.2. Normalized abundances of amino acid and TCA cycle metabolites in Arabidopsis seeds for the wild type (Col-0) and sucrose synthase mutants (sus2-1, sus2-4, sus3-1 and sus3-2) at 15 DAF* p. 79

*Table 4.3. Normalized abundances of amino acid and TCA cycle metabolites in Arabidopsis seeds for the wild type (Col-0) and sucrose synthase mutants (sus3-1 and sus3-2) at 18 DAF* p. 80

*Table 4.4. Niveaux normalisés d'acides aminés et de métabolites du cycle TCA cycle dans la graine d'Arabidopsis au cours du développement pour l'écotype sauvage (Ws) et le mutant (sus1) de 9-15 JAF* p. 91

## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES UTILISÉS

16:0	acide hexadécanoïque	(acide palmitique)
17:0	acide heptadécanoïque	(acide margarinique)
18:0	acide octadécanoïque	(acide stéarique)
18:1	acide <i>cis</i> -9,12-octadécanoïque	(acide oléique)
18:2	acide <i>cis, cis</i> -9-octadécanoïque	(acide linoléique)
18:3	acide <i>cis, cis, cis</i> -9,12,15-octadécanoïque	(acide linoléique)
20:0	acide <i>n</i> -eicosanoïque	(acide arachidique)
20:1	acide <i>cis</i> -11- eicosanoïque	(acide eicosénoïque)
22:1	acide <i>cis</i> -13- docosénoïque hexadécanoïque	(acide érucique)
A, C, G, T	adénosine, cytosine, guanidine, thymidine	
Aa	acide aminé	
ABA	acide abscissique	
ABI3	« <i>ABA-INSENSITIVE 3</i> »	
ADN	acide désoxyribonucléique	
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire	
ADN-T	acide désoxyribonucléique transféré	
ARNm	acide ribonucléique messenger	
BET	bromure d'éthidium	
Col0	Columbia 0	
DA, kDA	dalton, kilodalton	
DEPC	diéthyl-pyrocarbonate	
DNTP	déoxynucléotides triphosphates	
ES	Erreur Standard	
Fru	fructose	
FST	« <i>flanking sequence tag</i> »	
<i>fus</i>	« <i>Fusca</i> »	
g	gravité	
g, mg, µg	gramme, milligramme, microgramme	
GFP	« <i>green fluorescent protein</i> »	
Glc	glucose	



GUS	β-glucoronidase
H, min, s	heure, minute, seconde
HSI2	« <i>HIGH-LEVEL EXPRESSION OF SUGAR-INDUCIBLE 2</i> »
JAF	jour après floraison
l, ml, μl	litre, millilitre, microlitre
LB	Luria Bertani
L1	Epiderme de l'embryon
<i>lec</i>	« <i>leafy cotyledon</i> »
m, cm, mm, μm	mètre, centimètre, millimètre, micromètre
M, mM, μM	molaire, millimolaire, micromolaire
MES	acide 2-(N-Morpholino)éthane sulfonique
MOPS	acide 3-(N-Morpholino) propane sulfonique
MS	Murashige et Skoog
NAD	β nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	β nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP	β nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	β nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
RAVs	« <i>proteins DNA-binding : RAV1, RAV2</i> »
Pb, kb	paire de bases , kilobase
PCR	« <i>polymerase chain reaction</i> »(réaction de polymérisation en chaîne)
pH	potentiel hydrogène
RE	réticulum endoplasmique
Rnase	ribonucléase
RT	« <i>reverse transcription</i> » (rétrotranscription ou transcription inverse)
SDS	sodium dodécylsulfate (lauryl sulfate)
SUS	saccharose synthase
TAE	tris acétate EDTA
TAG	triacylglycérol
TTG1	« <i>TRANSPARENT TESTA GLABRA 1</i> »
U	unité enzymatique commerciale
UDP-Glc	uridine 5'-diphosphoglucose
UV	ultraviolets
V, kV	volt, kilovolt

VAL	« <i>VP1/ABI3-LIKE</i> »
VP1	« <i>Viviparous 1</i> »
VLCFA	« <i>very long chain fatty acid</i> » (acide gras à très longue chaîne ; C <sub>≥</sub> 20)
Rapport VLCFA :	(20:0 + 20:1 + 20:2 + 22:1) / (16:0 + 18:0 + 18:1 + 18:2 + 18:3)
Ws	Wassilewskija
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

## Avant-propos

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire visent à mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent l'expression des gènes de saccharose synthase *AtSUS1*, *AtSUS2* et *AtSUS3* dans la graine d'*Arabidopsis thaliana* par l'utilisation d'outils de physiologie, de biochimie ainsi que de biologie moléculaire. La motivation à comprendre les mécanismes complexes de régulation du métabolisme carboné trouve son origine dans le cadre des recherches visant à améliorer les rendements en produits de réserves dans les graines des espèces d'importances agronomiques. En introduction, le premier chapitre présente les connaissances actuelles sur des gènes impliqués dans métabolisme carboné (dont la saccharose synthase). Le second chapitre présenté, sous la forme d'un article publié dans la revue « Plant Cell Physiology », décrit la localisation subcellulaire d'*AtSUS2* ainsi que son association avec les membranes des plastes. Le troisième chapitre présenté sous la forme d'un article soumis, décrit la régulation du patron d'expression des gènes *AtSUS2* et *AtSUS3* au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis thaliana*. Le quatrième chapitre présenté aussi sous la forme d'un article soumis, décrit le rôle des gènes *AtSUS2* et *AtSUS3* dans le métabolisme carboné au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis thaliana*. La discussion générale et les conclusions de ce travail sont présentées sous la forme d'un cinquième chapitre.

# **1.**

# **INTRODUCTION**



**Figure 1.1.** *Arabidopsis thaliana* (« Arabettes des Dames »)

À gauche, la plante à l'état végétatif, avant l'apparition de la hampe florale (en bas à gauche). Au centre, plante adulte au stade floraison/fructification. À droite, la fleur, hampe florale et graines. Les barres blanches représentent 1 cm, sauf dans le cas de la fleur et des graines où elles représentent 1mm (repris de <http://www-ijpb.versailles.inra.fr/en/sgap/equipes/cyto/images/Planche.gif>).

Dans le cycle de vie des spermatophytes (littéralement les « plantes à graines »), la graine est le stade vital qui permet la dissémination et la protection de l'embryon végétal. Elle a un rôle de protection du nouvel individu grâce à son enveloppe souvent durcie, et de nutrition grâce à des réserves de substances nourricières. Les graines ont en effet la propriété d'accumuler des réserves destinées au développement futur de l'embryon en jeune plantule. Les graines constituent aussi une source d'alimentation recherchée pour les animaux (incorporés dans des régimes alimentaires) et pour l'homme (céréales, légumes secs).

## **1.1. LE DEVELOPPEMENT DE LA GRAINE CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA***

### **1.1.1. *Arabidopsis thaliana*, espèce modèle**

*Arabidopsis thaliana* (l'Arabette des dames) est une plante très utilisée pour l'étude des dicotylédones qui appartient à la famille des Brassicacées (Crucifères). Bien qu'*A. thaliana* ait peu d'importance directe pour l'agriculture, cette petite plante présente plusieurs avantages qui lui ont permis de devenir un modèle pour la compréhension de la génétique, de la biologie cellulaire et moléculaire des plantes à fleurs. Avec environ 157 millions de paires de base (Bennett *et al.*, 2003) et cinq chromosomes, il s'agit d'un petit génome pour une espèce végétale. Il a été complètement séquencé, en 2000 (« Arabidopsis Genome Initiative », 2000). Depuis, un gros travail a été fait pour assigner des fonctions à ses 27,000 gènes et les 35,000 protéines qu'ils codent (<http://www.ebi.ac.uk/integr8/>), et de nombreuses bases de données ont été développées. De plus, cette plante a un temps de génération relativement bref (2 à 3 mois) et produit un grand nombre de descendants (plus de 10 000 graines par plante) (Figure 1.1).

En ce qui concerne l'étude du métabolisme carboné au cours de la maturation de la graine, *A. thaliana*, bien que produisant des graines de très petite taille, s'est avérée être un modèle tout à fait adéquat. Accumulant entre 30% et 40% de lipides dans ses graines (Baud *et al.*, 2002 ; Mansfield et Briarty, 1992), la plante présente un métabolisme très comparable à celui du colza et le développement et la maturation de la graine sont bien documentés (Baud *et al.*, 2002 ; Goldberg *et al.*, 1994 ; Harada, 1997 ; Laux et Jurgens, 1997 ; Laux *et al.*, 2004 ; Lehti-Shiu *et al.*, 2005 ; Lepiniec *et al.*, 2005, 2006 ; Mayer *et al.*, 1991 ; Weijers et Jurgens, 2005 ; West et Harada, 1993). *Arabidopsis* est donc un excellent modèle pour étudier les métabolismes d'accumulation de réserves dans les graines oléagineuses.

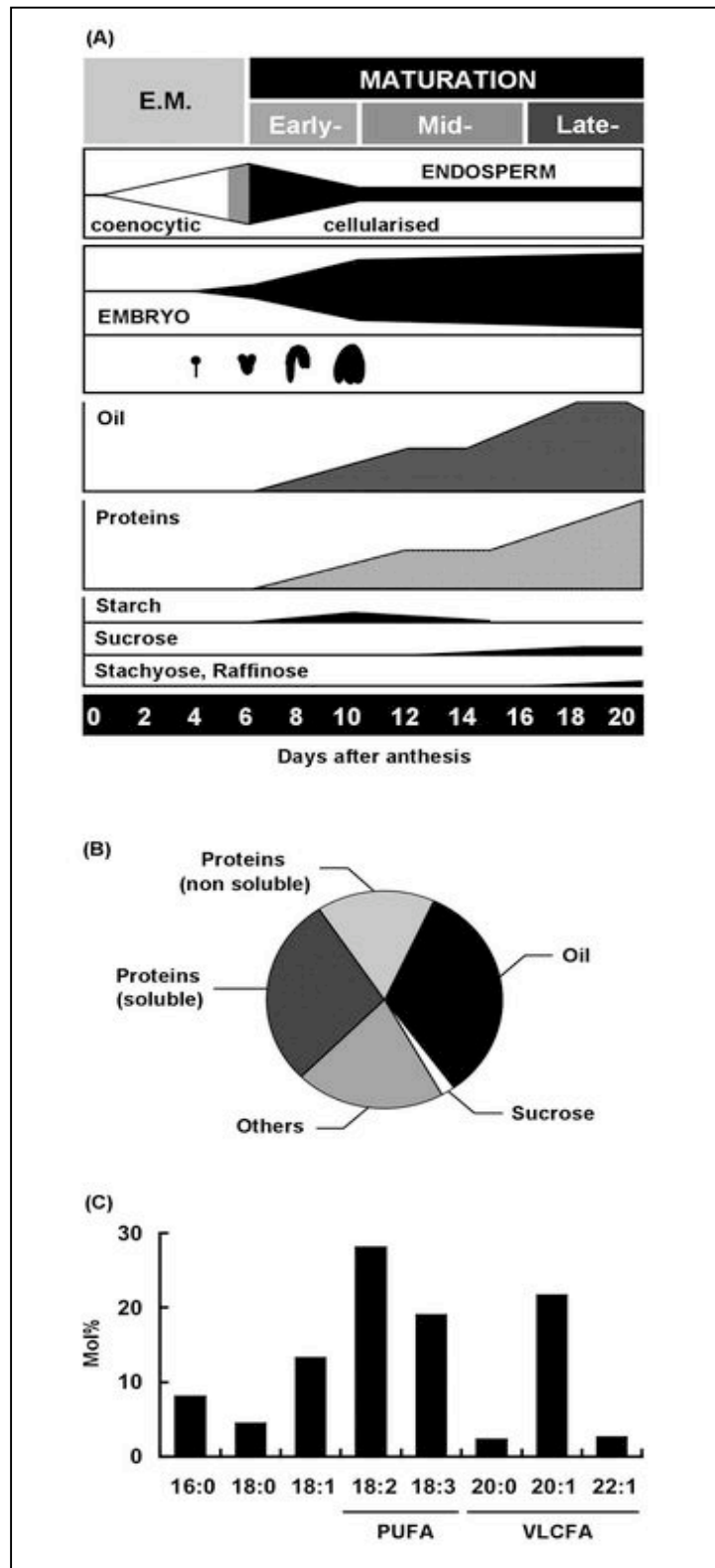
### 1.1.2. Développement et maturation de la graine d'*Arabidopsis*

Le développement et la maturation de la graine d'*Arabidopsis thaliana* durent environ 20 jours et peuvent être divisés en trois étapes.

- (i) La première étape correspondant à la phase de morphogenèse précoce de l'embryon, est initiée lorsque la double fécondation du sac embryonnaire a eu lieu. Le zygote principal ( $2n$ ), issu de la fécondation de l'oosphère, va se diviser activement et connaître une phase de morphogenèse caractérisée par l'acquisition du plan d'organisation de base de la plante mature. Parallèlement, le zygote accessoire ( $3n$ ), issu de la fécondation de la cellule centrale, se développe et forme l'albumen, d'abord coenocytique, puis cellularisé, qui finira par être presque totalement résorbé durant la phase de maturation (Mansfield et Briarty, 1990) (Figure 1.2.1).
- (ii) La deuxième étape correspond à la phase de maturation. Pendant cette phase de profondes modifications physiologiques et biochimiques affectent la graine. Les cellules embryonnaires connaissent une phase d'expansion et de différenciation. De nombreux métabolites sont transférés vers les cotylédons : la phase de maturation est une phase d'accumulation de réserves et de préparation à la dessiccation et à la dormance (Meinke, 1995). L'ABA (acide abscissique), en empêchant la germination précoce de l'embryon et en coordonnant l'expression de certains gènes-clefs de la maturation, joue ici un rôle important (Thomas, 1993).
- (iii) La troisième étape correspond à la phase de maturation tardive et de déshydratation. L'embryon, gonflé de réserves, occupe désormais presque tout l'espace disponible à l'intérieur de la graine. La dessiccation qui s'opère est corrélée à la rupture des liens trophiques entre la plante-mère et la silique. La graine sèche est constituée de l'embryon entouré d'une très fine couche de cellules d'albumen et de cinq couches tégumentaires (Debeaujon *et al.*, 2003), feuillets de cellules mortes compactés les uns sur les autres (Figure 1.2.2).

### 1.1.3. Mises en réserves dans la graine

Du côté carboné, on considère que chez la graine de colza et d'*Arabidopsis*, c'est le saccharose qui est majoritairement apporté à l'embryon (Baud *et al.*, 2002 ; Fait *et al.*, 2006). Cette molécule peut être importée par un ou plusieurs transporteurs ou par diffusion passive. Très rapidement ces molécules entrent dans le métabolisme des réserves. Chez le pois, la graine accumule principalement de l'amidon et des protéines (Rochat et Boutin, 1989). Dans



**Figure 1.3.** Graines d'*Arabidopsis thaliana* (repris de Baud *et al.*, 2008)

**A.** Vue schématique du développement de la graine adaptée de Baud *et al.*, 2002 (EM : morphogénèse de l'embryon)

**B.** Composition des graines mûres d'*Arabidopsis* (accession Ws)

**C.** Composition en acides gras des graines mûres d'*Arabidopsis* (accession Ws). (PUFA: acides gras poly insaturés, VLCFA, acides gras à très longues chaînes, résultats en mol%).



le cas d'*Arabidopsis*, la synthèse des protéines est associée à un métabolisme lipidique très actif puisque les triacylglycérols (TAG) de réserve représentent 40% de la masse de la graine sèche (Baud *et al.*, 2002). Ces deux métabolismes prennent leur source à partir du saccharose et des acides aminés importés et l'interaction entre ces deux types de métabolisme est tout à fait intéressante et mal connue (Figure 1.3).

#### **1.1.3.1. Glucides**

Durant la première moitié du développement de la graine d'*Arabidopsis*, alors que les composés de réserves (lipides et protéines) sont encore absents, celle-ci accumule une quantité importante d'amidon et ceci de manière transitoire (Focks et Benning, 1998). À maturité, cet amidon a presque totalement disparu (Baud *et al.*, 2002). À l'inverse, le saccharose est faiblement présent durant la première moitié du développement de la graine, mais semble accumulé plus tardivement et au final 500ng sont stockés dans la graine mature de l'écotype Columbia (Focks et Benning, 1998).

#### **1.1.3.2. Lipides**

Des réserves de nature lipidique sont synthétisées pendant la seconde moitié de la formation de la graine. Ces réserves sont constituées de triacylglycérols (TAG), esters de glycérol et d'acides gras. La biosynthèse des TAG, fait intervenir plusieurs compartiments cellulaires (cytosol et plastes) (Schwender *et al.*, 2003). Ces lipides de réserve sont finalement accumulés au sein du cytoplasme dans des corps lipidiques composés d'une matrice de TAG entourée par une simple couche de phospholipides qui occupent environ 60% du volume des cellules dans les cotylédons des embryons matures (Baud *et al.*, 2002 ; Fait *et al.*, 2006 ; Ruuska *et al.*, 2002 ; Schwender *et al.*, 2004 a,b ; Miquel et Browse, 1995). La composante hydrophobe de ces derniers interagit avec les TAG tandis que leurs têtes hydrophiles font face au cytoplasme. Cette couche de phospholipides contient également une population de protéines tout à fait spécifiques : les oléosines (Napier *et al.*, 1996).

#### **1.1.3.3. Protéines**

Durant la seconde moitié du développement de la graine également, la majorité des ARNm présents dans l'embryon codent des protéines de réserve qui sont alors massivement synthétisées (Pang *et al.*, 1988). En général, le peptide signal desdites protéines est clivé pendant leur transfert au travers de la membrane du reticulum endoplasmique (RE). Les propeptides, qui arrivent dans la lumière du RE, subissent plusieurs clivages protéolytiques

avant d'acquérir leur forme définitive, mais la localisation cellulaire précise de ces clivages demeure inconnue (Krebbes *et al.*, 1988). Elles gagnent ensuite l'appareil de Golgi et finissent par s'accumuler dans des corps protéiques. Les deux principaux types de protéines mises en réserve dans la graine d'*A. thaliana* sont une globuline, la cruciférine (12S) et une albumine, l'arabine (2S). L'une et l'autre sont constituées de deux sous-unités (Heath *et al.*, 1986 ; Hiraiwa *et al.*, 1997) associées entre elles après clivage du propeptide dont elles sont issues.

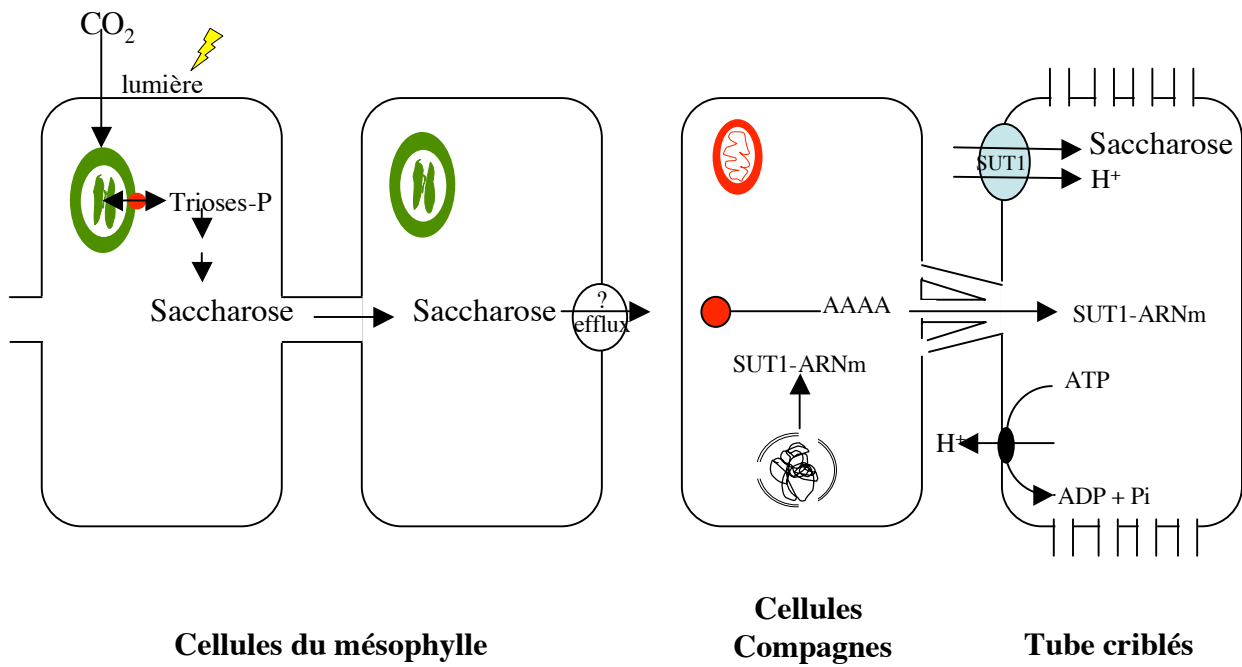
## 1.2. LE TRANSPORT DU SACCHAROSE

### 1.2.1. Les relations source-puits

L'ensemble des organes ou tissus qui composent une plante entière peut être divisé en deux catégories selon leur bilan carboné. D'une part, les organes sources sont ainsi identifiés par leur capacité à produire plus d'hydrates de carbone que la quantité nécessaire à leur croissance et leur développement. C'est bien sûr l'activité photosynthétique qui permet la fixation du CO<sub>2</sub> en hydrates de carbone aussi appelés photoassimilats. Cependant, tous les organes d'une plante ne sont pas photosynthétiquement autonomes et certains peuvent même être incapables de photosynthétiser. Ces organes, dont le bilan carboné est négatif sont appelés organes puits, et doivent importer les photoassimilats nécessaires à leur croissance à partir des organes sources, comme les feuilles matures, qui exportent leurs surplus de photosynthétats. Parmi les organes puits des plantes, on peut citer les fleurs, les graines, les fruits, les tubercules, les racines et les jeunes feuilles. Fait intéressant, la majorité de ces organes puits sont des organes d'intérêt agronomique (Ho, 1988).

### 1.2.2. La production et le chargement du saccharose

Dans la plupart des plantes, les produits de photosynthèse qui sont destinés à l'exportation vers les organes puits sont d'abords transformés en saccharose dans les tissus de la feuille. C'est sous cette forme que seront, généralement, chargés les sucres dans les tissus conducteurs du phloème. Le plus souvent, le chargement du saccharose dans les tubes criblés requiert de l'énergie sous forme d'ATP ; on parle de chargement actif du saccharose dans le phloème. C'est par le réseau phloémien qu'a lieu le transport des assimilats des organes sources aux organes puits. Le modèle de transport et chargement du saccharose développé par Giaquinta en 1983 reste toujours le plus accepté aujourd'hui comme référence pour la majorité des plantes qui utilisent le saccharose comme forme de transport des sucres (Bush et



**Figure 1.4.** Modèle montrant le cheminement du saccharose dans les cellules du mésophylle à travers le symplasma et l'import du saccharose dans le complexe Cellules compagnes/Tubes criblés, qui s'effectue directement au niveau de la membrane plasmique des tubes criblés (modèle solanacées). Adapté de Kühn *et al.* (1999).

SUT-1: transporteur de saccharose, dont l'activité a été prouvée, notamment chez la tomate.

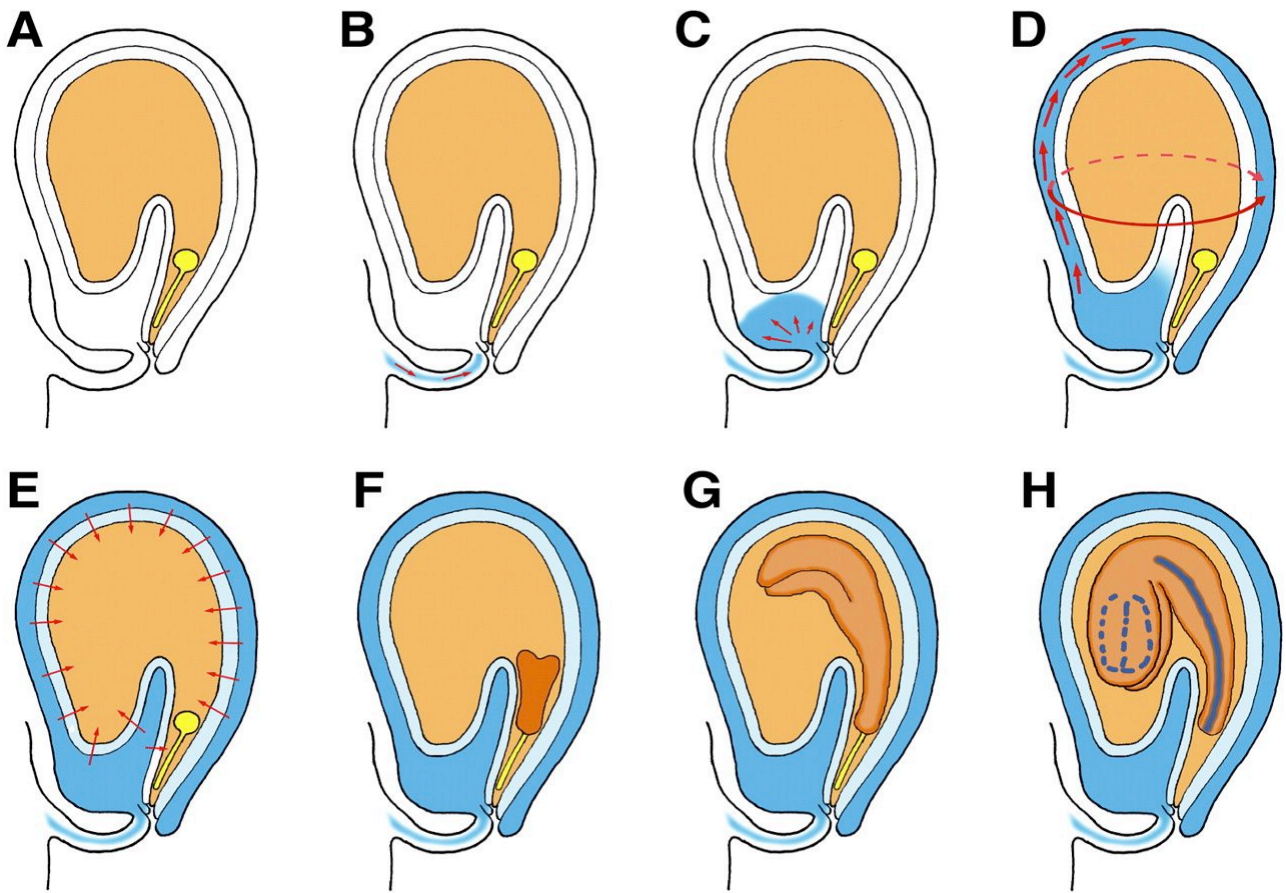
Chiou, 1995). Selon ce modèle, le saccharose circule d'abord de cellule en cellule par la voie symplastique dans le mésophylle en direction des vaisseaux conducteurs. Le gradient de concentration existant dans le phloème explique le mouvement du saccharose. L'activité métabolique élevée caractéristique des cellules compagnes (CC) leur sert entre autres à la production d'ATP pour le pompage du saccharose contenu dans l'espace intercellulaire. Par la suite, le saccharose passe du cytoplasme de la CC vers l'intérieur du tube criblé qui lui est associé. Le passage du saccharose entre la CC et les tubes criblés se fait sans apport d'énergie, *via* les nombreux plasmodesmes qui relient leurs cytoplasmes (Figure 1.4).

### **1.2.3. Le mouvement des assimilats dans le phloème**

Depuis 1930, le modèle le plus accepté pour expliquer le mouvement des assimilats dans le phloème est connu sous le nom de « théorie de mouvement en masse des assimilats » et fut développé par E. Münch (1930). Selon Münch, le saccharose se déplace dans le phloème grâce au gradient de concentration entre le contenu des cellules du phloème qui se situent près des cellules sources et celles qui se situent près des cellules puits. Au niveau des organes sources, la grande quantité en saccharose dans les tubes criblés, engendre une diminution importante du potentiel hydrique qui entraîne l'entrée passive de l'eau des espaces extracellulaires vers l'intérieur des tubes criblés : il s'en suit une augmentation de la pression hydrique dans cette région du phloème qui force le mouvement de la solution de saccharose vers les régions qui bordent les organes puits.

### **1.2.4. Le déchargement et l'utilisation du saccharose par les organes puits**

Afin d'utiliser le saccharose comme source d'hydrates de carbone, les cellules qui composent les organes puits doivent d'abord le décharger du phloème. Le saccharose peut aussi passer directement du cytoplasme des cellules compagnes à celui d'une cellule puits *via* les plasmodesmes qui les relient (voie symplastique). Dans le fruit de tomate, les études de déchargement utilisant du saccharose marqué au  $^{14}\text{C}$  ont permis de montrer que le saccharose est majoritairement déchargé *via* le symplaste au cours des premières journées de développement du fruit, mais qu'il y a une transition vers un mode de déchargement apoplastique dans le fruit mature (Dali *et al.*, 1992). Différentes équipes ont montré que le déchargement dans l'extrémité terminale du phloème, est la plupart du temps effectué par voie symplastique (Fisher et Oparka, 1996 ; Patrick, 1997 ; Hoth *et al.*, 2005 ; Stadler *et al.*, 2005). Cependant Zhang *et al.* (2007), ont montré que le déchargement du phloème peut se faire aussi par la voie apoplastique. Des travaux récents chez *Arabidopsis* ont permis



**Figure 1.5.** Domaines symplastiques dans la graine d'Arabidopsis et voies nutritionnelles dans la graine au cours du développement de l'embryon.

**A.** Vue générale de la jeune graine. Les parties maternelles sont en blanc, l'albumen en orange clair et le suspenseur et l'embryon globulaire en jaune.

**B.** Flux des assimilats dans le faisceau vasculaire du funicule. Ce dernier se termine dans le tégument à proximité du micropyle.

**C.** Déchargement dans le domaine «post-phloèmien »

**D.** Mouvements dans la couche externe du tégument (flèches rouge), qui s'étendent dans une zone symplasmique

**E.** Transport centripète (flèches rouge) depuis les couches interne du tégument vers l'albumen en franchissant deux barrières apoplastiques.

**F.** Pendant le stade cœur, la continuité symplasmique entre l'embryon et le suspenseur est interrompue.

**G.** Lors de la transition cœur/torpille, les connections symplastiques entre l'épiderme et la couche interne du tégument sont graduellement réduites, mais celles entre les cellules de l'épiderme sont nombreuses.

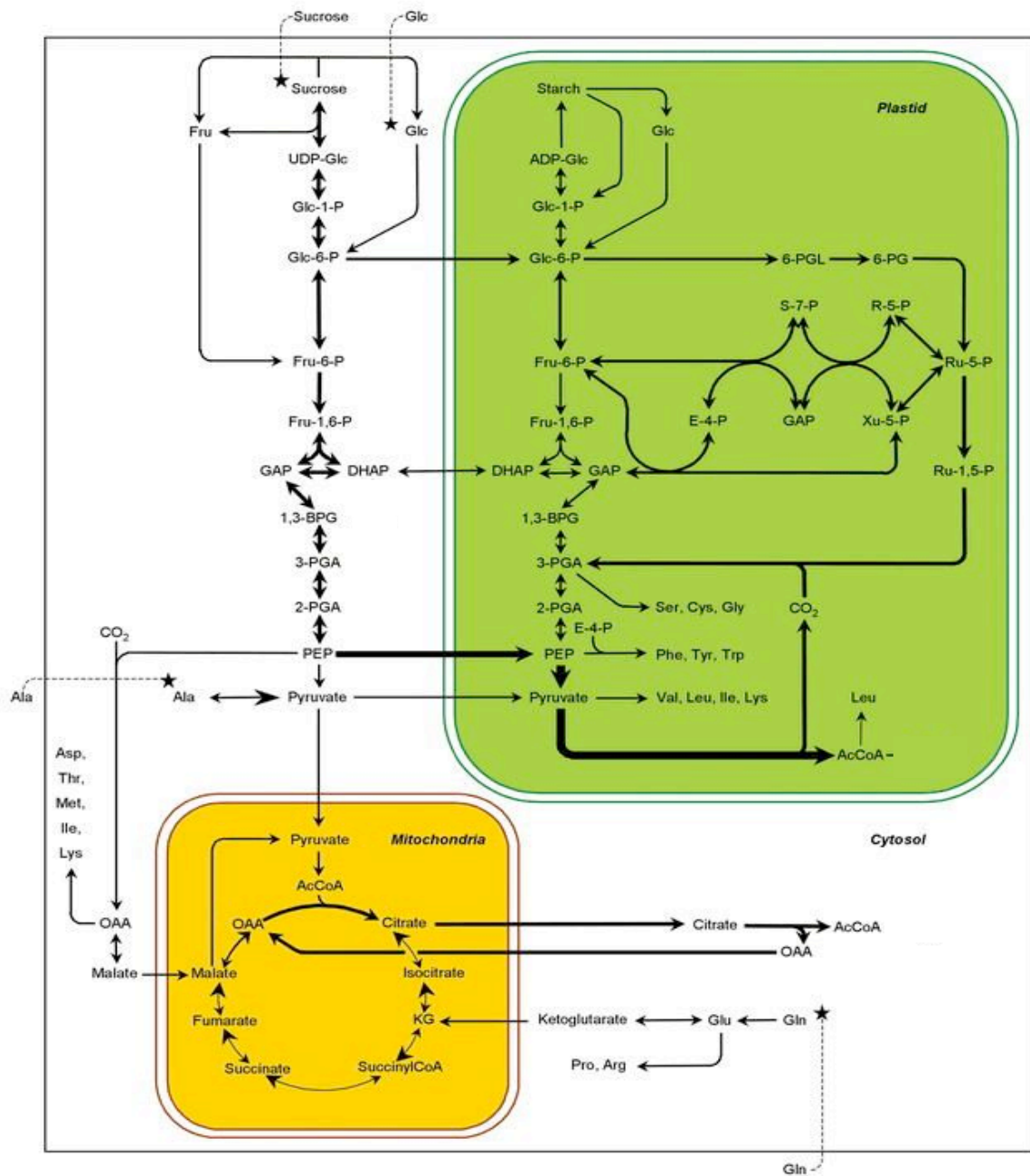
**H.** Dans les embryons matures, la stèle de la racine et de l'hypocotyle commence à former un domaine indépendant.

d'apporter des données sur les voies de déchargement du phloème chez cette espèce (Stadler *et al.*, 2005). L'anatomie de la graine d'*Arabidopsis* est différente de celle décrite pour les céréales et les légumineuses (Weber *et al.*, 2005). Grâce à une approche non destructrice utilisant des constructions GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle de différents promoteurs, les auteurs proposent un modèle assez complet des voies de transfert des assimilats dans la graine (Figure 1.5). Les transferts entre le tégument externe et interne, entre le tégument interne et l'albumen, puis entre l'albumen et l'embryon sont apoplastiques (Kim et Zambryski, 2005). Ces transferts nécessitent l'existence de transporteurs.

Au moins trois transporteurs de saccharose (AtSUC2, AtSUC3 et AtSUC5) sont présents dans la graine. AtSUC3 est présent largement dans l'embryon du suspenseur à la racine embryonnaire, mais son implication dans le transport du saccharose vers l'embryon reste à définir (Meyer *et al.*, 2004). AtSUC5 joue un rôle important mais transitoire dans la maturation précoce (Baud *et al.*, 2005). Les données sur AtSUC2, lui aussi présent dans la graine en maturation (Truernit et Sauer, 1995 ; Ruuska *et al.*, 2002) sont aussi très parcellaires (Baud *et al.*, 2008).

### **1.2.5. Le métabolisme du saccharose dans les organes puits**

Selon le stade de développement de la graine, la nutrition de l'embryon pourrait être différente. Il a été suggéré que l'albumen de la graine de colza contenait un pool d'hexoses important au début du développement (Hill *et al.*, 2003). Plus récemment cependant, Morley-Smith *et al.*, (2008) laissent entendre que l'albumen riche en hexose dans les jeunes graines n'est pas en contact direct avec l'embryon. Il n'en demeure pas moins que la transition de la division cellulaire à l'expansion cellulaire et aux synthèses de réserves pourrait être due au « *sugar switch* », celui-ci étant dans l'embryon (Morley-Smith *et al.*, 2008). Cette hypothèse reste à valider d'*Arabidopsis*, dans laquelle on mesure un tel « *switch* » (Baud *et al.*, 2002). Dans les organes puits, deux enzymes catalysent la dégradation du saccharose. L'une d'elles, l'invertase ( $\beta$ -fructofuranoside fructohydrolase, E.C. 3.2.1.26) catalyse l'hydrolyse, irréversible, du saccharose en fructose et en glucose, et peut être retrouvée dans la fraction soluble des protéines des tissus ou associée à la paroi cellulaire (Manning et Maw, 1975 ; Yelle *et al.*, 1991). Cette dernière, l'invertase pariétale, montre une activité maximale à pH acide, tandis que les invertases solubles peuvent être divisées en invertases acides (forme vacuolaire) et neutres (forme cytosolique) selon le pH optimal pour leur activité (Yelle *et al.*, 1991). L'autre enzyme de clivage du saccharose est la saccharose synthase (SUS) (UDP-glucose : D-fructose 2-glucosyl transferase, E.C. 2.4.1.13). Le clivage du saccharose génère



**Figure 1.6.** Schéma simplifié du métabolisme central dans l'embryon d'Arabidopsis (repris de Baud *et al.*, 2008). Ce schéma a été adapté des publications de White *et al.* (2000); Schwender *et al.* (2004) et Schwender *et al.* (2006). La largeur des flèches est proportionnelle au flux net de carbone dans les différentes voies.

un pool d'hexose phosphate qui sera utilisé dans trois voies distinctes (i) l'accumulation transitoire d'amidon, (ii) la voie oxydative des pentoses phosphates et (iii) la glycolyse cytosolique et plastidiale (Figure 1.6), voir Baud *et al.* (2008) pour une synthèse.

### 1.3. LA SACCHAROSE SYNTHASE

#### 1.3.1. Activité de la saccharose synthase

La saccharose synthase (SUS) est une glycosyl-transférase impliquée dans le métabolisme du saccharose (Sturm et Tang, 1999). Elle catalyse la réaction réversible de conversion de l'UDP et du saccharose en fructose et UDP-glucose. L'enzyme SUS est un tétramère formé de 4 sous-unités identiques. Son poids moléculaire est de 400 kDa environ, chaque sous-unité faisant 90-95 kDa. La saccharose synthase est totalement réversible *in vitro*. Le pH optimum dans le sens du clivage est 6,5 à 7 et de 8 à 9 dans le sens de la synthèse (Nomura et Akazawa, 1973). Le pH de 6,5-7 étant proche du pH cytoplasmique, il a été suggéré que la SUS fonctionnerait *in vivo* plutôt dans le sens du clivage, ce qui rejoint les études sur sa localisation dans les organes puits.

Son activité a été étudiée dans diverses plantes et il a été montré que cette enzyme joue un rôle majeur dans le métabolisme énergétique, contrôlant la mobilisation du saccharose dans différentes voies importantes pour les fonctions métaboliques, structurales et le stockage dans les cellules végétales (Zrenner *et al.*, 1995 ; King *et al.*, 1997 ; Chourey *et al.*, 1998 ; Barratt *et al.*, 2001 ; Haigler *et al.*, 2001 ; Weckwerth *et al.*, 2004). En effet, elle permet d'engager le carbone importé dans les voies de biosynthèse des composés de réserve tel que l'amidon et de maintenir un flux soutenu de saccharose entrant dans l'embryon, les résidus UDP-glucose et fructose générés sont alors associés aux processus de synthèse et d'accumulation des réserves carbonées dans la graine (Schwender et Ohlrogge, 2002 ; Schwender *et al.*, 2006). De plus, elle produit des glucoses phosphorylés qui peuvent entrer dans la glycolyse et servir à la production des précurseurs des acides gras par exemple (Baud *et al.*, 2008, comme synthèse). Cette enzyme est aussi importante pour son fonctionnement en hypoxie ou en anoxie. Dans des racines de tomate en anoxie, seule l'activité SUS permet au saccharose d'approvisionner la glycolyse (Germain *et al.*, 1997). Dans le grain de maïs en développement, l'hypoxie mesurée au centre du grain, n'affecte que peu la synthèse d'amidon et ce résultat est en faveur du fait que la SUS est une enzyme résistante à ce stress (Rollestchek *et al.*, 2005).

Dans de nombreuses études, l'activité de clivage du saccharose par la saccharose synthase (SUS) a été corrélée à la force de puits des organes de réserve, fournissant les substrats



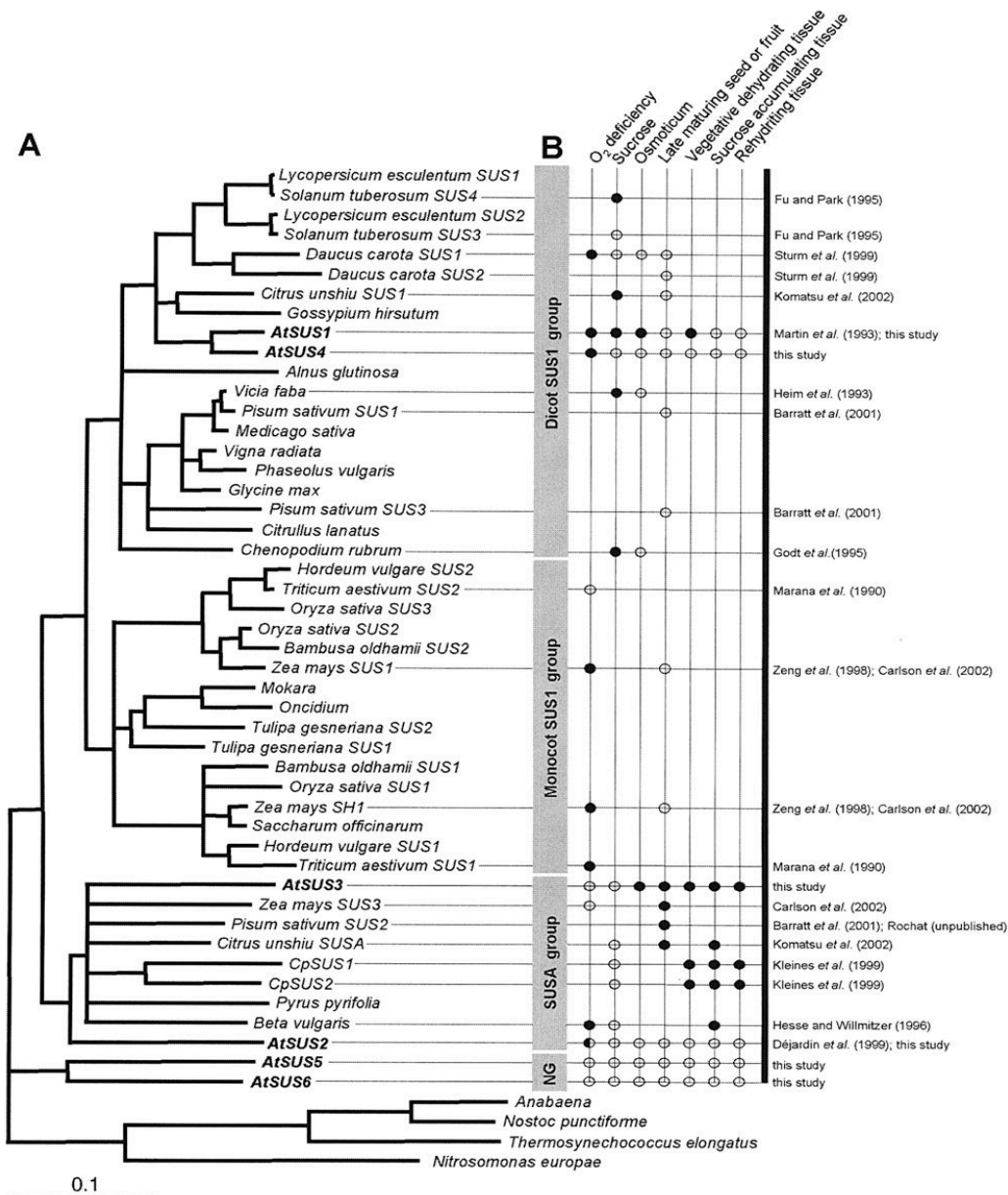
nécessaires à la biosynthèse de l'amidon dans le grain de maïs, le tubercule de pomme de terre ou l'embryon de pois (Sun *et al.*, 1992 ; Zrenner *et al.*, 1995 ; Déjardin *et al.*, 1997). King *et al.* (1997) ont décrit un pic d'activité SUS au cours du développement de la graine de colza, conduisant à s'interroger sur un rôle éventuel de la SUS dans la fourniture de carbone pour le métabolisme des graines oléagineuses.

### **1.3.2. La saccharose synthase : candidate au contrôle de la force des puits**

La première purification de la SUS remonte à 1955. Afin de purifier les enzymes responsables de la synthèse de saccharose dans les plantes, l'équipe du Dr. Cardini, en Argentine, a purifié la SUS2 partir de germe de blé (Cardini *et al.*, 1955). Ce n'est qu'en 1964 qu'Avigad et ses collaborateurs ont montré à partir d'extraits de protéines totales d'*Helianthus tuberosus* qu'en fait, l'équilibre de la réaction de la SUS favorise la dégradation de saccharose *in vivo* (Avigad *et al.*, 1964). La démonstration de la capacité de la SUS à dégrader le saccharose, combinée à la spécificité tissulaire de l'enzyme qui est uniquement retrouvée dans les tissus puits, a mené à la proposition d'un rôle central de la SUS dans le contrôle de l'entrée et de l'utilisation des photoassimilats dans les cellules puits (Fu *et al.*, 1995 ; Lerchl *et al.*, 1995).

### **1.3.3. Une famille de gènes**

La découverte chez le maïs de la présence d'isoformes de SUS, a permis de suggérer que l'enzyme puisse remplir diverses fonctions (Chourey, 1981). Ainsi, si les isoformes de SUS devaient remplir des fonctions différentes, la régulation des gènes codant certaines isoformes pouvait répondre à des stimuli différents. Tel que mentionné auparavant, il a été démontré qu'au moins deux gènes, *SH1* et *SUS1*, sont responsables de l'expression de la SUS dans les tissus du maïs (Chourey et Nelson, 1976 ; McCarty *et al.*, 1986) et qu'ils sont exprimés de façon différentielle dans les tissus du grain tel que suggéré auparavant par Chourey, (1981). La présence d'isoformes de la SUS a aussi été démontrée dans d'autres monocotylédones comme le blé (Maraña *et al.*, 1988), le sorgho (Chourey *et al.*, 1991), l'orge (Sanchez de la Hoz *et al.*, 1992) et le riz (Wang *et al.*, 1992 ; Yu *et al.*, 1992). À cause de la caractérisation intensive de la régulation de l'expression des gènes *SH1* et *SUS1* de maïs, ces derniers devinrent des références pour la classification des gènes de SUS isolés des autres plantes. Ainsi, les nouveaux clones étaient classés parmi les gènes de type *SUS1* ou *SUS2* (comme *SH1* chez le maïs) d'après leur homologie avec les gènes de maïs, leur spécificité tissulaire et leur réponse aux stimuli.



**Figure 1.7.** Comparaison des séquences d'acides aminés et des profils d'expression des saccharose synthases (repris de Baud *et al.*, 2004)

**A.** Arbre phylogénétique de distance effectué à partir du domaine glucosyl-transférase (GT) des protéines SUS. Une analyse « bootstrap » avec 1000 répétitions a été effectuée pour tester la robustesse de la topologie de l'arbre. *Alnus glutinosa*, X92378; *Anabaena*, AJ010639; *Bambusa oldhamii* SUS1, AAL50571 *Bambusa oldhamii* SUS2, AAL50570 *Beta vulgaris*, X81974; *Chenopodium rubrum*, X82504; *Citrullus lanatus*, BAA89232 *Citrus unshiu* SUS1, AB022092; *Citrus unshiu* SUS4, AB022091; *Craterostigma plantagineum* SUS1, AJ131999; *Craterostigma plantagineum* SUS2, AJ132000 ; *Daucus carota* SUS1, X75332; *Daucus carota* SUS2, Y16091 ; *Glycine max*, AF030231 ; *Gossypium hirsutum*, U73588 ; *Hordeum vulgare* SUS1, X65871 ; *Hordeum vulgare* SUS2 X69931 ; *Lycopersicon esculentum* SUS1, L19762 ; *Lycopersicon esculentum* SUS2; AJ011319 ; *Medicago sativa*, AF049487 ; *Mokara 'yellow' orchid*, AF530568 ; *Nitrosomonas europaeae*, ZP\_00002943; *Nostoc punctiforme*, AJ316589 ; *Oncidium* cv. 'Goldiana' orchid, AAM95943 *Oryza sativa* SUS1, X64770 ; *Oryza sativa* SUS2, X59046 ; *Oryza sativa* SUS3, L03366 ; *Phaseolus vulgaris*, AF315375 ; *Pisum sativum* SUS1, AJ012080 ; *Pisum sativum* SUS2, AJ001071 ; *Pisum sativum* SUS3, AJ311496 ; *Pyrus pyrifolia*, BAB20799 *Saccharum officinarum*, AF263384 ; *Solanum tuberosum* SUS3, U24088 ; *Solanum tuberosum* SUS4, U24087 ; *Thermosynechococcus elongatus*, NP\_681838 ; *Triticum aestivum* SUS1, AJ001117 ; *Triticum aestivum* SUS2, AJ000153 ; *Tulipa gesneriana* SUS1, X96938 ; *Tulipa gesneriana* SUS2, X96939 ; *Vicia faba*, X69773 ; *Vigna radiata*, D10266 ; *Zea mays* SH1, X02400 ; *Zea mays* SUS1, L22296 ; *Zea mays* SUS3, AY059416.

**B.** Comparaison des profils d'expression SUS avec les publications afférentes. Les cercles vides représentent l'absence de changement du taux d'ARNm pour le stress considéré. Les cercles pleins représentent une induction transcriptionnelle.

Chez les dicotylédones, malgré le clonage par deux équipes de gènes divergents de SUS chez *Arabidopsis* (Chopra *et al.*, 1992 ; Martin *et al.*, 1993), la confirmation de la présence d'au moins deux gènes de SUS n'est arrivée qu'en 1995 avec le clonage de deux gènes de SUS différents dans la pomme de terre (Fu et Park, 1995). À cause de leur faible homologie avec les gènes de type *SUS1* et *SUS2* caractérisés auparavant chez les monocotylédones, les gènes de pomme de terre furent considérés comme appartenant à des classes différentes et par conséquent, ont été nommés *SUS3* et *SUS4*. Les analyses d'homologies des séquences de *SUS3* et *SUS4*, ont révélé que les deux gènes se seraient distingués après la spéciation de la grande majorité des dicotylédones, car ils présentent plus d'homologies entre eux qu'avec les séquences *AtSUS1* (71 à 72% d'homologie) et SSA (66 à 67% d'homologie) d'*Arabidopsis*, et des séquences de SUS de haricot (74 à 76% d'homologie), et de carotte (78 à 80% d'homologie). Chez le pois, trois gènes sont connus (Büchner *et al.*, 1998 ; Barrat *et al.*, 2001). Le séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* a permis d'identifier la famille de saccharose synthases la plus vaste connue à ce jour, comprenant 6 membres. L'analyse de la structure des gènes et des distances entre séquences déduites en acides aminés révèle que les gènes *AtSUS* appartiennent à trois groupes distincts (Baud *et al.*, 2004) (Figure 1.7).

#### 1.3.4. Les mutants SUS

Afin de démontrer sans équivoque que la SUS contrôle réellement, l'importation et la destination du saccharose dans les organes puits, tel que suggéré par les études corrélatives, les chercheurs ont étudié des mutants SUS.

D'abord, il fut démontré que la mutation naturelle *shrunken 1* chez le maïs (nommée ainsi à cause de l'atrophie des grains de maïs portant la mutation) était associée à la perte complète de l'expression de la SUS codée par le locus *Shl* (Chourey et Schwartz, 1971). Le phénotype ridé du mutant *sh1* étant causé par une diminution de la quantité d'amidon accumulé dans la graine, les auteurs ont alors suggéré qu'il y avait réellement une relation directe entre l'activité SUS du grain de maïs et sa capacité à synthétiser de l'amidon (Chourey et Nelson, 1976), tel que suggéré auparavant par la comparaison du profil d'activité SUS et d'accumulation d'amidon dans les organes puits. Par contre, les résultats alors obtenus montraient que le mutant *sh1* possède un niveau résiduel d'activité SUS de 3-5% comparativement à la plante sauvage, et ce, malgré la perte complète du locus *Shrunken 1*. Plus tard, la découverte d'un second gène de SUS (*Sus1*) responsable de l'activité résiduelle retrouvée dans le mutant *sh1* a mené à la suggestion de rôles spécifiques pour chacune des deux isoformes de SUS. L'isoforme SS1, le produit du gène *Shl*, qui est spécifiquement

exprimée dans les tissus accumulateurs d'amidon, serait responsable du contrôle de la synthèse de l'amidon, et SS2, le produit du gène *Sus1* retrouvé dans les tissus en croissance rapide comme les jeunes feuilles, produirait les substrats nécessaires à l'élongation des cellules dans les tissus en croissance (McCarty *et al.*, 1986 ; Nguyen-Quoc *et al.*, 1990). Toutefois, le rôle proposé pour chacune des deux isoformes de SUS de maïs ne semble pas faire l'unanimité. Il a été suggéré que la diminution du contenu en amidon dans le mutant *sh1* était en fait le résultat d'une dégénération cellulaire causée par l'incapacité des cellules mutantes de synthétiser la cellulose qui est nécessaire à l'élaboration de la paroi cellulaire (Chourey *et al.*, 1998). Ainsi, SS1 ne fournirait pas les substrats pour la synthèse d'amidon, mais plutôt pour la synthèse de la paroi cellulaire. Dans cette lancée, le même article soutient que l'isoforme SS2 serait responsable de l'approvisionnement du métabolisme de l'amidon (Chourey *et al.*, 1998). Plus récemment, un troisième gène a été identifié chez le maïs, SUS3, (Carlson *et al.*, 2002). Ce gène est plus proche des gènes de dicotylédones (Figure 1.7), il est aussi exprimé dans les embryons en cours de développement. Des pommes de terre transgéniques exprimant un ADNc antisens du gène de la SUS de pomme de terre ont ensuite été produites afin d'y inhiber l'expression de la SUS (Zrenner *et al.*, 1995). L'expression du transgène a permis d'atteindre jusqu'à 96% d'inhibition de l'activité SUS dans les tubercules. Les tubercules de ces plantes accumulaient le tiers de la quantité d'amidon des tubercules témoins, et ce, au profit du glucose et du fructose qui ont vu leur niveau augmenter de 277 et 158 fois, respectivement (Zrenner *et al.*, 1995). La diminution importante du contenu en amidon a entraîné une diminution de 50% du poids sec moyen des tubercules, sans toutefois qu'il n'y ait d'effet sur la valeur du poids frais (Zrenner *et al.*, 1995). Aussi en réponse à la perte d'activité SUS, l'activité saccharolytique de l'invertase acide du tubercule a été haussée de 38 fois. À la lumière de ces résultats, les auteurs conclurent aussi que SUS joue un rôle essentiel pour l'établissement de la force de puits et pour l'approvisionnement du métabolisme de l'amidon du tubercule de pomme de terre. De plus, l'augmentation majeure de l'activité invertase acide n'a pas permis de compenser la perte de SUS (Zrenner *et al.*, 1995). Chez le pois, 3 isoformes sont recensées (SUS1, SUS2, SUS3), une mutation sur le gène *SUS1* (Craig *et al.*, 1999) conduit à des graines fortement ridées et pauvres en amidon. Cette mutation n'exerce, par contre, aucun rôle sur la teneur en cellulose, mettant en évidence que les différentes isoformes peuvent remplir différentes fonctions métaboliques dans la plante.

Le rôle de la saccharose synthase chez la graine et la fibre de coton a été mis en évidence par Ruan *et al.* (2003). L'analyse a été concentrée sur 0 à 3 jours après l'anthèse (JAA) pour le

développement précoce de la fibre et 25 JAA, quand la fibre et la graine sont à leur taille maximale. La suppression de l'activité de SUS de 70% ou de plus dans l'épiderme d'ovule a mené à un phénotype de diminution de la quantité des fibres. Le niveau de la suppression de SUS était corrélé fortement avec le degré d'inhibition de déclenchement et d'élongation des fibres, probablement en raison de la réduction des hexoses. Dans la graine, la suppression de SUS dans le tissu maternel, réprime le développement de la fibre sans affecter le développement de l'embryon ni la taille de la graine. Par contre, la suppression additionnelle dans l'albumen et l'embryon empêche leur développement (Ruan *et al.*, 2003).

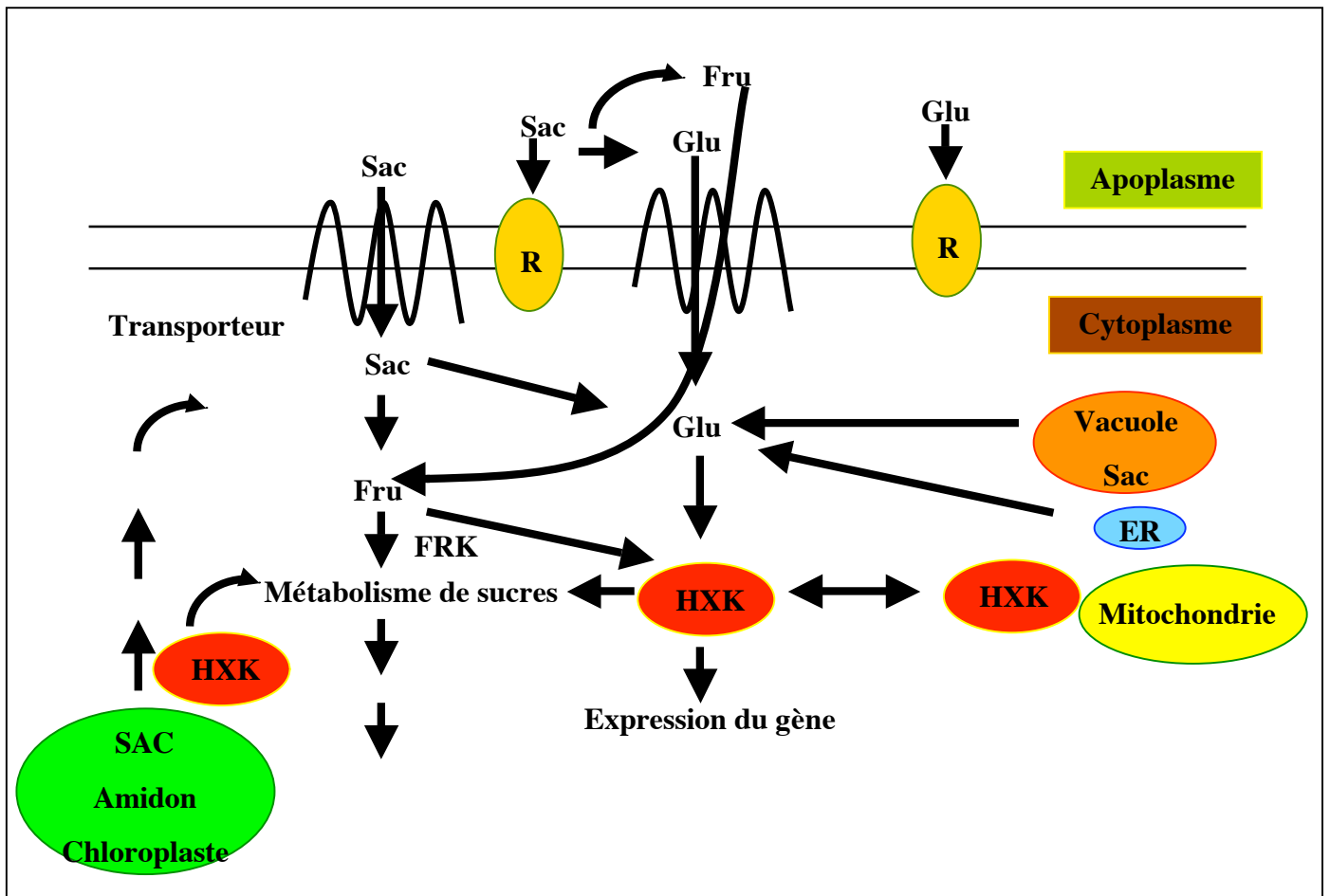
Plus récemment les propriétés et les modèles d'expression des six isoformes de SUS dans *Arabidopsis* ont été décrits, et les fonctions de celles-ci ont été explorées par l'analyse des mutants d'insertion de T-DNA (Bieniawska *et al.*, 2007). Les isoformes ont des propriétés cinétiques généralement semblables. Bien qu'il y ait une variation de sensibilité à la rétro-inhibition par le fructose, elle est peu susceptible être d'une importance physiologique principale. Aucune isoforme n'a les mêmes modèles d'expression spatiaux et temporels (Baud *et al.*, 2004 ; Bieniawska *et al.*, 2007 ; Fallahi *et al.*, 2008). Certaines sont fortement exprimées dans des tissus spécifiques, tandis que d'autres sont exprimés de façon plus ubiquitaire. Dans tous les organes examinés, plus d'une sont exprimées. Les plantes mutantes pour une des isoformes n'ont aucun phénotype évident de croissance, et ne sont pas sensiblement différentes des plantes du type sauvage ; les graines matures ne diffèrent pas dans leurs masses dans les conditions de croissance (Bieniawska *et al.*, 2007) utilisées. Les doubles mutants manquant des paires d'isoformes suivantes SUS2 et SUS3, et SUS5 et SUS6, ne sont également pas sensiblement différents à ces égards des plantes de type sauvage. Ces résultats semblent étonnants par rapport aux phénotypes marqués qui sont obtenus quand on élimine différentes isoformes de la SUS dans des plantes cultivées comme le pois, le maïs, la pomme de terre et le coton (Bieniawska *et al.*, 2007).

## 1.4. LE CONTRÔLE DE L'EXPRESSION DE LA SACCHAROSE SYNTHASE

### 1.4.1. Perception des sucres et signalisation par les hexoses et le saccharose

Les sucres peuvent agir également en tant que signaux de régulation pour contrôler l'expression de divers gènes impliqués dans différents processus de la plante (Koch, 1996 ; Jang et Sheen, 1997 ; Smeeckens, 1998 ; Lalonde *et al.*, 1999 ; Roitsch, 1999). Deux systèmes pour la détection d'hexoses existent dans la plante : un système dépendant de la voie des hexokinases (HXK) et l'autre non. Le système dépendant de HXK requiert la phosphorylation

des sucres tandis que le second permet la perception directe (Smeekens, 2000). Les évidences en faveur de la signalisation dépendante de HXK sont venues des observations qui montraient que des analogues de sucres, phosphorylés par HXK, pouvaient déclencher la répression des gènes photosynthétiques (Jang et Sheen, 1994). De plus, le métabolisme des sucres phosphorylés n'est pas nécessaire pour réprimer l'expression des gènes photosynthétiques, puisque les deux analogues de glucose, le 2-désoxy glucose (2-DG) et le 2-désoxy mannose, qui ne peuvent pas être métabolisés après la phosphorylation peuvent également causer la répression de ces gènes. Ces résultats ont suggéré que les voies de signalisation par les sucres ne se chevauchent pas avec des voies métaboliques du glucose. La possibilité que le glucose soit converti en d'autres dérivés pouvant déclencher la répression sans subir la phosphorylation a été également éliminée (Jang et Sheen, 1994). Le Glucose-6-phosphate (G-6-P) a été montré agir en tant que signal de répression (Brun *et al.*, 1993). La fourniture directe des sucres phosphorylés dans les cellules de maïs par l'intermédiaire d'électroporation ne provoque pas la répression des gènes photosynthétiques (Jang et Sheen 1997). La concentration intracellulaire de G-6-P n'ayant pas augmenté en réponse à un traitement avec le glucose, il a été suggéré que le glucose était un signal direct. De plus, le mannoheptulose, un inhibiteur concurrentiel de HXK a bloqué la répression provoquée par le 2-DG. Ces observations indiquent que la HXK est le senseur médiateur du signal de répression. Cette idée a été soutenue par le fait que le 3-oxy-méthyl-glucose (3-O-MG) ne pourrait pas relayer la répression provoquée par le 2-DG parce que le 3-O-MG ne peut pas être phosphorylé par HXK. Les évidences de l'existence des voies de signalisation indépendantes de HXK sont venues grâce aux observations sur les analogues du glucose. Le 6-désoxy glucose (6-DG), un analogue de glucose, qui est transporté à travers la membrane plasmique mais qui ne peut pas être phosphorylé par la HXK, active l'expression des gènes codant l'invertase de paroi cellulaire (CIN), la saccharose synthase (SUS) et la phénylalanine ammonia lyase (Roitsch *et al.*, 1995 ; Godt et Roitsch, 1997 ; Ehness *et al.*, 1997). Similairement le 3-O MG qui ne peut pas être phosphorylé est capable d'activer le promoteur « patatin class-1 », ce qui suggère l'existence de voie de signalisation indépendantes de la HXK (Roitsch, 1999). Trois voies de transduction du signal « glucose » dans les plantes ont été suggérées (Xiao *et al.*, 2000) : (i) une voie dépendante d'AtHXK1 dans laquelle l'expression du gène est corrélée à la fonction de signalisation modulée par l'AtHXK1 (ii) une voie dépendante de la glycolyse, contrôlée par l'activité catalytique des AtHXK1 et HXK2 un hétérologue de levure (iii) une voie indépendante de HXK dans laquelle l'expression du gène est indépendante d'AtHXK1. Cependant, en utilisant, deux mutations indépendantes pour l'isoforme de HXK1, il a été



**Figure 1.8.** Les emplacements possibles pour la perception des signaux sucres par les hexokinases (basé sur Rolland *et al.* (2002)). Glu, glucose ; Fru, fructose ; Sac, saccharose ; HXK, hexokinase ; ER, réticulum endoplasmique ; FRK, fructokinase; R, récepteur. (repris de Gupta et Kaur, 2005).













montré que le métabolisme du G-6-P est découplé du signal dépendant de HXK1 (Moore *et al.*, 2003). Un mécanisme pour la détection du glucose par la HXK1, où un changement de conformation par l'union de substrat lance une cascade de signalisation, a été proposé (Harrington et Bush, 2003). Cependant, il n'est pas encore établi clairement, si la HXK détecte le glucose d'une façon dépendante de la concentration linéaire en glucose ou bien si la HXK détecte le flux de glucose directement. Donc, la détection d'hexoses et les fonctions de signalisation sont encore dépendantes de la localisation subcellulaire, de la translocation et de l'interaction avec les effecteurs en aval de HXK (Rolland *et al.*, 2002). Les emplacements possibles, pour la signalisation de sucre sont montrés sur la Figure 1.8. De multiples voies de transduction du signal glucose, qui contrôlent divers gènes et processus, sont intimement liées aux étapes du développement et aux conditions environnementales (Xiao *et al.*, 2000).

Une fonction de signalisation pour le saccharose a été également suggérée, puisqu'il a été montré que le saccharose réprime les niveaux d'ARNm et l'activité de transport du « proton-sucrose symporteur » (Barker *et al.*, 2000). La double fonction des sucres (nutriment et molécule de signalisation) complique l'analyse des mécanismes impliqués dans les voies de transduction des signaux (Rolland *et al.*, 2001).

#### 1.4.1.1. Régulation des gènes *SUS* par des signaux sucres

Les Saccharose synthases sont connues pour répondre aux concentrations en sucres (Salanoubat et Belliard, 1989 ; Koch *et al.*, 1992 ; Fu et Park, 1995 ; Fu *et al.*, 1995 ; Godt *et al.*, 1995 ; Huang *et al.*, 1996 ; Koch, 1996 ; Komatsu *et al.*, 2002). Par exemple, chez le maïs, l'expression maximale du gène *shunken1* (*Sh1*) est soumise à l'approvisionnement limité d'hydrates de carbones, tandis que le gène *Sus1* est fortement exprimé quand les sucres sont abondants (Koch *et al.*, 1992). Il est connu chez le riz que l'expression des deux gènes *SUS*, *RSUS1* et *RSUS2*, est régulée par des sucres (Liao et Wang 2002). Les sucres peuvent servir de molécules signal régulant l'expression de nombreux gènes *via* différentes voies de transduction. La voie de régulation de *RSUS1* et *RSUS2* n'implique pas l'hexokinase, mais celle-ci aurait une fonction catalytique requise pour le maintien de l'expression maximale du gène. De plus, le gène *SUS4* de la pomme de terre a une expression plus ou moins ubiquitaire dans la plante, mais il est inductible par le saccharose dans les feuilles, alors que l'expression du gène *SUS3* demeure inchangée dans les mêmes conditions (Fu et Park, 1995). Cette induction est régulée par la présence de boîtes « *sucrose responsive* » (SURE) se situant dans les régions 5' et 3' UTR du gène *SUS4* (Fu *et al.*, 1995). Chez *Arabidopsis*, le gène *SUS1* est régulé par des sucres (Ciereszko et Kleczkowski, 2002), et le D-glucose et le D-mannose



	<i>LEC2</i>	<i>FUS3</i>	<i>ABI3</i>	<i>LEC1</i>
	<i>pLEC2::GUS</i>	<i>pFUS::FUS GFP</i>	ISH	ISH
	Santos et al. unpubl. To et al., 2006	Gazzarini et al., 2004	To et al., 2006	Lotan et al., 1998
Late heart				
Torpedo				
U shape				

**Figure 1.9.** Spécificité tissulaire du réseau de régulation B3 dans le développement de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana*. Les secteurs où l'expression du gène est détectée sont indiqués en rouge. Les profils d'expression ont été déterminés à partir de la fusion promoteur:GUS pour *LEC2*, et promoteur: cDNA:GFP pour *FUS3*, des hybridations *in situ* (ISH) ont été réalisées pour *ABI3* et *LEC1*. (repris de Santos-Mendoza *et al.*, 2008)

régulent ce gène *via* des mécanismes modulés par l'hexokinase. Le saccharose a probablement un effet d'induction indirecte sur l'expression d'*AtSUS1*. De plus, ce gène pourrait avoir une expression dépendante du potentiel osmotique des cellules. Donc l'expression du gène *AtSUS1* serait régulée par au moins deux voies de transduction dépendantes de la nature et de la force du signal.

#### **1.4.2. Facteurs de transcription LEC1, LEC2, ABI3 et FUS3**

Les facteurs de transcription, LEC2, ABI3 et FUS3 sont des régulateurs-clés de la maturation de la graine. Les gènes *LEC1*, *LEC2*, et *FUS3* sont nécessaires du début de l'embryogenèse (Parcy *et al.*, 1997) à la phase de la maturation tardive (Meinke *et al.*, 1994 ; Parcy *et al.*, 1994 ; Holdsworth *et al.*, 1999 ; Raz *et al.*, 2001). LEC2, ABI3 et FUS3 peuvent se lier aux promoteurs de gènes spécifiques de la maturation (Kroj *et al.*, 2003 ; Monke *et al.*, 2004).

##### **1.4.2.1. Structure des gènes LEC2, FUS3 et ABI3**

Les gènes *LEC2*, *FUS3* et *ABI3* codent des facteurs de transcription de la famille du domaine B3 (Giraudat *et al.*, 1992 ; Luerssen *et al.*, 1998 ; Stone *et al.*, 2001). Le domaine de fixation à l'ADN de type B3 de 120 acides aminés a été, à l'origine, identifié comme la troisième région basique de la protéine ABI3 et de son homologue *Viviparous* (VP1) de maïs (McCarty *et al.*, 1991). Ce domaine est également trouvé dans d'autres classes de facteurs de transcription (Qu et Zhu, 2006), nommés ARF (facteurs de réponse à l'auxine ; Ulmasov *et al.*, 1997), RAV (rapporté à ABI3/VP1 ; Kagaya *et al.*, 1999) ainsi que dans la famille de HSI2/VAL (Suzuki *et al.*, 2007 ; Tsukagoshi *et al.*, 2005, 2007). Ce domaine B3 partage quelques similitudes avec le domaine de fixation à l'ADN d'une ribonucléase procaryote. La structure du domaine B3 a été déterminée, et un modèle de son interaction avec l'ADN a été proposé (Yamasaki *et al.*, 2004). *LEC1* appartient à une classe différente de protéines et est homologue à des sous-unités HAP3 des facteurs se fixant à la boîte CAAT (CBF), une famille de facteurs de transcription hétéromérique (Lee *et al.*, 2003 ; Lotan *et al.*, 1998).

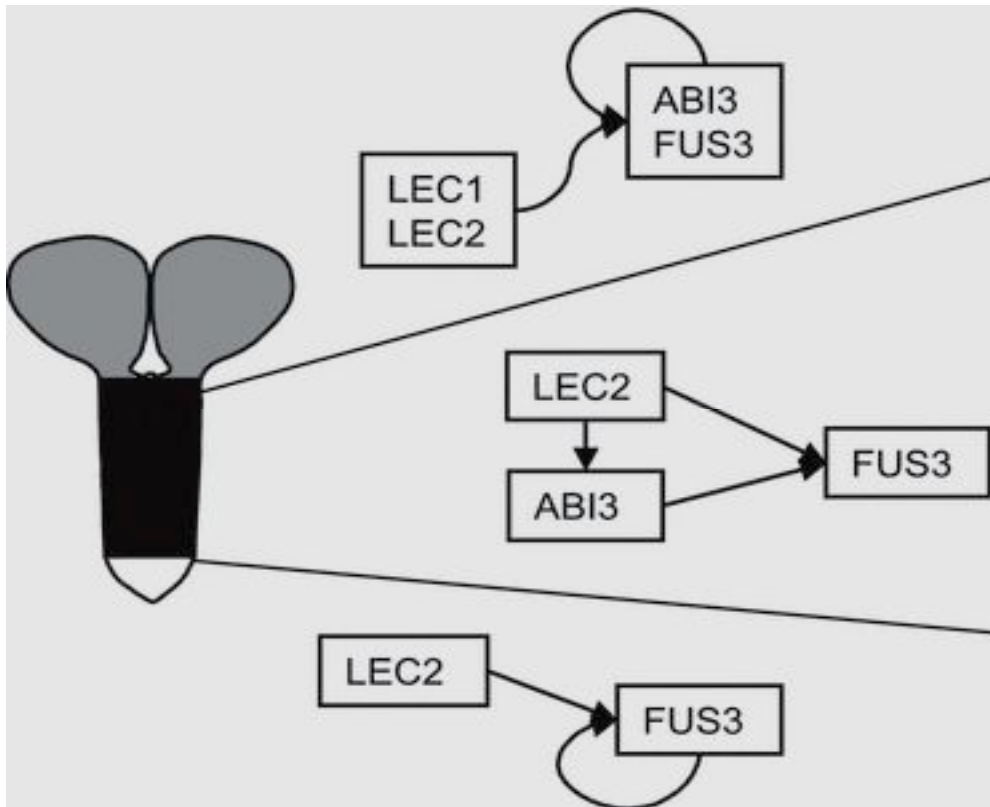
##### **1.4.2.2. Expression des gènes LEC1, LEC2, FUS3 et ABI3**

Les profils d'expression ont été caractérisés pour ces quatre gènes (Figure 1.9). *LEC1* est spécifiquement exprimé dans la graine et est détecté dans l'embryon et l'albumen, pendant l'embryogenèse (Lee *et al.*, 2003 ; Lotan *et al.*, 1998). *LEC2* est principalement exprimé pendant le développement de l'embryon, bien qu'il soit également détecté dans les tissus végétatifs (Kroj *et al.*, 2003 ; Stone *et al.*, 2001). L'expression de *FUS3* a été principalement

détectée dans le protoderme de l'embryon (Gazzarrini *et al.*, 2004 ; Tsuchiya *et al.*, 2004). Compatible avec cette localisation, l'expression spécifique de *FUS3* dans la couche cellulaire du protoderme peut sauver la plupart des phénotypes *fus3*, y compris permettre l'accumulation de SSP dans diverses couches cellulaires de l'embryon (Gazzarrini *et al.*, 2004). Ce modèle d'expression spécifique L1 est difficilement conciliable avec un effet direct de *FUS3* sur le promoteur des gènes de SSP dans tout l'embryon. Il a été proposé que *FUS3* agirait indirectement par la régulation de l'expression de *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* (*TTG1*) et des niveaux hormonaux (GAs et ABA). Récemment il a été prouvé qu'*ABI3* était exprimé dans tout l'embryon, donc cela est compatible avec le modèle d'expression de ses gènes cibles (To *et al.*, 2006). *ABI3* est également détecté dans des organes végétatifs avec un rôle dans le développement du méristème latéral (Rohde *et al.*, 2000). La majeure partie des données disponibles jusqu'ici a été obtenue en utilisant des gènes rapporteurs dirigés par des promoteurs natifs dans des plantes transgéniques. Bien que ces approches aient donné lieu à des résultats cohérents, des expériences complémentaires sont nécessaires pour décrire plus largement l'expression tissulaire et cellulaire de ces gènes de régulation en prenant en considération la régulation post-transcriptionnelle (To *et al.*, 2006).

#### **1.4.2.3. Les mutants *lec1*, *lec2*, *fus3* et *abi3***

Les mutations sur les gènes d'*ABI3* (Giraudat *et al.*, 1992 ; Koornneef *et al.*, 1984), *LEC1* (Lotan *et al.*, 1998 ; Meinke, 1992 ; West *et al.*, 1994), *LEC2* (Meinke *et al.*, 1994 ; Stone *et al.*, 2001) et *FUS3* (Baumlein *et al.*, 1994 ; Gazzarrini *et al.*, 2004 ; Keith *et al.*, 1994 ; Luerksen *et al.*, 1998) ont des effets pleiotropiques semblables sur le phénotype de la graine (Koornneef *et al.*, 1984 ; Harada, 2001 ; Holdsworth *et al.*, 1999 ; Percy *et al.*, 1997 ; Vicent *et al.*, 2000 ; Nambara et Marrion-poll, 2005). Chez les mutants *lec1* et *fus3*, les cotylédons sont porteurs de trichomes et accumulent des anthocyanes, ce qui leur confère une coloration pourpre. Les embryons *lec1*, *lec2* et *fus3* sont vivipares et intolérants à la dessiccation; l'accumulation des réserves est fortement altérée dans tout l'embryon. Ce phénotype est très similaire à celui du mutant *abi3* (Nambara *et al.*, 1992). Le mutant *lec2* produit quant à lui des graines tolérantes à la dessiccation et le processus d'accumulation des réserves n'est affecté que dans les cotylédons (Meinke *et al.*, 1994). Les travaux de Raz *et al.* (2001) ont montré que les mutations de type *fus/lec* affectent la croissance de l'embryon à partir du moment où la courbure des cotylédons est initiée. Dans les embryons plus âgés, le cycle cellulaire est dérégulé et des divisions cellulaires sont encore observées au stade U-retourné chez ces embryons mutants, alors que toute activité de division a cessé chez le sauvage. Par

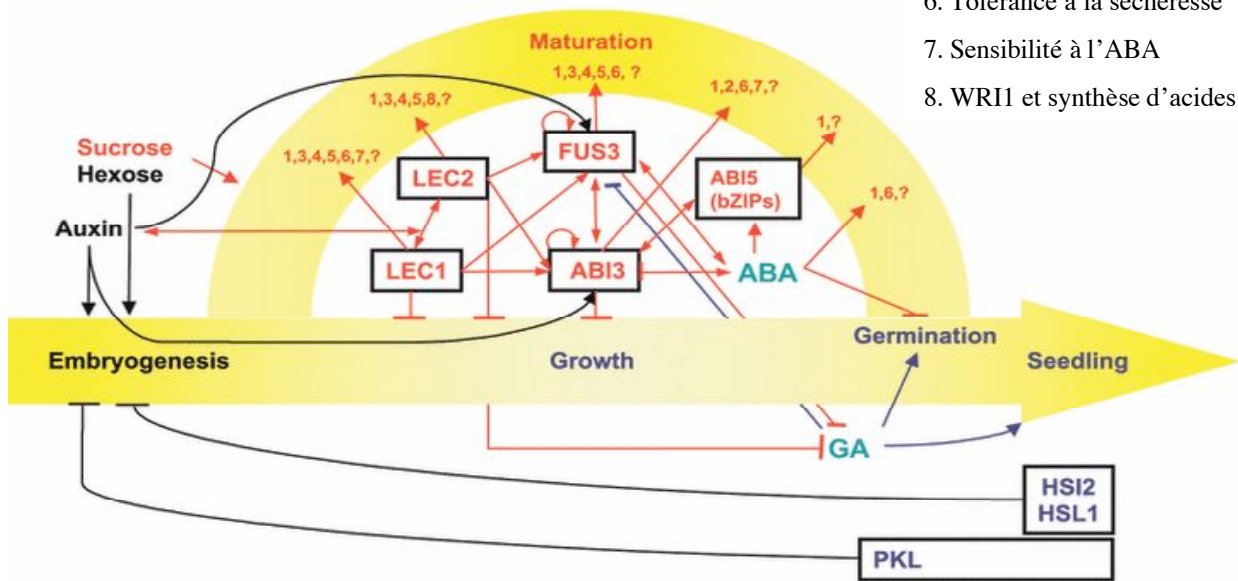


**Figure 1.10.** Un réseau complexe de régulations locales et redondantes. Représentation schématique des contrôles génétiques locaux dans divers tissus de l'embryon (Lotan *et al.*, 1998; To *et al.*, 2006 ; Tsuchiya *et al.*, 2004). (repris de Santos-Mendoza *et al.*, 2008)

conséquent, ces embryons mutants, lorsqu'ils sont retirés de la graine, présentent un potentiel de croissance marqué. Les mutants *abi3* et *aba1* se distinguent des mutants *fus/lec* en ce qu'ils ne présentent pas ce potentiel de croissance; l'arrêt des divisions cellulaires à la fin de la période de morphogénèse de l'embryon a bien été mis en place chez ces mutants. Dès lors, il est permis de penser que les facteurs de transcription LEC/FUS, d'une part, et la voie de signalisation de l'ABA, d'autre part, participent de manière coopérative à l'arrêt de la croissance embryonnaire en fin de morphogénèse, lequel arrêt est indispensable à l'entrée en maturation: les facteurs de transcription de type LEC/FUS seraient responsables de l'arrêt des divisions cellulaires, après quoi l'ABA imposerait un état de dormance à l'embryon (Raz *et al.*, 2001).

#### 1.4.2.4. Un réseau de régulation complexe

Bien que les mutants *lec2*, *fus3* et *abi3* montrent des altérations assez semblables dans les processus de maturation, ils montrent également des phénotypes spécifiques qui semblent être additifs dans les doubles mutants, suggérant que les trois protéines appartiennent à des voies de régulation parallèles qui se recouvrent partiellement (Keith *et al.*, 1994 ; Meinke *et al.*, 1994 ; West *et al.*, 1994). Diverses analyses génétiques ont établi l'existence des interactions entre ces gènes, mais leur vraie nature reste à être élucidé au niveau moléculaire (Brocard-Gifford *et al.*, 2003 ; Nambara *et al.*, 2000 ; Parcy *et al.*, 1997 ; Raz *et al.*, 2001). L'implication de FUS3 et LEC2 a été montrée dans des voies partiellement redondantes pour la régulation locale de l'expression *FUS3* (Kroj *et al.*, 2003). En outre, des analyses de doubles mutants avec *lec1*, *lec2* et *fus3* ont suggéré que LEC1 pourrait agir en amont de LEC2 et de FUS3 (Meinke *et al.*, 1994). Finalement, une analyse génétique approfondie de la régulation de l'expression des gènes en simples et doubles mutants (To *et al.*, 2006) démontre que l'expression de *FUS3* et *ABI3* est contrôlée par un réseau complexe de régulations locales et redondantes impliquant LEC1 et LEC2, et FUS3 et ABI3 eux-mêmes (Figure 1.10). L'expression de *FUS3* est régulée par LEC2 et par lui même (FUS3) dans la pointe de la racine, par LEC2 et ABI3 au niveau de l'axe de l'embryon, et par les quatre régulateurs dans les cotylédons. L'expression d'*ABI3* est également contrôlée par les quatre protéines de régulation dans les cotylédons. Ces résultats sont en agrément avec des études moléculaires démontrant que l'expression ectopique de *LEC1* ou de *LEC2* peut induire l'expression de *FUS3* et d'*ABI3* (Kagaya *et al.*, 2005b ; Santos-Mendoza *et al.*, 2005). Il serait intéressant de savoir dans quelle mesure ABI3 et FUS3 peuvent compléter la mutation *lec1*, comme il a été précédemment déterminé pour le mutant *lec2* (To *et al.*, 2006). Néanmoins, de telles



1. Protéines de stockage
2. Dégradation de la chlorophylle
3. Formation de trichome
4. Répression du système vasculaire
5. Répression d'anthocyanine
6. Tolérance à la sécheresse
7. Sensibilité à l'ABA
8. WRI1 et synthèse d'acides gras

**Figure 1.11.** Modèle proposé des interactions génétiques et moléculaires dans le réseau de régulation impliqué dans le contrôle du développement et de la maturation de la graine chez *Arabidopsis thaliana*. Les flèches et les barres T indiquent des effets positifs et négatifs, respectivement. Les facteurs qui induisent et/ou maintiennent la maturation de la graine sont montrés en rouge. Les facteurs qui favorisent la croissance et la différenciation cellulaire sont montrés en bleu. Les nombres indiquent les diverses cibles des régulateurs (repris de Santos-Mendoza *et al.*, 2008)

expériences ne peuvent pas empêcher des effets non spécifiques 'B3' en raison de l'expression (non physiologique) constitutive de *FUS3* ou *ABI3* qui changerait leur spécificité de fixation à l'ADN. Des expériences additionnelles sont nécessaires pour confirmer ces résultats (e.g. expression ectopique de *FUS3* dans des doubles mutants *abi3 lec2* ou *ABI3* dans un fond mutant *lec2 fus3*). De même, l'induction directe de divers gènes cibles par *LEC2* (Braybrook *et al.*, 2006 ; Kroj *et al.*, 2003 ; Santos-Mendoza *et al.*, 2005) devrait être confirmé dans un fond mutant de *fus3 abi3*. De façon intéressante, au moins deux membres de la famille récemment caractérisée HIS/VAL de répresseurs de la transcription (i.e. *HSI2* et *HSL1*) inhibent de manière redondante le réseau de facteurs de transcription de type B3 pendant la maturation de la graine (Figure 1.11) (Suzuki *et al.*, 2007 ; Tsukagoshi *et al.*, 2005, 2007). Le fait que ces régulateurs peuvent fonctionner par la répression des gènes inductibles par les sucres est compatible avec un rôle de la signalisation par les sucres dans le processus de la maturation.

L'ensemble des éléments présentés durant l'introduction générale permettra de mieux appréhender les chapitres suivants de ce manuscrit de thèse. Nous développerons et discuterons successivement des résultats de la localisation de la protéine *SUS2*, de la régulation des gènes *SUS2* et *SUS3* par trois facteurs de transcription (*LEC2*, *FUS3* et *ABI3*) ainsi que les fonctions des gènes *SUS1*, *SUS2* et *SUS3* dans le métabolisme carboné au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis*.

## **2. LOCALISATION DE LA PROTÉINE AtSUS2**



## **2. L'étude de la localisation d'*AtSUS2* dans la graine indique une forte association avec les plastes**

### **2.1. Résumé**

*AtSUS2* (At5g49190) étant fortement et spécifiquement exprimé durant la phase de maturation de la graine, il semblait important d'obtenir des éléments sur la localisation spatio-temporelle de la protéine correspondante dans la graine. En utilisant des anticorps spécifiques pour cette isoforme, le profil d'accumulation de la protéine SUS2 a été déterminé pendant le développement de la graine pour l'écotype sauvage (Col-0) et un maximum d'accumulation a été révélé à 15 JAF. Nous avons ensuite utilisé des techniques d'immunolocalisation sur coupes de graines en développement. Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que la localisation de la protéine SUS2 évolue au cours du développement. Durant la morphogenèse elle a été détectée dans la couche tégumentaire interne (endothélium), l'albumen et l'épiderme de l'embryon. Durant la phase de maturation, sa présence se généralise dans tout l'embryon (excepté dans le méristème apical et le tissu vasculaire). De plus, nous avons révélé une étroite co-localisation entre la protéine SUS2 et les plastes de l'embryon, mise en évidence grâce à un anticorps spécifique (E37). Ce résultat a permis de suggérer un rôle pour SUS2 dans l'acheminement des produits du métabolisme du saccharose vers G-6-P ou PEP, deux des composés carbonés entrant dans les plastes pour la synthèse d'amidon ou de lipides. Ces résultats suggèrent que SUS2 peut avoir différents rôles dans les tissus et cellules de la graine. Ils ont fait l'objet d'une publication acceptée dans *Plant Cell Physiology* (ci-après).

Running title: SUS2 localization in Arabidopsis seed

Corresponding author: Rochat Christine,

INRA, Seed Biology Laboratory, UMR 204, INRA-AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, RD10, 78026 Versailles Cedex, France.

fax 33 1 30 83 30 96; e-mail [Christine.rochat@versailles.inra.fr](mailto:Christine.rochat@versailles.inra.fr)

**2.2. Study of AtSUS2 localization in seeds reveals a strong association with plastids**

Juan Gabriel Angeles Núñez, Jocelyne Kronenberger, Sylvie Wuillème, Loïc Lepiniec and Christine Rochat\*.

INRA, Seed Biology Laboratory, UMR 204, INRA-AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, RD10, 78026 Versailles Cedex, France.

\*For correspondence: (fax 33 1 30 83 30 96; e-mail [Christine.rochat@versailles.inra.fr](mailto:Christine.rochat@versailles.inra.fr))

**Abstract**

Sucrose synthase (SUS) is a key enzyme in sucrose metabolism. This enzyme catalyses the reversible conversion of sucrose and UDP to UDP-glucose and fructose. In the *Arabidopsis* *SUS* gene family (six members), *SUS2*, is strongly and specifically expressed in *Arabidopsis* seeds during the maturation phase. Using specific antibodies we have shown that, *SUS2* is localised in the embryo, endosperm and seed coat with differential patterns. During the maturation phase, the *SUS2* protein seems to be mainly co-localised with plastids in the embryo. This novel finding is discussed in relation to the role of this enzyme in storage organs.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*, plastids, seeds, sucrose synthase.

Seed development in *Arabidopsis thaliana*, like in many dicotyledon species, can be roughly divided into three stages namely embryogenesis, maturation and desiccation (Baud *et al.*, 2002). These stages are characterised by specific sequences of events and metabolic modifications in the three seed compartments (i.e. embryo, endosperm and seed coat). The seed coat tissue in *Arabidopsis* seeds, is composed of five cell layers (Debeaujon *et al.*, 2003). During maturation, storage compounds are synthesised and accumulated in the embryo in the form of lipids and proteins (Baud *et al.*, 2002).

These massive accumulation of storage compounds requires sucrose imported from maternal tissues (Voelker and Kinney, 2001). Sucrose synthase (SUS) cleavage activity is correlated with the sink strength of storage organs and provides the substrates for starch synthesis in maize or pea embryos (Chourey and Nelson, 1976; Déjardin *et al.*, 1997b). Indeed, analysis of some SUS mutants such as *rugosus4* in pea (*rug4*, Craig *et al.*, 1999) or *shrunken1* in maize (*sh1*, Chourey *et al.*, 1998) revealed that they produce seeds/kernels which are severely affected in their starch accumulation.

The *Arabidopsis* genome contains six sucrose synthase genes, the exact function of each remains to be demonstrated (Bieniawska *et al.*, 2007). *SUS2* is specifically and highly induced in seeds during early maturation phase (12 DAF) and is a marker of the onset of seed storage product biosynthesis, including both triglycerides (oil) and proteins (Baud *et al.*, 2004).

The aim of this study was to determine the relative amount of *SUS2* protein as well and its cellular localization during seeds development in *Arabidopsis*.

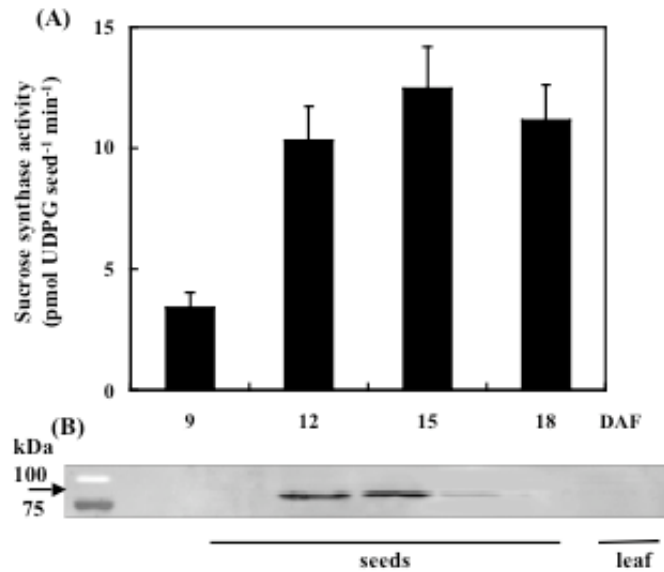


Fig. 1. SUS2 in seeds

(A) Time course analysis of total SUS activity measured on developing seeds isolated from 3 siliques of wild type (Col-0). Values are the means  $\pm$ SE of triplicate measurements on two independent cultures.

(B) Presence of SUS2 protein in seeds of Col-0. Panel shows immunoblot of SDS-polyacrylamide gel of soluble proteins from developing seeds (9 to 18 DAF) and leaves (as a control). All lanes are from the same gel and blot, and contain the same total protein amount (25  $\mu$ g). Left-hand arrow: approximate position of 92 kDa MW. Blot developed with Ab-SUS2.

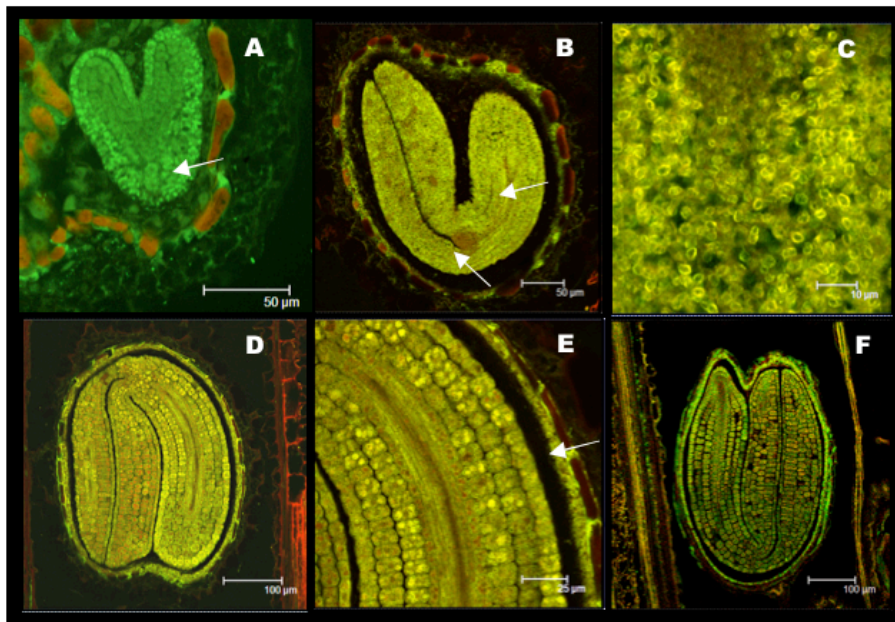


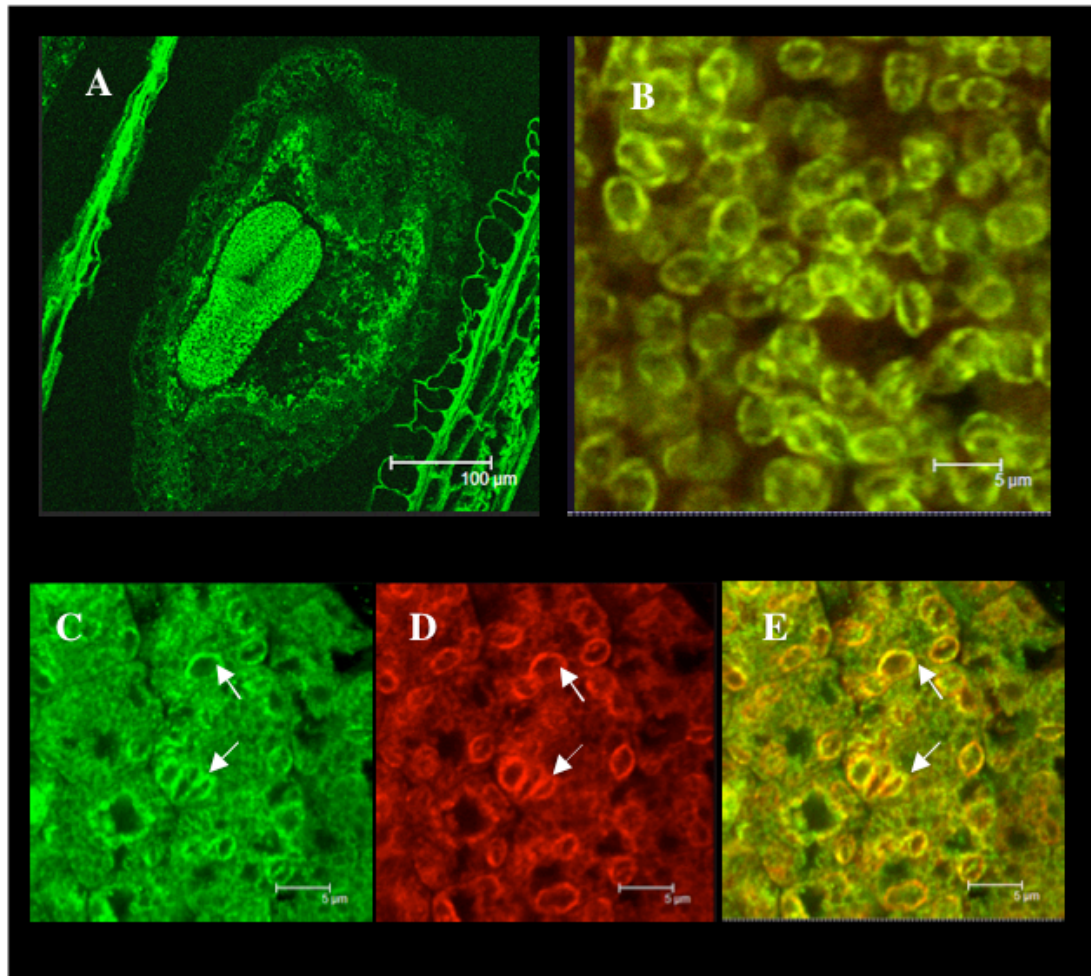
Fig. 2. SUS2 protein immunolocalisation in developing Arabidopsis seeds. Confocal laser-scanning microscopy of a longitudinal section from seeds of the accession Col-0. (A) Seed at torpedo stage (arrow indicates the preferential localization of SUS2 in the epidermis of the embryo). (B) Seed at 12 DAF (arrows show the absence of SUS2 in vascular tissue and the apical meristem). (C) High magnification of embryo at 12 DAF showing elliptic structures within cells. (D) Seed at 15 DAF. (E) Close-up of (D) showing abundance of SUS2 in the endosperm. (F) Seed at 18 DAF.

Total SUS activity was measured in developing Arabidopsis seeds from the Col-0 accession (Fig. 1A). Activity reached a peak during maturation, at about 15 days after flowering (DAF), which corresponds approximately to the middle of this stage (Baud *et al.*, 2002). This activity pattern fitted well with *SUS2* mRNA abundance, although we cannot exclude the presence of other SUS isoform activities, such as *SUS3*, in seeds at late maturation (Baud *et al.*, 2004; Bieniawska *et al.*, 2007; Fallahi *et al.*, 2008). To characterise *SUS2* protein accumulation, a specific antibody was raised against this isoform (see material and methods section), designated as “Ab-SUS2”. This polyclonal antibody recognises a unique band of the expected molecular size ( $\approx 92$  kDa) on immunoblots with Arabidopsis seed crude extracts and no *SUS2* protein was detected in leaves, as expected (Fig. 1B). In Col-0 seeds, *SUS2* protein was mainly accumulated during the early and mid-maturation phases, with a peak at 15 days after flowering (DAF) followed by a strong decrease at 18 DAF (Fig. 1B).

The localization of *SUS2* protein was studied in seeds from 9 to 18 DAF, using Ab-SUS2, conjugated to ALEXA-488 and visualised by confocal microscopy (Fig. 2A-F). *SUS2* protein was detected in embryo, endosperm and seed coat (Fig. 2E). From 6 - 9 DAF, *SUS2* was most abundant in the epidermis of the embryo (Fig. 2A) then, between 12 and 15 DAF *SUS2* protein was observed throughout the embryo (Fig. 2B-D), except in the apical meristem and the vascular zone (Fig. 2B). At 18 DAF, less protein was detected although the localization pattern was the same (Fig. 2F).

Higher magnification of embryo cells at 12 DAF, revealed a strong association of the fluorescent signal with ellipsoid structures of around 3-4  $\mu\text{m}$  for their major axis (Fig. 2C). At 15 DAF (Fig. 2E), however, *SUS2* was clearly localised in both the cytosol and around these organelles.

To confirm the identity of these structures, in developing seeds immunolocalisation was carried out using an antibody against E37, one of the major polypeptides of the inner membrane of the plastid envelope (Teyssier *et al.*, 1996). This protein (an S-adenosyl methionine-dependent methyltransferase) is present in the internal envelope of plastids from photosynthetic and non photosynthetic tissues (Teyssier *et al.*, 1996) as well as in developing embryos (Fig. 3A-B). To confirm the association of *SUS2* with these organelles, a double-localisation was carried out, using both antibodies (Hsieh and Huang, 2005). This experiment strongly suggest that the *SUS2* protein co-localised with plastid associated E37 (compare Fig. 3C-D-E).



**Fig. 3.** E37 protein immunolocalisation in developing *Arabidopsis* seeds.

Confocal laser-scanning microscopy of a section from seeds of the Col-0 accession. (A) Seeds at 9 DAF. (B) Close-up of plastids at 12 DAF. (C-D-E) Co-immunolocalisation of SUS2 with plastids at 12 DAF. (C) Localization of SUS2 obtained with ALEXA 488. (D) Visualisation of plastids with E37 (Teyssier *et al.*, 1996) coupled to ALEXA 563 (E) Overlay of the two images.



SUS2 was also abundant in the endosperm, in particular during the maturation phase (Fig. 4A). In this cell layer, fluorescence revealed that SUS2 was also associated with plastids. In wild type seed, a strong SUS2 expression was also detected in the endothelium layer of the seed coat (Fig. 4A), where condensed tannins are synthesised (Debeaujon *et al.*, 2003). These compounds accumulate in vacuoles of the endothelium cells and a clear signal of SUS2 accumulation was observed in this layer, even in the *tt8-4* mutant (Nesi *et al.*, 2000), which does not accumulate such compounds (Fig. 4B-C). SUS2 was also present in outer integuments where starch accumulates (Fig. 4D-G).

During seed development in Arabidopsis, a peak of total SUS activity was observed at 15 DAF (Fig. 1A), which correlates with expression level of SUS2 protein (Fig. 1B) indicating that *SUS2* gene is specifically and strongly expressed in Arabidopsis seed, during the maturation phase, when reserve accumulation occurs. Nevertheless, at 18 DAF, as relative amount of SUS2, strongly decreased, a high total SUS activity still subsist, certainly due to other SUS isoforms such as SUS3 (Baud *et al.*, 2004 ; Fallahi *et al.*, 2008).

In other species examined to date, sucrose synthase proteins are localised in different tissues that fulfil specific functions. For instance, sucrose catabolism by SUS directly sustains cellulose synthesis and suppression of SUS in the ovule epidermis of cotton seeds represses fiber initiation and elongation (Ruan *et al.*, 2003). The metabolic activity of SUS allows sucrose to enter general cell metabolism giving rise to starch and lipid production (Chourey and Nelson, 1976; Déjardin *et al.*, 1997b; King *et al.*, 1997). In this work, we report the localization of SUS2 protein in the embryo, endosperm and seed coat (Fig. 2, 3 and 4). The expression of the enzyme in these tissues varied during seed development; it was first detected in the endothelium layer of the seed coat, the endosperm and the epidermis of the embryo (Fig. 2A) and subsequently was found throughout the embryo (except for the apical meristem and vascular tissue). This expression pattern correlates well with seed nutrition at this stage and symplasmic domains in the seed (Stadler *et al.*, 2005).

SUS is considered to be cytosolic enzyme (Keller *et al.*, 1988). Nevertheless, membrane association of SUS with plasmalemma is well documented and was first described in cotton fibers or maize kernels (Amor *et al.*, 1995; Carlson and Chourey, 1996). SUS association with the plasma membrane was suggested to channel carbon directly from sucrose to cellulose and/or callose synthases in the membrane. More recently, it has been shown, using *Beta vulgaris* vesicles, that some SUS protein is associated with the tonoplast (Etxeberria and

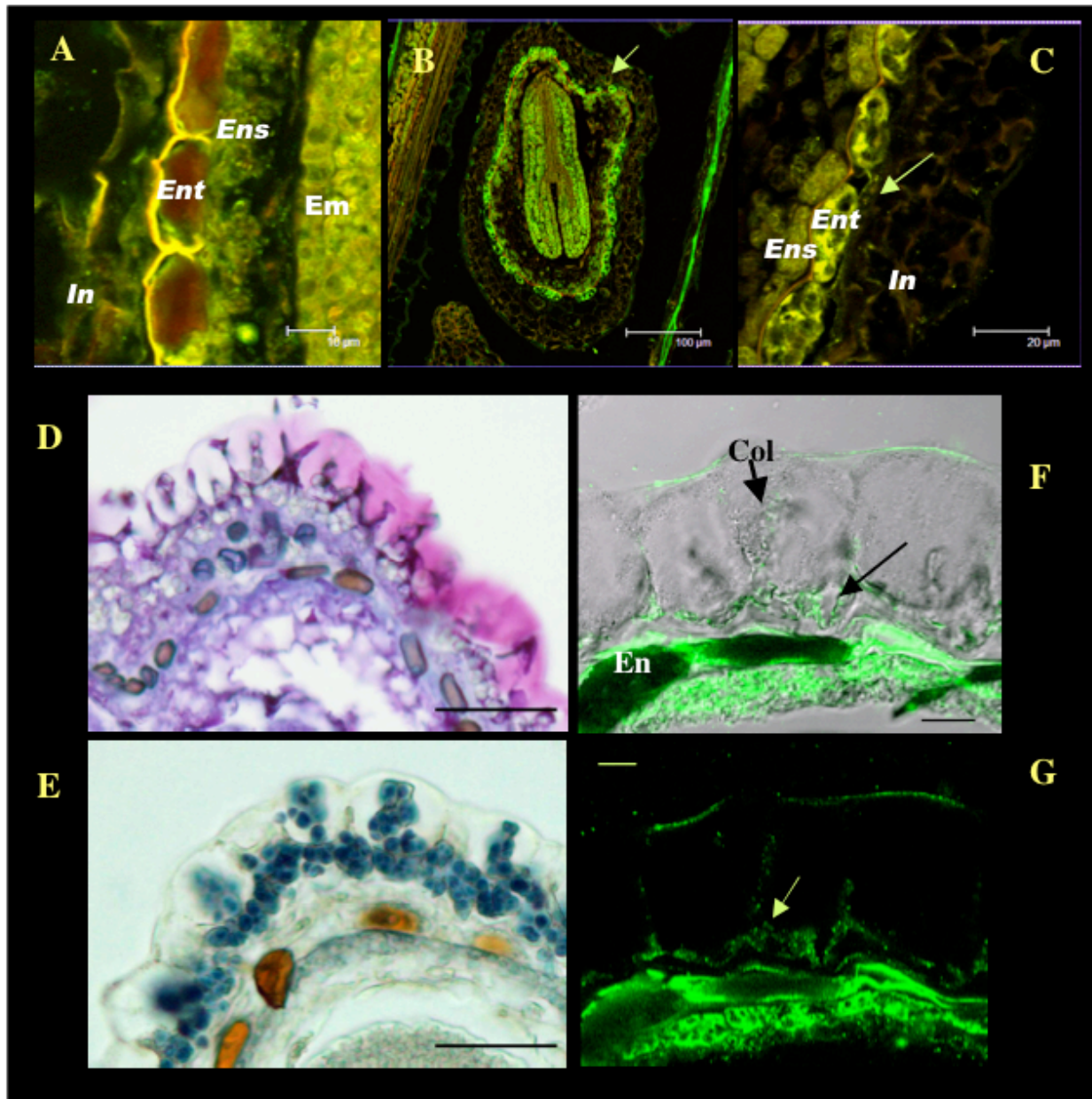


Fig. 4. Details of seed coat structure at 12 DAF. (A) Focus on endothelium layer in a 12 DAF seed. (B-C) Endothelium of *tt4-8* seed showing abundance of SUS2 inside endothelium layer. (D) Coloration with toluidine blue showing mucilage and columella. (E) Coloration with iodine solution showing starch grain in columella and in outerlayer of seed coat. (F-G) Immunolocalisation of SUS2 in external layer. Ens: endosperm, Ent: endothelium layer, Em: Embryo, In: inner seed coat layers, Col: columella. Scale bars, (D), (E) 60 μm; (F), (G) 80 μm.

Gonzalez, 2003). Recent experiments on maize revealed that some SUS isoforms may also be targeted into mitochondrial organelles (Subbaiah *et al.*, 2006).

A new feature was shown in this study: SUS2 protein seems to be associated with plastid membranes during maturation phase (Fig. 2C and Fig. 3). Plastids in seeds, import assimilates that are subsequently converted into storage compounds (starch) and metabolic intermediates (amino acids, acyl-CoAs, sugars, secondary compounds) for export to other cellular compartments for further metabolism such as triacylglycerides in Arabidopsis. This result is consistent with the hypothesis that SUS2 association with the plastid may play a role in channelling of sucrose metabolism to G-6-P or PEP, both carbon compounds which enter the plastids (Fox *et al.*, 2000) enabling starch or lipid synthesis. This result is in accordance with recently published co-localization of SUS protein and starch grains in the seed coat of Arabidopsis (Fallahi, *et al.*, 2008). Co-immunolocalisation of SUS2 with E37, a polypeptide of the inner plastid envelope, clearly showed that the SUS2 protein was not targeted inside the plastid. This is in accordance with the absence of a putative chloroplast targeting sequence (Subbaiah *et al.*, 2006). Significant amounts of SUS2 were also found in two specific layers of the seed coat. The SUS2 protein was present in the endothelium layer around vacuoles containing tannins (Debeaujon *et al.*, 2003). This could suggest a role of SUS2 in tannin biosynthesis as a carbon supplier. Moreover, many genes involved in flavonoid biosynthesis are known to be regulated by sucrose (Solfanelli *et al.*, 2006). SUS2 was also associated with the outer integuments, which include cells that synthesize the polysaccharide mucilage (Fig. 4), which again is in agreement with the presence of starch grains and plastids.

### **Experimental procedures**

Plant material (accession Col-0) was grown as previously described (Baud *et al.*, 2002).

For each developmental stage tested, samples of about 200 seeds isolated from siliques were used for measuring total SUS activity in the 2-step assay as described by Egger and Hampp (1992). The following modifications were introduced: polyclar was omitted, and 0.2% (v/v) Triton X-100 (Sigma) was added to the extraction buffer.

### **Immunoblotting**

Approximately 200 seeds isolated siliques at different developmental stages were extracted at 4°C in 120  $\mu$ l of sample buffer 200mM Tris/Borate pH 8.7 (Egger and Hampp, 1992). Denatured samples were subjected to SDS-PAGE electrophoresis in 8% acrylamide/Bis gel (BIO-RAD), 25  $\mu$ g proteins were loaded. The apparent molecular size of the SUS2 subunit

was determined with precision plus protein™ standards (BIO-RAD) covering a 10-250-kDa range. Polyacrylamide gels were blotted as already described (Dejardin *et al.*, 1997a) with AbSUS2 (1.5:100). This polyclonal antibody was obtained after injecting a synthetic peptide specific for this protein (H2N-PTG RFE TMR EWV YDA C-CONH2) into rabbits (Eurogentec). The peptide chosen was specific of AtSUS2 protein. Immunolabelling was detected using TBS containing 1% BSA and Alexa fluor 488 (anti-rabbit 1:2500; Invitrogen) and incubated for 2-h in darkness. The samples were visualised with a phosphoimager by image reader FLA-5000 V3.0 (FUJIFILM FLA-5000).

### **Immunolocalisation**

For immunolocalisation of the protein, during seed development siliques were fixed as described previously (Macquet *et al.*, 2007). Sections of 8  $\mu\text{m}$  were incubated with the primary antibody (anti-rabbit SUS2 1:500), and secondary antibody (anti-Alexa 488 1:200). The samples were visualised with an inverted Leica TCS-NT confocal laser scanner equipped with an argon/krypton laser (Omnichrome, Chino, CA, USA). Double labelling of SUS2 and E37, was performed as described by Hsieh and Huang (2005) using rabbit antibodies against SUS2 protein (1:100) and rabbit antibodies against E37 (1:500). Sections were treated with both conjugated Alexa 488 against mouse revealing SUS2 protein and conjugated Alexa 568 against rabbit (revealing E37 protein). After three washes, sections were visualised as above. Controls were performed and signal specificity of confocal observations checked at each stage, for each antibody.

### **Acknowledgements**

We acknowledge I. Debeaujon (Versailles) for gift of *tt4-8* seed and M. Block (Grenoble) for the E37 antibody. We thank Dr Helen North for her kind improvement of the English language. This work was supported by a fellowship from the Mexican government for the CONACYT to Juan Gabriel Angeles-Núñez. We are grateful to Lionel Gissot and Olivier Grandjean for assistance with confocal microscopy. The confocal equipment used in this study was partially financed by the region Ile de France.

## References

- Amor, Y., Haigler, C.H., Johnson, S., Wainscott, M. and Delmer, D.P. (1995). A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9353-9357.
- Baud, S., Boutin, J.P., Miquel, M., Lepiniec, L. and Rochat, C. (2002) An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 151-160.
- Baud, S., Vaultier, M.N. and Rochat, C. (2004) Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 55, 397-409.
- Bieniawska, Z., Paul-Barratt, D.H., Garlick, A.P., Thole, V., Kruger, N.J., Martin, C., Zrenner, R. and Smith, A.M. (2007) Analysis of the sucrose synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant J.* 5, 810-828.
- Carlson, S.J. and Chourey, P.S. (1996) Evidence for plasma membrane-associated forms of sucrose synthase in maize. *Mol. Gen. Genet.* 252, 303-310.
- Chourey, P.S., Taliercio, E.W., Carlson, S.J. and Ruan, Y.L. (1998) Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 259, 88-96.
- Chourey, P.S. and Nelson, S.E. (1976) The enzymatic deficiency conditioned by the *shrunk-1* mutation in maize. *Biochem. Genet.* 14, 1041-1055
- Craig, J., Barratt, P., Tatge, H., Déjardin, A., Handley, H., Gardner, C.D., Barber, L., Wang, T., Hedley, C. and Martin, M. (1999) Mutations at the *rug4* locus alter the carbon and nitrogen metabolism of pea plants through an effect on sucrose synthase. *Plant J.* 17, 353-362.
- Debeaujon, I., Nesi, N., Perez, P., Devic, M., Grandjean, O., Caboche, M. and Lepiniec, L. (2003) Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *Plant Cell* 15, 2514-2531.

Déjardin, A., Rochat, C., Maugenest, S and Boutin, J-P. (1997a) Purification, characterization and physiological role of sucrose synthase in the pea seed coat (*Pisum sativum L.*). *Planta* 201, 128-137.

Déjardin, A., Rochat, C., Wuillème, S. and Boutin, J-P. (1997b) Contribution of sucrose synthase, ADP-glucose pyrophosphorylase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds. *Plant, Cell Environ.* 20, 1421-1430.

Egger, B. and Hampp, R. (1992) Invertase, sucrose synthase and sucrose phosphate synthase in lyophilized spruce needles; microplate reader assays. *Trees* 7, 98-103.

Etxeberria, E. and Gonzalez, P. (2003) Evidence for a tonoplast-associated form of sucrose synthase and its potential involvement in sucrose mobilization from the vacuole. *J. Exp. Bot.* 54, 1407-1414.

Fallahi, H., Scofield, G.N., Badger, M.R., Chow, W.S., Furbank, R.T. and Ruan, Y-L (2008) Localization of sucrose synthase in developing seed and siliques of *Arabidopsis thaliana* reveals diverse roles for SUS during development. *J. Exp. Bot.*, doi:10.1093/JXB/ern180.

Fox, S.R., Hills, L.M., Rawsthorne, S. and Hills, M.J. (2000) Inhibition of the glucose-6-phosphate transporter in oilseed rape (*Brassica napus L.*) plastids by acyl-CoA thioesters reduces fatty acid synthesis. *Biochem. J.* 352, 525-532.

Hsieh, H. and Huang, A. H. (2005) Lipid-rich tapetosomes in Brassica tapetum are composed of oleosin-coated oil droplets and vesicles, both assembled in and then detached from the endoplasmic reticulum. *Plant J.* 6, 889-899.

Keller, F., Frehner, M., and Wiemken, A. (1988) Sucrose Synthase, a Cytosolic Enzyme in Protoplasts of Jerusalem Artichoke Tubers (*Helianthus tuberosus L.*). *Plant Physiol.* 88, 239-241.

King, S.P., Lunn, J.P. and Furbank, R.T. (1997) Carbohydrate content and enzyme metabolism in developing canola siliques, *Plant Physiol.* 114, 153-160.

Macquet, A., Ralet, M-C, Kronenberger, J, Marion-Poll A., North H. M. (2007) *In situ*, chemical and macromolecular study of the composition of *Arabidopsis thaliana* mucilage. *Plant Cell Physiol.*48, 984-999.

Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Pelletier, G., Caboche, M. and 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, 1863-1878.

Ruan, Y.L., Llewellyn, D.J. and Furbank, R.T. (2003) Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development. *Plant Cell* 15, 952-964.

Solfanelli, C., Poggi, A., Loreti, E., Alpi, A. and Perata, P. (2006) Sucrose-Specific Induction of the Anthocyanin Biosynthetic Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140, 637-646.

Stadler, R., Lauterbach, C. and Sauer, N. (2005) Cell-to-cell movement of green fluorescent protein reveals post-phloem transport in the outer integument and identifies symplastic domains in *Arabidopsis* seeds and embryos. *Plant Physiol.* 139, 701-712.

Subbaiah, C.C., Palaniappan, A., Duncan, K., Rhoads, D.M., Huber, S.C. and Sachs, M.M. (2006) Mitochondrial localization and putative signaling function of sucrose synthase in maize. *J. Biol. Chem.* 281, 15625-15635.

Teyssier, E., Block M., Douce, R. and Joyard, J. (1996) Is E37, a major polypeptide of the inner membrane from plastid envelope, an S-adenosyl methionine-dependent methyltransferase? *Plant J.* 10, 903-912.

Voelker, T. and Kinney, A.J. (2001) Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 335-361.

Ce travail sur la localisation de la protéine a permis de montrer la localisation de la protéine SUS2 dans les trois compartiment de la graine (embryon, albumen et tégument), ainsi que son association avec les membranes des plastes pendant la phase de la maturation, correspondant à la phase d'accumulation de produits de réserves. De plus, l'activité totale de SUS a été corrélée avec l'accumulation de la protéine SUS2 pendant la phase de maturation. La question était alors d'en savoir plus sur la corrélation entre la période de l'accumulation de la protéine SUS2 et la période d'accumulation des produits de réserves. Pour cela nous avons mis en place une étude sur la régulation des gènes *SUS2* et *SUS3* par trois facteurs de maturation (*LEC2*, *FUS3* et *ABI3*), en utilisant des mutants pour ces facteurs de maturation, fortement perturbés dans leur métabolisme carboné. Cette étude est décrite dans le prochain chapitre.



**3.**  
**RÉGULATION DE**  
***SUS2* ET *SUS3* PAR DES**  
**FACTEURS DE**  
**TRANSCRIPTION**

### 3. Analyse sur la régulation des gènes *AtSUS2* et *AtSUS3* dans la graine d'*Arabidopsis*

#### 3.1. Résumé

Les gènes *AtSUS2* (At5g49190) et *AtSUS3* (At4g02280) étant exprimés fortement à mi-maturation c'est-à-dire la meilleure période de la synthèse de composés des réserves, il semblait important d'obtenir des éléments sur la régulation spatio-temporelle de ces gènes au cours du développement de la graine. En utilisant des approches de physiologie et de biologie moléculaire, nous avons étudié la régulation de l'expression de leur promoteur respectif pendant le développement de la graine pour l'écotype sauvage (Ws) et pour deux mutants de maturation de la graine (*lec2-4* et *fus3-4*). Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que le niveau d'expression des promoteurs (*Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* et *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA*) atteint un pic d'activité durant la phase de maturation de la graine (15 et 18 JAF respectivement) ; ce résultat est cohérent avec le profil d'expression obtenu par histochimie. En utilisant des lignées *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* et *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* en fond mutant (*lec2-4* et *fus3-4*) ainsi qu'une approche de PCR-Q et une caractérisation biochimique, nous avons montré que les profils d'accumulation des ARN messagers et de la protéine aussi bien que l'activité totale, ont été fortement affectés dans ces mutants pendant le développement de graine. L'utilisation d'un anticorps spécifique SUS2 (Ab-SUS2) nous a permis, de plus, de montrer que l'accumulation de la protéine SUS2 est fortement réduite dans *lec2-4* et dans *fus3-4* durant la phase de la maturation. Finalement nous avons prouvé que l'activité du promoteur *AtSUS2* est induit *in planta* par des solutions de sucres (glucose, saccharose et tréhalose). L'ensemble des données nous a permis de suggérer l'implication des gènes *SUS2* et *SUS3* dans le métabolisme carboné pendant le développement de la graine. Ces résultats seront soumis très prochainement pour publication dans la revue «Journal of Experimental Botany» (ci-après).

Running title: *SUS2* and *SUS3* regulation in Arabidopsis seed

Corresponding author: Rochat Christine,

INRA, Seed Biology Laboratory, UMR 204, INRA-AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, RD10, 78026 Versailles Cedex, France.

fax 33 1 30 83 30 96; e-mail [Christine.rochat@versailles.inra.fr](mailto:Christine.rochat@versailles.inra.fr)

**3.2. Comprehensive analysis of *SUS2* and *SUS3* regulation in Arabidopsis seed**

Juan Gabriel Angeles-Núñez, Sylvie Wuillème, Adeline Berger, Martine Miquel, Bertrand Dubreucq, Loïc Lepiniec and Christine Rochat\*.

INRA, Seed Biology Laboratory, UMR 204, INRA-AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, RD10, 78026 Versailles Cedex, France.

\*For correspondence: fax 33 1 30 83 30 96; e-mail [Christine.rochat@versailles.inra.fr](mailto:Christine.rochat@versailles.inra.fr)

### 3.2.1. ABSTRACT

Sucrose synthase (SUS) is a key enzyme in sucrose metabolism. This enzyme catalyses the reversible conversion of sucrose and UDP to UDP-glucose and fructose. The Arabidopsis genome contains six sucrose synthase genes. *SUS2* and *SUS3*, two members of this multigene family, are expressed in Arabidopsis seeds during the maturation phase. The regulation of *SUS2* and *SUS3* expression was investigated during seed development for wild type (WT) and for seed maturation mutants (i.e. *lec2-4* and *fus3-4*). The accumulation patterns of *SUS* mRNA and protein, as well as total activity, were strongly affected in these mutants during seed development. We showed that the activity of the *SUS2* promoter was induced *in planta* by sugar (glucose, sucrose and trehalose) and that the activities of *SUS2* and *SUS3* promoters are redundantly regulated by LEC2 and FUS3 during the maturation phase. This finding is discussed in relation to the role of these enzymes in the biosynthesis of seed storage products.

Key words: sucrose synthase, *Arabidopsis thaliana*, seeds, regulation, *lec2*, *fus3*.

### 3.2.2. INTRODUCTION

Seed development in *Arabidopsis thaliana*, like in many dicotyledon species, can be roughly divided into three stages namely embryogenesis, maturation and desiccation (Baud *et al.*, 2002). These stages are characterised by specific sequences of events and metabolic modifications in the three seed compartments (i.e. embryo, endosperm and seed coat). Embryo and endosperm are surrounded by a maternal tissue derived from the ovary integuments, the seed coat. This tissue in *Arabidopsis* seed is composed of five cell layers (Debeaujon *et al.*, 2003). During the early morphogenesis stage of embryo development (until 6 DAF), cell division occurs together with embryogenesis leading to torpedo stage (Baud *et al.*, 2002). During maturation stage, storage compounds are synthesised and accumulated in the embryo (Mansfield *et al.*, 1992). In *Arabidopsis* seeds, carbon and nitrogen resources are mainly stored in the form of lipids and proteins (Baud *et al.*, 2002). These reserves will fuel the establishment of the seedling after the onset of germination (Bewley and Black, 1994). During late maturation stage, the embryo becomes metabolically quiescent and tolerant to desiccation.

Sucrose represents the major sugar form in which the photosynthetically assimilated carbon is transported in plants. After it has been synthesised in green leaves or siliques walls, sucrose is transported through the phloem, to supply sink organs like seeds (Zhang *et al.*, 2007 for a review). This flux is driven by the so-called sink strength (Ho, 1988). During the seed maturation phase, the accumulation of massive storage compounds relies on the use of sucrose imported from maternal tissues (Voelker and Kinney, 2001). The cleavage of sucrose in plants is catalysed either by invertases ( $\beta$ -D-fructofuranoside fructohydrolase, EC 3.2.1.26) or by sucrose synthases (UDP-glucose: D-fructose 2- $\alpha$ -D-glucosyl transferase, EC 2.4.1.13, SUS). Sucrose synthases (SUS) cleavage activity correlates with sink strength of storage organs, providing substrates for starch synthesis in potato tubers, maize or pea embryos (Zrenner *et al.*, 1995; Chourey and Nelson, 1976; Déjardin *et al.*, 1997). Analysis of some SUS mutants such as *rugosus4* in pea (*rug4*, Craig *et al.*, 1999) or *shrunk1* in maize (*sh1*, Chourey *et al.*, 1998) revealed that resulting seeds/kernels are severely affected in starch accumulation.

In species examined to date, sucrose synthase is encoded by a small multigene family. Expression of different *SUS* genes is spatially and temporally regulated and is differentially modulated in response to anoxia, low temperatures and osmotic stress (Maraña *et al.*, 1990; Chourey *et al.*, 1991; Zeng *et al.*, 1998; Déjardin *et al.*, 1999). Moreover, the expression of

*SUS* genes is also differentially affected by sugars (Salanoubat and Belliard, 1989; Fu *et al.*, 1995; Godt *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1996; Koch, 1996; Komatsu *et al.*, 2002). For instance, in maize, the *SHRUNKEN1* (*SH1*) gene is highly expressed under limited carbohydrate supply, whereas *SUS1* is upregulated when sugars are abundant (Koch *et al.*, 1992). In detached potato leaves, the expression of *SUS4* gene is induced by sucrose, while the expression of *SUS3* remains unaffected (Fu and Park, 1995). In suspension-cultured cells of rice, two sucrose synthase genes, *RSUS1* and *RSUS2*, were found to be differentially regulated by sugars (Liao and Wang, 2003). In addition glucose analogues, 3-*O*-methyl glucose, 6-deoxyglucose and mannose, did not trigger the induction of *RSUS1* expression, suggesting that hexose uptake *per se* and hexokinase are not involved in the sugar-sensing pathway controlling *RSUS1* expression (Liao and Wang, 2003). Last, in Arabidopsis, *SUS1* is upregulated by glucose and D-mannose via hexokinase-dependent mechanisms (Cierieszko and Kleczkowski, 2002).

The Arabidopsis genome contains six sucrose synthase genes (Barrat *et al.*, 2001), the exact function of which remains to be demonstrated (Bieniawska *et al.*, 2007). *SUS2* (At5g49190) was isolated and initially characterised by Chopra *et al.* (1992). This gene is specifically and highly induced in seeds during early maturation phase (12 DAF) and appears as a marker of seeds maturation (Baud *et al.*, 2004). A strong induction in *SUS2* transcript accumulation was measured between 6 and 12 DAF, corresponding to the enhancement of seed maturation phase (Baud *et al.*, 2002). This developmental stage is characterised by a decrease in starch concentration in seeds and by the onset of storage compounds biosynthesis, including both triglycerides (oil) and proteins. This result is consistent with a microarray study that examined changes in gene expression during *A. thaliana* seeds development (Ruuska *et al.*, 2002). *SUS2* appears to be specifically expressed in early maturing seeds and is not induced in leaves in response to various abiotic stresses, including O<sub>2</sub> deficiency, dehydration, or sugar feedings (Baud *et al.*, 2004). *SUS3* is highly induced in seeds during late maturation phase (18 DAF) (Baud *et al.*, 2004; Bieniawska *et al.*, 2007; Fallahi *et al.*, 2008). A strong induction in *SUS3* transcript accumulation was measured in seeds between 15 and 18 DAF, corresponding to maturation phase during which reserve accumulation occurs (Baud *et al.*, 2002; Fait *et al.*, 2006). This developmental stage is characterised by a rapid increase in seed dry weight and accumulation of large quantities of oil and storage proteins.

Moreover, this gene seems also to be induced in various organs under dehydration conditions, including leaves deprived of water or submitted to osmotic stress (Baud *et al.*, 2004).

In *Arabidopsis thaliana*, four major regulators ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3 (ABI3), FUSCA 3 (FUS3), LEAFY COTYLEDON 1 and 2 (LEC1) and (LEC2) control most aspects of seed maturation, such as the accumulation of storage compounds, cotyledon identity, acquisition of desiccation tolerance and dormancy (To *et al.*, 2006; Gutierrez *et al.*, 2007; Santos-Mendoza *et al.*, 2008). It was recently suggested that *SUS2* could be a target of LEC2 (Santos-Mendoza *et al.*, 2005).

Here we report a comprehensive analysis on the regulation of *SUS2* and *SUS3* expression, throughout maturation phase in *Arabidopsis* seeds. To check the regulation of these genes by two transcription factors (LEC2 and FUS3), we used promoter-GUS, quantitative RT-PCR, *in situ* hybridization and biochemical analyses in WT and corresponding mutant alleles (i.e. *lec2-4* and *fus3-4* respectively). Last, to check possible regulation of *SUS2* expression by carbohydrates, the effect of sugar was tested using 15 DAF siliques of *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA*. The results obtained in this study are discussed in relation to the possible role of these enzymes in the biosynthesis of storage products.

### 3.2.3. MATERIALS AND METHODS

#### 3.2.3.1. Plant material and culture conditions

The *lec2-4* (Stone *et al.*, 2001) and *fus3-4* (Harscoët *et al.*, unpublished) mutants are in Wassilewskija (WS) background and obtained from the Versailles's T-DNA collection (Bechtold *et al.*, 1993). Seeds were surface-sterilized and sown on Murashige and Skoog (MS) medium (M02 555, pH 5.6; Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands). After a cold treatment (48-h at 4°C) in the dark, the plates were transferred to a growth chamber and incubated at 20°C/15°C (day/night) temperatures under a 16-h/8-h (light/dark) regime. After 15 days, the plantlets were transferred to sterilised compost, grown under a 16-h/8-h light/dark regime associated with 21°C/18°C (day/night) temperature. The plants were irrigated twice a week with fertilisation solution (Plant-prod, fertile, [www.fertilpot.com](http://www.fertilpot.com)).

#### 3.2.3.2. Assay for sucrose synthase activity

Samples of about 200 isolated seeds for each developmental stage tested were used for measuring total SUS activity in 2-step assay as described by Egger and Hampp (1992). Following changes were introduced: Polyclar was omitted, but 0,2% Triton X-100 (Sigma) was added to the extraction buffer.



### 3.2.3.3. RNA isolation and reverse transcription PCR

Total RNA was isolated using an on-column system (Rneasy Plant Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) with an on-column DNase treatment (RNase free DNase set, Qiagen) according by the manufacturer's instruction. RNAs were reversed transcribed using Superscript II (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The primers sets used in this study were previously reported by Baud *et al.* (2004).

### 3.2.3.4. Quantitative RT-PCR

Quantitative RT-PCR was performed with a Light Cycler using SYBR Green mix (ROCHE, Tutzing, Germany). The primers were designed using the Light Cycler probe design software version 3.5 and tested for efficiency rates as well as sensibility to dilutions series of cDNA samples. Specific primers were designed for *SUS2* and *SUS3* genes (Baud *et al.*, 2004). The parameters for quantitative PCR were: (1) initial denaturation 95°C 8', (2) 45 cycles as follows: 94°C 10'', 55°C 10'' 72°C 15'' with a temperature transition rate of 20°C S<sup>-1</sup>, and (3) determination of fusion curve 94°C 1'', 65°C 30'' and an increase to 94°C with a temperature transition rate of 0.1°C s<sup>-1</sup>. The results obtained were standardised to the constitutive *EF1A4α* gene expression level (Liboz *et al.*, 1990; Nesi *et al.*, 2000).

### 3.2.3.5. Construction of *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* and *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* transgenes and plant transformation

The *SUS2* 5' region used in this study corresponds to region -1744 to -1 bp relative to the *SUS2* translationally start site and was amplified from Ws genomic DNA with 5'-*attB1*-ATGTCGACTACAAAGCGCCAAGGAGATA-3' and 5'-*attB2*-CAAGCTACAGTGAATTTAAA-3', *attB1* and *attB2* referring to the corresponding Gateway™ recombination sequences. The PCR product was introduced by a BP recombination reaction into pDONOR207 entry vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and transferred to the binary vector pBI101-R1R2-GUS (F. Divol, J.-C. Palauqui and B. Dubreucq, Institute Jean-Pierre Bourgin, INRA, Versailles, France, unpublished) by a LR recombination reaction, to obtain a transcriptional fusion between the *SUS2* promoter and *uidA*. The resulting binary vectors were electroporated into *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1pMP90 (Koncz and Schell, 1986) and used for agroinfiltration of *A. thaliana* inflorescences (Bechtold *et al.*, 1993). Six kanamycin-resistant transformants were selected on MS medium and then transferred to soil for further characterisation. The different lines

exhibited similar staining patterns. To conduct measurements of *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* activity during seed development, two representative *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* lines were chosen. *SUS3* 5' region used in this study corresponds to region -1270 to -1 bp relative to the *SUS3* translationally start site and was amplified from *Ws* genomic DNA with 5'-*attB1*-ACGCGTCGACGCGGTTTCAAGCTTATCAAG-3' and 5'-*attB2*-CGGGATCCGAATATTCAGATGATCACTAAAAC-3', *attB1* and *attB2* referring to the corresponding Gateway recombination sequences. To obtain transgenic plants (*Pro<sub>SUS3</sub>:uidA*) we used the same procedure described above. Seven kanamycin-resistant transformants were selected on MS medium and then transferred to soil for further characterisation. The different lines exhibited similar staining patterns. To conduct measurements of *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* activity during seed development, two representative *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* lines were chosen.

### 3.2.3.6. Generation of lines *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* and *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* in mutant backgrounds

*Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* and *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* (female parent) was introduced in *lec2-4* and *fus3-4* mutants backgrounds (male parent) by crossing, using two representative *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* lines and one representative *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* line. Ten plants for each cross were selected for [*lec2*] and [*fus3*] phenotypes, respectively in the progenies for the verification of different GUS patterns. The different lines analysed, exhibited similar GUS staining patterns. For histochemical experiments during seed development, one representative progeny line was chosen for each cross.

### 3.2.3.7. GUS activity

GUS embryo staining was carried out as previously described in Baud *et al.* (2007). The GUS staining was performed using developing embryos isolated from developing seeds, of representative lines. The fluorometric assay was performed as described by Jefferson (1987) on extracts made from *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* developing siliques and *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* developing seeds. The reaction product of the assay, namely 4-methylumbelliferone, was measured kinetically, in duplicates, using a fluorometer (Fluoroskan II; Labsystems, Helsinki, Finland). Protein concentration was estimated for each extract using the method of Bradford (1976).

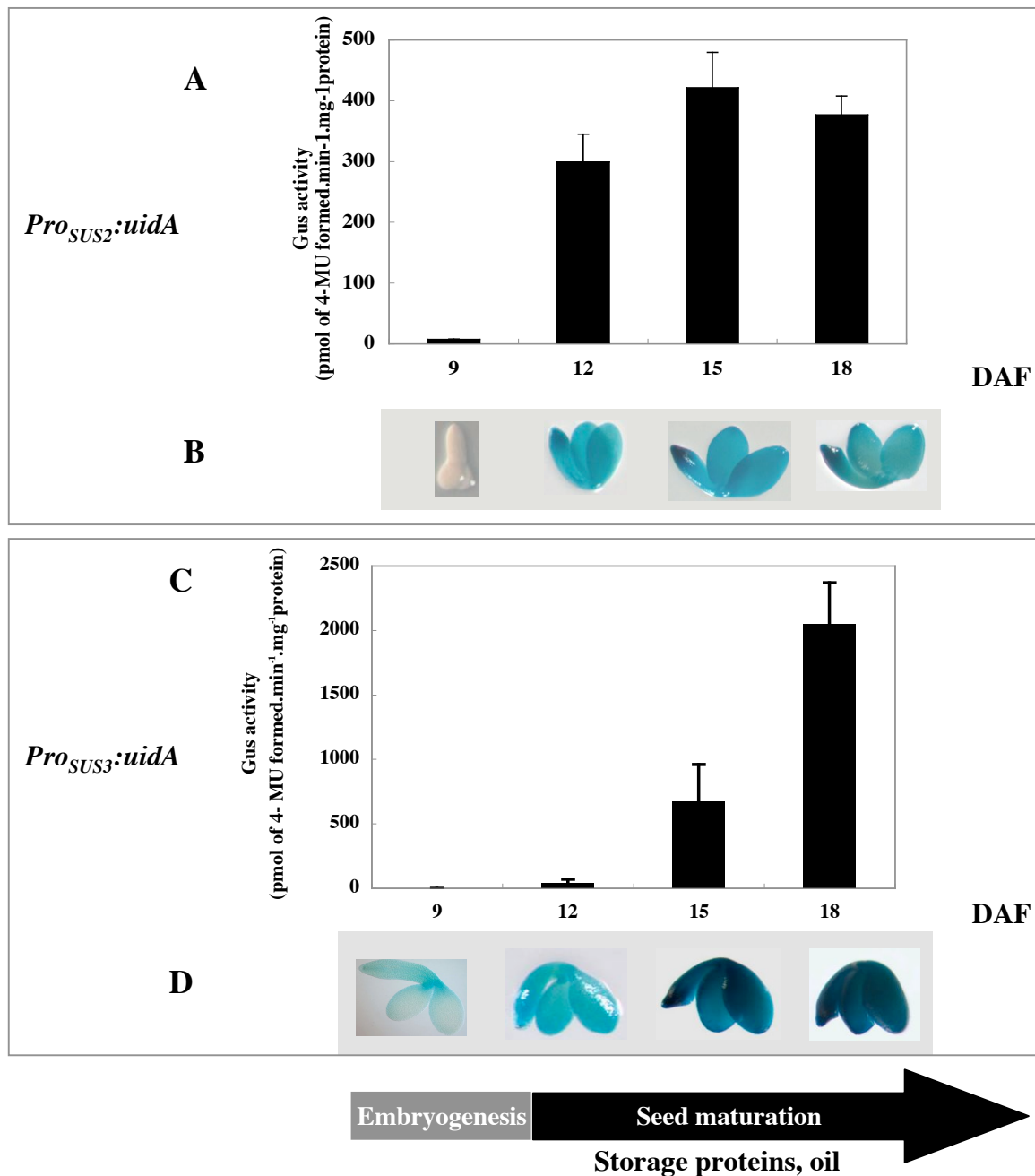


Figure 3.1. *SUS2* and *SUS3* in seeds.

(A) GUS activity was performed using a transgenic *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* silique of indicated ages, of a representative line. Data are the means  $\pm$ SE of fifteen measurements on two independent cultures.

(B) Expression pattern of the *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* in developing embryos. The GUS staining was performed using developing embryos isolated from seeds of indicated ages, of a representative line. Pictures presented in this analysis, are representative images of embryo after GUS staining (for comparison).

(C) GUS activity was performed using seeds isolated of a transgenic *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* silique of indicated ages, of a representative line. Data are the means  $\pm$ SE of fifteen measurements on two independent cultures.

(D) Expression pattern of the *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* in developing embryos. The GUS staining was performed using developing embryos isolated from seeds of indicated ages, of a representative line. Pictures presented in this analysis, are representative images of embryo after GUS staining (for comparison).

### 3.2.3.8. Immunoblotting and Immunolocalisation

Immunoblotting and immunolocalisation analyses were performed as described previously by Angeles *et al.* (2008) and Macquet *et al.* (2007) respectively.

### 3.2.3.9. *In situ* hybridization

The GUS fragment used as probe was amplified using specific primers *GUS* (5'-ATG GGT CAG TCC CTT ATG TTA CGT-3' and 5'-TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCT CAT TGT TTG CCT CCC TGC TG-3'). The probe was labelled using digoxigenin (DIG 11d-UTP; DIG oligonucleotide tailing kit; Roche, Meylan, France) according to the manufacturer's instructions. Developing siliques from transgenic plants carrying the *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* and *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* were fixed, embedded and sectioned as described by Baud *et al.* (2005). *In situ* hybridization and immunodetection of the DIG-labelled probes were performed using an anti-DIG antibody coupled with alkaline phosphatase, as described by the manufacturer (Roche).

### 3.2.3.10. Sugar feeding

Siliques aged of 15 DAF from two representatives transgenic lines carrying the *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* were fed with the reported concentrations of glucose, sucrose, trehalose, mannitol, MES, 2-deoxyglucose, 3-*O*-methyl glucose and *N*-acetyl-glucosamine, in the dark for 17 h. After treatment, siliques were frozen in liquid N<sub>2</sub> and stored at -80 °C before measuring *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* activity.

### 3.2.3.11. Carbohydrate analyses and lipid analyses

Samples of 20 lyophilised seeds for each developmental stage tested were used for the carbohydrate and lipid analyses, as described by Baud *et al.* (2002).

## 3.2.4. RESULTS

### 3.2.4.1. Functional analysis of *SUS2* and *SUS3* promoter

To gain further insights into the spatio-temporal regulation of *SUS2* and *SUS3* expression, several complementary techniques were used. First the spatio-temporal activity of the *SUS2* and *SUS3* 5' region was investigated. A 1744 bp fragment (referred to as *Pro<sub>SUS2</sub>*) and a 1270 bp fragment (referred to as *Pro<sub>SUS3</sub>*) were fused translationally to the *uidA* reporter gene. Six and seven, respectively, kanamycin-resistant transformants were selected on MS medium and

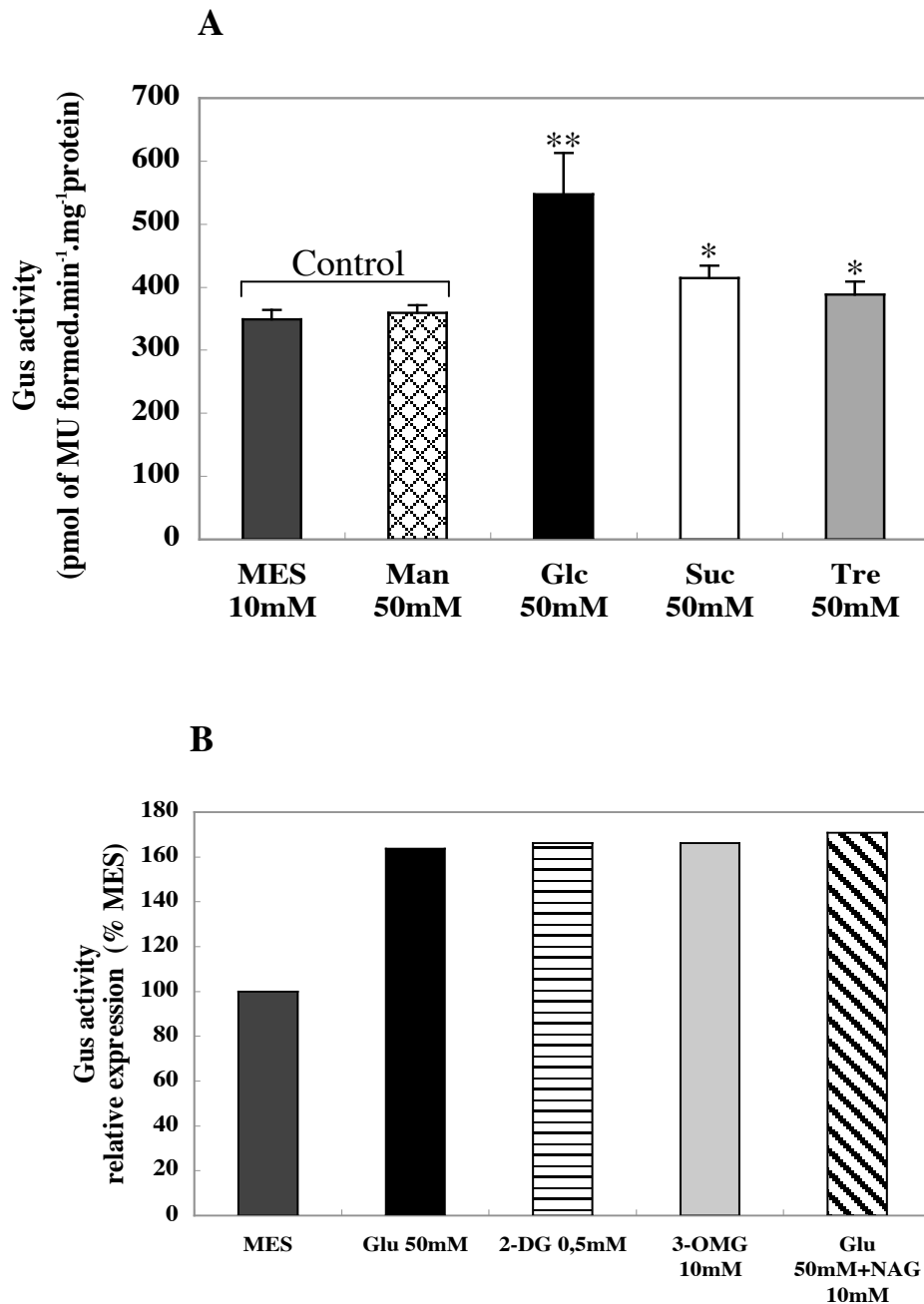


Figure 3.2. (A) Effects of sugars on expression of *Pro<sub>SUS2</sub>::uidA* in 15 DAF siliques. Siliques of a representative line were incubated using glucose (Glc) 50mM; sucrose (Suc) 50mM; trehalose (Tre) 50mM; mannitol (Man) 50mM and MES 10mM in feeding solution. Values are the means  $\pm$ SE of thirty measurements on two independent cultures; \*\* P<0,01 student T-test.

(B) Effects of two glucose analogues and an inhibitor of hexokinase on expression of *Pro<sub>SUS2</sub>::uidA* in siliques of 15 DAF. Siliques of a representative line were incubated using either glucose (Glc) 50mM; 2-deoxyglucose (2-DG) 0.5mM; 3-O-methyl glucose (3-OMG) 10mM; N-acetyl-glucosamine (NAG) 10mM, in feeding solutions.

Siliques were incubated during 17 hours at dark. Data obtained on more than 15 siliques were plotted as relative expression of *Pro<sub>SUS2</sub>::uidA* in MES (10mM control).

then transferred to the soil for further characterisation. The different lines obtained exhibited similar staining patterns. To conduct measurements of *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* and *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* activity during seed development, two representative *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* and *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* lines were chosen. The chimeric construct activities of *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* and *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* in transgenic *A. thaliana* lines were assayed by fluorometric measurements. *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* activity, showed a strong increase from 12-18 DAF (Figure 3.1-A). Activity was detected in the seed coat, in the endosperm (data not shown) and in the embryo of maturing seeds. Staining was found in U-shaped embryos, later in the hypocotyls and in the outer parts of young cotyledons (Figure 3.1-B). No staining was found at the torpedo stage of development and earlier. This was fully consistent with the results of *SUS2* immunolocalisation reported by Angeles-Nuñez *et al.* (2008).

*Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* activity was measured during seed development and showed a strong increase from 15 to 18 DAF (Figure 3.1-C). Spatial detection of *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* activity showed activity in the seed coat, in the endosperm (data not shown) and the embryo of maturing seeds. Staining was found in U-shaped embryos and later, in the hypocotyls and in the outer parts of young cotyledons (Figure 3.1-D).

Last, using a *GUS* probe, an *in situ* hybridization experiment was carried out to confirm the *SUS2* and *SUS3* promoter activity. Spatial localisation of *GUS* transcripts was performed using transgenic *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* and *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* seeds at various developmental stages of a representative line for each promoter (Supplemental Figure 1; page 49). In maturation *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* seeds containing U-shaped embryos and later, a signal of *GUS* transcripts accumulation could be detected both in embryonic tissues and in the endosperm, with the exception of the apical meristematic zone and the vascular zone. This result is consistent with *GUS* staining analyses. The accumulation of *GUS* transcripts was observed in upturned-U *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* embryos and later, in the endosperm, in the apical meristematic zone and in the vascular zone. This result is consistent with *GUS* staining analysis.

#### **3.2.4.2. Regulation of *SUS2* expression by sugar**

It has been shown that *SUS3*, in leaves, is regulated by osmotic stress but not by sugars (Baud *et al.*, 2004). However no information was available on *SUS2* regulation, as no expression is detected in vegetative organs. To check the possible regulation of *SUS2* expression by carbohydrates, the effects of sugars were tested using 15 DAF siliques of *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA*. The activity of the promoter was significantly induced by 50mM of glucose, sucrose and trehalose when supplemented in the feeding solution for 17 hours (Figure 3.2-A). *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* activity

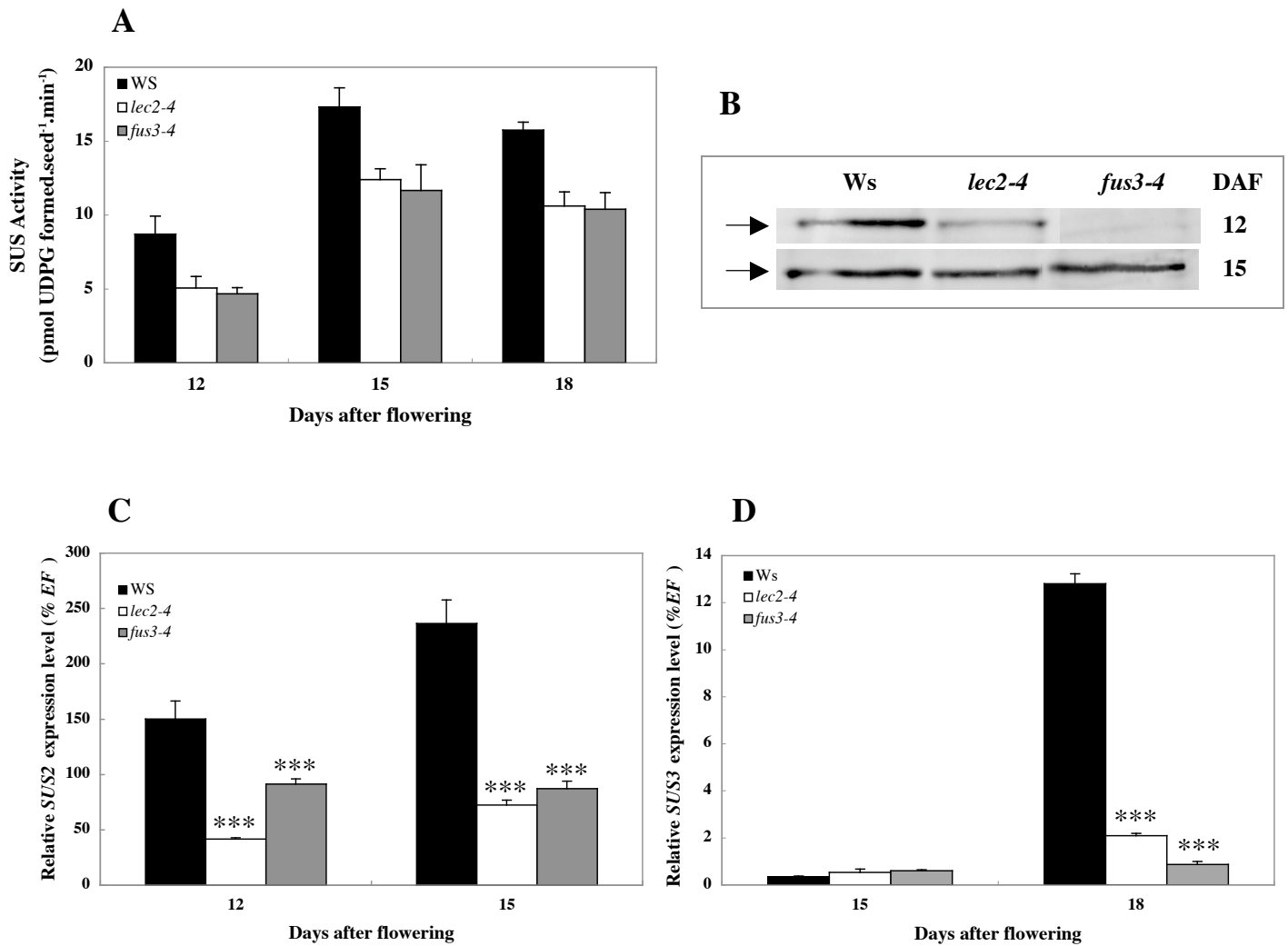


Figure 3.3. *SUS2* and *SUS3* in seeds of transcription factor mutants.

(A) Time course analysis of total SUS activity measured on developing seeds isolated from 3 siliques of wild type (Ws), *lec2-4* and *fus3-4* mutants. Three development stages were selected (12, 15 and 18 days after flowering). Values are the means  $\pm$ SE of triplicate measurements on two independent cultures.

(B) Presence of SUS2 protein in seeds. Panel shows immunoblots of SDS-polyacrylamide gel of soluble proteins from developing seeds (12-15 DAF) for the wild type (Ws) and the *lec2-4*, and *fus3-4* mutants. All lanes are from the same gel and blot and contain the same total protein amount (20  $\mu$ g). Left-hand arrows: approximate position of 92 kDa MW. Blot developed with Ab-SUS2 (Angeles *et al.*, 2008).

(C and D) Relative expression profile of *SUS2* and *SUS3* respectively in seed regulatory mutants. Relative transcript levels were measured by Q-RT-PCR and standardized to the constitutive *EF1A4 $\alpha$*  (*EF*) expression level. The mRNA were extracted from developing seeds. Data are the mean  $\pm$ SE of triplicate measurements on two independent cultures; \*\*\* P<0,001 student T-test.

measured in siliques after incubation with 50mM glucose increased by 50% when compared with the control. Glucose at 50mM was the most effective effector as compared with sucrose and trehalose (Figure 3.2-A). No difference of *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* expression was observed using two glucose analogues, namely 2-deoxyglucose and 3-O-methyl glucose or with hexokinase inhibitor (N-acetyl-glucosamine, NAG; see Figure 3.2-B), suggesting that hexokinase activity is not involved in the sugar sensing pathway controlling *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* expression.

#### 3.2.4.3. Regulation of *SUS2* and *SUS3* by *LEC2* and *FUS3*

As *lec2* and *fus3* mutations are known to prevent completion of seed maturation and affect sugar metabolism (Gutierrez *et al.*, 2007), we studied here the possible regulation of *SUS2* and *SUS3* by these transcription factors.

Total *SUS* activity was measured in Arabidopsis seeds during maturation phase (12-18 DAF) in two mutants (*lec2-4* and *fus3-4*) and corresponding Ws accession (see material and methods section). From 12 DAF until 18 DAF, this activity was reduced in *lec2-4* and *fus3-4* mutants in comparison with the WT (Figure 3.3-A).

The relative accumulation of the *SUS2* protein was quantified on immunoblot using a specific antibody “Ab-*SUS2*” reported in Angeles-Nuñez *et al.* (2008). The results revealed that *SUS2* protein accumulation in these mutant backgrounds was also strongly affected during maturation phase as compared to wild type. At 12 DAF, the *SUS2* protein in *lec2-4* mutant was reduced by about 50% and a stronger diminution was observed in *fus3-4* mutant (80%). However at 15 DAF *lec2-4* and *fus3-4* mutants showed 80% of *SUS2* level as compared to WT (Figure 3.3-B).

Quantitative data on *SUS2* and *SUS3* transcript accumulation in the two regulatory mutants (*i.e.* *lec2-4* and *fus3-4*) along with Ws were obtained by Quantitative RT-PCR experiments, normalised to the constitutive *EF1A $\alpha$ 4* (*EF*) gene expression level (Liboz *et al.*, 1990; Nesi *et al.*, 2000). The transcript accumulation of *SUS2* and *SUS3* were affected in these mutants as compared to wild type. During early maturation phase (12 DAF) the accumulation of *SUS2* mRNA was reduced by about 60% in *lec2-4* and by 40% in *fus3-4* mutants when compared with the WT. At mid-maturation (15 DAF), *SUS2* mRNA accumulation was reduced by 60% in *lec2-4* and *fus3-4* mutants as compared to WT (Figure 3.3-C). At 15 DAF, no difference of *SUS3* mRNA accumulation was detectable in *lec2-4* and *fus3-4* mutants when compared with the WT. However at 18 DAF, *SUS3* accumulation was reduced by 80% in *lec2-4* and 90% in *fus3-4* when compared to the WT (Figure 3.3-D).



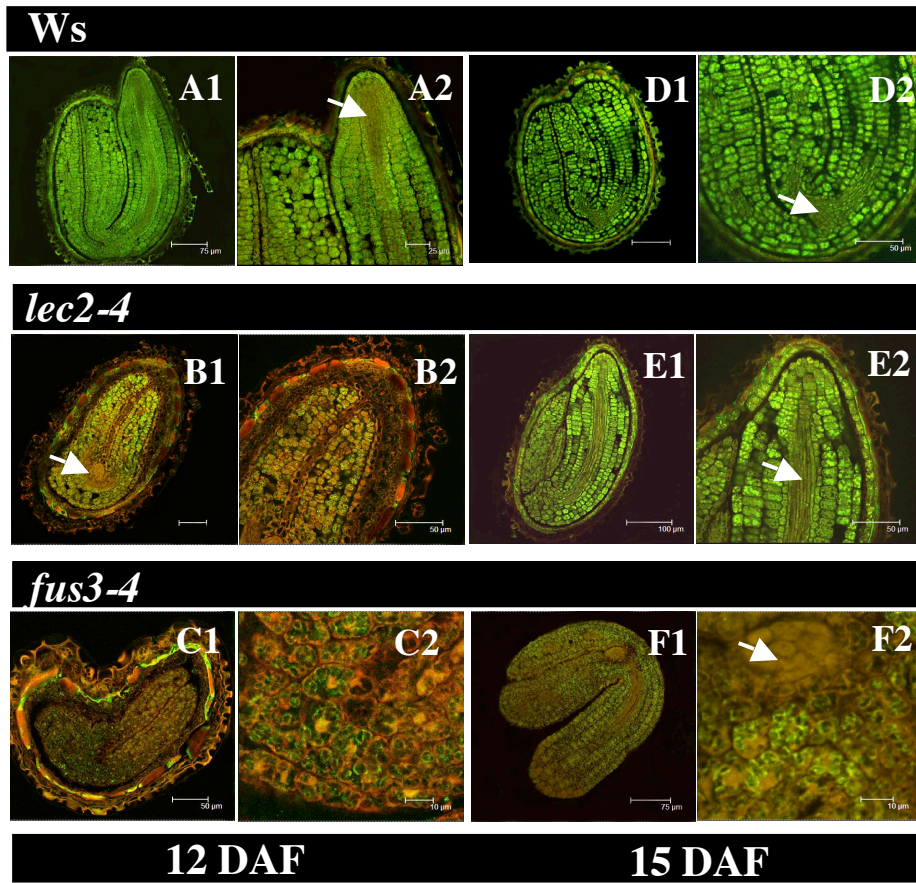


Figure 3.4. SUS2 protein immunolocalisation in Arabidopsis WT (Ws), *lec2-4* and *fus3-4* developing seeds. Confocal laser-scanning microscopy of a longitudinal section from 12 and 15 DAF seeds. First line WS, second lane, *lec2-4*; third line, *fus3-4*. **A-B-C** immunolocalisation at 12 DAF; **D-E-F** immunolocalisation at 15 DAF. Arrows show the absence of SUS2 in vascular tissue and apical meristem. Pictures presented in these analyses are representative images of embryos after immunolocalisation (for comparison).

#### 3.2.4.4. Localisation of *SUS2* protein in *lec2-4* and *fus3-4* mutants

The localisation of *SUS2* protein was studied in seeds during early maturation phase (12 DAF) and mid-maturation phase (15 DAF) in wild type and in the two regulatory mutants, using “Ab-*SUS2*” and confocal microscopy (Figure 3.4). At 12 and 15 DAF in the Ws accession, *SUS2* protein was widely observed in the whole embryo (Figure 3.4-A1 and 3.4-D1 respectively) with the exception of the apical meristematic zone and the vascular zone (see Figure 3.4-A2 and 3.4-D2). These observations are consistent with the expression patterns reported for the accession Col-0 (Angeles-Nuñez *et al.*, 2008). A modified spatial expression was observed for *lec2-4* and *fus3-4* mutants. In *lec2-4*, *SUS2* was observed in the hypocotyls and around cotyledons (Figure 3.4-B1 and 3.4-B2). *SUS2* accumulation was strongly reduced at 12 DAF in *fus3-4* mutant as compared with the wild type and the expression was confined to the hypocotyls (Figure 3.4-C1 and 3.4-C2). Nevertheless at 15 DAF, an increase of *SUS2* accumulation was observed in this mutant with a localisation of the protein in the hypocotyls and around cotyledons (Figure 3.4-F1). These results are consistent with the activity of *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* (Figure 3.1-B).

To test whether *lec2* and *fus3* mutations could alter *SUS2* and *SUS3* expression patterns, the *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* and *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* constructs were introduced by crossings in these mutant backgrounds (see material and methods section). In *lec2-4*, at 12 DAF, the expression *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* was found in the hypocotyls but was restricted to the borders of cotyledons (Figure 3.5-B). Interestingly, the pattern of *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* was strongly affected in *fus3-4* with a weak expression restricted to the root meristem and at the border of the cotyledons (Figure 3.5-I). The *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* expression observed in *lec2-4* from 12-15 DAF was similar to the *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* expression, found in the hypocotyls and borders of cotyledons. In *fus3-4*, the *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* expression was found in hypocotyls from 12-15 DAF being different to the *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* expression observed. These results suggested that *SUS2* and *SUS3* are differentially regulated (directly or not) by *FUS3* and *LEC2*. This idea is consistent with their different expression patterns in the WT.

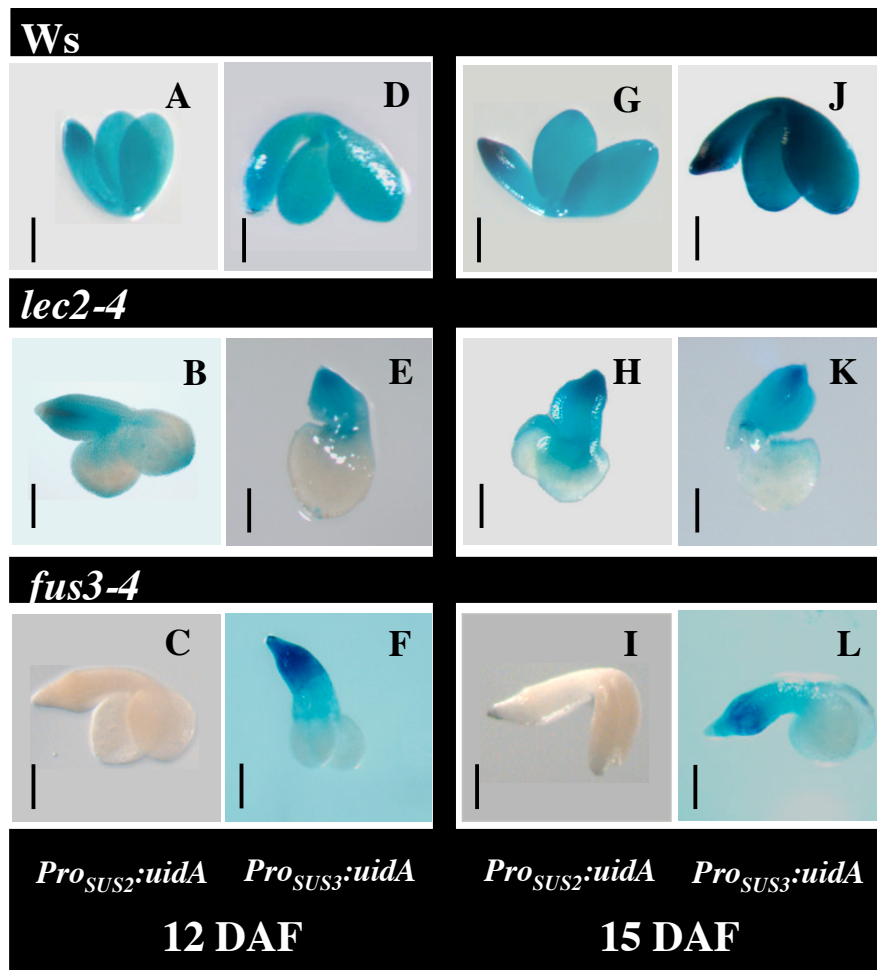


Figure 3.5. GUS staining in Arabidopsis WT (Ws), *lec2-4* and *fus3-4* developing seeds. First line WS, second lane, *lec2-4*; third line, *fus3-4*. **A-B-C** *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* staining at 12 DAF; **D-E-F** *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* staining at 12 DAF; **G-H-I** *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* staining at 15 DAF and **J-K-L** *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* staining at 15 DAF. Pictures presented in these analyses are representative images of embryo after GUS staining (for comparison). Bars: 50  $\mu$ m.

### 3.2.5. DISCUSSION

#### 3.2.5.1. The *SUS2* and *SUS3* expression patterns are concomitant with the storage phase in *Arabidopsis* seeds

Fine characterisation of *SUS2* and *SUS3* expression pattern, based on the use of complementary approaches such as Quantitative RT-PCR, *in situ* hybridization and promoter:GUS analyses, demonstrated that *SUS2* and *SUS3* expression is finely regulated both in time and space in *Arabidopsis* seeds. The expression patterns detected in *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* and *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* plants, showed that both promoters are active during the maturation phase. Activities of *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* and *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* reach a peak during mid and late maturation phase respectively, at about 15 and 18 DAF (Figure 3.1), corresponding to reserves accumulation period. When analysing the tissue specificity of *SUS2* and *SUS3* expression, it appears that these genes are expressed in the seed coat, endosperm and the embryo. The activity of *SUS2* and *SUS3* promoter fitted well *SUS2* and *SUS3* mRNA accumulation presented in this work. Altogether these results showed that *SUS2* and *SUS3* gene are strongly expressed in *Arabidopsis* seed, during the maturation phase, when reserve accumulation occurs. This is in good correlation being correlated with total SUS activity (Figure 3.1 and 3.3A). These results suggest a role for these genes, in the maturation phase of *Arabidopsis* seeds with partially redundant functions. This idea is consistent with Fallahi *et al.* (2008) in which the authors suggested that, in the later stages of seed development AtSUS metabolizes sucrose in the embryo and cotyledon. Indeed the shift of 3 DAF in their expression suggested also the implication of these genes in more specific functions in the seeds. This idea is consistent with the hypothesis reported by Angeles-Nuñez *et al.* (2008), indicating that *SUS2* association to plastid may play a role in the channeling of sucrose metabolism to G-6-P or PEP, both carbon compounds entering plastids (Fox *et al.*, 2000; Rolletschek *et al.*, 2007; Baud *et al.*, 2007) to initiate starch or lipid synthesis. Furthermore, this also may explain the possible implication of *SUS3* in desiccation tolerance suggest by Baud *et al.* (2004).

#### 3.2.5.2. *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* is regulated by glucose, trehalose and sucrose

In this work, we showed that *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* activity is regulated by glucose, trehalose and sucrose (Figure 3.2-A) in *Arabidopsis* seeds. As glucose (at 50 mM, see Figure 3.2-A) was the most effective effector, we tested two non-metabolisable glucose analogues (Gibson, 2000), to distinguish the role of sugars as signalling molecules from their metabolic role: *i.e.* 2-deoxyglucose, a sugar analogue that is taken up into cells and is phosphorylated by

DAF	6	9	12	15	18	21
<b>Weight (<math>\mu\text{g}\cdot\text{seed}^{-1}</math>)</b>						
WS	2.2 ± 0.22	3.9 ± 0.28	10.1 ± 0.33	12.8 ± 0.36	17.4 ± 0.34	<b>23.1 ± 0.27a</b>
<i>lec2-4</i>	2.2 ± 0.30	3.8 ± 0.32	7.6 ± 0.29	11.0 ± 0.18	15.8 ± 0.22	<b>20.4 ± 0.24b</b>
<i>fus3-4</i>	1.6 ± 0.10	3.6 ± 0.38	8.1 ± 0.22	12.8 ± 0.36	16.3 ± 0.47	<b>20.6 ± 0.43b</b>
<b>Sucrose (<math>\text{ng}\cdot\text{seed}^{-1}</math>)</b>						
WS	32 ± 6	18 ± 18	31 ± 31	<b>49 ± 9b</b>	<b>140 ± 30b</b>	<b>434 ± 4b</b>
<i>lec2-4</i>	24 ± 10	34 ± 8	30 ± 29	<b>308 ± 38a</b>	<b>348 ± 47a</b>	<b>616 ± 12a</b>
<i>fus3-4</i>	25 ± 10	106 ± 42	41 ± 21	<b>103 ± 17a</b>	<b>295 ± 47a</b>	<b>596 ± 48a</b>
<b>Starch (<math>\text{ng}\cdot\text{seed}^{-1}</math>)</b>						
WS	169 ± 40	476 ± 124	971 ± 141	<b>561 ± 27b</b>	<b>194 ± 39b</b>	<b>46 ± 5c</b>
<i>lec2-4</i>	161 ± 56	841 ± 39	1077 ± 82	<b>908 ± 93a</b>	<b>622 ± 91a</b>	<b>711 ± 23a</b>
<i>fus3-4</i>	116 ± 57	616 ± 142	1275 ± 71	<b>580 ± 55b</b>	<b>214 ± 41b</b>	<b>294 ± 78b</b>
<b>Fatty acid content (<math>\mu\text{g}\cdot\text{seed}^{-1}</math>)</b>						
WS	0.05 ± 0.01	0.13 ± 0	1.94 ± 0.07	3.15 ± 0.21	5.28 ± 0.2	<b>7.55 ± 0.1a</b>
<i>lec2-4</i>	0.15 ± 0.04	0.22 ± 0.04	0.99 ± 0.02	2.48 ± 0.06	3.63 ± 0.2	<b>5.21 ± 0.1c</b>
<i>fus3-4</i>	0.08 ± 0.01	0.2 ± 0.01	1.12 ± 0.09	3.35 ± 0.09	4.46 ± 0.4	<b>5.92 ± 0.2b</b>

Supplementary Table 3.1. Biochemical characterisation of *lec2-4* and *fus3-4* during seed development. Values are the mean of triplicate measurements on two independent cultures.

hexokinases (Gibson, 2000) and 3-*O*-methylglucose, a sugar analogue that is taken up into cells but is not phosphorylated. No difference was observed between these analogues (Figure 3.2-B), suggesting that hexokinases were not involved in the sugar-sensing pathway controlling *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* expression. This result was confirmed using an hexokinase inhibitor together with glucose (Figure 3.2-B). Altogether, our data suggest that the non-phosphorylated glucose is the signal for induced *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* expression. This is consistent with other studies showing that the expression of *SUS* genes is differentially affected by sugar (Salanoubat and Belliard, 1989; Koch *et al.*, 1992; Fu *et al.*, 1995; Godt *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1996; Komatsu *et al.*, 2002; Liao and Wang, 2003). Recent data have shown that high sugar levels induce expression of genes of storage metabolism, such as those of starch biosynthesis (Rook *et al.*, 2006). Our result suggests that glucose plays a role as signalling molecule on the regulation of the *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* expression *in planta*.

### **3.2.5.3. Decrease in total SUS activity correlated with storage reserves modifications in regulatory mutants (*lec2-4* and *fus3-4*)**

The plant-specific B3 transcriptional regulators LEC2 and FUS3, play key roles in the control of seed maturation (Santos-Mendoza *et al.*, 2008 for a review). Many studies have revealed that these proteins play roles in controlling mid and late-embryogenesis. Mutations at any of these individual loci affect multiple processes, including accumulation of storage proteins, as well as acquisition of desiccation tolerance and dormancy. In this study, we have shown that the total SUS activity was differentially affected during the maturation phase in these maturation mutants. These decreases in total SUS activity (Figure 3.3-A) were correlated with the loss in seed weight, the decrease in fatty acid content and the increase in sucrose and starch contents as compared with the wild type (supplemental Table 3.1). This suggests that the decrease in sucrose synthase expressed in these mutants during maturation phase (principally *SUS2* and *SUS3*), may directly or indirectly contribute the observed reductions, in the accumulation of storage compounds. This is consistent with the co-localization of *SUS2* with plastid membranes during maturation phase reported by Angeles-Nuñez *et al.* (2008). Indeed, Fallahi *et al.* (2008) reported the co-localization of SUS protein and starch grains in the seed coat during early stages of seed development.

	<i>SUS2</i>	<i>SUS3</i>
<b>WT</b>		
mRNA	Mid-maturation	Late-maturation
Expression-GUS	Mid-maturation	Late-maturation
Staining-GUS	Whole embryo	Whole embryo
<b><i>lec2-4</i></b>		
mRNA	Reduced during mid-maturation	Reduced during late maturation
Staining-GUS	Hypocotyls and around cotyledons	Hypocotyls and around cotyledons
<b><i>fus3-4</i></b>		
mRNA	Reduced during mid-maturation	Reduced during late maturation
Staining-GUS	No expression	Hypocotyls

Table 3.1. Summarised results obtained on the regulation of *SUS2* and *SUS3* genes by LEC2 and FUS3 during maturation phase of Arabidopsis seed.

#### 3.2.5.4. The accumulation of SUS2 protein were affected in *fus3-4* and *lec2-4* mutants

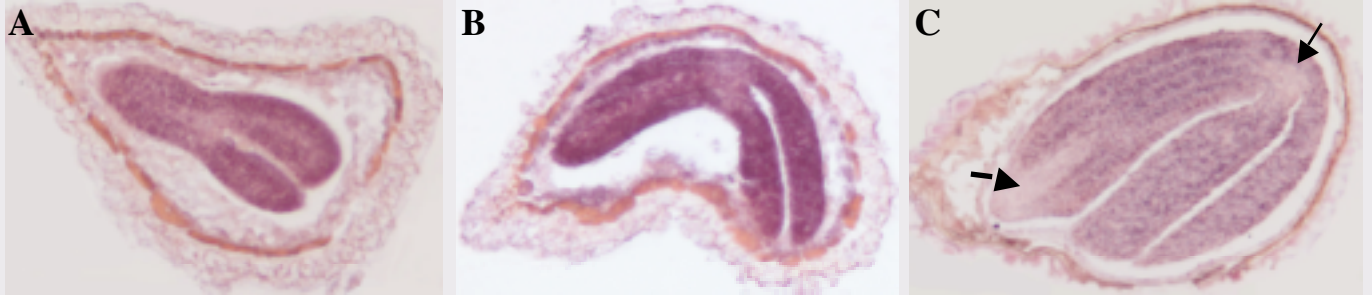
*SUS2* protein accumulation was reduced in *fus3* and *lec2* mutants, during early maturation phase (Figure 3.3-B). This is consistent with total SUS activity pattern (Figure 3.3-A). In *lec2-4* and *fus3-4* mutants, the *SUS2* accumulation remained lower as compared with the wild type (Figure 3.3-B). These results are in good accordance with the *SUS2* lower accumulation observed by immunolocalisation analysis (Figure 3.4). In addition, the accumulation pattern of *SUS2* protein in *lec2-4* (embryo axis and around cotyledons, Figure 3.4-B1, 3.4-E1) and *fus3-4* (hypocotyl, Figure 3.4-C1, 3.4-F1) suggest, that *SUS2* accumulation in these zones play a role in storage process of Arabidopsis seed. This idea is supported by the report in *Vicia faba L.* presented by Weber *et al.* (1996), showing that the sucrose metabolism was controlled by sucrose synthase during cotyledon development, the major storage organ in *Vicia faba* seed. Interestingly this reduction of *SUS2* accumulation observed in *fus3-4* mutant implicates specifically the embryo since no modification was observed in the seed coat (Figure 3.4-C1). This result suggests that the *SUS2* expression in the seed coat is not regulated by *FUS3* and *LEC2*, thus indicating other alternative regulation pathways.

#### 3.2.5.5. *SUS2* and *SUS3* genes are differentially regulated by *LEC2* and *FUS3*

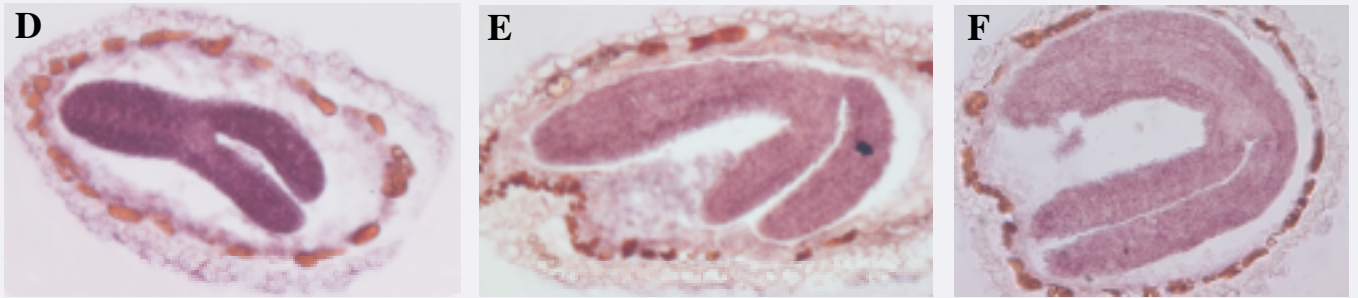
Promoter-GUS and quantitative RT-PCR analyses in these mutant backgrounds (*lec2-4* and *fus3-4*) have demonstrated that *SUS2* and *SUS3* genes were down regulated by the mutations of the two transcription factors *LEC2* and *FUS3*. In *lec2-4*, *Pro<sub>SUS2</sub>::uidA* and *Pro<sub>SUS3</sub>::uidA* expression was observed in hypocotyls and around cotyledons (Figure 3.5-B-E-H-K). The fact that *SUS2* and *SUS3* are present in *lec2-4* mutant, where *FUS3* is also expressed, suggests that *LEC2* may indirectly control *SUS2* and *SUS3* through *FUS3* (To *et al.*, 2006). In addition, Santos-Mendoza *et al.* (2005), using a chimeric fusion of *LEC2* to the rat glucocorticoid receptor (GR), recently reported the accumulation of *SUS2* transcript in leaves, suggesting that *SUS2* may be a putative target of *LEC2*. We consequently used this system and found by Q-RT-PCR analysis that the accumulation of *SUS2* transcript observed in leaves by the authors was not under the direct control of *LEC2:GR* (data not shown). On the other hand we have seen that *SUS2* was strongly down regulated in *fus3-4* mutant during seed development (Figure 3.5-C and 3.5-I). This result indicates that *SUS2* is strongly regulated by *FUS3* in the embryo. Quantitative RT-PCR studies in the maturation mutants (*lec2-4* and *fus3-4*) indicate that *SUS2* and *SUS3* genes exhibited a marked decrease in the accumulation of their transcripts in seeds at the onset and end of the maturation phase respectively. Theses strong decrease of *SUS2* and *SUS3* mRNA levels were correlated with decrease in SUS activities,



### ***GUS* mRNA localisation in *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* seeds**



### ***GUS* mRNA localisation in *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* seeds**



Supplemental Figure 3.1. Spatial localization of *GUS* transcripts in transgenic *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* and *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* seeds at various developmental stages.

(A-B-C) Analysis of *GUS* mRNA accumulation by *in situ* hybridization in transgenic *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* seeds (D-E-F) Analysis of *GUS* mRNA accumulation by *in situ* hybridization in transgenic *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* seeds. A nucleotide sequence specific to *GUS* was identified which allowed oligonucleotide-hybridization experiments to be carried out to characterize the *GUS* expression pattern in developing seeds from transgenic plants carrying the *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* and *Pro<sub>SUS3</sub>:uidA* respectively. Pictures presented in this analysis, are representative images of embryo after *in situ* hybridization (for comparison). Arrows show the absence of mRNA of *GUS* in *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* vascular tissue and apical meristem.

accumulation protein and staining-GUS. All these data shows that the *SUS2* and *SUS3* genes are transcriptionally regulated by FUS3.

This comprehensive analysis of *SUS2* and *SUS3* regulation in the Arabidopsis seeds, confirms that these genes are strongly expressed during seed maturation phase. Nevertheless a clear delay of 3 DAF in their expression was pointed out. We have showed that *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* was upregulated by sugars and that the hexokinase is not involved in the sugar-sensing pathway controlling its activity. In addition, LEC2 and FUS3 are (directly or not) involved in *SUS2* and *SUS3* expression (see Table 3.1 for summarised results). Last we showed that the *SUS2* accumulation in seed coat is not regulated by FUS3. Our results provide valuable information on the regulation of two sucrose synthase genes strongly expressed during the maturation phase corresponding to period which reserve accumulation occurs, paving the way for additional analyses. It would be interesting to study the metabolite profile (Weckwerth *et al.*, 2004), in single and multiple mutants during seed development, combining mutations of seeds specific gene (*SUS2*) with other sucrose synthase mutants strongly expressed in developing seed of Arabidopsis, as well as *SUS1* (embryogenesis phase) and *SUS3* (late maturation phase).

### 3.2.6. ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge P. Laufs and H. Morin for providing us the *in situ* GUS-probe. This work was supported by a fellowship from the Mexican government for the CONACYT to Juan Gabriel Angeles Núñez. We are grateful to Lionel Gissot and Olivier Grandjean for assistance in confocal microscopy. The confocal equipment used in this study was partially financed by the region Ile-de-France Region.

### 3.2.7. REFERENCES

**Angeles-Nuñez, J.G., Kronenberger, J., Wuillème, S., Lepiniec, L. and Rochat, C.** (2008) Study of AtSUS2 localization in seeds reveals a strong association with plastids. *Plant cell Physiol.* doi:10.1093/pcp/pcn117.

**Barratt, D.H., Barber, L., Kruger, N.J., Smith A.M., Wang, T.L. and Martin, C.** (2001) Multiple, Distinct isoforms of sucrose synthase in pea. *Plant Physiol.* **127**, 655-664.

**Baud, S., Mendoza M.S., To, A., Harscoët, E., Lepiniec, L. and Dubreucq, B.** (2007) WRINKLED1 specifies the regulatory action of LEAFY COTYLEDON2 towards fatty acid metabolism during seed maturation in Arabidopsis. *Plant J.* **5**, 825-838.

**Baud, S., Wuillème, S., Lemoine, R., Kronenberger, J., Caboche, M., Lepiniec, L. and Rochat, C.** (2005) The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in Arabidopsis. *Plant J.* **43**, 824-836.

**Baud, S., Vaultier, M.N. and Rochat, C.** (2004) Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **55**, 397-409.

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

**Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G.** (1993) In planta infiltration of adult Arabidopsis plants. *C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci.* **316**, 1194-1199.

**Bewley, J.D. and Black, M.** (1994) *Seeds: Physiology of Development and Germination*, 2<sup>nd</sup> edn. New York: Plenum.

**Bieniawska, Z., Paul-Barratt, D.H., Garlick, A.P., Thole, V., Kruger, N.J., Martin, C., Zrenner, R. and Smith, A.M.** (2007) Analysis of the sucrose synthase gene family in Arabidopsis. *Plant J.* **5**, 810-828.

**Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

**Chopra, S., Del-favero, J., Dolferus, R. and Jacobs, M.** (1992) Sucrose synthase of *Arabidopsis*: genomic cloning and sequence characterization. *Plant Mol. Biol.* **18**, 131-134.

**Chourey, P.S., Taliercio, E.W., Carlson, S.J. and Ruan, Y.L.** (1998) Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **259**, 88-96.

**Chourey, P.S., Taliercio, E.W. and Kane, E.J.** (1991) Tissue-specific expression and anaerobically induced posttranscriptional modulation of sucrose synthase genes in *Sorghum bicolor* M. *Plant Physiol.* **96**, 485-490.

**Chourey, P.S. and Nelson, S.E.** (1976) The enzymatic deficiency conditioned by the shrunken-1 mutation in maize. *Biochem. Genet.* **14**, 1041-1055.

**Ciereszko, I. and Kleczkowski, L.A.** (2002) Glucose and mannose regulate the expression of a major sucrose synthase gene in *Arabidopsis* via hexokinase-dependent mechanisms. *Plant Physiol. and Biochem.* **40**, 907-911.

**Craig, J., Barratt, P., Tatge, H., Déjardin, A., Handley, H., Gardner, C.D., Barber, L., Wang, T., Hedley, C. and Martin, M.** (1999) Mutations at the *rug4* locus alter the carbon and nitrogen metabolism of pea plants through an effect on sucrose synthase. *Plant J.* **17**, 353-362.

**Debeaujon, I., Nesi, N., Perez, P., Devic, M., Grandjean, O., Caboche, M. and Lepiniec, L.** (2003) Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *Plant Cell.* **15**, 2514-2531.

**Déjardin, A., Sokolov L.N. and Kleczkowski L.A.** (1999) Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. *Biochem. J.* **344**, 503-509.

**Déjardin, A., Rochat, C., Wuillème, S. and Boutin, J-P.** (1997) Contribution of sucrose synthase, ADP-glucose pyrophosphorylase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds. *Plant, Cell and Environ.* **20**, 1421-1430.

**Egger, B. and Hampp, R.** (1992) Invertase, sucrose synthase and sucrose phosphate synthase in lyophilized spruce needles; microplate reader assays. *Trees* **7**, 98-103.

**Fallahi, H., Scofield, G. N., Badger, M. R., Chow, W. S., Furbank, R. T. and Ruan, Y.L.** (2008) Localization of sucrose synthase in developing seed and siliques of *Arabidopsis thaliana* reveals diverse roles for SUS during development. *J. Ext. Bot.* doi:10.1093/jxb/ern180.

**Fox, S.R., Hills, L.M., Rawsthorne, S. and Hills, M.J.** (2000) Inhibition of the glucose-6-phosphate transporter in oilseed rape (*Brassica napus* L.) plastids by acyl-CoA thioesters reduces fatty acid synthesis. *Biochem. J.* **352**, 525-532.

**Fu, H. and Park, W.D.** (1995) Sink and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato. *Plant Cell* **7**, 1369-1385.

**Fu, H., Kim, S.Y. and Park, W.D.** (1995) High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato *Sus4* sucrose synthase gene require 5'- and "'-flanking sequences and the leader intron. *Plant Cell* **7**, 1387-1394.

**Gazzarrini, S., Tsuchiya, Y., Lumba, S., Okamoto, M. and McCourt, P.** (2004) The Transcription Factor *FUSCA3* Controls Developmental Timing in *Arabidopsis* through the Hormones Gibberellin and Abscisic Acid. *Dev. Cell* **7**, 373-385.

**Gibson, S.I.** (2000) Plant sugar-response pathways: part of a complex regulatory web. *Plant Physiol.* **124**, 1532-1539.

**Godt, D.E., Riegel, A. and Roitsch, T.** (1995) Regulation of sucrose synthase expression in *Chenopodium rubrum*: Characterization of sugar induced expression in photoautotrophic suspension cultures and sink tissue specific expression in plants. *Plant Physiol.* **146**, 231-238.

**Gutierrez, L., Van Wuytswinkel, O., Castelain, M. and Bellini, C.** (2007) Combined networks regulating seed maturation. *Trends Plant Sci.* **7**, 294-300.

**Ho, L.C.** (1988) Metabolism and compartmentation of imported sugar in sink organs in relation to sink strength. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 355-378.

**Huang, J.W., Chen, J.T., Yu, W. P., Shyur, L.F., Wang, A.Y., Sung, H.Y., Lee, P.D. and Su, J.C.** (1996) Complete structure of three rice sucrose synthase isogenes and differential regulation of their expressions. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 233-239.

**Jefferson, R.A.** (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 387-405.

**Koch, K.E.** (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plant. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 509-540.

**Koch, K.E., Nolte, K.D., Duke, E.R., McCarty, D.R. and Avigne, W.T.** (1992) Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *Plant Cell* **4**, 59-69.

**Komatsu, A., Moriguchi, T., Koyama, K., Omura, M. and Akihama, T.** (2002) Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggest different roles and phylogenetic relationships. *J. Exp. Bot.* **53**, 61-71.

**Koncz, C. and Schell, 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.

**Liao, Y.C. and Wang A.Y.** (2003) Sugar-modulated gene expression of sucrose synthase in suspension-cultured cells of rice. *Physiol. Plant.* **118**, 319-327.

**Liboz, T., Bardet, C., Le Van Thai, A., Axelos, M. and Lescure, B.** (1990) The four members of the gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 alpha are actively transcribed. *Plant Mol. Biol.* **14**, 107-110.

**Macquet, A., Ralet, M.C., Kronenberger, J., Marion-Poll, A. and North H.M.** (2007) In situ chemical and macromolecular study of the composition of *Arabidopsis thaliana* mucilage. *Plant Cell Physiol.* **48**, 984-999.

**Mansfiel, S.G. and Briarty, L. G.** (1992) Cotyledon cell development in *Arabidopsis thaliana* during reserve deposition. *Can. J. Bot.* **70**, 151-164.

**Maraña, C., Garcia-Olmedo, F. and Carbonero, P.** (1990) Differential expression of two types of sucrose synthase-encoding genes in wheat in response to anaerobiosis, cold shock and light. *Gene* **88**, 167-172.

**Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Pelletier, G., Caboche, M. and 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**, 1863-1878.

**Rolletschek, H., Nguyen, T.H., Häusler, R.E., Rutten, T., Göbel, C., Feussner, I., Radchuk, R., Tewes, A., Claus, B., Klukas, C., Linemann, U., Weber, H., Wobus, U. and Borisjuk, L.** (2007) Antisense inhibition of the plastidial glucose-6-phosphate/phosphate translocator in *Vicia* seeds shifts cellular differentiation and promotes protein storage. *Plant J.* **51**, 468-484.

**Rook, F., Hadingham, S. A., Li, Y. and Bevan, M. W.** (2006) Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant, cell and Environ.* **29**, 426-434

**Ruuska, S.A., Girke, T., Benning, C. and Ohlrogge, J.B.** (2002) Contrapuntal networks of gene expression during *Arabidopsis* seed filling. *Plant Cell* **14**, 1191-1206.

**Salanoubat, M. and Belliard, G.** (1989) The steady-state level of potato sucrose synthase mRNA is dependent on wounding, anaerobiosis and sucrose concentration. *Gene* **84**, 181-185.

**Santos-Mendoza, M., Dubreucq, B., Baud, S., Parcy, F., Caboche M. and Lepiniec, L.** (2008) Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in *Arabidopsis*. *Plant J.* **54**, 608-620.

**Santos-Mendoza, M., Dubreucq, B., Miquel, M., Caboche M. and Lepiniec, L.** (2005) LEAFY COTYLEDON 2 activation is sufficient to trigger the accumulation of oil and seed specific mRNAs in *Arabidopsis* leaves. *FEBS Letters* **579**, 4666-4670.

**Stone, S.L. Kwong, L.W., Yee, K.M., Pelletier, J., Lepiniec, L., Fischer, R.L., Goldberg, R.B. and Harada, J.J.** (2001) LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 11806-11811.

**To, A., Valon, C., Savino, G., Guilleminot, J., Devic, M., Giraudat, J. and Parcy, F.** (2006) A Network of Local and Redundant Gene Regulation Governs *Arabidopsis* Seed Maturation. *Plant Cell* **18**, 1642-1651.

**Voelker, T. and Kinney, A.J.** (2001) Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 335-361.

**Weber, H., Buchner, P., Borisjuk, L. and Wobus, U.** (1996) Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* L. is controlled by the concerted action of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase: expression patterns, metabolic regulation and implications for seed development. *Plant J.* **9**, 841-850.

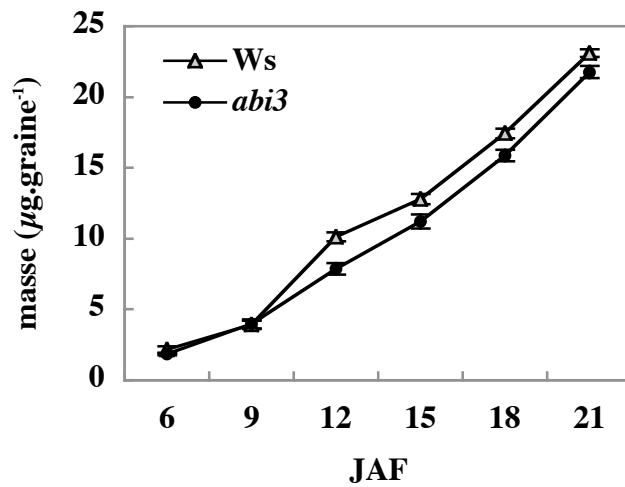
**Weckwerth, W., Loureiro, M. E., Wenzel, K., Fiehn, O.** (2004) Differential metabolic networks unravel the effects of silent plant phenotypes. *Pro. Nat. Acad. Sci. USA.* **101**, 7809-7814.

**Zeng, Y., Wu, Y., Avigne, W.T. and Koch, K.E.** (1998) Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional responses. *Plant Physiol.* **116**, 1573-1583.

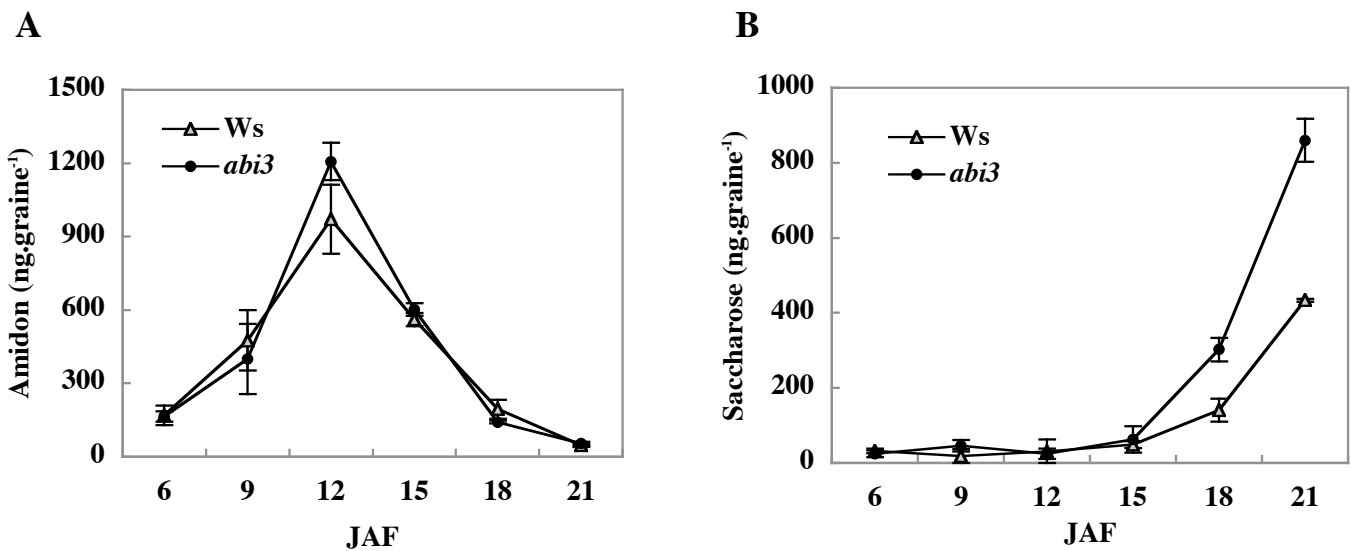
**Zhang, W.-H., Zhou, Y., Dibley, K., Tyerman, S., Furbank, R.T. and Patrick, J.W.** (2007) Nutrient loading of developing seeds. *Functional Plant Biol.* **34**, 314-331.

**Zrenner, R., Salanoubat, M., Willmitzer, L. and Sonnewald, U.** (1995) Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* **7**, 97-107.





**Figure 3.7.** Effet de la mutation *abi3* sur la masse de matière sèche de la graine d'Arabidopsis au cours du développement pour l'écotype sauvage (Ws) et le mutant (*abi3*). Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  ES de neuf mesures.



**Figure 3.8.** Effet de la mutation *abi3* sur la synthèse des hydrates de carbone au cours du développement de la graine d'Arabidopsis pour l'écotype sauvage (Ws) et le mutant (*abi3*).

(A, B) Évolution de l'accumulation d'amidon et du saccharose. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  ES de trois répétitions techniques.

### **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.

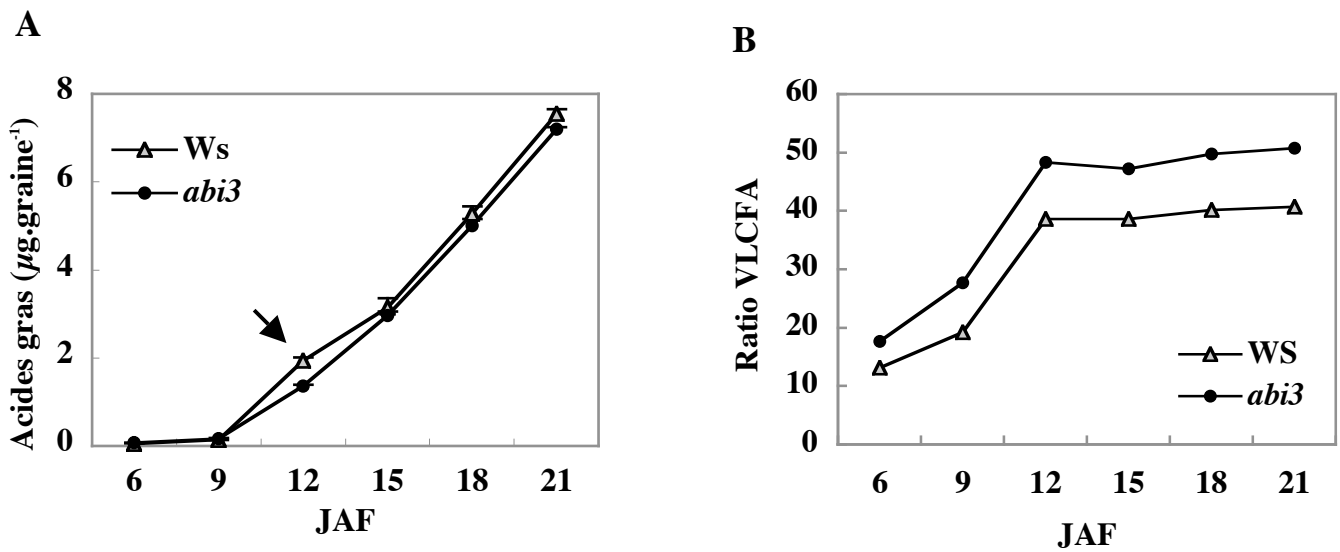
#### **3.3.1. Résultats**

##### **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*.

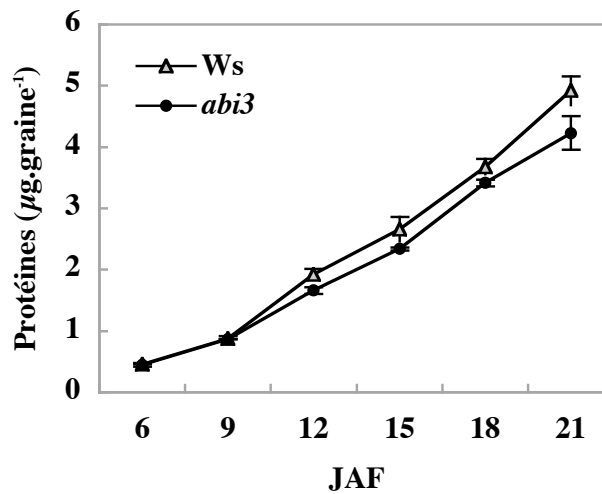
##### **3.3.1.2. Développement de la graine**

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).

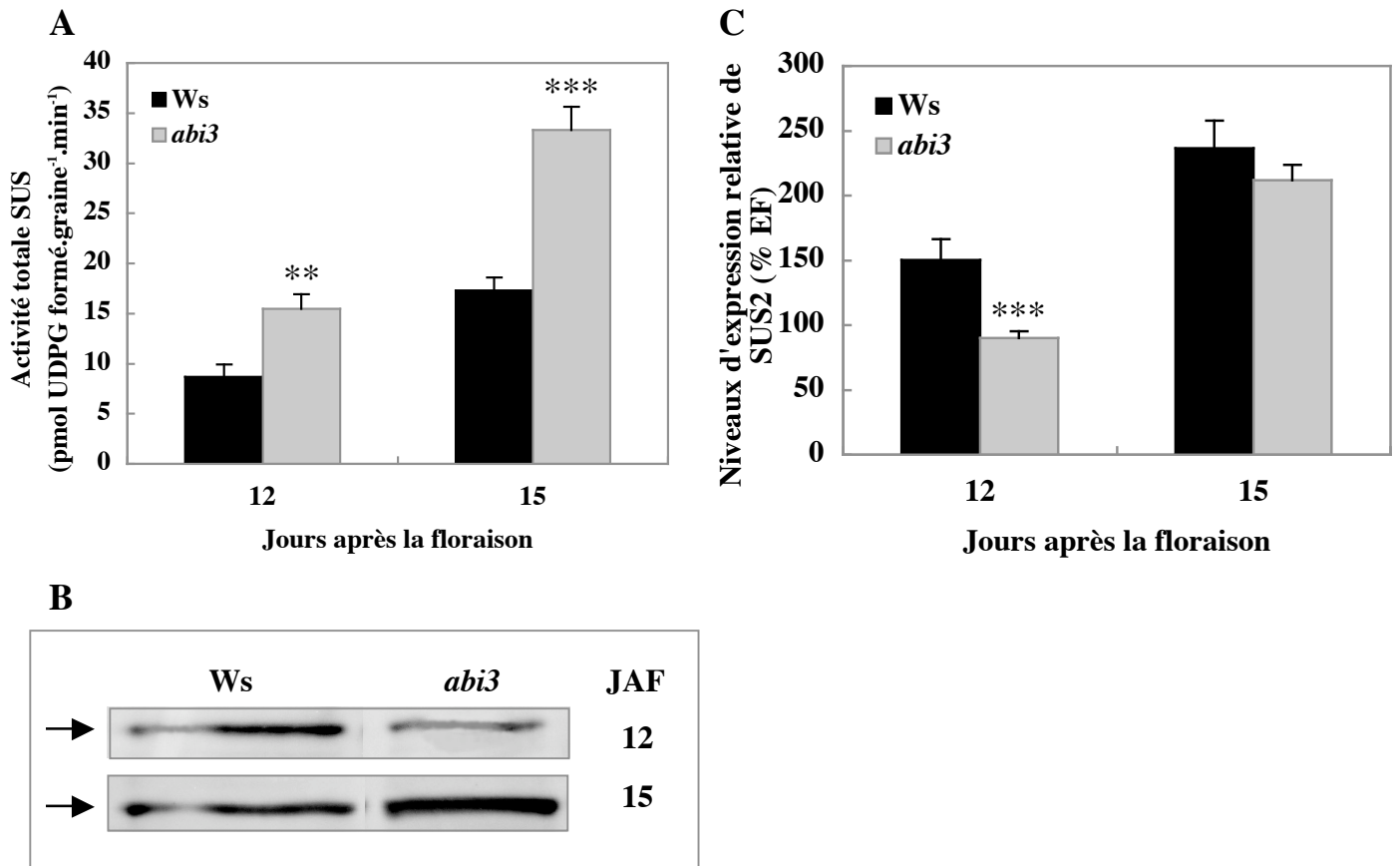
### 3.3.1.5. Synthèse des protéines totales pendant le développement de la graine

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).

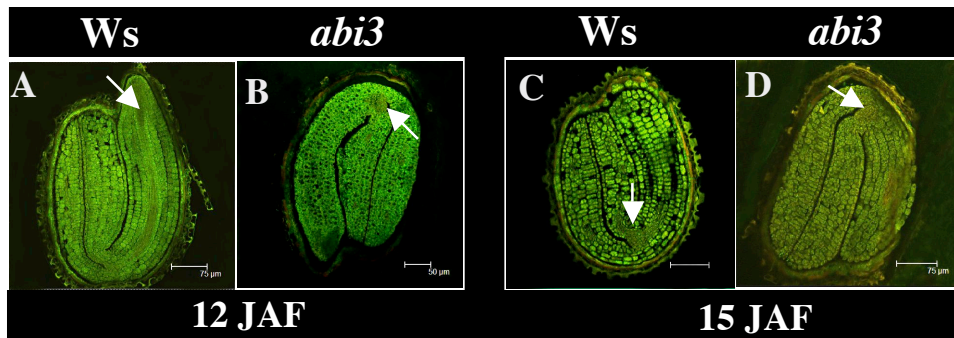
### 3.3.1.7. Localisation de *SUS2* dans le mutant *abi3*

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

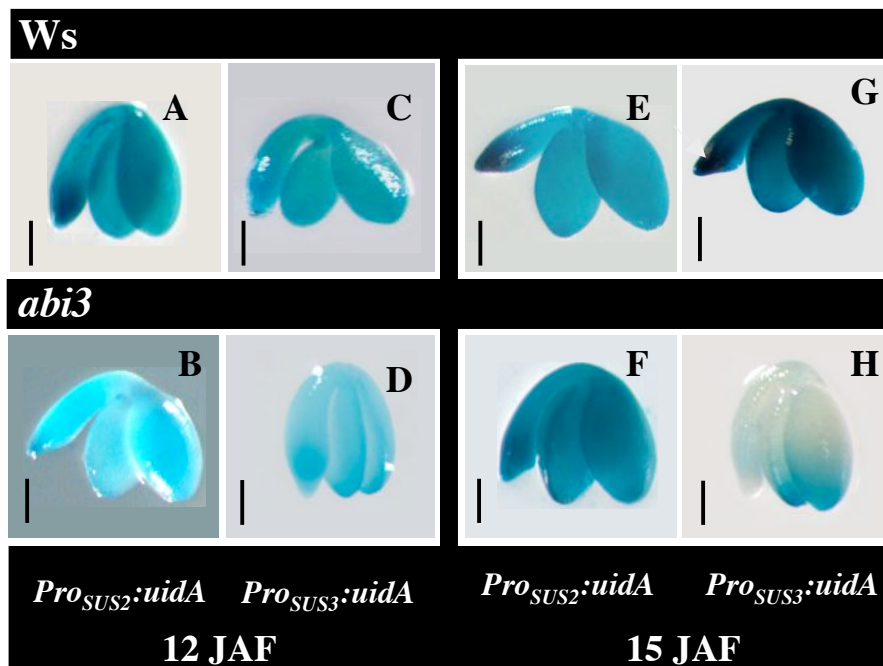
La protéine *SUS2* est spécifique de la graine et est localisée dans l'embryon, l'albumen et le tégument. Des coupes fines de la graine d'*Arabidopsis* dans la paraffine (8  $\mu$ m) ont été réalisées sur des graines au cours du développement. L'immunolocalisation de la protéine *SUS2* réalisée chez 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.



**Figure 3.12.** Immunolocalisation de la protéine AtSUS2 dans la graine d'Arabidopsis. Microscopie confocale sur la section longitudinale de la graine pour l'écotype Ws et le mutant *abi3* à 12 et 15 JAF. (A et C) Ws ; (B et D) *abi3*. Les images (A et B) correspondent à des graines âgées de 12 JAF et les images (C et D) correspondent à des graines âgées de 15 JAF. Les flèches blanches indiquent l'absence de la protéine SUS2 dans le méristème apical et dans le tissu vasculaire.



**Figure 3.13.** Localisation de l'activité GUS par histochimie dans la graine d'Arabidopsis au cours du développement pour l'écotype sauvage (Ws) et le mutant (*abi3*). (A et B) *Pro<sub>SUS2</sub>::uidA* à 12 JAF ; (C et D) *Pro<sub>SUS3</sub>::uidA* à 12 JAF ; (E et F) *Pro<sub>SUS2</sub>::uidA* à 15 JAF ; (G et H) *Pro<sub>SUS3</sub>::uidA* à 15 JAF. Bars: 50 $\mu$ m

### 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.

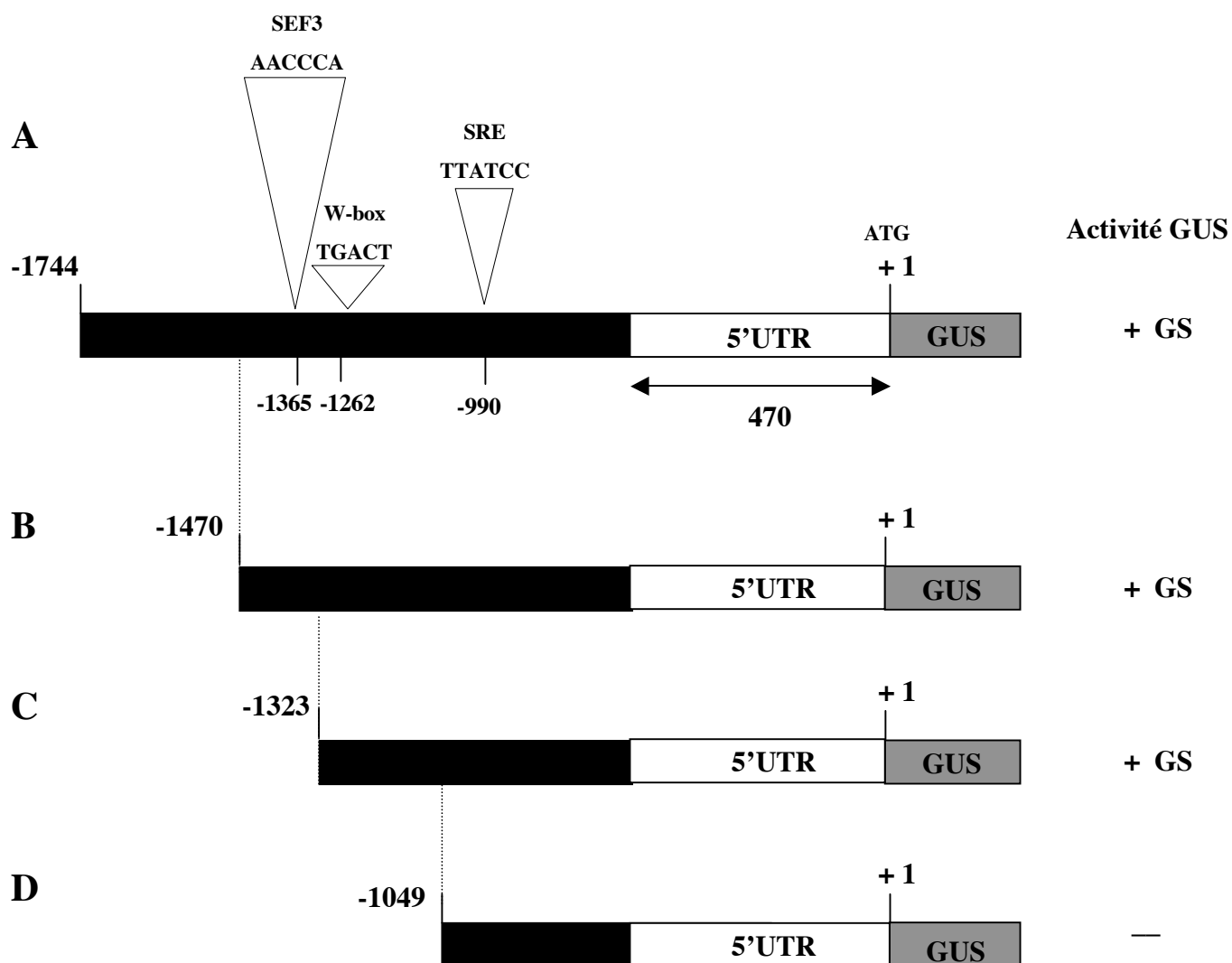


Figure 3.14. Diagramme schématique des constructions de délétions du promoteur *AtSUS2*.

(A) *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* de 1744 bp: Cette construction est fonctionnelle et graine spécifique (+ GS)

(B) *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* de 1470 bp: Cette construction est fonctionnelle et graine spécifique (+ GS)

(C) *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* de 1323 bp: Cette construction est fonctionnelle et graine spécifique (+ GS)

(D) *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* de 1049 bp. Cette construction n'est pas fonctionnelle (- GS).

### 3.4. Analyse Fonctionnelle du Promoteur *AtSUS2*

L'étude de la régulation du promoteur *AtSUS2*, spécifique de la graine, est intéressante dans le cadre de l'analyse du processus de maturation de la graine. Nous disposons d'un outil indispensable pour l'étude fonctionnelle, une construction comprenant le promoteur de *SUS2* (1744 pb en amont de l'ATG) fusionné au gène rapporteur GUS (*Pro<sub>SUS2</sub>:uidA*) qui s'exprime spécifiquement dans la graine.

#### 3.4.1. Analyse *in silico* du promoteur *SUS2*

Une analyse du promoteur du gène *SUS2* a été réalisée par Chopra *et al.* (1992). Ces auteurs ont pu montrer que ce gène possède une région 5'UTR qui s'étendrait sur 453pb chez l'écotype Col-0. En utilisant la RT-PCR semiquantitative, nous avons confirmé la taille du 5'UTR pour l'écotype d'étude (Ws) qui s'étendrait sur 470 pb.

Étant donné que les gènes de la famille des saccharose synthases sont connus pour répondre aux sucres (c.f. chapitre précédent), nous avons entrepris de chercher les boîtes de régulation du gène en amont de cette région 5'UTR répondant potentiellement aux sucres. Cette analyse a été réalisée à partir du logiciel PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/place>) et la position des différentes boîtes de régulation identifiées est représentée sur la figure 3.14A.

Une boîte « *Sucrose-Repressive Element* » (SRE) a été trouvée à -990 pb. Ce motif TTATCC est un élément sucre-répresseur connu dans les promoteurs de gènes participant à l'inhibition du débourrement des bourgeons (Tatematsu *et al.*, 2005). Un promoteur synthétique portant une répétition en tandem du motif SRE conduit à une répression sucre-dépendante de l'expression de son gène rapporteur. Dans les bourgeons axillaires d'*Arabidopsis*, SRE pourrait donc contribuer à la régulation nutritionnelle de l'expression génique.

Une boîte W-box a été trouvée à -1262 pb. Les facteurs de transcription de type WRKY se fixent sur au moins une W-box, contenant un cœur TGACT conservé spécifiques du règne végétal et font partie d'une superfamille de plus de 100 représentants (Eulgem, 2000). Les W-box sont décrites comme des éléments cis activateurs de la transcription de gènes impliqués par exemple dans la régulation du programme de défense induit par les pathogènes, dans la sénescence ou encore dans les processus plante-spécifique comme le développement des trichomes ou la biosynthèse des métabolites secondaires.

Le motif TGACT a été étudié chez l'orge (Sun *et al.*, 2003). Le facteur WRKY, *SUSIBA2* (*Sugar Signaling in Barley*) contrôlé par les sucres, semble pouvoir se lier à des éléments cis régulateurs de type W-box pour induire l'expression du gène codant l'isoamylase1 (*iso1*) et

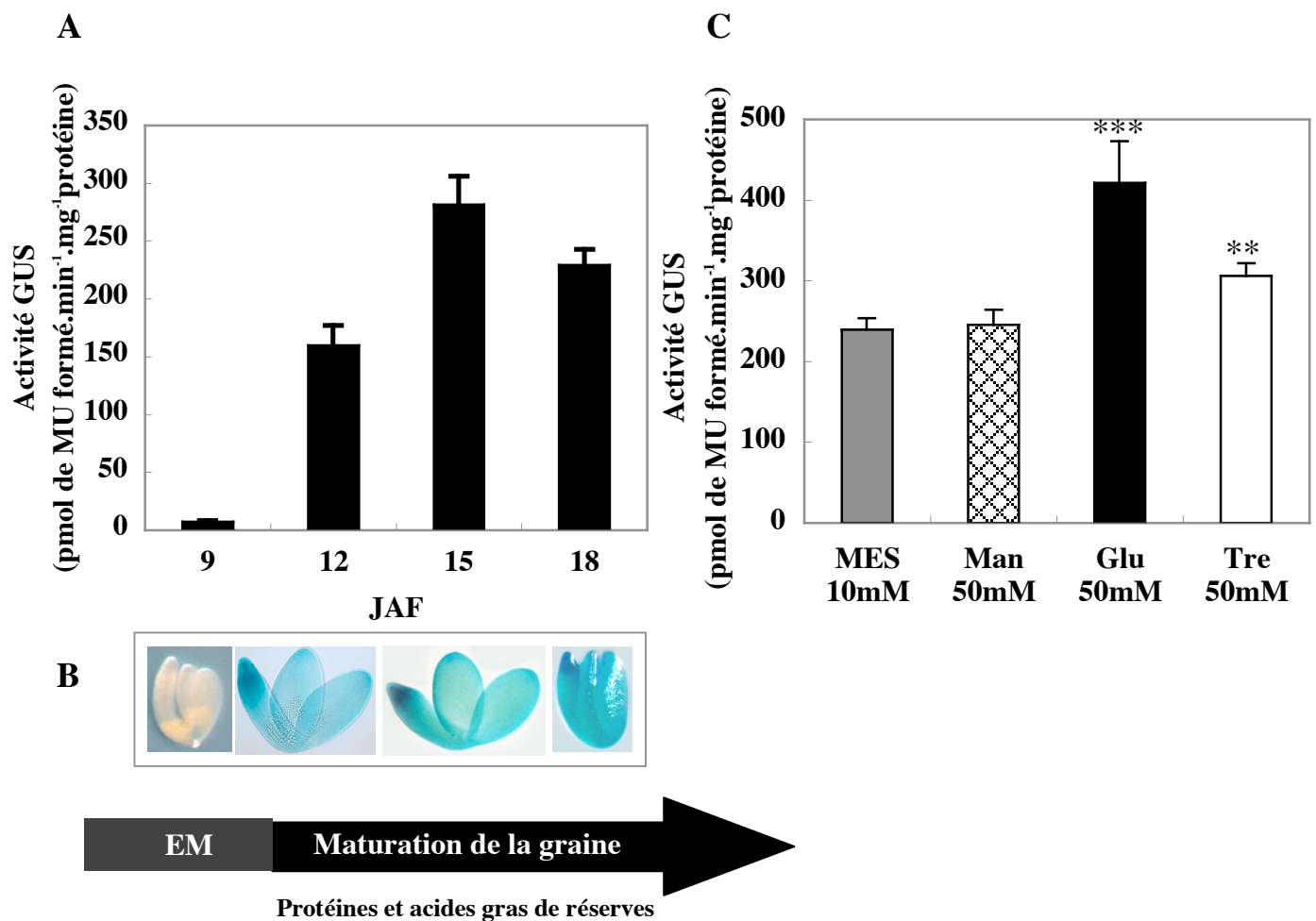


Figure 3.15. Activité GUS du *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* (1470 pb) au cours du développement

(A) L'activité GUS a été mesurée par fluorométrie en utilisant des siliques au cours du développement d'une lignée *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* (1470 pb) représentative. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  Erreur Standard (ES) de neuf mesures (B) L'activité GUS par histochimie a été obtenue en utilisant des embryons isolés au cours du développement d'une lignée *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* (1470 pb) représentative. Les photos présentées, sont représentatives de la lignée étudiée. (C) L'effet de sucres sur l'expression du *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* (1470 pb) a été mesuré en utilisant des siliques âgées de 15 JAF. Les siliques provenant d'une lignée représentative ont été incubées dans des solutions de sucres (glucose (glu) 50mM ; trehalose (Tre) 50mM ; mannitol (Man) 50mM et MES 10 mM) durant une période de temps de 17 heures. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  ES de neuf mesures ; \*\*P<0,01 student T-test. EM : embryogenèse de l'embryon.

ainsi participer à la signalisation sucre conduisant à la synthèse d'amidon dans les grains d'orge.

Enfin, une boîte de régulation de type SEF3 (AACCCA) a été trouvée à -1365, ce facteur spécifique de la graine, est un régulateur positif de la transcription de la  $\beta$ -conglycinine, impliqué dans le développement de la graine chez le soja (Allen *et al.*, 1989).

### 3.4.2. Taille du promoteur minimum *SUS2*

Afin d'étudier la régulation du promoteur *SUS2*, 1744 pb du promoteur *SUS2* avait été fusionné au gène reporteur GUS. Différentes délétions de ce promoteur ont ensuite été entreprises en utilisant la technologie GATEWAY™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Notre objectif était d'obtenir une construction *ProSUS2:uidA* contenant le promoteur minimum fonctionnel, la figure 3.14 montre d'une part une construction de 1049 pb dans laquelle aucune activité GUS n'a été trouvée et d'autre part deux constructions fonctionnelles et spécifiques de la graine de 1470 et 1323 pb. La construction de 1470 pb présente un profil d'expression similaire à celui de la construction *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* de 1744 pb (Figure 3.15). Cependant, une analyse préliminaire de l'expression par histochimie de la construction de 1323 pb (Figure 3.16 ; page suivante) révèle une légère diminution de l'expression au niveau de la pointe racinaire de l'embryon.

### 3.4.3. Discussion

Dans cette étude trois constructions comprenant des délétions 5' de la fusion *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* ont été analysées : deux constructions fonctionnelles de 1470 et 1323 pb respectivement et une construction de 1049 pb qui n'est pas fonctionnelle (Figure 3.14).

Nous avons montré que la construction *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* de 1470 pb, présente un profil d'activité GUS similaire à celle de la construction *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* de 1740pb y compris l'effet de solutions sucrées (Figure 3.15). Par contre la construction *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* (1049 pb) ne permet plus d'expression du gène *uidA*. Ce résultat suggère que les boîtes de régulation nécessaires pour la fonctionnalité du promoteur *SUS2* sont localisées en la région entre -1470 et -1049bp, par rapport à l'ATG (Figure 3.14B-D) or les deux boîtes de régulation SEF3 (AACCCA) et W-box (TGACT) sont présentes dans cette région.

Le motif TGACT trouvé à -1262 pb de l'ATG du gène *SUS2*, a été étudié chez l'orge (Sun *et al.*, 2003) ; cette boîte est connue pour se lier à des facteurs de transcription type WRKY. De plus, les W-box se regroupent fréquemment dans des petits fragments de promoteur et

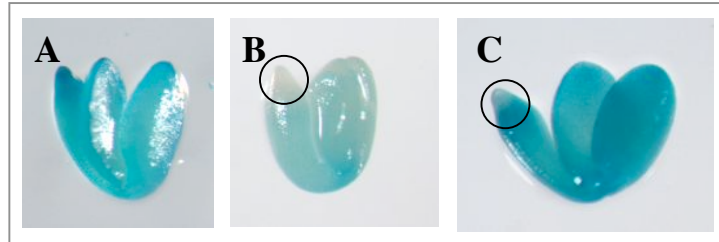


Figure 3.16. Activité GUS de une délétion promoteur *SUS2* fusionné au gène rapporteur *uidA*

L'activité GUS par histochimie a été obtenue en utilisant des embryons isolés des graines à 15 JAF

(A) lignée *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* (1740 bp) (B-C) lignée *Pro<sub>SUS2</sub>:uidA* (1323 bp), les photos présentées pour cette lignée montrent les variations d'expressions obtenues.

peuvent agir ensemble en synergie. Or, trois séquences contenant le cœur du motif W-box (TGACT) ont été observées à proximité du facteur WRKY.

Le facteur WRKY, *SUSIBA2* (*Sugar Signaling in Barley*) contrôlé par les sucres, semble pouvoir se lier à des éléments cis régulateurs de type W-box pour induire l'expression du gène de l'isoamylase1 (*iso1*) et ainsi participer à la signalisation sucre conduisant à la synthèse d'amidon dans les grains d'orge. Ainsi, la question se pose de savoir dans quelle mesure ces boîtes régulent l'expression du gène *SUS2* et *via* quel facteur de transcription.

La boîte de régulation de type SEF3 (AACCCA) a été trouvée à -1365. Ce facteur spécifique de la graine, est un régulateur positif de la transcription de la  $\beta$ -conglycinine, impliqué dans le développement de la graine chez le soja (Allen *et al.*, 1989). Donc, notre analyse de délétions du promoteur et les conclusions présentées pour ces boîtes de régulation suggèrent qu'elles pourraient être potentiellement importantes pour la régulation du promoteur (Figure 3.14). Pour évaluer cette hypothèse l'analyse de l'activité GUS par histochimie du promoteur 1323 pb a été réalisée. Cette construction ne contient pas la boîte de régulation SEF3 et présente une activité GUS absente aux niveaux de la pointe racinaire des embryons. Ce résultat suggère que cette boîte pourrait être impliquée dans la perte d'activité détectée dans la pointe de la racine. La mutagenèse dirigée pourrait être intéressante pour confirmer cette hypothèse ainsi que pour étudier l'importance de la boîte de régulation (W-box).

L'ensemble des résultats obtenus à partir de l'analyse de la régulation des gènes *AtSUS* par trois facteurs de maturation sont en agrément avec l'idée que les gènes de la saccharose synthase sont impliqués dans le métabolisme carboné pendant le développement de la graine d'*Arabidopsis*. De ce fait, pour tester cette hypothèse nous avons mis en place une analyse fonctionnelle de trois membres de cette famille multigénique (*SUS1*, *SUS2* et *SUS3*). L'étude est décrite dans le prochain chapitre.

**4.**  
**IMPLICATION DES**  
**SACCHAROSE SYNTHASES**  
**DANS LE MÉTABOLISME**  
**CARBONÉ**



## 4. Analyse du métabolisme carboné dans la graine d'Arabidopsis

### 4.1. Résumé

Deux gènes codant la saccharose synthase, nommés *AtSUS2* (At5g49190) et *AtSUS3* (At4g02280) sont fortement et différemment exprimés dans la graine d'Arabidopsis, pendant la phase de maturation correspondant à la période de la synthèse de composés de stockage. Pour étudier les fonctions de ces deux gènes dans la graine au cours du développement, des analyses fonctionnelles complètes ont été effectuées, y compris la caractérisation biochimique et le profil métabolique de deux allèles nuls pour chaque isoforme. Les résultats obtenus ont permis de montrer l'importance de ces enzymes (SUS) pour le métabolisme du saccharose dans la graine d'Arabidopsis au cours du développement. La caractérisation biochimique indique que les gènes *AtSUS2* et *AtSUS3* exercent un fort contrôle sur la biosynthèse d'amidon dans la graine. Une implication du gène *AtSUS2* dans la biosynthèse du saccharose a aussi été suggérée. Enfin nos résultats montrent que les gènes *SUS2* et *SUS3* sont différemment impliqués, durant la phase de maturation, dans la biosynthèse de squelettes carbonés utilisés pour la synthèse d'acides aminés *via* des réactions de transamination. Ces résultats seront soumis très prochainement pour publication dans la revue « New Phytologist » (ci-après).

Running title: Sucrose synthase in Arabidopsis seed

Corresponding author: Rochat Christine,

INRA, Seed Biology Laboratory, UMR 204, INRA-AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, RD10, 78026 Versailles Cedex, France.

fax 33 1 30 83 30 96; e-mail [Christine.rochat@versailles.inra.fr](mailto:Christine.rochat@versailles.inra.fr)

#### 4.2. *SUS2* and *SUS3* genes are implicated in sucrose metabolism in Arabidopsis seed

Juan Gabriel Angeles-Núñez, Sylvie Wuillème, Gilles Clément, Loïc Lepiniec, Martine Miquel and Christine Rochat\*.

INRA, Seed Biology Laboratory, UMR 204, INRA-AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, RD10, 78026 Versailles Cedex, France.

\*For correspondence: (fax 33 1 30 83 30 96; e-mail [Christine.rochat@versailles.inra.fr](mailto:Christine.rochat@versailles.inra.fr))

##### 4.2.1. Summary

Sucrose synthase (SUS) catalyses the reversible conversion of sucrose and UDP to UDP-glucose and fructose, which are both used in multiple biochemical pathways. Two genes encoding sucrose synthase, namely *SUS2* (At5g49190) and *SUS3* (At4g02280) are strongly and differentially expressed in Arabidopsis seed, during the maturation phase, corresponding to the period of storage compounds synthesis. To further investigate the functions of both *SUS2* and *SUS3* isoforms in developing seed, comprehensive functional analyses were carried out, including biochemical characterisation and metabolite profiling of two *sus2* and two *sus3* alleles. The results obtained outlined the importance of these SUS isoforms for sucrose metabolism in developing seeds of Arabidopsis. Biochemical characterisations indicate that *SUS2* and *SUS3* exert high control over starch biosynthesis in seed. An implication of *SUS2* in sucrose biosynthesis was suggested. Finally our results showed that *SUS2* and *SUS3* genes are differentially implicated in the biosynthesis of some of which reserve as carbon skeleton for the amino acids synthesis via transamination reactions especially at mid-maturation phase.

**Key words:** sucrose synthase, developing seed, Arabidopsis, metabolite profiling, fatty acid, starch.

### 4.2.2. Introduction

The ability to make seeds is a key evolutionary trait of higher plants. All seed characteristics (e.g. physical and biochemical protection by the seed coat, desiccation tolerance, quiescent metabolism and accumulation of storage compounds for efficient seedling development) contribute to embryo survival and dispersion. In the life cycle of higher plants, seed development is a crucial process providing the link between two distinct sporophytic generations. According to several plant models this process can be divided into the two stages of morphogenesis and maturation (Mansfield *et al.*, 1992; Baud *et al.*, 2002). These stages are characterised by specific sequences of events and metabolic modifications in the three seed compartments (i.e. embryo, endosperm and seed coat). During the early morphogenesis stage of embryo development (until 6 DAF), cell division occurs together with embryogenesis leading to torpedo stage (Baud *et al.*, 2002). During maturation stage, storage compounds are synthesised and accumulated in the embryo (Mansfield *et al.*, 1992). In *Arabidopsis* seeds, carbon and nitrogen resources are stored in the form of lipids and proteins (Baud *et al.*, 2002). These reserves will fuel the establishment of the seedling after onset of germination (Bewley and Black, 1994). During late maturation stage, the embryo becomes metabolically quiescent and tolerant to desiccation. Sucrose represents the major form in which the photosynthetically assimilated carbon is transported in plants. After it has been synthesised in green leaves or siliques walls, sucrose is transported through the phloem to supply sink organs like seeds (Zhang *et al.*, 2007 for a review). This flux is driven by the so-called sink strength (Ho, 1988). The cleavage of sucrose in plants is catalysed either by invertases ( $\beta$ -D-fructofuranoside fructohydrolase, EC 3.2.1.26) or by sucrose synthases (UDP-glucose: D-fructose 2- $\alpha$ -D-glucosyl transferase, EC 2.4.1.13, SUS). Invertases, are involved in various aspects of the plant life cycle and in the plant response to environmental stimuli (Roitsch and Gonzalez, 2004). Sucrose synthase (SUS) cleavage activity correlates with sink strength of storage organs, providing substrates for starch synthesis in potato tubers, maize or pea embryos (Zrenner *et al.*, 1995; Chourey and Nelson, 1976; Déjardin *et al.*, 1997). Previous studies showed that expression of SUS in *Vicia faba* seeds (Weber *et al.*, 1997) or potato tubers (Zrenner *et al.*, 1995) is involved mainly in the synthesis and storage of starch and protein. In species examined to date, sucrose synthases are encoded by a small multigene family. The *Arabidopsis* genome contains six sucrose synthase genes that exhibit distinct expression profiles regulated by various environmental stress conditions such as oxygen deprivation, dehydration, cold treatment and sugar feedings (Baud *et al.*, 2004; Bieniawska *et al.*, 2007).

Transcriptomic analysis (<http://www.genevestigator.ethz.ch/at/>), shows that two isoforms (SUS2 and SUS3) of this multigene family, are strongly expressed in Arabidopsis seed during mid and late maturation phases respectively. The *SUS2* gene (At5g49190) was isolated and initially characterised by Chopra *et al.* (1992). *SUS2* is specifically and highly induced in seeds during early maturation phase (12 DAF) and appears as a marker of seed maturation (Baud *et al.*, 2004; Angeles-Nuñez *et al.*, 2008). Indeed, the very strong induction in *SUS2* transcript accumulation was measured between 6 and 12 DAF, corresponding to the enhancement of seed maturation phase (Baud *et al.*, 2002; Bieniawska *et al.*, 2007). This developmental stage is characterised by a decrease in starch concentration in seed and by the onset of storage product biosynthesis, including both triacylglycerides (oil) and proteins. This result is consistent with a microarray study that examined changes in gene expression during *A. thaliana* seed development (Ruuska *et al.*, 2002). *SUS2* appears to be specifically expressed in early maturing seeds and is not induced in leaves in response to various abiotic stresses, including O<sub>2</sub> deficiency, dehydration, or sugar feedings (Baud *et al.*, 2004). *SUS3* (At4g02280) seems to be induced in various organs under dehydration conditions including leaves deprived of water or submitted to osmotic stress as well as maturing seeds (Baud *et al.*, 2004). *SUS3* is highly induced in seeds during the late maturation phase (18 DAF) (Baud *et al.*, 2004; Bieniawska *et al.*, 2007; Fallahi *et al.*, 2008). Indeed, the very strong induction in *SUS3* transcript accumulation was measured in seeds between 12 and 18 DAF, corresponding to maturation phase, which is characterised by a rapid increase in seed dry weight resulting from the accumulation in large amount of storage products (oil and proteins) and a concomitant decrease in relative water content of the seed (Baud *et al.*, 2002; Baud *et al.*, 2004; Fait *et al.*, 2006).

Analysis of some SUS mutants such as *rugosus4* in pea (*rug4*, Craig *et al.*, 1999) or *shrunkened 1* in maize (*Sh1*, Chourey *et al.*, 1998) revealed that resulting seeds/kernels are severely affected in their starch accumulation during seed development. Sucrose catabolism by SUS sustains directly cellulose synthesis and suppression of SUS in the ovule epidermis of cotton seed represses fiber initiation and elongation (Ruan *et al.*, 2003). Expression of different *SUS* genes is spatially and temporally regulated and is differentially modulated in response to anoxia, low temperatures and osmotic stress (Maraña *et al.*, 1990; Chourey *et al.*, 1991; Zeng *et al.*, 1998; Déjardin *et al.*, 1999). In Arabidopsis seeds, no metabolic phenotype was observed on simple and double sucrose synthase mutants when considering dry seeds (Bieniawska *et al.*, 2007). However it was recently reported that total SUS activity reaches a peak during the maturation phase, at about 15 DAF, which corresponds approximately to the

middle of this stage (Fallahi *et al.*, 2008; Angeles-Nuñez *et al.*, 2008). This activity pattern fitted well *SUS2* mRNA abundance; however the authors did not exclude the presence of other SUS isoform activities, especially *SUS3*, in late maturing seed (Angeles-Nuñez *et al.*, 2008). Moreover it was reported that *SUS2* is localised in the embryo, endosperm and seed coat and that the protein is associated with plastids in seeds during the maturation phase (Angeles-Nuñez *et al.*, 2008). Together, these elements are consistent with the hypothesis that *SUS2* and *SUS3* enzymes are implicated in sucrose metabolism during seed development of *Arabidopsis* (Fallahi *et al.*, 2008; Angeles-Nuñez *et al.*, 2008). To test this hypothesis we have extensively characterised two *sus2* and two *sus3* null alleles in developing seeds of *Arabidopsis*, using biochemical approaches and metabolic profiling.

### **4.2.3. Material and methods**

#### **4.2.3.1. Plant material and culture conditions**

The *sus2-1* (SALK-076303), *sus2-2* (SALK-022538), *sus3-1* (SALK-019405), *sus3-2* (SALK-016906) mutants are in Col-0 background. Homozygous lines for these mutants were obtained. Seeds were surface-sterilized and sown on Murashige and Skoog (MS) medium (M02 555, pH 5.6; Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands). After a cold treatment (48-h at 4°C) in the dark, the plates were transferred to a growth chamber and incubated at 20°C/15°C day/night temperatures under a 16-h/8-h light/dark regime. After 15 days, the plantlets were transferred to sterilised compost, grown under a 16-h/8-h light/dark regime associated with 21°C/18°C day/night temperature. The plants were irrigated twice week with fertilisation solution (Plant-prod, fertile, [www.fertilpot.com](http://www.fertilpot.com)).

#### **4.2.3.2. Assay of sucrose synthase activity during seed development**

Samples of about 200 isolated seeds for each developmental stage tested were used for measuring total SUS activity in a 2-step assay as described by Egger and Hampp (1992) with the following changes: Polyclar was omitted, and 0.2% Triton X-100 (Sigma, Lyon, France) was added into the extraction buffer.

#### **4.2.3.3. Carbohydrate and lipid analyses**

Samples of 20 lyophilised seeds for each developmental stage tested were used for the carbohydrate and lipid analyses as described by Baud *et al.* (2002).

#### 4.2.3.4. Total protein analysis in seed development

Samples of 10 lyophilised seeds for each developmental stage tested were used for the total protein analyses as described by Baud *et al.* (2002).

#### 4.2.3.5. Metabolic profiling using gas chromatography-time of flight mass spectrometry (GC/TOF-MS)

##### 1) Data acquisition

Samples were extracted and derivatized according to Fiehn, (2006). Extraction mix was methanol, chloroform, water (2.5:1:1) containing ribitol at 6.6  $\mu\text{g/ml}$  as internal standard. It was cooled at  $-20^{\circ}\text{C}$  before use.

Samples of about 200 seeds were ground in a 1.5 ml microtube (Eppendorf) with a Teflon coated pestle in 300  $\mu\text{l}$  of extraction buffer for 30s. They were then shaken for 10 min in an Eppendorf thermomixer at 1,400 rpm and  $4^{\circ}\text{C}$ . Insoluble material was removed by centrifugation and the supernatant was extracted with 120  $\mu\text{l}$  of water. Samples of 250  $\mu\text{l}$  of the polar phase were dried overnight in a vacuum centrifuge (Savant).

Dried extracts were derivatized first with 20  $\mu\text{l}$  of 20 mg/ml methoxyamine hydrochloride (Sigma) in pyridine for 90 min at  $28^{\circ}\text{C}$ . 8  $\mu\text{l}$  were then dissolved 10 times in derivatization grade MSTFA (1 ml ampules Macherey-Nagel) containing 5% alkane mix (C10, C12, C15, C19, C22, C28, C32, C36) and derivatized for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . Samples were allowed to rest for 2 hours at room temperature before injection.

1  $\mu\text{l}$  of derivatized samples were then injected in the split mode with a ratio of 1/10 using a hot needle technique (10 sec of preinjection dwell time) with a CTC combi PAL in an Agilent 6890N gas chromatograph. The liner was a split/splitless one with glass wool (Restek). The column was a 30 m Restek RTX-sil with a built-in additional 10 m guard column.

Temperature program was 7 min at  $70^{\circ}\text{C}$ ,  $10^{\circ}\text{C} / \text{min}$  to  $330^{\circ}\text{C}$  and 4 min at  $330^{\circ}\text{C}$ .

Injector temperature was  $240^{\circ}\text{C}$  and transfer line temperature  $250^{\circ}\text{C}$ .

Metabolites were identified with a Waters GCT-premier time of flight mass spectrometer in electronic impact mode. A lock mass was not requested in the TDC settings centroiding parameters because requesting one resulted in hatching of many peaks. Masses were thus analyzed nominally.

Source temperature was  $200^{\circ}\text{C}$  and the instrument was tuned with perfluoro tributylamine with the 69 Da fragment intensity equalling the 219 Da fragment one. Trap current was 200  $\mu\text{A}$  with an electron energy of 70 eV. Ion repeller voltage was 1V. Focus 1, 2 and 3 lenses

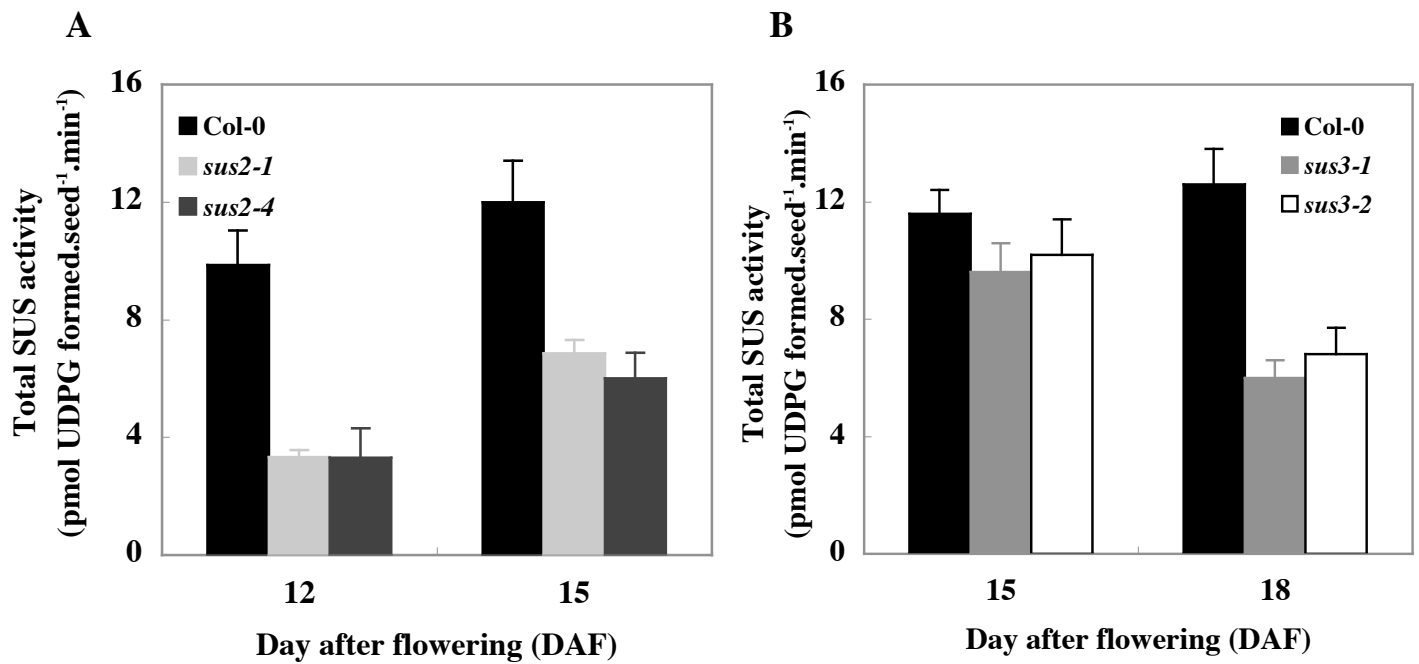


Figure 4.1. Time course analysis of total SUS activity measured on developing seeds isolated from 3 siliques of (A) wild type (Col-0) and *sus2-1*, *sus2-4* (B) wild type (Col-0) and *sus3-1* and *sus3-2*. Values are the means  $\pm$  SE of triplicate measurements on two independent cultures.

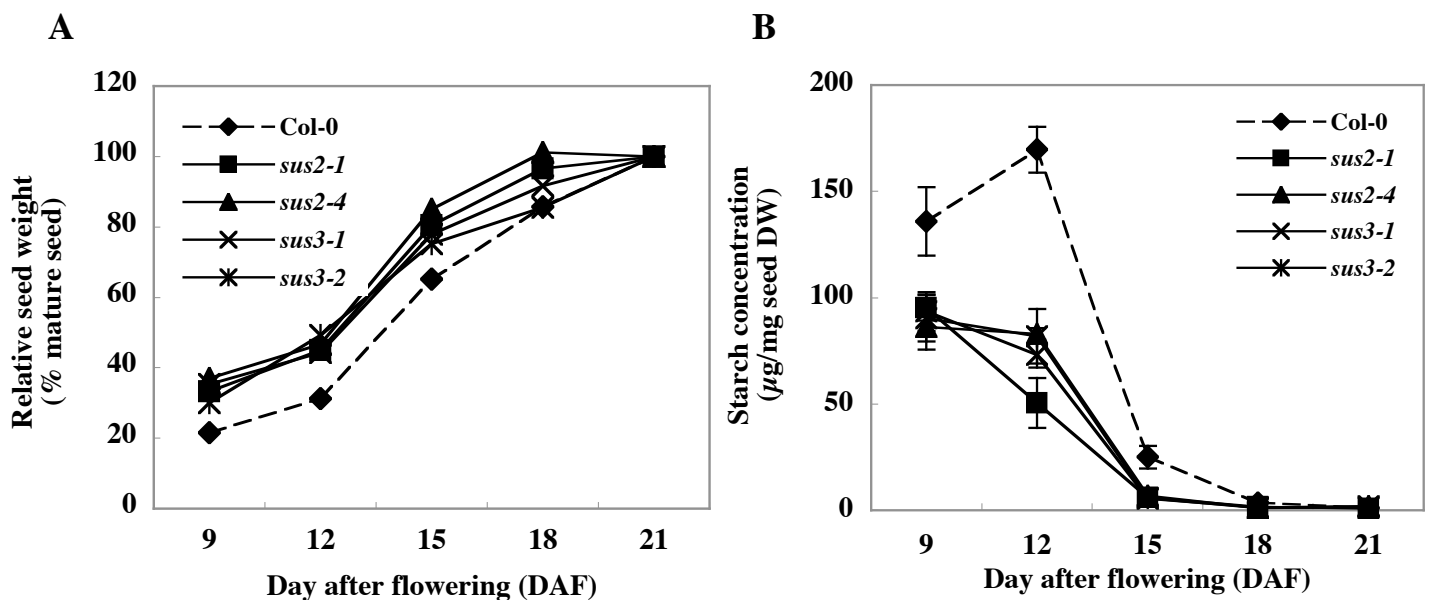


Figure 4.2. Effect of the *sus* mutations on growth parameters in developing Arabidopsis seeds for the wild type (Col-0) and sucrose synthase mutants (*sus2-1*, *sus2-4*, *sus3-1* and *sus3-2*) (A) Relative seed weight. Each data point is the mean of nine independent measurements (B) Evolution of starch concentration. Each data point is the means  $\pm$  SE of three independent measurements.



voltages were respectively of 75, 15 and 45 V. MCP was set to 2700 V. TDC trigger threshold and TDC signal threshold were 350 mV and 20 mV respectively. Dynamic Range Enhancement (DRE) parameters were around 10 on 5 selected fragments. Acquisition rate was ten spectra per second (which resulted in 5 points per second after DRE treatment) and on a mass range 50-650 Da.

## 2) Data treatment

Raw Masslynx chromatograms were converted into NetCDF files and analyzed with the AMDIS freeware for peak deconvolution and compounds identification. A retention time indices and mass spectra based local library was constructed with the help of the NIST and Golm databases and from the injection of standard compounds. Compounds identified with the AMDIS software were quantified using the Waters Quanlynx software. Waters Markerlynx software was also used to obtain a fast overview of the results. Multivariate statistical analyses were performed with the TMEV freeware. Normalized abundance are presented.

## 4.2.4. Results

### 4.2.4.1. Isolation and molecular characterisation of sucrose synthase mutants

To examine the roles of the SUS2 and SUS3 isoforms in developing seed, we obtained T-DNA insertion lines affected in At5g49190 and At4g02280 genes from the Salk Institute (<http://signal.salk.edu/>). For each isoform, we obtained two null alleles and used these lines in our subsequent analyses. The *sus2-1* (SALK-076303), *sus2-4* (SALK-022538), *sus3-1* (SALK-019405) and *sus3-2* (SALK-016906), are in the Col-0 genetic background. Plant genomic DNA flanking the right and left T-DNA borders of the corresponding sucrose synthase mutants studied, were amplified by PCR and sequenced, confirming the FSTs found in the FLAGdb/FST database (data not shown).

### 4.2.4.2. Activity of sucrose metabolising-enzymes during seed development

In order to evaluate the importance of sucrose-metabolising enzymes during Arabidopsis seed development, invertases (acid soluble, alkaline and acid insoluble) and SUS activities were measured *in vitro* using protein extracts prepared from isolated seeds for the null alleles (*sus2-1*, *sus2-4*, *sus3-1* and *sus3-2*) and wild type (Col-0, WT). No difference in invertase activity was detected during seed development in the different mutant backgrounds when compared

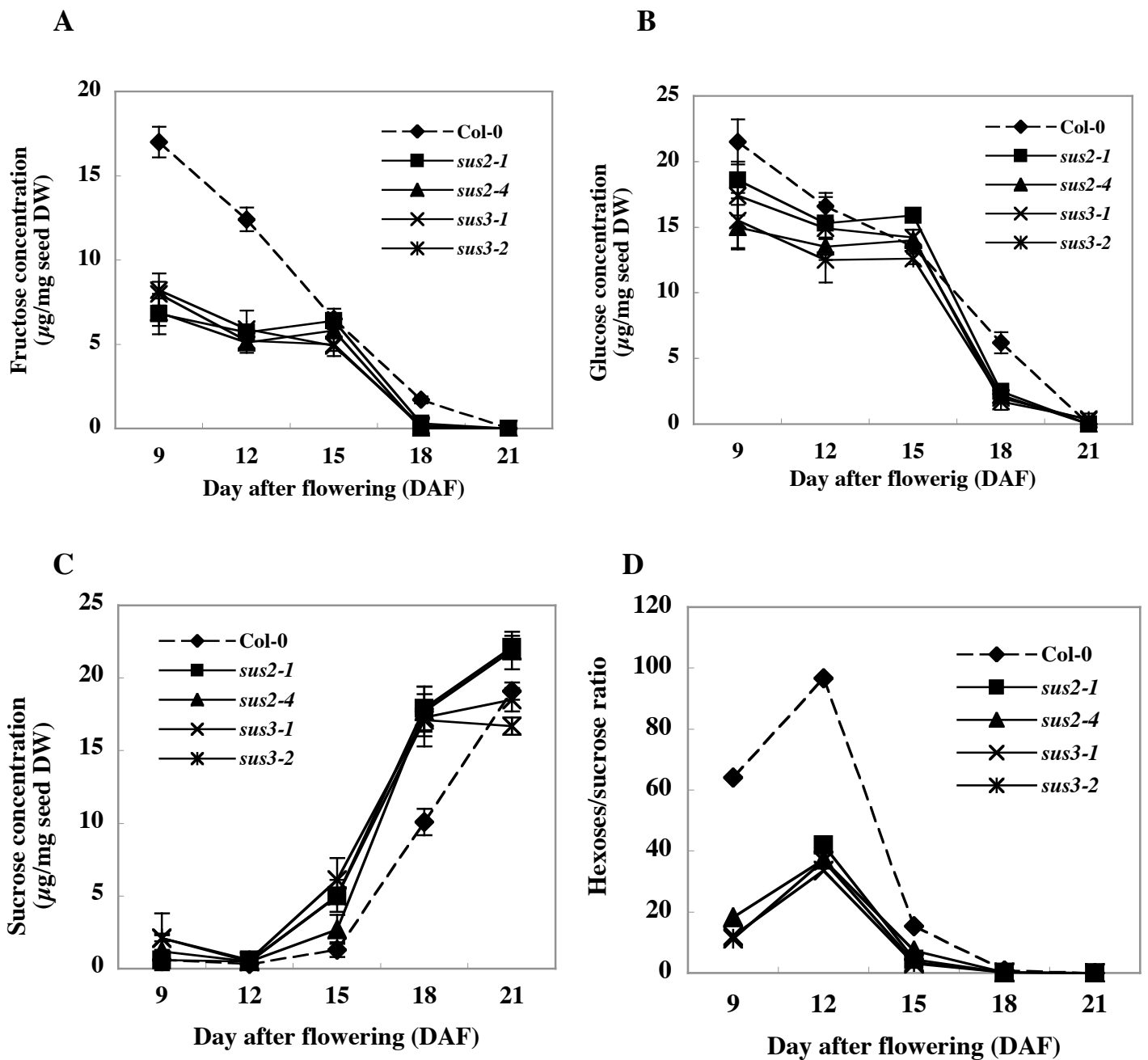


Figure 4.3. Effect of the *sus* mutations on the evolution of carbohydrate content in developing Arabidopsis seeds for the wild type (Col-0) and sucrose synthase mutants (*sus2-1*, *sus2-4*, *sus3-1* and *sus3-2*) (A) fructose concentration (B) glucose concentration (C) sucrose concentration (D) hexoses/sucrose ratio. Each data point is the means  $\pm$  SE of three independent measurements.

with the WT (data not shown). Conversely, their total SUS activity was strongly modified. In *sus2* mutant seeds, SUS activity was decreased by 60% at 12 DAF and by 30% at 15 DAF (Figure 1A). In *sus3* mutant seeds no difference in SUS activity was detected at 15 DAF, however it was reduced by 50% at 18 DAF (Figure 4.1B).

#### 4.2.4.3. Seed development

Evolution of seed dry weight (DW) followed a sigmoid pattern with a rapid increase between morphogenesis and mid-maturation phases. No significant differences in the DW of the mature seeds were found between the various lines studied here. The comparisons in the DW were made on the basis of the relative seed DW with 100 values for mature seed (25 $\mu$ g). In *sus2* and *sus3* mutant seeds, the relative weight increased by 15% from 9-15 DAF. However no differences were detected in these mutant seeds during late stage of seed development when compared with the WT (Figure 4.2A).

#### 4.2.4.4. Evolution of the carbohydrate content during seed development

To determine whether the sucrose synthase mutations had an impact on carbohydrate content in developing seeds, several parameters were then measured using lyophilised developing seeds. Marked changes in the levels of carbohydrate compounds were detected in both mutants (*sus2* and *sus3*), during seed development in comparison with the WT. The seed transiently stocks high amount of starch during the morphogenesis phase and this starch is degraded during maturation phase. In *sus2* and *sus3* mutant seeds, starch accumulation decreased by 30% at 9 DAF, by 50% at 12 DAF and by 70% at 15 DAF as compared with the WT (Figure 4.2B). The hexoses (fructose and glucose) pattern in these mutant seeds was affected during seed development when compared with their WT counterparts. In *sus2* and *sus3* mutant seeds, the fructose content decreased by 60% from 9-12 DAF but no significant difference was detected at 15 DAF. However a faster degradation in their fructose content was detected at 18 DAF (Figure 4.3A). Conversely, in *sus2* and *sus3* mutant seeds, no significantly change was observed in the glucose contents when compared to their WT counterpart except at 18 DAF where, as fructose, its concentration was reduced by 60% (Figure 4.3B). The sucrose synthase mutants studied present an altered sucrose pattern in comparison with their WT counterpart. In *sus2* and *sus3* mutants the sucrose content was increased by 2-fold and 4-fold respectively at 15 DAF, by 45% at 18 DAF in both *sus2* and *sus3* mutants and by 15% at 21 DAF (dry seed) in *sus2* mutant seeds but no difference was detected in *sus3* mutants at the same development stage (Figure 4.3C). The hexoses/sucrose

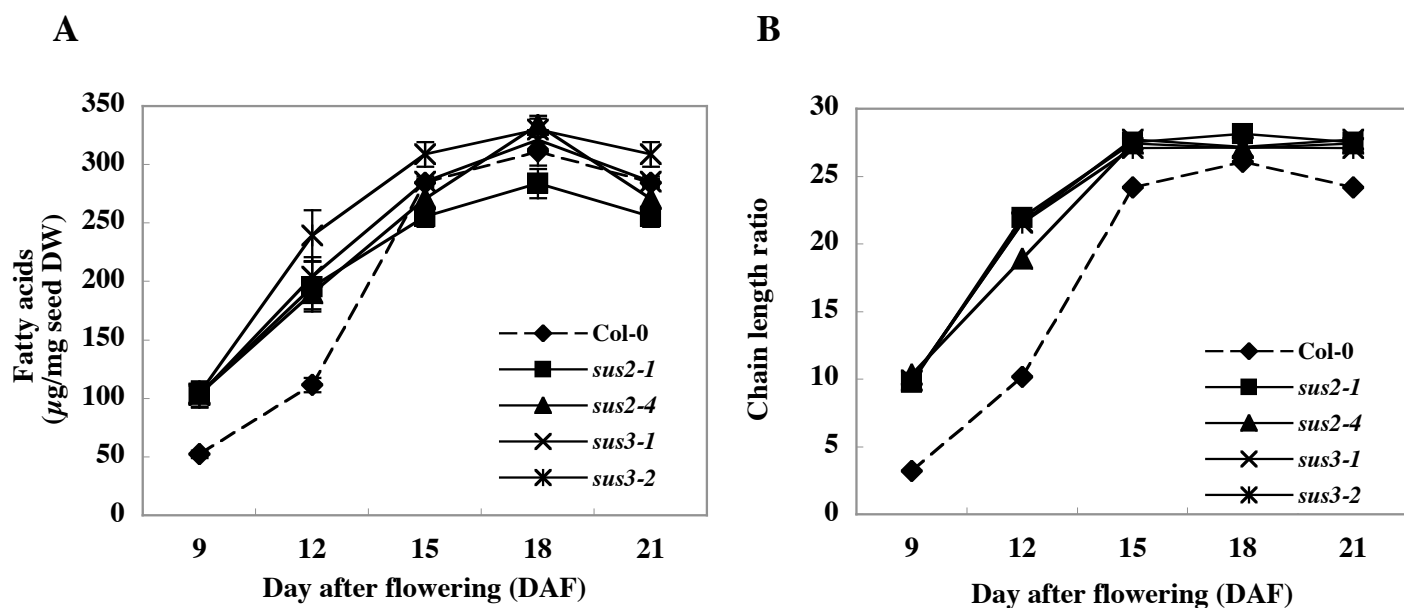


Figure 4.4. Effect of the *sus* mutations on the synthesis of fatty acids in developing Arabidopsis seeds for the wild type (Col-0) and sucrose synthase mutants (*sus2-1*, *sus2-4*, *sus3-1* and *sus3-2*). (A) total fatty acids content (B) chain length ratio. Values are the means  $\pm$  SE of three replicates carried out on batches of 20 seeds.

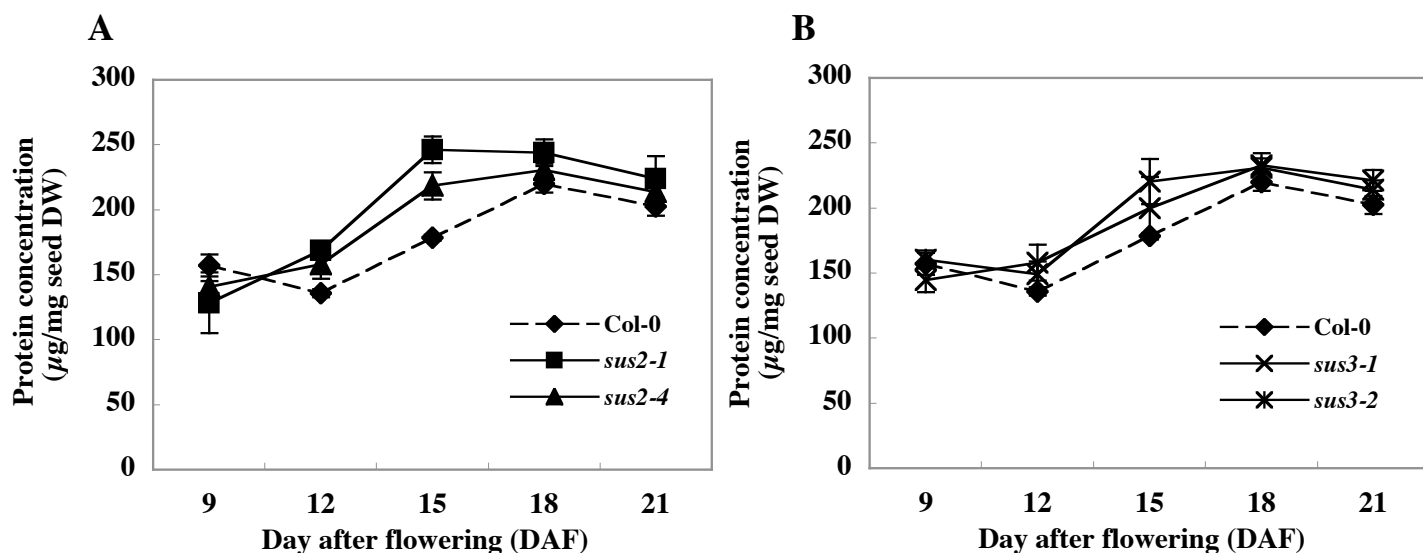


Figure 4.5. Effect of the *sus* mutations on the synthesis of total proteins in developing Arabidopsis seeds for the wild type (Col-0) and sucrose synthase mutants (A) *sus2-1*, *sus2-4* (B) *sus3-1* and *sus3-2*. Values are the means  $\pm$  SE of three replicates carried out on batches of 10 seeds.

ratio in *sus2* and *sus3* mutant seeds was strongly affected in comparison with the WT. In *sus2* and *sus3* this ratio decreased by 35% and 80% respectively at 9 DAF, by 55% at 12 DAF and by 50% at 15 DAF (Figure 4.3D). These results on the primary metabolism observed by a biochemical characterisation are consistent with those obtained, later on, in our metabolite profiling approach using GC/TOF-MS (data not shown).

#### **4.2.4.5. Synthesis of fatty acids during seed development**

The pattern of total fatty acid accumulation in the sucrose synthase mutants studied was affected during seed development in comparison with their WT counterpart. The mutants present a similar pattern both in fatty acid concentration and very long chain fatty acid (VLCFA)/C16-C18 fatty acid ratio. The total fatty acid content in *sus2* and *sus3* mutant seeds was increased by 55% during early period of seed development (9-12 DAF). Then no significant difference was detected from 15-21 DAF (Figure 4.4A). Similarly, important differences in their VLCFA /C16-C18 ratio were detected especially from 9-12 DAF (increased by 50%) but 5-15% increases of the ratios were recorded for all other development stages studied (Figure 4.4B).

#### **4.2.4.6. Synthesis of total protein during seed development**

The pattern of total protein content in *sus2* and *sus3* mutant seeds was affected differentially during seed development in comparison with their WT counterpart. In *sus2* mutant seeds the protein content increased by 25% from 12-15 DAF, however no difference was detected during late stages of seed development (Figure 4.5A). Interestingly in *sus3* mutant seeds no difference in their total protein content was detected (Figure 4.5B).

#### **4.2.4.7. Metabolite profiling during seed development**

GC/TOF-MS analyses provide data in term of abundance (i.e. the amount of a specific ionised fragment) for a large number of metabolites. Comparisons between lines were carried out for each compound in term of normalised abundances. Only data about the more abundant organic acids and amino acids are presented here.

##### **4.2.4.7.1. TCA cycle metabolites**

Comparisons of the normalised abundances of TCA metabolites (pyruvate, succinate, fumarate, malate and citrate) in WT and sucrose synthase mutants reveal that they are affected in *sus2* and *sus3* mutant seeds during seed development. In *sus2* mutants the malate and

TCA metabolites	Col-0	<i>s2-1</i>	<i>s2-4</i>
Pyruvate	4.9 ± 0.3	3.7 ± 1	2.9 ± 1.2
Succinate	12.3 ± 0.6	10.9 ± 2.2	23.0 ± 5
Fumarate	32.0 ± 7.1	<b>92.2 ± 5.1</b>	<b>86.0 ± 7</b>
Malate	251.2 ± 19	<b>435.0 ± 40</b>	<b>671.0 ± 62</b>
citrate	227.2 ± 80	<b>503.0 ± 126</b>	<b>792.0 ± 198</b>

Table 4.1. Normalized TCA cycle metabolites abundance in Arabidopsis seeds for the wild type (Col-0) and sucrose synthase mutants (*sus2-1* and *sus2-4*) at 12 DAF. Values are the mean ± SE of triplicate measurements

citrate abundances increased by 2.5 fold and by 3.4 fold respectively at 12 DAF (Table 4.1), but no difference was detected for these TCA metabolites at 15 DAF, while the pyruvate, succinate and fumarate abundances increased by 80%, by 60% and by 1.5-fold respectively at the same development stage (Table 4.2; page 79). In *sus3* mutants, the malate and citrate abundances decreased by 65% and 75% respectively at 15 DAF (Table 4.2) but no difference was detected at 18 DAF (Table 4.3; page 80). However, the pyruvate, succinate and fumarate abundances decreased by 40%, by 55% and by 60% respectively at the same development stage (Table 4.3).

#### 4.2.4.7.2. Free amino acids

The abundances of many free amino acids were affected in developing seed of sucrose synthase mutants when compared with their wild type counterpart. The main free amino acids detected by GC/TOF-MS analysis throughout seed development for the WT and for *sus2* and *sus3* mutants were alanine, aspartate, glutamate, glutamine, isoleucine, leucine, proline, serine, threonine, valine and  $\gamma$ -amino-butyric acid (Gaba). In *sus2* and *sus3* mutants the serine abundance was decreased by 75% and by 35% respectively at 15 DAF (Table 4.2). In *sus2* the leucine and alanine abundances were decreased by 55% and by 50% respectively at the same development stage (Table 4.2). In *sus3* mutants the leucine abundance was decreased by 35% but no difference was detected for their alanine abundance at 15 DAF (Table 4.2). In *sus3* mutants serine, leucine and alanine abundances decreased by 60%, 55% and 85% respectively at 18 DAF (Table 4.3). Important modifications were also detected for proline abundance in *sus2* and *sus3* mutants. In *sus2* the proline abundance decreased by 70% at 12 DAF (data not shown) and by 85% at 15 DAF as compared with the WT (Table 4.2). In *sus3* mutants proline abundance decreased by 65% at 15 DAF (Table 4.2) and by 75% at 18 DAF (Table 4.3).

#### 4.2.5. Discussion

In most plants, a major part of the organic carbon produced during photosynthesis is channelled into the synthesis of sucrose, which is transported to tissues sink (Martin *et al.*, 1993). In sink tissues the sucrose may be used as the source of carbon skeleton for building structural elements, as a metabolic fuel or may accumulate and be stored at high concentrations. Sucrose cleavage is vital to multicellular plants, not only for the allocation of carbon sources but also for the initiation of hexose-based sugar signals in developing organs.

Only the invertase and reversible sucrose synthase reactions catalyse known paths of sucrose breakdown *in vivo* (Koch, 2004). We present here lines of direct evidence to demonstrate the implication of SUS2 and SUS3 enzymes in sucrose metabolism at different seed developmental stages. Our analysis of single knockout mutants (*sus2* and *sus3*) supports this idea. In *sus2* and *sus3* mutant seeds, an important decrease in their SUS activity level was detected during the maturation phase (Figure 4.1). This reduced SUS activity was accompanied by important carbon modifications in developing seed.

#### **4.2.5.1. Decreased SUS activity leads to important decrease of starch accumulation in developing seed of Arabidopsis.**

In Arabidopsis seeds, starch is transiently accumulated during the first half of development and very low amounts remain in the dry seed (Baud *et al.*, 2002; Fait *et al.*, 2006). In oilseed rape it was proposed that starch accumulation could strengthen the seed as a principal sink organ prior to the synthesis of the storage compound (oil) and that it could finely regulate nutrient allocation between the different tissues of the seed during the development (Da Silva *et al.*, 1997). In this study we showed that the decreased SUS activity in *sus2* and *sus3* mutant seeds during the maturation phase leads to reduced starch accumulation (Figure 4.2B). This result is a direct evidence that a decrease in SUS activity reduces the availability of assimilates for starch biosynthesis in *sus2* and *sus3* mutant seeds. Our result is consistent with the co-localisation in seed coat of starch grains and SUS2 protein reported by Angeles-Nuñez, *et al.* (2008). Muñoz *et al.* (2005) suggested that UDP-glucose formed by SUS reaction could be channelled to the starch biosynthesis in source leaves. In pea, a decrease in SUS activity was responsible for the reduction in the availability of assimilates for storage component biosynthesis and normal growth (Craig *et al.*, 1999). Zrenner *et al.* (1995) also reported that a reduction in the level of SUS activity in transgenic potato tubers decreased the starch biosynthesis. Moreover a faster degradation of starch content was observed (Figure 4.2B), suggesting that its breakdown products are used as carbon source for the oil biosynthesis pathway. This is consistent with Norton and Harris, (1975) the authors suggesting that the starch could serve as a carbon source required to sustain the high rates of lipid synthesis during oil deposition.





#### **4.2.5.2. Decreased SUS activity leads to decreased hexoses/sucrose ratio in developing seeds of *Arabidopsis* that could be responsible of changes in seed development time course.**

In higher plants, sugar metabolism has been shown to be essential for the control of seed development, mainly through the regulation of the source/sink process (Herbers and Sonnewald, 1998; White *et al.*, 2001). In *Vicia faba* the phase of intensive cell division is characterised by a high hexoses/sucrose ratio (Weber *et al.*, 1997). Similarly, in *Arabidopsis* seeds the transition of the pre-storage phase to the maturation (storage) phase, where cell elongation and differentiation occur, is characterised by a clear switch in carbohydrate state, from a high to low hexoses/sucrose ratio (Baud *et al.*, 2002; Fait *et al.*, 2006). In this work, we have shown that the lower SUS activity detected in *sus2* and *sus3* mutant seeds leads to an increased sucrose concentration and a decreased fructose concentration (Figure 4.3A and 4.3C) resulting in a lower hexoses/sucrose ratio, especially during early maturation stage when compared with the WT (Figure 4.3D). It could be then suggested that this lower hexoses/sucrose ratio possibly explain why *sus2* and *sus3* enter earlier the maturation phase than their WT counterpart, as judged by the dry matter and lipid time course deposition (Figure 4.2A and 4.4A). This is also consistent with Lin *et al.* (2006), who reported that the temporary storage of assimilates during early stages in the form of starch will maintain constant and strong sink strength by preventing accumulation of sucrose and hexoses in the seed coat and embryo. It may also prevent negative feedback regulation of photosynthesis in the source tissues due to accumulation of unused sugars in the sink tissue. Last, the faster hexoses degradation observed during the late maturation phase in *sus2* and *sus3* mutant seeds suggest that these hexoses may be used like carbon suppliers to complete the filling of seeds. Sucrose is the most abundant soluble saccharide in the dry seed among a wide range of *A. thaliana* accessions (Bentsink *et al.*, 2000). Its accumulation begins during the early maturation phase and ends concomitantly with storage component biosynthesis (Baud *et al.*, 2002; Fait *et al.*, 2006). We showed here that *sus2* and *sus3* mutant seeds present more important accumulation in sucrose content during both early and late stage of seed development in comparison with the WT, remaining higher in *sus2* dry seed (Figure 4.3A). This result may suggest (i) that the SUS2 enzyme is necessary for the regulation of sucrose accumulation in *Arabidopsis* seed (ii) and the higher level of sucrose stored in *sus2* mutant seeds may be used as energy resource in other processes as well as desiccation tolerance and germination. This idea is consistent with Baud *et al.* (2002), the authors suggesting that the sucrose can be an energy resource, easily and rapidly available during early germination.

Amino acid	Col-0	<i>s2-1</i>	<i>s2-4</i>	<i>s3-1</i>	<i>s3-2</i>
Alanine	149.0 ± 11	<b>27.0 ± 4.0</b>	<b>25.0 ± 15</b>	174.0 ± 16	150.0 ± 32
Aspartate	13.0 ± 2.5	<b>4.0 ± 1.5</b>	<b>2.0 ± 0.7</b>	8.0 ± 2	4.0 ± 1.6
Glutamate	46.0 ± 14	<b>3.0 ± 1.7</b>	<b>2.5 ± 1.5</b>	28.0 ± 3.5	13.0 ± 6.5
Glutamine	10.5 ± 4.8	ND	ND	4.0 ± 1.1	2.3 ± 1.1
Isoleucine	9.4 ± 2.4	<b>2.1 ± 0.6</b>	<b>3.6 ± 0.9</b>	5.9 ± 1.2	8.4 ± 0.5
Leucine	12.0 ± 2.5	<b>3.1 ± 0.4</b>	<b>5.4 ± 3</b>	8.0 ± 2	6.5 ± 0.5
Proline	20.2 ± 2.5	<b>2.9 ± 1.1</b>	<b>2.0 ± 0.7</b>	6.7 ± 1.6	4.4 ± 1.6
Serine	13.3 ± 1.9	<b>3.0 ± 1</b>	<b>3.6 ± 1.8</b>	8.5 ± 1.1	7.6 ± 3.2
Threonine	7.7 ± 1.3	<b>2.3 ± 0.7</b>	<b>2.2 ± 0.6</b>	5.8 ± 1.7	4.4 ± 0.8
Valine	29.3 ± 3.1	<b>6.6 ± 1.5</b>	<b>11.0 ± 5.6</b>	17.8 ± 2.8	23.2 ± 1.6
Gaba	3.9 ± 0.8	<b>0.33 ± 0.2</b>	<b>0.58 ± 0.2</b>	1.9 ± 0.3	1.7 ± 0.8

TCA metabolites	Col-0	<i>s2-1</i>	<i>s2-4</i>	<i>s3-1</i>	<i>s3-2</i>
Pyruvate	5.7 ± 1.2	<b>10.5 ± 0.4</b>	<b>9.1 ± 2.6</b>	5.2 ± 0.7	4.0 ± 0.5
Succinate	13.1 ± 1.2	<b>21.3 ± 2.1</b>	<b>26.0 ± 6</b>	11.0 ± 2.4	8.2 ± 1.1
Fumarate	20.7 ± 8.2	<b>56.0 ± 14</b>	<b>60.0 ± 9</b>	20.0 ± 3.2	22.0 ± 4
Malate	183.0 ± 14.5	209.0 ± 35	201.0 ± 47	<b>84.0 ± 14</b>	<b>66.0 ± 20</b>
Citrate	550.0 ± 212	600.0 ± 92	523.0 ± 117	<b>272.0 ± 77</b>	<b>145.0 ± 38</b>

Table 4.2. Normalized abundances of amino acid and TCA cycle metabolites in Arabidopsis seeds for the wild type (Col-0) and sucrose synthase mutants (*sus2-1*, *sus2-4*, *sus3-1* and *sus3-2*) at 15 DAF. Values are the mean ± SE of triplicate measurements: Gaba =  $\gamma$ -amino-butyric acid; ND = not detected.

Indeed it was reported that the seed germination is associated with degradation and mobilization of the reserves accumulated during maturation (Bewley and Black, 1994; Bewley, 1997; Borisjuk *et al.*, 2004; Penfield *et al.*, 2005). Last, Leprince *et al.* (1990) suggested that the sucrose may be a key factor towards the acquisition of desiccation tolerance in embryos of *Brassica campestris*.

#### **4.2.5.3. Decreased SUS activity leads to increased lipid accumulation in developing seed of Arabidopsis.**

The biosynthesis of seed oil and starch both depend on the supply of carbon from the maternal plant. The biochemical interactions between these two pathways are not fully understood (Lin *et al.*, 2006). This work showed that *sus2* and *sus3* mutant seeds are affected in their oil biosynthesis. The *sus2* and *sus3* mutant seeds present significant increases in fatty acid accumulation during early stages of seed development (Figure 4.4A). These increases are correlated with important decreases in both starch and fructose content. This result may suggest that the absence of SUS2 and/or SUS3 enzymes induces a competition between the starch and oil biosynthesis during this early period of seed development, being consistent as there one detected between these two pathways in the *sse1/per16* mutant (Lin *et al.*, 2004) and *wri1* mutant (Focks and Benning 1998; Cernac and Benning, 2004).

Surprisingly this perturbed fatty acid pattern was not detected during late stages of mutant seed development including mutant dry seeds. This may indicate that the influence of SUS in seed filling is largely compensated and regulated for in later stages of development, which are characterised by high rates of oil accumulation.

Further studies will be required to define the factors leading to the development shift from starch to lipid storage and to assess their role in controlling overall sink activity in developing oilseeds (Lin *et al.*, 2006).

#### **4.2.5.4. Decreased SUS activity leads to perturbed TCA intermediates and amino acid abundance in developing seed of Arabidopsis.**

The TCA cycle is connected to amino acid metabolism (Fait *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2006; Weigelt *et al.*, 2008). Our study of the organic acids profile in *sus2* and *sus3* mutant seeds revealed important alterations in both amino acids and TCA intermediates abundances, during the maturation phase (Table 4.1, 4.2 and 4.3). The decreased amino acid abundance detected in *sus2* and *sus3* mutant seeds during mid and late maturation phases respectively are correlated with the decreased SUS activities measured in these mutants (see Figure 4.1, Table

Amino acid	Col-0	<i>s3-1</i>	<i>s3-2</i>
Alanine	735.0 ± 244	<b>64.8 ± 8.2</b>	<b>111.0 ± 97</b>
Aspartate	4.8 ± 1.3	3.5 ± 0.9	1.9 ± 0.1
Glutamate	11.1 ± 4.5	<b>4.5 ± 2</b>	<b>5.24 ± 0.0</b>
Glutamine	1.0 ± 0.0	0.17 ± 0.1	0.48 ± 0.0
Isoleucine	18.4 ± 5.2	<b>5.5 ± 0.4</b>	<b>7.2 ± 3.5</b>
Leucine	15.1 ± 2.4	<b>6.7 ± 0.3</b>	<b>5.4 ± 2.5</b>
Proline	19.0 ± 1	<b>4.8 ± 0.4</b>	<b>4.74 ± 4.3</b>
Serine	8.7 ± 0.4	<b>3.6 ± 0.3</b>	<b>2.4 ± 2</b>
Threonine	6.8 ± 0.2	<b>3.9 ± 0.7</b>	<b>2.5 ± 1.2</b>
Valine	44.2 ± 8	<b>16.3 ± 0.6</b>	<b>17.2 ± 7.2</b>
Gaba	2.7 ± 0.55	<b>0.64 ± 0.1</b>	<b>0.67 ± 0.3</b>

TCA metabolites	Col-0	<i>s3-1</i>	<i>s3-2</i>
Pyruvate	11.2 ± 2.6	<b>4.5 ± 0.6</b>	<b>6.6 ± 2</b>
succinate	28.0 ± 2.8	<b>12.0 ± 1</b>	<b>8.1 ± 1.9</b>
fumarate	47.0 ± 11	<b>19.2 ± 2.7</b>	<b>17.8 ± 5.9</b>
malate	200.0 ± 6.9	140.0 ± 9.6	156.5 ± 47.8
citrate	337.0 ± 24	377.0 ± 41	205.0 ± 55

Table 4.3. Normalized abundances of amino acid and TCA cycle metabolites in Arabidopsis seeds for the wild type (Col-0) and sucrose synthase mutants (*sus3-1* and *sus3-2*) at 18 DAF. Values are the mean ± SE of triplicate measurements: Gaba =  $\gamma$ -amino-butyric acid.

4.2 and 4.3). This result suggests that in *sus2* mutant seeds the amino acids are used for the production of storage proteins, which is consistent with the increased protein content detected at the same period of seed development (Figure 4.5). This idea is consistent with the correlation between the storages product accumulation (oil and storage proteins) and the decrease in amino acids abundance (White *et al.*, 2000; Ruuska *et al.*, 2002; Hajduch *et al.*, 2005; Fait *et al.*, 2006). However the decreased amino acids abundance detected in *sus3* mutant seeds may suggest that the amino acids are also used in processes implicated in late periods of seed development as well as in desiccation tolerance and germination processes.

In the absence of photosynthesis the leucine catabolism provides an alternate source of acetyl-CoA for metabolic processes (Anderson *et al.*, 1998). We have reported here that leucine abundance decreased in *sus2* and *sus3* mutant seeds during mid and late maturation phases respectively. This result may suggest that (i) the faster leucine degradation detected is a consequence of a possible photosynthesis inhibition induced by the higher sucrose content measured in these mutants (ii) the products obtained by a faster leucine catabolism then being used like a carbon source for metabolic processes as well as in fatty acid biosynthesis making up for the lack of photosynthetates. This idea is consistent with the correlation between high sucrose levels and induction of fructan synthesis proving the sugar-induced feedback inhibition of photosynthesis (Wagner *et al.*, 1983; Vijn *et al.*, 1999). During seed filling in Brassicacea the photosynthesis contributes to carbon or energy metabolism in the seed (Eastmond *et al.*, 1996; King *et al.*, 1997).

Balance in TCA intermediates was perturbed in *sus2* and *sus3* mutant seeds during seed development. In *sus2* mutant seeds an important increase in citrate and malate abundances was detected at 12 DAF, concomitantly with increased fatty acid content and decreased pyruvate abundance (Figure 4.4 and Table 4.1). This result may be explained with the recent report of Lin *et al.*, (2006), the authors showing that, as an alternative to fatty acid synthesis, pyruvate could enter the TCA cycle by forming acetyl-CoA and citrate in mitochondria, or by forming malate through phosphoenolpyruvate and oxaloacetate before entering mitochondria. Also increased flow in the TCA cycle may supply the essential amino acids via the transaminations for the storages protein synthesis (Singh, 1999) (Figure 4.5A). In *sus3* mutant seeds the decreased levels detected for TCA intermediates at 18 DAF, were concomitant with a decrease in both amino acid abundance and SUS activity (Figure 4.1 and Table 4.3), suggesting a decreased flow of carbon into the cycle as a likely consequence of decreased SUS activity.

#### 4.2.6. Conclusion

We have shown that *SUS2* and *SUS3* isoforms are differentially implicated in the carbon metabolism. The *sus2* and *sus3* mutant seeds present a strong metabolic phenotype during seed development. Our results show that the attenuated starch biosynthesis detected in the *sus2* and *sus3* mutant favoured fatty acid biosynthesis during early period of seed development. The starch deficiency detected in these mutant seeds give proof that *SUS2* and *SUS3* genes are implicated in the starch biosynthesis in *Arabidopsis* seed. The higher sucrose content accumulated in *sus2* mutant seeds is evidence that the *SUS2* gene may play a role in the control of the sucrose biosynthesis. Finally our results showed that *SUS2* and *SUS3* genes are differentially implicated in the biosynthesis of some of which reserve as carbon skeleton for the amino acid synthesis via transamination reactions especially at mid-maturation phase.

#### 4.2.7. Acknowledgements

We acknowledge J.P. Boutin for critical reading on the paper. This work was supported by a fellowship from the Mexican government for the CONACYT to Juan Gabriel Angeles-Núñez.

#### 4.2.8. References

**Anderson, M.D., Che, P., Song, J., Nikolau, B.J. and Wurtele, E.S.** (1998) 3-Methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase is a component of the mitochondrial leucine catabolic pathway in plants. *Plant physiol.* **118**, 1127-1138.

**Angeles-Núñez, J.G., Kronenberger, J., Wuillème, S., Lepiniec, L. and Rochat, C.** (2008) Study of AtSUS2 localization in seeds reveals a strong association with plastids. *Plant cell Physiol.* doi:10.1093/pcp/pcn117.

**Baud, S., Vaultier, M.N. and Rochat, C.** (2004) Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **55**, 397-409.

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

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

**Bewley, J.D. and Black, M.** (1994) *Seeds: Physiology of Development and Germination*, 2<sup>nd</sup> edn. New York: Plenum.

**Bieniawska, Z., Paul-Barratt, D.H., Garlick, A.P., Thole, V., Kruger, N.J., Martin, C., Zrenner, R. and Smith, A.M.** (2007) Analysis of the sucrose synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant J.* **5**, 810-828.

**Bourguignon, J., Rébeillé, F. and Douce, R.** (1999) Serine and glycine metabolism in higher plants, in: B.K. Singh (Ed.), *Plant Amino Acids, Biochemistry and Biotechnology*, Marcel Dekker, New York, 111-146.

**Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

**Cernac, A. and Benning, C.** (2004) *Wrinkled1* encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* **40**, 575-585.

**Chopra, S., Del-favero, J., Dolferus, R. and Jacobs, M.** (1992) Sucrose synthase of *Arabidopsis*: genomic cloning and sequence characterization. *Plant Mol. Biol.* **18**, 131-134.

**Chourey, P.S., Taliercio, E.W., Carlson, S.J. and Ruan, Y.L.** (1998) Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **259**, 88-96.

**Chourey, P.S., Taliercio, E.W. and Kane, E.J.** (1991) Tissue-specific expression and anaerobically induced posttranscriptional modulation of sucrose synthase genes in *Sorghum bicolor* M. *Plant Physiol.* **96**, 485-490.



**Chourey, P.S. and Nelson, S.E.** (1976) The enzymatic deficiency conditioned by the shrunken-1 mutation in maize. *Biochem. Genet.* **14**, 1041-1055.

**Craig, J., Barratt, P., Tatge, H., Déjardin, A., Handley, H., Gardner, C.D., Barber, L., Wang, T., Hedley, C. and Martin, M.** (1999) Mutations at the *rug4* locus alter the carbon and nitrogen metabolism of pea plants through an effect on sucrose synthase. *Plant J.* **17**, 353-362.

**Da Silva, P.M.F.R., Eastmond, P.J., Hill, L.M., Smith, A.M., Rawsthorne, S.** (1997) Starch metabolism in developing embryos of oilseed rape. *Planta* **203**, 480-487.

**Déjardin, A., Sokolov L.N. and Kleczkowski L.A.** (1999) Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. *Biochem. J.* **344**, 503-509.

**Déjardin, A., Rochat, C., Wuillème, S. and Boutin, J-P.** (1997) Contribution of sucrose synthase, ADP-glucose pyrophosphorylase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds. *Plant, Cell and Environment.* **20**, 1421-1430.

**Egger, B. and Hampp, R.** (1992) Invertase, sucrose synthase and sucrose phosphate synthase in lyophilized spruce needles; microplate reader assays. *Trees.* **7**, 98-103.

**Fait, A., Angelovici, R., Less, H., Ohad, I., Urbanczyk-Wochiniak, E., Fernie, A.R. and Galili G.** (2006) *Arabidopsis* Seed Development and Germination is Associated with Temporally Distinct Metabolic Switches. *Plant physiol.* **142**, 839-854.

**Fallahi, H., Scofield, G. N., Badger, M. R., Chow, W. S., Furbank, R. T. and Ruan, Y.L.** (2008) Localization of sucrose synthase in developing seed and siliques of *Arabidopsis thaliana* reveals diverse roles for SUS during development. *J. Ext. Bot.* doi:10.1093/jxb/ern180.

**Fox, S.R., Hills, L.M., Rawsthorne, S. and Hills, M.J.** (2000) Inhibition of the glucose-6-phosphate transporter in oilseed rape (*Brassica napus* L.) plastids by acyl-CoA thioesters reduces fatty acid synthesis. *Biochem. J.* **352**, 525-532.

- Fiehn O.** (2006) Metabolite Profiling in Arabidopsis. *Methods Mol. Biol.* **323**, 439-447).
- Focks, N. and Benning, C.** (1998) *Wrinkled1*: a novel, low-seed-oil mutant of Arabidopsis with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant Physiol.* **118**, 91-101.
- Fu, H. and Park, W.D.** (1995) Sink and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato. *Plant Cell.* **7**, 1369-1385.
- Hein, U., Weber, H., Bäumlein, H. and Wobus, U.** (1993) A sucrose synthase gene of *Vicia faba* L.: expression pattern in developing seeds in relation to starch synthesis and metabolic regulation. *Planta.* **191**, 394-401.
- Hendry, G.A.F. and Wallace, R.K.** (1993) The origin, distribution and evolutionary significance of fructans. In M Suzuki, NJ Chatterton, eds, Science and Technology of Fructans. CRC Press, Boca Raton, Fl., 119-139.
- Herbes, H., Sonnewald, U.** (1998) Molecular determinants of sink strength. *Current Opinion in Planta Biology* **1**, 207-216.
- Ho, L.C.** (1988) Metabolism and compartmentation of imported sugar in sink organs in relation to sink strength. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 355-378.
- Huang, J.W., Chen, J.T., Yu, W. P., Shyur, L.F., Wang, A.Y., Sung, H.Y., Lee, P.D. and Su, J.C.** (1996) Complete structure of three rice sucrose synthase isogenes and differential regulation of their expressions. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 233-239.
- Isla, M.I., Vattuone, M.A. and Sampietro, A.R.** (1991) Modulation of potato invertase activity by fructose. *Phytochemistry* **30**, 423-426.
- King, S.P., Lunn, J.P. and Furbank, R.T.** (1997) Carbohydrate content and enzyme metabolism in developing canola siliques, *Plant Physiol.* **114**, 153-160.

**Koch, K.E.** (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plant. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 509-540.

**Koch, K.E.** (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 235-246.

**Koch, K.E., Nolte, K.D., Duke, E.R., McCarty, D.R. and Avigne, W.T.** (1992) Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *Plant Cell.* **4**, 59-69.

**Komatsu, A., Moriguchi, T., Koyama, K., Omura, M. and Akihama, T.** (2002) Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggest different roles and phylogenetic relationships. *J. Exp. Bot.* **53**, 61-71.

**Leprince, O., Bronchart, R. and Deltour, R.** (1990) Changes in starch and soluble sugar in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. *Plant Cell Environ* **13**, 539-546.

**Lin, Y., Cluette-Brown, J.E. and Goodman, H.M.** (2004) The peroxisome deficient Arabidopsis mutant *sse1* exhibits impaired fatty acid synthesis. *Plant physiol.* **135**, 814-827.

**Lin, Y., Ulanov, A.V., Lozovaya, V., Widholm, J., Zhang, G., Guo, J. and Goodman H.M.** (2006) Genetic and trasgenetic perturbations of carbon reserve production in Arabidopsis seeds reveal metabolic interactions of biochemical pathways. *Planta* **225**, 153-164.

**Mansfiel, S.G. and Briarty, L. G.** (1992) Cotyledon cell development in Arabidopsis thaliana during reserve deposition. *Can. J. Bot.* **70**, 151-164.

**Maraña, C., Garcia-Olmedo, F. and Carbonero, P.** (1990) Differential expression of two types of sucrose synthase-encoding genes in wheat in response to anaerobiosis, cold shock and light. *Gene.* **88**, 167-172.

**Martin, T., Frommer, W.B., Salanoubat, M. and Willmitzer, L.** (1993) Expression of an *Arabidopsis* sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs. *Plant J.* **4**, 367-377.

**Muñoz, F.J., Baroja-Fernandez, E., Moran-Zorzano, M.T., Viale, A.M., Etxeberria, E., Alonso-Casajus, N. and Pozueta-Romero, J.** (2005) Sucrose synthase controls both intracellular ADP glucose levels and transitory starch biosynthesis in source leaves. *Plant and cell Physiol.* **46**, 1366-1376.

**Norton, G. and Harris, J.F.** (1975) Compositional changes in developing rape seed (*Brassica napus* L.). *Planta* **123**, 163-174.

**Roitsch, T. and Gonzalez, M.C.** (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* **9**, 606-613.

**Ruan, Y.L., Llewellyn, D.J. and Furbank, R.T.** (2003) Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development. *Plant Cell.* **15**, 952-964.

**Ruuska, S.A., Girke, T., Benning, C. and Ohlrogge, J.B.** (2002) Contrapuntal networks of gene expression during *Arabidopsis* seed filling. *Plant Cell.* **14**, 1191-1206.

**Sturm, A. and Tang, G.Q.** (1999) The sucrose-cleaving enzymes of plant are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science* **4**, 401-404.

**Vijn, I. and Smeekens, S.** (1999) Fructan: more than a reserve carbohydrate?. *Plant Physiol.* **2**, 351-360.

**Voelker, T. and Kinney, A.J.** (2001) Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 335-361.

**Wang, T.L. and Hedley, C.L.** (1993) Seed mutants in *Pisum*. *Genet.* **25**, 64-70.

**Weber, H., Buchner, P., Borisjuk, L. and Wobus, U.** (1996) Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* L. is controlled by the concerted action of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase: expression patterns, metabolic regulation and implications for seed development. *Plant J.* **9**, 841-850.

**Weber, H., Borisjuk, L., Heim, U., Sauer, N. and Wobus, U.** (1997) A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* **9**: 895-908.

**Weckwerth, W., Loureiro, M. E., Wenzel, K., Fiehn, O.** (2004) Differential metabolic networks unravel the effects of silent plant phenotypes. *Pro. Nat. Acad. Sci. USA.* **101**, 7809-7814.

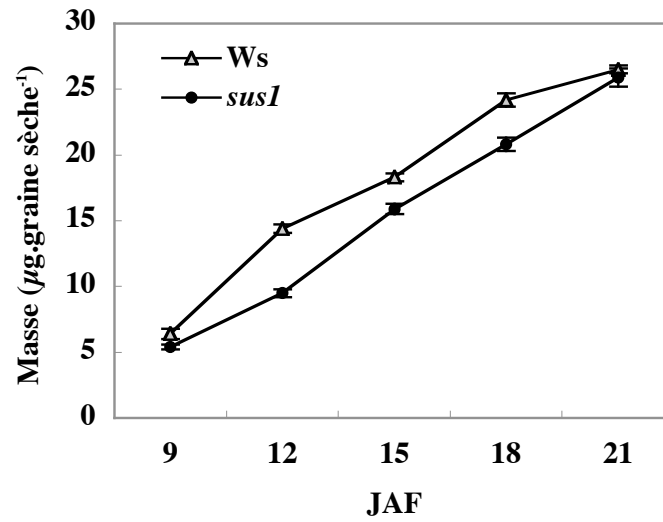
**Weigelt, K., Küster, H., Radchuk, R., Müller, M., Weichert, H., Fait, A., Fernie, A.R, Saalbach, I. And Weber, H.** (2008) Increasing amino acid supply in pea embryos reveals specific interactions of N and C metabolism, and highlights the importance of mitochondrial metabolism. *Plant J.* doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03560.x

**White, J.A. and Benning, C.** (2001) Genomic approaches towards the engineering of oil seeds. *Plant Physiol. Biochem.* **39**, 263-270.

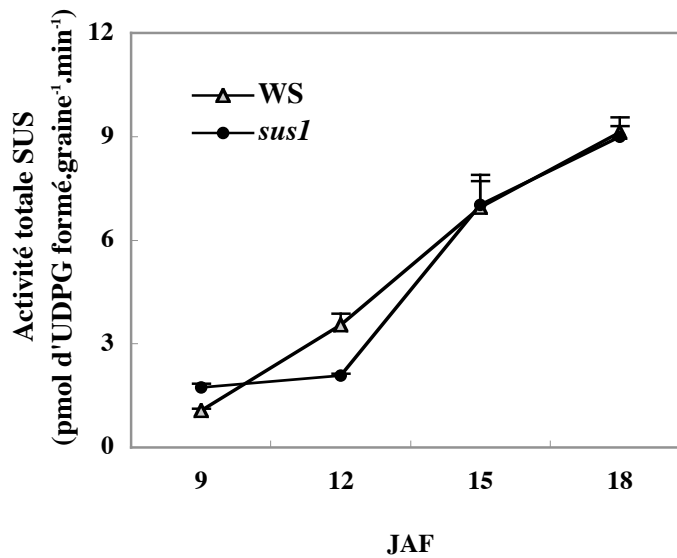
**Zeng, Y., Wu, Y., Avigne, W.T. and Koch, K.E.** (1998) Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional responses. *Plant Physiol.* **116**, 1573-1583.

**Zhang, W.-H., Zhou, Y., Dibley, K., Tyerman, S., Furbank, R.T. and Patrick, J.W.** (2007) Nutrient loading of developing seeds. *Functional Plant Biol.* **34**, 314-331.

**Zrenner, R., Salanoubat, M., Willmitzer, L. and Sonnewald, U.** (1995) Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* **7**, 97-107.



**Figure 4.6.** Effet de la mutation *sus1* sur la masse de matière sèche de la graine d'Arabidopsis au cours du développement pour l'écotype sauvage (Ws) et le mutant (*sus1*). Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  ES de neuf mesures.



**Figure 4.7.** Effet de la mutation *sus1* sur l'activité totale SUS de la graine d'Arabidopsis au cours du développement pour l'écotype sauvage (Ws) et le mutant (*sus1*). Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  ES de trois répétitions techniques.

### **4.3. Le mutant *Atsus1* présente un métabolisme carboné perturbé au cours du développement de la graine**

Le gène *SUS1* (At5g20830) cloné par Martin *et al.* (1993) est exprimé dans différents organes de la plante (Ciereszko et Kleczkowski, 2002 ; Baud *et al.*, 2004 ; Bieniawska *et al.*, 2007). Une analyse transcriptomique (<http://www.genevestigator.ethz.ch/at/>), montre que le gène *AtSUS1* est exprimé différemment pendant le développement de la graine d'Arabidopsis. L'enzyme SUS1 est-elle impliquée dans le métabolisme du saccharose pendant le développement de la graine d'Arabidopsis ? Pour évaluer cette hypothèse nous avons caractérisé le mutant *sus1* en utilisant différentes approches de biochimie incluant l'analyse du profil métabolique dans graine d'Arabidopsis au cours du développement.

#### **4.3.1. Résultats**

##### **4.3.1.1. Isolement et caractérisation moléculaire du mutant *sus1***

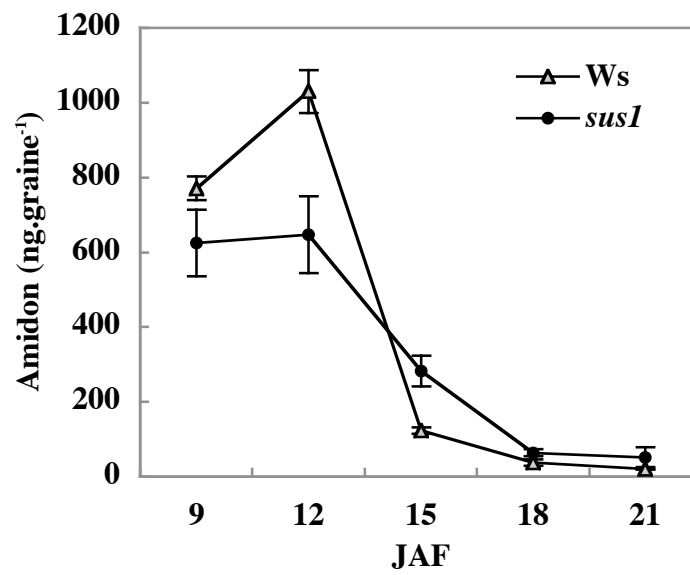
Pour examiner le rôle de l'isoforme SUS1 dans le développement de la graine, nous avons obtenu une lignée d'insertion T-DNA dans le gène At5g20830. Nous avons sélectionné un allèle nul et nous l'avons employé dans les analyses suivantes. Le mutant *sus1* (DRL 61) est dans le fond génétique Ws. En utilisant l'ADN génomique de plantes *sus1* nous avons amplifié par PCR les bordures flanquantes gauches et droites du T-DNA. Les séquences obtenues confirment la FST trouvée dans la base de données de FLAGdb/FST (<http://genoplante-info.infobiogen.fr>).

##### **4.3.1.2. Développement de la graine**

L'évolution de la masse de matière sèche de la graine présente une augmentation rapide entre la morphogénèse et la phase de mi-maturation. Une diminution de 15% à 30% est observée chez le mutant *sus1* entre 12 et 18 JAF par rapport au sauvage (Figure 4.6). Cependant aucune différence sensible dans la masse des graines matures (25µg) n'a été détectée entre le mutant (*sus1*) et le sauvage (Ws).

##### **4.3.1.3. Activité saccharose synthase**

Afin d'évaluer l'importance de l'isoforme SUS1 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'allèle nul (*sus1*) et l'écotype sauvage (Ws). L'activité totale SUS est diminuée de 40% au début de maturation (12 JAF) dans le mutant



**Figure 4.8.** Effet de la mutation *sus* sur la synthèse d'amidon au cours du développement de la graine d'Arabidopsis pour l'écotype sauvage (Ws) et le mutant (*sus1*). Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  ES de trois répétitions techniques.



par rapport au sauvage. Cependant, aucune différence significative n'a été détectée en dehors de cette période (Figure 4.7).

#### **4.3.1.4. Évolution de l'accumulation en hydrates de carbone pendant le développement de la graine**

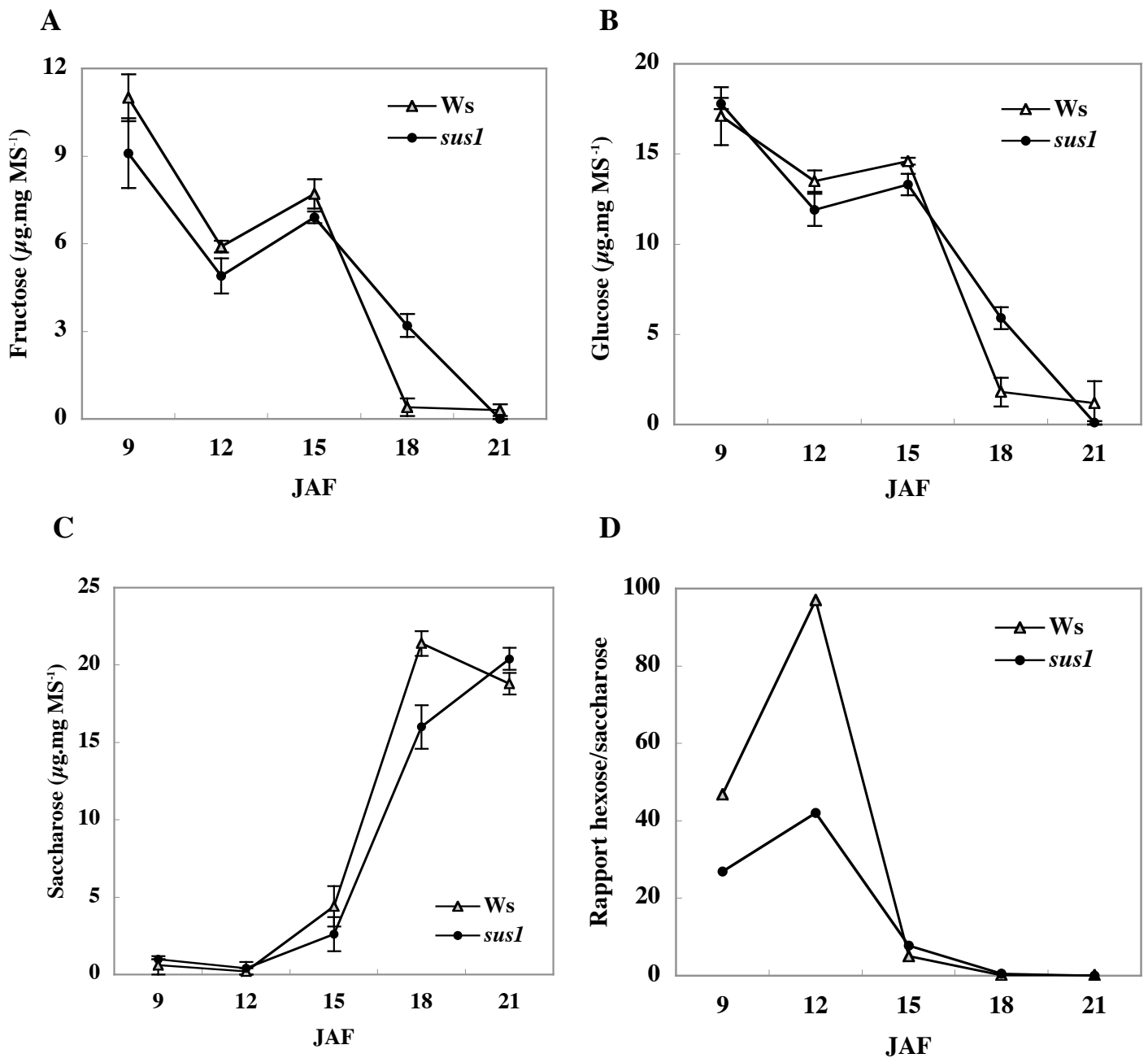
Afin de déterminer si la mutation de *SUS1* avait un impact sur la teneur en hydrates de carbone dans la graine au cours du développement, la quantité de sucres a été mesurée en utilisant des graines lyophilisées en développement. La quantité d'amidon chez le mutant *sus1* est diminuée de 40% par rapport au sauvage à 12 JAF, en revanche une augmentation de 2.5-fois par rapport au sauvage est observée à 15 JAF (Figure 4.8).

Le profil des hexoses (fructose et glucose) dans ce mutant est affecté pendant la phase de maturation tardive (18 JAF). La teneur en fructose est augmentée d'un facteur 8 par rapport au sauvage. Pour la même période, la teneur en glucose est augmentée d'un facteur 3 (Figure 4.9A-B). En revanche une diminution de 25% en saccharose est détectée à 18 JAF pour ce mutant (Figure 4.9C).

Le rapport des hexoses/saccharose dans le mutant *sus1* est fortement diminué de 40% à 9 JAF et de 60% à 12 JAF (Figure 4.9D).

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

Le profil d'accumulation des acides gras totaux dans le mutant *sus1* est perturbé au début de la phase de maturation (12 JAF). Pendant cette période, la concentration en acides gras est en baisse de 25% par rapport au sauvage, cependant hors de cette période, aucune différence significative n'a été détectée (Figure 4.10A). Le mutant présente également une moindre accumulation d'acides gras à très longues chaînes avec une baisse du ratio (VLCFA)/C16-C18) à 9 et 12 JAF, présentant une diminution de 60% et de 20% respectivement (Figure 4.10B). Les profils sont ensuite similaires.



**Figure 4.9.** Effet de la mutation *sus* sur la synthèse des hydrates de carbone au cours du développement de la graine d'Arabidopsis pour l'écotype sauvage (Ws) et le mutant (*sus1*).

(A) Teneur en fructose (B) Teneur en glucose (C) Teneur en saccharose (D) Rapport hexoses/saccharose. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  ES de trois répétitions techniques.

#### 4.3.1.6. Synthèse de protéines totales pendant le développement de la graine

Aucune différence significative dans la teneur en protéines totales dans les graines *susI* n'a été détectée pendant le développement de la graine par rapport au sauvage (Figure 4.11).

#### 4.3.1.7. Profil métabolique durant le développement de la graine

Afin de déterminer si la mutation de *SUSI* avait un impact sur l'abondance des acides aminés et sur les intermédiaires du cycle TCA dans la graine au cours du développement, nous avons mis en place une analyse du profil métabolique par GC/TOF-MS (« *gas chromatography-time of flight mass spectrometry* »), en utilisant des graines isolées de siliques au cours du développement.

La comparaison de l'abondance d'intermédiaires du cycle TCA (succinate, fumarate, malate et citrate) entre l'écotype sauvage (Ws) et le mutant (*susI*) a mis en évidence, que l'abondance de certains de ces intermédiaires chez le mutant est diminuée durant le développement de la graine. Ainsi, une diminution de 85% en fumarate a été observée de 9 à 15 JAF, de 40% à 12 JAF et de 65% à 15 JAF en malate et enfin de 25% à 12 JAF et de 40% à 15 JAF en citrate (Table 4.4).

L'abondance d'acides aminés libres chez le mutant *susI* est modifiée au cours du développement de la graine par rapport au sauvage. Les acides aminés détectés par l'analyse GC/TOF-MS sont : alanine, aspartate, glycine, glutamate, glutamine, isoleucine, leucine, proline, sérine, thréonine, valine et Gaba ( $\gamma$ -acide aminé butyrique).

Des diminutions de 50 à 70% ont été détectées pour le glutamate, la thréonine et la proline à 9 JAF, alors que pour la même période des augmentations de 1.5-fois à 2.0-fois ont été détectées pour la leucine et l'isoleucine (Table 4.4).

À 12 JAF des augmentations importantes, de 2.0-fois à 4.5-fois ont été détectées pour le glutamate, l'aspartate, la proline, la leucine, la valine, l'isoleucine, et la glutamine (Table 4.4).

À 15 JAF, des augmentations, de 1.5-fois à 8.0-fois ont été observées pour la glutamine, l'isoleucine, la leucine, la proline et la valine (Table 4.4).

#### 4.3.2. Discussion

Dans la plupart des plantes, une partie du carbone organique produit par la photosynthèse est affecté à la synthèse du saccharose, qui est transporté vers les organes puits (Martin *et al.*,

Acide aminé	9 JAF		12 JAF		15 JAF	
	Ws	<i>sus1</i>	Ws	<i>sus1</i>	Ws	<i>sus1</i>
Alanine	54.0 ± 8.0	76.8 ± 1.4	112.9 ± 4.8	122.7 ± 15	175.9 ± 18.9	153.7 ± 5.7
Aspartate	28.4 ± 1.0	20.2 ± 3.5	<b>19.4 ± 3.0</b>	<b>38.0 ± 2.9</b>	6.8 ± 1.3	3.6 ± 0.2
Glycine	72.9 ± 3.5	62.1 ± 6.8	8.6 ± 2.0	34.4 ± 16.5	10.0 ± 1.7	15.5 ± 8.1
Glutamate	<b>56.6 ± 2.0</b>	<b>28.0 ± 0.2</b>	<b>26.6 ± 5.2</b>	<b>57.6 ± 5.5</b>	12.8 ± 1.9	9.0 ± 0.0
Glutamine	19.1 ± 2.2	32.0 ± 4.3	<b>12.1 ± 1.8</b>	<b>53.7 ± 6.0</b>	<b>18.4 ± 0.5</b>	<b>29.3 ± 0.0</b>
Isoleucine	<b>3.8 ± 0.4</b>	<b>8.2 ± 0.5</b>	<b>8.3 ± 0.5</b>	<b>28.2 ± 6.7</b>	<b>11.5 ± 1.7</b>	<b>92.35 ± 10.5</b>
Leucine	<b>6.4 ± 1.1</b>	<b>10.2 ± 0.4</b>	<b>8.1 ± 0.8</b>	<b>22.0 ± 3.2</b>	<b>11.9 ± 0.2</b>	<b>52.2 ± 2.9</b>
Proline	<b>13.0 ± 2.9</b>	<b>4.1 ± 0.7</b>	<b>7.0 ± 0.8</b>	<b>14.1 ± 1.5</b>	<b>13.1 ± 2.3</b>	<b>34.3 ± 0.5</b>
Serine	40.8 ± 2.9	27.2 ± 4.0	33.3 ± 1.8	35.5 ± 7.1	14.7 ± 1.5	10.5 ± 2.7
Threonine	<b>17.1 ± 0.8</b>	<b>8.0 ± 1.0</b>	21.3 ± 1.3	8.2 ± 0.0	15.8 ± 0.4	7.2 ± 0.9
Valine	16.7 ± 0.0	29.7 ± 4.5	<b>33.0 ± 2.3</b>	<b>78.3 ± 1.8</b>	<b>46.7 ± 0.8</b>	<b>139.1 ± 29.6</b>
Gaba	4.9 ± 1.2	3.5 ± 1.0	0.5 ± 0.0	2.4 ± 0.8	0.2 ± 0.1	-

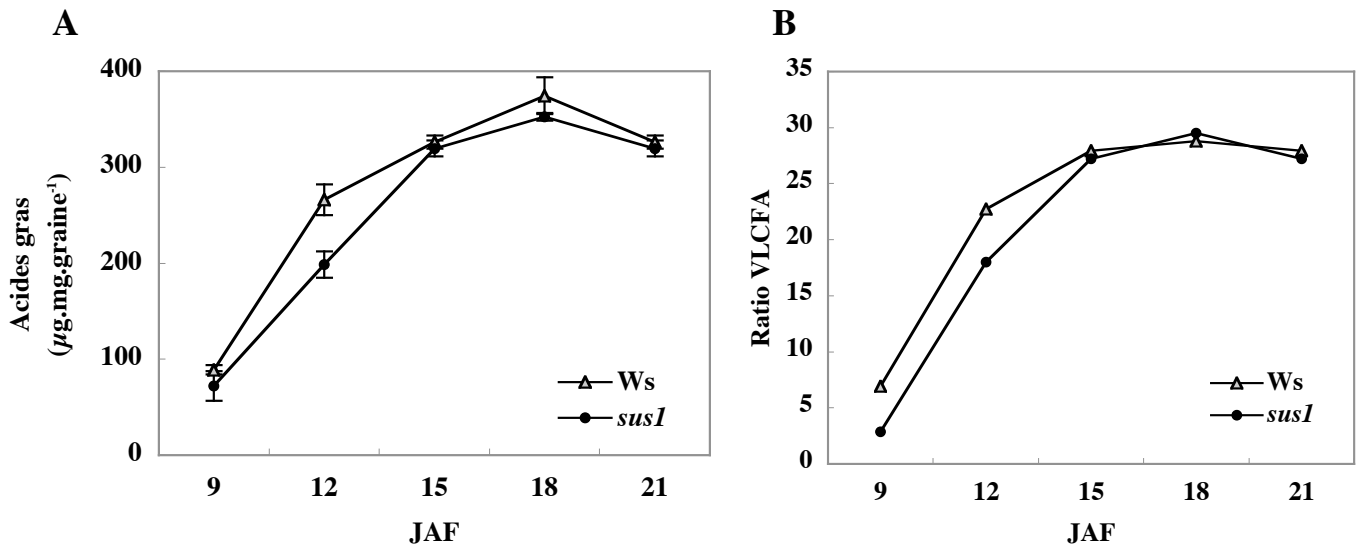
TCA métabolites	9 JAF		12 JAF		15 JAF	
	Ws	<i>sus1</i>	Ws	<i>sus1</i>	Ws	<i>sus1</i>
succinate	15.4 ± 1.3	10.8 ± 0.2	13.0 ± 4.4	16.6 ± 2.5	15.0 ± 3.2	9.5 ± 0.2
fumarate	<b>77.9 ± 21.0</b>	<b>9.7 ± 1.1</b>	<b>104.7 ± 4.4</b>	<b>15.0 ± 2.2</b>	<b>141.5 ± 12.9</b>	<b>18.3 ± 3.1</b>
malate	369.1 ± 14.5	339.1 ± 3.7	<b>626.08 ± 37.9</b>	<b>381.4 ± 33.4</b>	<b>483.9 ± 23.9</b>	<b>158.2 ± 4.8</b>
citrate	130.1 ± 9.2	168.8 ± 2.1	<b>636.9 ± 22.1</b>	<b>478.0 ± 10.1</b>	<b>911.3 ± 18.4</b>	<b>535.3 ± 3.8</b>

**Table 4.4.** Niveaux normalisés d'acides aminés et de métabolites du cycle TCA dans la graine d'*Arabidopsis* au cours du développement pour l'écotype sauvage (Ws) et le mutant (*sus1*) de 9-15 JAF. Les valeurs représentent la moyenne ± ES de trois mesures: Gaba :  $\gamma$ -amino-butyric acid ; - : non détecté.

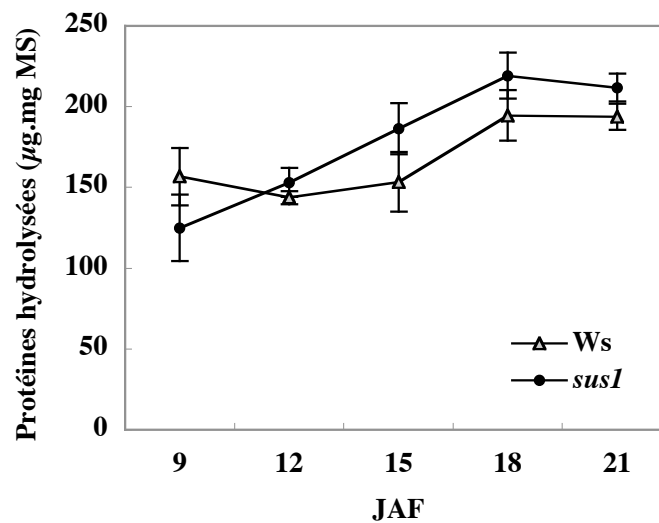
1993). Dans ces organes puits, le saccharose peut être utilisé comme source de squelette carboné pour la synthèse des éléments structuraux, comme carburant métabolique ou peut s'accumuler et être stocké à des concentrations élevées. Le clivage du saccharose est essentiel pour les plantes, non seulement pour l'approvisionnement en sources carbonées, mais également pour le déclenchement des signaux sucre à partir des hexoses dans les structures en formation. Seules l'invertase et la saccharose synthase catalysent le clivage du saccharose dans les voies métaboliques connues *in vivo* (Koch, 2004). Dans le papier 3, le rôle des isoformes SUS2 et SUS3 a été discuté, et nous présentons ici l'implication de l'isoforme SUS1 dans le métabolisme du saccharose, durant le développement de la graine d'*Arabidopsis*, par l'analyse d'un mutant *sus1*. Dans le mutant *sus1*, l'activité totale SUS est affectée principalement au début de la maturation (Figure 4.6). Cette activité SUS perturbée est accompagnée de modifications importantes dans le métabolisme carboné pendant le développement de la graine.

#### **4.3.2.1. La diminution de la quantité d'amidon chez le mutant *sus1* est corrélée avec la diminution d'activité totale SUS pendant la maturation**

Dans les graines d'*Arabidopsis*, l'amidon est accumulé transitoirement pendant la première moitié du développement puis est rapidement dégradé durant la phase tardive du développement (Papier 3 ; Baud *et al.*, 2002 ; Fait *et al.*, 2006). Chez le colza, il a été proposé que l'accumulation d'amidon pouvait renforcer le statut de la graine comme organe-puits principal avant la synthèse des composés de stockage (huile) et qu'il pourrait réguler l'allocation de nutriments entre les différents tissus de la graine pendant le développement (daSilva *et al.*, 1997). Dans cette étude, nous avons observé que la diminution de la quantité d'amidon observée au début de la maturation (12 JAF) chez le mutant *sus1* est corrélée avec la diminution de l'activité de SUS. Ce résultat suggère que la saccharose synthase pourrait être impliquée dans la diminution de la quantité d'amidon. Cette hypothèse est cohérente avec la co-localisation de SUS avec des grains d'amidon observés dans la graine d'*Arabidopsis* (Fallahi *et al.*, 2008 ; Angeles-Nuñez *et al.*, 2008) ainsi qu'à la corrélation entre la diminution de l'activité totale SUS et la diminution de la quantité d'amidon reportée dans le papier 3 de ce manuscrit. À mi-maturation (15 JAF), nous avons observé que la dégradation de l'amidon est moins rapide par rapport au sauvage (Figure 4.8). Ce résultat suggère qu'à cette période (15 JAF) le mutant *sus1* peut accomplir la synthèse de produits de réserve (lipides, protéines), sans cette réserve d'amidon. Cette idée est cohérente avec les résultats obtenus pour cette période où le mutant ne présente pas de différences en lipides, et protéines de réserves



**Figure 4.10.** Effet de la mutation *sus* sur la synthèse des acides gras au cours du développement de la graine d'Arabidopsis pour l'écotype sauvage (Ws) et le mutant (*susI*).  
**(A)** Concentration d'acides gras totaux **(B)** Ratio VLCFA. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  ES de trois répétitions techniques.



**Figure 4.11.** Effet de la mutation *sus* sur la synthèse des protéines au cours du développement de la graine d'Arabidopsis pour l'écotype sauvage (Ws) et le mutant (*susI*). Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  ES de trois répétitions techniques.

(Figure 4.10A et 4.11). Cet amidon sera dégradé plus tard pour fournir les squelettes de carbone issus de sa dégradation dans la maturation tardive de la graine, par exemple dans la synthèse du saccharose. Cette idée est cohérente avec l'hypothèse que la biosynthèse du saccharose et des oligosaccharides dérive de la dégradation d'amidon à partir d'une accumulation transitoire d'hexose (Yazdi-Samadi *et al.*, 1977 ; Leprince *et al.*, 1990).

#### **4.3.2.2. Le changement de l'activité totale de SUS observé dans le mutant *sus1* mène à la modification du rapport hexoses/saccharose dans les graines d'*Arabidopsis* au cours du développement**

Dans les plantes supérieures, le métabolisme du saccharose est essentiel pour le contrôle du développement de la graine, principalement pour la régulation des relations source-puits (Herbers et Sonnewald, 1998 ; Blanc *et al.*, 2001). Chez *Vicia faba*, la phase de la division cellulaire est caractérisée pour un haut rapport des hexoses/saccharose (Weber *et al.*, 1997). Dans la graine, la transition de la phase de pré-stockage à la phase de maturation (stockage), quand l'élongation et la différenciation cellulaire se produisent, est caractérisée par une inversion dans le rapport hexoses/saccharose (Baud *et al.*, 2002 ; Fait *et al.*, 2006). Dans ce travail, nous avons montré que la diminution de l'activité totale SUS observée au début de la maturation (Figure 4.7) mène à la diminution de la concentration du saccharose (Figure 4.9C), et à l'augmentation de la concentration du fructose et du glucose (Figure 4.9A-B) ayant pour résultat un rapport inférieur d'hexoses/saccharose particulièrement au début de la maturation (12 DAF) (Figure 4.9D). Le saccharose est le glucide soluble le plus abondant dans la graine sèche pour un éventail d'accessions d'*Arabidopsis thaliana* (Bentsink *et al.*, 2000). Son accumulation commence au début de la maturation et finit simultanément avec la synthèse de produits de stockage (Baud *et al.*, 2002 ; Fait *et al.*, 2006). Nous avons montré ici que la diminution du saccharose observée à 18 JAF dans le mutant *sus1* est concomitante avec l'accumulation transitoire des hexoses (Figure 4.9A-C), suggérant que l'accumulation des hexoses est utilisée comme source de carbone dans des processus impliqués durant la phase de maturation tardive de la graine. Cette idée est cohérente avec la dégradation du glucose durant la phase de dessiccation (Norton *et al.*, 1975 ; Yazdi-Samadi *et al.*, 1977).

#### **4.3.2.3. La diminution de l'activité totale de SUS dans le mutant *sus1* mène à la diminution de la concentration en lipides au cours du développement de la graine**

La biosynthèse d'acides gras et d'amidon dépend de la même source de carbone : le saccharose provenant de la plante-mère. L'interaction biochimique entre ces deux voies

métaboliques n'est pas bien connue (Lin *et al.*, 2006). Dans ce travail, nous avons montré que le mutant *sus1* est affecté dans la voie de biosynthèse de lipides au début de la maturation (12 JAF) ; ceci pourrait être corrélé avec la diminution de l'activité totale de SUS à ce même stade. Ce résultat suggère que la diminution de l'activité totale de SUS dans cette période conduit à la diminution en squelettes carbonés disponibles pour la voie de biosynthèse de lipides. Cette hypothèse est cohérente avec la co-localisation de la protéine SUS2 avec les membranes des plastes pendant la phase de maturation. À ce niveau SUS2 pourrait jouer un rôle dans l'acheminement des produits du métabolisme du saccharose vers le G-6-P ou PEP (Angeles-Nuñez *et al.*, 2008), composés carbonés qui entrent dans les plastes pour être utilisés comme squelettes carbonés dans différents processus de biosynthèse (Fox *et al.*, 2000 ; Rolletschek *et al.*, 2007 ; Baud *et al.*, 2007).

#### **4.3.2.4. La diminution de l'activité totale SUS dans le mutant *sus1* mène à la perturbation de l'abondance en acides organiques**

Le cycle TCA est connecté au métabolisme des acides aminés (Fait *et al.*, 2006 ; Lin *et al.*, 2006 ; Weigelt *et al.*, 2008). L'étude métabolique a montré une abondance en acides organiques perturbée au cours du développement de la graine chez le mutant *sus1*.

Dans ce travail, nous avons montré que l'abondance des intermédiaires du cycle TCA est perturbée chez le mutant *sus1* par rapport au sauvage. Une diminution importante en citrate et malate a été détectée pendant la phase de la maturation, cette diminution est corrélée avec la diminution de l'activité totale SUS mesurée pour la même période ainsi qu'à l'augmentation des acides aminés pendant la phase de la maturation. Ce résultat suggère une diminution du flux de carbone dans le cycle TCA pendant cette période, probablement comme conséquence de la diminution de l'activité totale SUS mesurée pour la même période.

Durant le développement de la graine, l'abondance en acides aminés chez le mutant *sus1* est plus importante que chez le sauvage, elle est corrélée avec la diminution des intermédiaires du cycle TCA. Ce résultat est cohérent avec l'échange de flux constant entre l'accumulation des acides aminés et intermédiaires du cycle TCA (Lin *et al.*, 2006). L'accumulation des acides aminés observée chez le mutant *sus1* suggère que la graine de ce mutant accumule des acides aminés qui seront utilisés dans le processus de la maturation tardive.



# **5.**

## **DISCUSSION GÉNÉRALE**

L'étude de trois gènes de saccharose synthase (*SUS1* (At5g20830), *SUS2* (At5g49190) et *SUS3* (At4g02280)) au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis thaliana*, a permis de tester l'implication de ces gènes dans le métabolisme carboné de la graine. Pour ce travail de thèse, des approches de cytologie, physiologie, de biochimie, de métabolomique, et de biologie moléculaire ont été mises en oeuvre.

### 5.1. Étude de la protéine AtSUS2

Notre étude sur la protéine SUS2 a permis de contribuer à la connaissance de l'accumulation et de la localisation de cette protéine au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis thaliana*. AtSUS2 est fortement et spécifiquement accumulée pendant la phase de la maturation, correspondant à la période de synthèse des produits de réserve notamment protéines et lipides (ce travail de thèse ; Baud *et al.*, 2002 ; Fait *et al.*, 2006). L'accumulation de cette protéine est corrélée avec l'accumulation des niveaux de transcrits observés pour le gène *AtSUS2* dans la graine (ce travail de thèse ; Baud *et al.*, 2004 ; Bieniawska *et al.*, 2007) ainsi qu'avec le pic d'activité totale de SUS observé à mi-maturation. Ces résultats nous ont amenés à nous questionner sur l'implication de cette isoforme dans la phase de maturation. L'étude de la localisation subcellulaire de la protéine a donné des éléments importants concernant les rôles possibles de cette isoforme dans le développement de la graine. Nous avons confirmé la spécificité de la localisation de cette protéine dans la graine ; localisée dans le tégument, l'albumen et l'embryon, il semble que cette isoforme peut être impliquée dans différents aspects du métabolisme de la graine. Cette hypothèse est cohérente avec son association aux membranes des plastes durant la phase de maturation. Les plastes, dans la graine, importent des assimilats qui seront plus tard convertis en composés de stockage (amidon) et intermédiaires métaboliques (acides aminés, acyl-CoA, sucres, composés secondaires) puis exportés vers d'autres compartiments cellulaires pour la biosynthèse de produits de réserves comme par exemple les triacylglycérides de la graine d'*Arabidopsis*. Ce résultat est compatible avec l'hypothèse que l'association de la protéine SUS2 avec les plastes pourrait jouer un rôle dans l'accroissement des concentrations en G-6-P ou PEP, deux composés carbonés qui entrent dans les plastes (Fox *et al.*, 2000 ; Rolletschek *et al.*, 2007 ; Baud *et al.*, 2007), sont issus du métabolisme du saccharose et qui permettent les synthèses de l'amidon ou des lipides. La protéine SUS2 est aussi présente dans la couche de l'endothélium autour des vacuoles contenant des tannins (Debeaujon *et al.*, 2003). Nous avons suggéré un rôle de SUS2 dans la biosynthèse des tannins en tant que fournisseur de carbone. D'ailleurs,

beaucoup de gènes impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes sont connus pour être régulés par le saccharose (Solfanelli *et al.*, 2006).

SUS2 a été également associée aux téguments externes, qui incluent les cellules qui synthétisent le mucilage de polysaccharides, ce qui est en agrément avec la présence des grains d'amidon et des plastes (Macquet *et al.*, 2007). Toutes ces données suggèrent que l'isoforme SUS2 peut être impliquée dans le métabolisme carboné de la graine au cours du développement. Cette idée est cohérente avec l'implication des AtSUS dans la biosynthèse d'amidon suggérée par Fallahi *et al.* (2008).

L'ensemble des résultats obtenus par notre étude et celle de Fallahi *et al.* (2008) est en accord avec les fonctions attribuées pour les saccharose synthases dans d'autres espèces (Chourey et Nelson, 1976 ; Zrenner *et al.*, 1995 ; Déjardin *et al.*, 1997 ; Chourey *et al.*, 1998 ; Craig *et al.*, 1999 ; Ruan *et al.*, 2003). Cependant, le travail sur les simples et doubles mutants des saccharose synthases chez *Arabidopsis* dans la graine mature, reporté par Bieniawska *et al.* (2007) a montré que les graines sèches d'*Arabidopsis* ne sont pas affectées en l'absence d'une et même de deux isoformes. Les auteurs suggèrent que les protéines SUS n'ont pas un rôle fondamental dans le remplissage de la graine mature. Par contre, le fait que les mutants *sus*, ne montrent aucun phénotype à la fin du développement n'exclut pas que ces isoformes soient impliquées dans différents processus au cours du développement tel qu'il a été suggéré par Angeles-Nuñez *et al.* (2008) ainsi que par Fallahi *et al.* (2008). Pour approfondir, les connaissances sur les saccharose synthases chez *Arabidopsis thaliana*, nous avons mis en oeuvre une étude sur l'expression et la régulation des deux gènes (*AtSUS2* et *AtSUS3*) fortement exprimés durant la phase de maturation de la graine. Les connaissances acquises par cette étude sont récapitulées et discutées dans le prochain paragraphe.

## **5.2. Régulation de l'expression des gènes *AtSUS***

### **5.2.1. Analyse fonctionnelle du promoteur *AtSUS2***

L'analyse fonctionnelle du promoteur a permis d'identifier une zone potentiellement importante pour la fonctionnalité du promoteur (-1323 à -1049 par rapport à l'ATG). Dans cette région, nous avons répertorié deux boîtes de régulation potentiellement importantes pour l'expression du promoteur, cependant des analyses de mutagenèse dirigée seront nécessaires pour déterminer leur véritable importance dans la fonctionnalité du promoteur *AtSUS2*.

### 5.2.2. Régulation de l'expression de *SUS2* par des solutions sucrées

Dans cette étude, nous avons montré que l'activité du promoteur *SUS2* est régulée par des solutions sucrées notamment par le glucose. Les hexokinases ne sont pas impliquées dans cette régulation ; ce résultat est cohérent avec d'autres études qui montrent que l'expression des gènes de la saccharose synthase est différentiellement affectée par les sucres, (Salanoubat et Belliard, 1989 ; Koch *et al.*, 1992 ; Fu *et al.*, 1995 ; Godt *et al.*, 1995 ; Huang *et al.*, 1996 ; Komatsu *et al.*, 2002 ; Liao et Wang, 2003). Nous avons donc suggéré que le glucose, joue un rôle comme molécule signal dans la régulation de l'expression de la fusion *ProSUS2 :uidA in planta*.

### 5.2.3. Régulation de l'expression de *SUS2* et *SUS3* par trois facteurs de la transcription

Afin de mieux comprendre l'implication de *SUS2* et *SUS3* dans le développement de la graine d'*Arabidopsis*, nous avons étudié leurs expressions au cours du développement ainsi que leurs régulations durant la phase de maturation de la graine. Cette étude nous a permis de montrer le profil d'expression de ces gènes. Ces deux gènes suivent un profil parallèle, avec un clair décalage de leur expression maximale. *SUS2* montre un pic d'expression à mi-maturation alors que *SUS3* est induit durant la maturation tardive (C.f. *Pro<sub>SUS2</sub> :uidA* ; *Pro<sub>SUS3</sub> :uidA*). L'activité d'expression de ces gènes, est corrélée avec l'activité totale SUS. Ces résultats montrent clairement que ces deux gènes sont exprimés fortement pendant la phase de maturation de la graine, évoquant une fois de plus la question de leurs rôles dans la graine pendant la phase de maturation. Afin d'avoir plus d'éléments sur la fonction de ces gènes, nous avons mis en oeuvre une étude sur leur régulation par trois facteurs de la maturation (LEC2, FUS3 et ABI3). Pour accomplir cette étude, nous avons analysé l'expression de *SUS2* et *SUS3* dans les fonds mutants *lec2-4*; *fus3-4* et *abi3*. Les résultats obtenus dans cette analyse montrent clairement, que l'expression de *SUS2* et *SUS3* est fortement régulée par ces facteurs de transcription durant la phase de la maturation. La question était alors de savoir de quelle façon, les gènes *SUS2* et *SUS3* sont régulés par ces facteurs de transcription. En utilisant, une fusion chimérique de LEC2 avec un récepteur glucocorticoïde (GR) de rat, Santos-Mendoza *et al.* (2005) ont reporté l'accumulation de transcrits *SUS2* dans les feuilles, évoquant la possibilité que *SUS2* soit une cible de LEC2. Nous avons utilisé ce système et nous avons montré que l'accumulation de transcrits observée par les auteurs n'est pas sous le contrôle direct de LEC2. Pour élucider, si le gène *SUS3* est une cible directe ou indirecte de LEC2, il sera possible d'utiliser ce système. Une diminution de l'activité totale de SUS dans ces fonds mutants (pour des facteurs de transcription) a été observée pendant la phase de maturation ;

elle est corrélée avec des modifications dans l'accumulation de produits de stockage pour la même période. Ces résultats suggèrent que la diminution de l'activité totale de la saccharose synthase conduit à la diminution des squelettes de carbone disponibles pour la biosynthèse de produits de réserves. Cette hypothèse est cohérente avec le rôle suggéré pour *SUS2* dans l'acheminement des composés carbonés vers les plastes (Angeles-Nuñez *et al.*, 2008) ainsi qu'avec la co-localisation des protéines *SUS* avec les grains d'amidon (Fallahi *et al.*, 2008). Cependant pour estimer l'importance de ces gènes de la saccharose synthase dans le métabolisme carboné au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis*, une étude fonctionnelle sur des mutants pour ces gènes sont nécessaires. Donc, pour aller plus loin dans l'étude des gènes de saccharose synthase chez la graine d'*Arabidopsis*, nous avons fait une analyse fonctionnelle complète sur des allèles nuls (*sus1*, *sus2*, *sus3*). La description et l'interprétation des résultats obtenus dans cette analyse sont présentées dans le prochain paragraphe.

### 5.3. Analyse fonctionnelle de *SUS1*, *SUS2* et *SUS3*

Comme il a été évoqué dans les deux premières parties de cette discussion générale, les saccharose synthases de la graine d'*Arabidopsis*, semblent être impliquées dans le métabolisme carboné, pendant la phase de maturation de la graine. Pour tester cette hypothèse nous avons étudié le profil métabolique des différents allèles nuls, au cours du développement de la graine. Premièrement, nous avons effectué une caractérisation biochimique, qui a dévoilé d'importants phénotypes métaboliques durant le développement de la graine, qui étaient corrélés avec la diminution de l'activité totale de *SUS*. Les mutants *sus2* et *sus3* présentent un profil métabolique semblable : ils sont affectés dans l'accumulation de l'amidon contrairement à *sus1*, qui ne présente aucune modification. Ce résultat d'une part confirme l'implication de *SUS2* et *SUS3* dans la biosynthèse de l'amidon, et d'autre part montre que les gènes de la saccharose synthase ont diverses fonctions. L'accumulation du saccharose dans les mutants *sus2* évoque l'importance du gène *SUS2* dans la régulation de la biosynthèse du saccharose. La question est de savoir comment et pourquoi les mutants *sus2* accumulent du saccharose. Nous avons suggéré que cette accumulation de saccharose était utilisée par la graine mutante *sus2* comme source de carbone lors de processus tardifs tel que la germination, cette idée étant cohérente avec le rôle du saccharose suggéré par Baud *et al.* (2002) comme une source d'énergie rapidement disponible pendant la germination. Cependant le profil d'accumulation de saccharose observé dans les mutants *sus3*, montre que la graine mutante *sus3* utilise le saccharose accumulé pendant le développement pour arriver à des teneurs

comparables au type sauvage à fin maturation. Pour ces mutants, nous avons suggéré que l'accumulation du saccharose, observée de la morphogenèse de l'embryon jusqu'à la maturation tardive, est utilisée comme squelette de carbone pour finir le remplissage de la graine, ceci étant cohérent avec le rattrapage observé dans les produits de réserves.

Deuxièmement, une analyse du profil métabolique a été réalisée en utilisant la méthode GC/TOF-MS pour comparer l'abondance en acides organiques de la graine sauvage et des graines mutantes. Cette analyse a montré des différences importantes dans l'abondance relative des intermédiaires du cycle TCA et des acides aminés ; ces différences semblent corrélées avec la diminution de l'activité totale de SUS. Dans les mutants *sus2*, la diminution des acides aminés est corrélée avec l'augmentation des contenus de produits de réserves (protéines et acides gras). Ce résultat suggère que les acides aminés chez la graine mutante ont été dirigés vers la synthèse de protéines et de lipides, cette idée étant cohérente avec le rôle de certains acides aminés dans ces voies de biosynthèses (White *et al.*, 2000 ; Ruuska *et al.*, 2002 ; Fait *et al.*, 2006). Par contre, la diminution en acides aminés observée chez la graine du mutant *sus3* n'est pas corrélée à des variations du contenu de ces produits de stockages ; les acides aminés sont donc probablement utilisés dans d'autres processus de la maturation tardive. Contrairement à ces deux mutants, la graine *sus1* accumule des quantités importantes en acides aminés. La question est de savoir comment et pourquoi le mutant *sus1* accumule des acides aminés. Nous avons suggéré que les acides aminés accumulés par la graine *sus1* sont utilisés comme précurseurs des processus métaboliques tardifs de la graine, cette idée étant cohérente avec le rôle des acides aminés dans la graine en fin de maturation (Baud *et al.*, 2002 ; Fait *et al.*, 2006).

En conclusion, l'ensemble des données obtenues dans ce travail de thèse montre que les saccharose synthases d'*Arabidopsis thaliana* sont impliquées dans le métabolisme carboné pendant le développement de la graine. Cependant, les graines matures des mutants analysés dans ce travail ne présentent pas de différences significatives dans leur remplissage en fin de maturation par rapport à leur sauvage respectif (sauf pour les graines du mutant *sus2* qui accumulent d'importantes quantités de saccharose). Ces conclusions sont cohérentes avec les résultats obtenus par Bieniawska *et al.* (2007). Nos résultats montrent cependant que cette famille de saccharose synthases présente un mode d'action complexe, avec des fonctions spécifiques mais aussi avec des fonctions partagées qui font que la graine arrive à la fin de la maturation avec un remplissage complet. Cette conclusion est cohérente avec les résultats obtenus sur les double mutants reportés par Bieniawska *et al.* (2007). De ce fait, la question

suivante se pose : l'absence de trois gènes de saccharose synthase, peut-elle affecter le remplissage de la graine mature ? Cette question, amène aux perspectives décrites dans le prochain paragraphe.

#### 5.4. Perspectives

Les perspectives de travail immédiates liées à cette étude sont multiples et variées ; elles correspondent aux divers points demandant confirmation, aux différents aspects restant à élucider comme la taille du promoteur minimal fonctionnel d'*AtSUS2*. L'analyse de la zone putative, détectée entre -1323 pb et -1049 pb par rapport à l'ATG, est nécessaire pour aller plus loin sur les connaissances des boîtes de régulation que contrôlent l'expression du gène. De ce fait, une analyse de mutagenèse dirigée permettra de mettre en lumière : la taille minimale fonctionnelle du promoteur ainsi que l'effet des différentes boîtes de régulation sur l'expression du gène *in vivo*. Il sera aussi nécessaire de compléter l'analyse *in silico* pour la recherche de boîtes de fixation pour les facteurs de transcription type B3.

La détermination de l'accumulation des niveaux de transcrits de *SUS1*, *SUS2* et *SUS3* en fond mutant *sus1* ou *sus2* ou *sus3*, est une autre perspective immédiate qui peut nous apporter des informations importantes sur l'expression de ces gènes dans les fonds mutants pour des membres de la même famille, établissant les relations d'action entre eux. En plus des résultats présentés et discutés dans ce manuscrit, nous avons observé que l'accumulation de la protéine *SUS2* est modifiée dans le mutant *sus1* et le mutant *sus3* au cours du développement de la graine, donc ce résultat met en évidence que l'absence d'un gène de cette famille multigénique peut modifier l'expression des autres membres.

Les perspectives à plus long terme, sont liées aux aspects du métabolisme carboné tel qu'évoqué dans le chapitre précédent. Jusqu'ici, les différentes études présentées dans ce travail de thèse, montrent clairement l'implication des saccharose synthases étudiées dans le métabolisme carboné pendant la phase de la maturation, sans conséquences sur la masse et la qualité de la graine en fin de maturation. Donc, la question est de savoir, quels sont les mécanismes qui permettent à la graine d'accomplir son remplissage pendant la phase de la maturation tardive. Pour répondre à cette question des études métaboliques fines sur la phase de la maturation tardive sont nécessaires, puisque c'est pendant cette période que la graine déclenche un mécanisme qui permet de terminer son remplissage. La comparaison des profils métaboliques par GC/TOF-MS des graines *sus1*, *sus2* et *sus3*, avec leurs sauvages respectifs





au cours de la maturation tardive (en considérant des graines en fin de développement : de la maturation tardive jusqu'à la graine sèche) permettra d'obtenir un profil métabolique plus complet par rapport à celui que nous avons obtenu dans cette étude. Les résultats ainsi obtenus pourront être analysés en utilisant le logiciel « *MAPMAN* » pour avoir une analyse *in silico* des différents événements métaboliques ainsi qu'enzymatiques déclenchés durant cette période. Cette analyse, pourra nous fournir des éléments importants pour mieux comprendre les mécanismes d'action pendant cette période tardive ainsi que probablement des informations pour diriger des études qui amèneront à une meilleure compréhension des mécanismes qui contrôlent le métabolisme carboné en fin maturation.

Une autre question se pose : l'absence des trois gènes de saccharose synthase (*SUS1*, *SUS2*, *SUS3*) peut-elle affecter le remplissage de la graine mature ? Pour répondre à cette question, une autre perspective à long terme se dessine, qui consiste à étudier les effets de l'absence, des trois gènes des saccharose synthases, dans le métabolisme carboné de la graine d'*Arabidopsis*. De ce fait, l'obtention de triples mutants (par exemple *sus1sus2sus3* pour lesquels nous avons des éléments sur les mutants simples, qui montrent leur implication dans le métabolisme carboné) serait un outil important pour étudier l'expression des autres gènes de saccharose synthases (*SUS4*, *SUS5*, *SUS6*). L'expression des invertases ainsi que le profil métabolique au cours du développement pourront être investigués afin de répertorier les modifications du métabolisme carboné primaire. Les résultats obtenus par ces analyses pourront être comparés avec le profil obtenu dans les simples mutants, cette comparaison permettra d'établir les relations entre les membres de cette famille ainsi que les corrélations qui existent entre l'activité totale SUS dans ces triples mutants et l'accumulation de produits de réserves.



# **6. MATÉRIEL ET MÉTHODES**



## 6.1. MATERIELS

### 6.1.1. MATERIEL VEGETAL

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. écotype Wassilevskija (Ws) constitue le matériel végétal de nos travaux. Il s'agit de l'écotype utilisé pour générer la collection de transformants primaires par insertion d'un ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bechtold *et al.*, 1993).

### 6.1.2. SOUCHES BACTERIENNES

Les souches d'*Escherichia coli* sont mises en culture à 37°C.

*Escherichia coli* souche DH10B.

Génotype : F, *mcrA*,  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ ,  $\phi 80dlacZ\Delta M15$ ,  $\Delta lacX74$ , *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*,  $\Delta(ara, leu)7697$ , *galU*, *galK*,  $\lambda$ , *rpsL*, *nupG* (GibcoBRL).

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* est cultivée à 28°C.

*Agrobacterium tumefaciens*.

La souche C58C1Rif (pmp90) a été utilisée pour la transformation des plantes (Koncz *et al.*, 1984). Cette souche dérive de la souche C58. Elle possède un gène de résistance à la rifampicine et l'ADN de transfert (ADN-T) du plasmide Ti a été remplacé par un gène conférant la résistance à la gentamycine.

### 6.1.3. VECTEURS

Plasmide pB101

Le plasmide pB101 (Ozyme) est un plasmide binaire de 12,2 kb. Il possède une origine de répllication RK2 lui permettant de se maintenir aussi bien dans *E. coli* que dans *Agrobacterium*, ainsi que le gène de résistance à la kanamycine (*NPTII*) et la cassette GUS. Cette cassette n'étant précédée d'aucun promoteur, ce plasmide permet de caractériser des séquences promotrices en insérant celles-ci en 5' de la cassette.

### Plasmide pDONR207

Le pDONR207 (Quiagen) est le vecteur d'entrée utilisé par la technologie Gateway. Il possède des séquences de recombinaison attP1 et attP2 permettant le clonage des produits de PCR amplifiés avec des amorces spécifiques de cette technique. Il possède en outre une origine de répllication issue de pUC19 ainsi que deux séquences de terminaison de la transcription T1 et T2.

### Plasmide pB101 Gateway (Dubreucq et Divol, communication personnelle)

Ce plasmide a été obtenu à partir de pB101 en insérant en amont du gène *GUS* une cassette de contre-sélection « ccdB » spécifique à la technique Gateway. Cette cassette amplifiée dans le plasmide pBS (Stratagène) est bordée par les séquences de recombinaison R1 et R2. Une recombinaison de type LR entre le vecteur d'entrée et ce vecteur de destination permet d'introduire le promoteur étudié en amont du gène *GUS*.

## 6.2. MÉTHODES

### 6.2.1. MANIPULATIONS DU MATERIEL VEGETAL

#### 6.2.1.1. Germination *in vitro*

Les graines sont stérilisées par incubation dans une solution de chlore/éthanol (3,75 mg de chlore actif par ml d'éthanol à 85%) durant 7 min, puis rincées dans 1 ml d'éthanol absolu. Mises à sécher une nuit sous une hotte à flux laminaire, elles sont ensuite semées en conditions stériles sur un milieu MS gélosé (Annexe) préalablement coulé en boîtes de pétri ( $\varnothing = 50$  mm ; Grener), en présence ou non d'un agent de sélection (annexe). Le semis réalisé, les boîtes de pétri sont scellées à l'aide de sparadrap aéré, puis placées à l'obscurité, à 4°C, durant 48 h, afin de lever la dormance résiduelle des lots de graines et de synchroniser la germination. Cette étape de stratification réalisée, les boîtes de Pétri sont transférées dans une chambre de culture *in vitro* dont les conditions d'hygrométrie, de photo-et thermo-périodes sont contrôlées (60 % d'humidité relative ; 16 h de lumière à 20°C / 8 h d'obscurité à 15°C ; intensité lumineuse de 200  $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  au niveau des boîtes). Les jeunes plantules qui se développent sont destinées à être repiquées puis cultivées.

Cas particulier des sélections sur antibiotiques : les graines sont semées à la volée sur un milieu nutritif additionné d'un antibiotique (kanamycine, hygromycine, rifampycine). Environ une semaine après germination, les individus sensibles présentent des cotylédons blanchâtres

et le développement de leur racine est bloqué. Les individus résistants se développent classiquement et sont aisément repérables grâce à la couleur verte de leurs cotylédons, la présence de feuilles et d'un appareil racinaire.

#### 6.2.1.2. Culture en chambre de culture et suivi des plantes

Après 10 à 20 jours de culture *in vitro*, les jeunes plantules sont repiquées en chambre de culture (80 % d'humidité relative ; 16 h de lumière à 20°C / 8 h d'obscurité à 15°C ; 200 $\mu$ E.m-2.S-1) dans du terreau (Stender, Allemagne), et régulièrement arrosées avec une solution nutritive riche en azote (Lesaint et Coïc, 1983).

Plantes destinées à la production de graines : le repiquage s'effectue dans des pots carrés de 5 cm de côté. Dès l'apparition de la première hampe florale, celle-ci est engagée à travers l'orifice central d'un récolteur qui vient se positionner juste au-dessus de la rosette. Un araconne transparent s'y insert, qui soutiendra la plante en fleur tout en évitant le risque de contamination d'une plante à l'autre. Après un mois de culture environ, la plante sèche est « battue » pour en récolter les graines.

Plantes destinées à l'analyse : le repiquage s'effectue dans des pots individuels de plus grand diamètre (10 cm), et les plantes sont tuteurées dès que débute leur floraison, ce qui facilite les prélèvements de tissus (feuilles, tiges, boutons floraux, siliques). Sur chaque plante, la première hampe florale à se développer est seule conservée ; les suivantes sont éliminées dès leur apparition. Chaque jour, les boutons floraux s'ouvrant (un point blanc apparaît à l'extrémité du bouton) sont marqués à l'aide d'une fine bande de sparadrap aéré de couleur fixé sur le pédoncule floral ; ce stade de développement coïncide avec l'étape de pollinisation de la fleur et sert de référence pour la datation des siliques et des graines qu'elles contiennent. L'unité de développement utilisée est le nombre de Jour Après Floraison (JAF).

#### 6.2.1.3. Croisements

Sur un bouton floral de la plante choisie comme parent femelle, tous les organes du calice et du périanthe hormis le pistil sont excisés à la pince. La fleur paternelle dont les anthères sont à maturité est ensuite mise en contact avec le pistil de l'autre fleur, afin d'y déposer le pollen. Les autres fleurs et les siliques présentes sur la hampe florale portant la fleur croisée sont excisées ainsi que les autres boutons de l'inflorescence.

#### 6.2.1.4. Transformation des plantes par *Agrobacterium tumefaciens*

La transformation d'*A. thaliana* repose sur la méthode d'inoculation au silwet (Clough et Bent, 1998). Le sylwet (Witco) est un puissant agent mouillant qui facilite la pénétration des agrobactéries dans les interstices cellulaires de par les lésions tissulaires qu'il engendre. Le plasmide binaire recombiné qui doit servir à la transformation est donc introduit dans la souche C58C1Rif(pmp90) d'*A. tumefaciens* par électroporation. Les bactéries recombinantes sont sélectionnées sur milieu LB supplémenté en rifampicine, gentamycine, ainsi qu'en un antibiotique de sélection spécifique du plasmide recombiné. Un clone isolé sert à l'ensemencement d'une pré culture de 5 ml conduite sur une nuit en présence des mêmes antibiotiques de sélection. Cette pré culture permettra d'ensemencer une culture finale de 750 ml, conduite durant 24 h et contenant elle aussi les antibiotiques précédemment évoqués. Les bactéries sont ensuite culottées par centrifugation (6 000 x g, 10 min, 4°C) et reprises dans 250 ml de milieu d'infiltration (Annexe). Le sylwet (50 µl) est alors ajouté à la suspension bactérienne. Les plantes à transformer ont été cultivées en barquettes ; elles forment une population dense de 30 à 50 individus par barquette et commencent à fleurir. Les fleurs sont immergées 5 à 7 min dans la suspension bactérienne puis les plantes sont remises en culture. Les graines qui seront récoltées sont semées sur un milieu de sélection qui permet d'isoler les transformants primaires (T1). Ceux-ci seront repiqués en chambre de culture pour la production des graines de la génération T2.

### 6.2.2. ANALYSES BIOCHIMIQUES

#### 6.2.2.1. Dosage des glucides

Les teneurs en sucres sont déterminées sur des lots de 20 graines après extraction dans 2 x 500 µl d'éthanol à 80 %, à 4°C : après centrifugation du broyat (15 000 x g, 10 min, 4°C), les extraits solubles (surnageants) sont prélevés, concentrés à sec, puis repris dans 200 µl d'eau. Le résidu (culot) est utilisé pour le dosage de l'amidon.

#### Glucides solubles

Les teneurs en glucose, fructose et saccharose ont été déterminées par la méthode de Bergmeyer *et al.* (1974) au moyen d'un kit (Roche). La réduction du NADP<sup>+</sup> en NADPH via la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (E.C.1.1.1.49 ; Roche) est mesurée par spectrophotométrie à 340nm. Ces méthodes ont été adaptées pour des dosages en micro plaques de type ELISA, ce qui autorise la réalisation de 96 dosages (gamme de référence



incluse), et une réduction sensible de la quantité d'échantillon requise. Deux gammes de concentrations connues en glucose et en saccharose sont utilisées pour l'étalonnage du lecteur de micro plaques (Labsystems Multiskan Ascent).

#### Amidon

La méthode de dosage utilisée pour l'amidon dérive de celle de Planchot *et al.* (1997). Le résidu d'extraction éthanolique est séché à l'étuve, puis suspendu dans 150  $\mu$ l de tampon (MOPS 50 mM, pH 7,0) contenant 15,4 U d' $\alpha$ -amylase thermostable (E.C.3.2.1.1 ; Sigma). La suspension obtenue est incubée à 100°C durant 6 min. 200  $\mu$ l d'un tampon acétate de sodium 0,2 M pH 4,8 contenant 35 U d'amyloglucosidase (E.C.3.2.1.3 ; Roche) sont ensuite ajoutés avant incubation de la suspension à 50°C durant 30 min, avec agitation régulière. Après centrifugation (15 000 x g, 10 min, 4°C), le glucose présent dans le surnageant est dosé par la méthode décrite ci-dessus.

#### 6.2.2.2. Dosage des protéines hydrolysées

Le micro-dosage des protéines a été adapté de Landry et Delhaye (1996), pour l'hydrolyse et le micro-dosage sur des graines d'*Arabidopsis thaliana*. Les protéines sont hydrolysées en acides aminés libres. L'hydrolyse alcaline permet de ne pas dégrader les acides aminés soufrés et le tryptophane. Le dosage s'effectue par rapport à une gamme de BSA (0,2,4,6,8,10 et 20  $\mu$ g/puit) et les résultats sont exprimés en  $\mu$ g de protéines /puit. Il consiste à broyer 10 graines (préalablement pesées) avec 200  $\mu$ g de NaOH 3N et de réaliser l'hydrolyse à 130 °C pendant 45 min (bain sec). Après avoir prélever 100 $\mu$ l d'hydrolysats, il faut ajouter dans la gamme et les échantillons 100  $\mu$ l de CH<sub>3</sub>COOH 35% pour stopper la réaction puis 400  $\mu$ l de méthylcellosolve 60%, 150  $\mu$ l de KCN 2% et 150  $\mu$ l de ninhydrine 3%. Ensuite les tubes sont déposés 15 min à 100 °C et plongés dans la glace 2 min pour arrêter la réaction. Pour finir, il faut prélever et déposer 200  $\mu$ l de chaque tube dans les puits d'une microplaque et lire à 570 nm (Rosen, 1957)

#### 6.2.2.3. Analyses des lipides

##### Extraction rapide

Cette technique d'extraction, très rapide, \*permet de transméthyle la majorité des acides gras présents dans la graine. Les graines sont simplement broyées à l'aide d'une baguette en verre dans le fond d'un tube de réaction. La baguette est soigneusement rincée avec le mélange

méthanol sulfurique (CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 :2,5, v/v) introduit pour l'étape de dérivation afin que tout l'échantillon demeure dans le tube.

#### Dérivation des acides gras

L'extrait est chauffé à 80°C durant 90 min dans 1 ml de mélange méthanol sulfurique (CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 :2,5, v/v). Les acides gras, libres ou estérifiés sous forme de lipides, sont ainsi transformés en esters méthyliques. Ces esters, après ajout de 1,5 ml d'eau et de 450 µl d'hexane suivi d'une agitation vigoureuse et d'une centrifugation (850 x g, 3 min, 4°C), sont extraits dans la phase organique.

#### Chromatographie en phase gazeuse

Pour chaque échantillon, 1 µl d'extrait est analysé, après dérivation, par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne Supelcowax de 15 m x 0,53 mm (Supelco, Bellefonte) ; la détection et la quantification des esters méthyliques est réalisée par ionisation de flamme (Browse *et al.*, 1986). Une température initiale de 160°C est appliquée durant 1 min, puis une rampe de température (40°C par min) est appliquée jusqu'à 190°C, suivie d'une seconde (4°C par min) jusqu'à 230°C. Cette température finale est maintenue 2 min. Une quantité déterminée d'un acide gras absent chez les plantes (17:0) est ajoutée à chaque échantillon au moment de la dérivation et sert d'étalon interne.

6.2.2.4. Profil métabolique utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse en temps de vol (GC/TOF-MS).

##### 1) Acquisition des données.

Les échantillons ont été extraits et dérivés selon Fiehn, (2006). La solution d'extraction était méthanol, chloroforme, eau (2.5 : 1 : 1) contenant du ribitol à 6,6 µg/ml en tant que contrôle interne. Elle a été refroidie à -20°C avant l'utilisation. Les échantillons d'environ 200 graines ont été broyés pendant 30 s dans un microtube de 1.5 ml (Eppendorf) contenant 300 µl de tampon d'extraction avec un pilon en téflon. Ils ont alors été agités 10 min dans un agitateur thermostaté (*Eppendorf thermomixer*) à 1400 rpm et 4°C. Puis le matériel insoluble a été séparé par centrifugation et le surnageant a été extrait avec 120 µl d'eau. 250 µl de la phase polaire ont été séchés durant la nuit dans une centrifugeuse à vide (Savant). Les extraits secs ont été dérivés d'abord avec 20 µl de chlorhydrate de methoxyamine (Sigma) à 20 mg/ml dans la pyridine pendant 90 min à 28 °C. Puis 8 µl ont été dissous 10 fois dans du N-méthyl-N-triméthylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA) (ampoules de 1 ml Macherey-Nagel) contenant

5% d'un mélange d'alcane (C10, C12, C15, C19, C22, C28, C32, C36) et dérivés pendant 30 min à 37°C. Les échantillons ont été laissés pendant 2 heures à température ambiante avant injection. 1  $\mu$ l des échantillons dérivés ont alors été injectés avec division dans un rapport de 10 et en utilisant une technique d'aiguille chaude (10 s de temps de preinjection, l'échantillon étant remonté dans le corps de la seringue) avec un injecteur *CTC combi PAL* dans un appareil de chromatographie en phase gazeuse *Agilent 6890N*. L'insert était de type division/sans division et contenait de la laine de verre (Restek). La colonne Rtx-5Sil MS (Restek) avait 30 m de longueur avec une précolonne de 10m. Le programme de température était 7 min à 70°C, 10°C/min à 330°C et 4 min à 330°C. La température de l'injecteur était de 240°C et la température de ligne de transfert de 250°C. Les métabolites ont été analysés avec un spectromètre de masse à temps de vol *Waters GCT-premier* en mode impact électronique. Nous n'avons pas utilisé de masse de référence interne durant l'analyse car cela se traduisait par un hachurage des pics. Nous avons donc travaillé, non en masse précise comme le permet ce type d'appareil, mais en masse nominale. La température de la source était de 200°C et l'instrument a été calibré avec de la perfluorotributylamine (PFTBA) en égalant l'intensité du fragment de 69 Da et celle du fragment de 219 Da. Le courant de piège était 200  $\mu$ A avec une énergie d'électrons de 70 eV. La tension de repousseur d'ion était de 1V. Les tensions des trois lentilles de focalisation étaient respectivement de 75, 15 et 45 V. La tension du détecteur (plaque multi canaux ou MCP) était de 2700 V. Les seuils de déclenchement et de signal du convertisseur temps numérique étaient de 350 mV et de 20 mV respectivement. Les paramètres d'extension de gamme dynamique (DRE) étaient de l'ordre de 10 sur les 5 fragments les plus importants de la PFTBA. Le taux d'acquisition était de 10 spectres par seconde (ce qui donne 5 points par seconde après le traitement d'extension de gamme dynamique DRE) et sur une gamme de masse de 50-650 Da.

## 2) Traitement de données

Les chromatogrammes bruts MassLynx ont été convertis en fichiers NetCDF et analysés avec le logiciel libre AMDIS pour l'identification des composants avec déconvolution. Les indices de rétention et les spectres de masse de chaque métabolite de la bibliothèque locale ont été construits avec l'aide des bases de données « NIST » et « Golm » et de l'injection de composés standards. Les composés identifiés avec le logiciel « AMDIS » ont été quantifiés avec le logiciel « Waters Quanlynx ». Le logiciel « Waters Markerlynx » a été également utilisé pour obtenir une vue rapide des résultats. Finalement les analyses statistiques multivariées ont été exécutées avec le logiciel libre TMEV.

#### 6.2.2.5. Dosage de l'activité saccharose synthase

La mesure de l'activité saccharose synthase a été effectuée en microplaques selon le protocole adapté de Egger et Hampp (1993). La réaction s'effectue en deux étapes (1) une étape spécifique de la formation de l'UDPG par l'enzyme (2) la détermination de la quantité d'UDPG formé via l'UDPG déshydrogénase (UDPG-DH). Les graines isolées de 3 siliques ont été broyées dans 200  $\mu$ l de tampon Tris-borate pH 7,6, Triton X100 0,2% , 1,6  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Après centrifugation, une aliquote du surnageant est incubée 15 min à 30°C dans 100 $\mu$ l de tampon Hepès-KOH 30 mM pH 6,7, 50  $\mu$ l de saccharose 1 M, 5 $\mu$ l d'UDP 340mM. Après de la réaction, 60  $\mu$ l de glycine-KOH 500mM pH9,3 et 5 $\mu$ l d'UDPG-DH, sont ajoutés la plaque est alors incubée 20 min sous agitation à 37°C. Les résultats sont calculés automatiquement par rapport à une gamme d'UDPG et exprimés en nmoles/puits. Un dosage de protéines total, à 595 nm, permet de ramener le résultat en quantité de protéines Bradford, (1976).

### 6.2.3. ANALYSES MOLECULAIRES

#### 6.2.3.1. Extraction d'acides nucléiques

##### Extraction d'ADN génomique

La méthode utilisée pour l'extraction d'ADN génomique d'*Arabidopsis* s'inspire de celle décrite par Doyle et Doyle, (1990). Sa caractéristique est de mettre à profit les propriétés détergentes du bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB ; Sigma) permettant la dénaturation des macromolécules protéiques et polysaccharidiques. Une feuille est broyée finement dans un microtube contenant 750  $\mu$ l de tampon d'extraction (NaCl 1.4 M, EDTA pH 8,0 20 mM, Tris-Hcl pH 8,0 100 mM, CTAB 2 %,  $\beta$ -mercaptoéthanol 0,2 %) préchauffé à 60°C. L'extraction s'effectue à 60°C pendant 30 min, sous agitation. Les protéines dénaturées par le  $\beta$ -mercaptoéthanol et le CTAB sont ensuite extraites dans un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24 :1 ; v/v) puis éliminées par centrifugation (15 000 x g, 15 min, 4°C) : les acides nucléiques du surnageant sont précipités en présence d'acétate de sodium 3 M (1 :10, v/v) par ajout d'un volume d'isopropanol. Culottés par centrifugation (15 000 x g, 15 min, 4°C) ils sont ensuite rincés dans 500  $\mu$ l d'éthanol à 70 %. Le culot est repris dans 100  $\mu$ l d'eau et les acides ribonucléïques sont éliminés par adjonction de 1  $\mu$ l de RNAase A à 10 mg.ml<sup>-1</sup> (Sigma) suivi d'une incubation de 30 min à 37°C. L'ADN est à

nouveau précipité à l'isopropanol en présence d'acétate de sodium. Après centrifugation, le nouveau culot est lavé, séché, repris dans 30  $\mu\text{l}$  d'eau et conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Méthode d'extraction rapide (Oard et Dronavalli, 1992)

Cette méthode requiert une faible quantité de matériel (une feuille de jeune plantule par exemple). L'échantillon est broyé à  $80^{\circ}\text{C}$  en microtube, puis suspendu dans 600  $\mu\text{l}$  de tampon d'extraction (NaCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 50 mM,  $\beta$ -mercaptoéthanol 10 mM) ; la suspension obtenue est portée à ébullition durant 7 min puis centrifugé (10 000 x g, 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Une aliquote de 450  $\mu\text{l}$  de surnageant est prélevée et additionnée de 45  $\mu\text{l}$  d'acétate d'ammonium 10 M et de 1 ml d'éthanol. L'ADN est précipité durant 30 min à  $-70^{\circ}\text{C}$ , puis culotté par une nouvelle centrifugation, avant d'être séché à l'air libre, et finalement repris dans 30 à 50  $\mu\text{l}$  d'eau.

#### Extraction d'ADN plasmidique

-Minipréparation (préparation de 2 à 5  $\mu\text{g}$  d'ADN plasmidique)

Une culture bactérienne est réalisée pendant une nuit dans 3 ml de milieu LB (Annexe) contenant l'agent de sélection approprié. La moitié de cette culture est centrifugée (6 800 x g, 2 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) en microtube. Le culot est resuspendu dans 350  $\mu\text{l}$  de tampon d'extraction (NaCl 0,1 M, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 5 %). La suspension obtenue est complétée par 5  $\mu\text{l}$  d'un mélange lysozyme à 50  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ /RNase à 2  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , puis portée à ébullition durant 50 s. Après centrifugation (10 000 x g, 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), le culot d'ADN est rincé dans 0,5 ml d'éthanol à 70 %, et finalement suspendu dans 30  $\mu\text{l}$  d'eau après une dernière centrifugation de 5 min suivie d'un séchage à l'air libre.

#### Extraction d'ARNs totaux

Au cours de l'extraction des ARNs, depuis le prélèvement des graines jusqu'au dosage des ARNs extraits, l'emploi de gants fréquemment renouvelés est requis. L'eau utilisée est traitée par le diethyl-pyrocabonate (DEPC; Sigma) à raison de 1 ml par litre d'eau. Après homogénéisation une nuit durant, sous une Sorbonne, un passage à l'autoclave permet d'éliminer cet agent.

Le matériel végétal congelé frais dans l'azote liquide et conservé à  $80^{\circ}\text{C}$  est broyé dans de l'azote liquide. L'extraction proprement dite est réalisée grâce au kit « Rneasy Plant Mini Extraction kit », selon les instructions du fournisseur (Qiagen). Une étape de dégradation de l'ADN génomique a été réalisée systématiquement, sur la colonne d'extraction, en utilisant

30U de DNase I Rnase-free (Qiagen), conformément au protocole fourni. Les ARNs sont élués dans 30 à 50  $\mu$ l d'eau DEPC. Ils sont ensuite conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Pour la synthèse des ADNc simples brins, le kit « SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis » (Gibco BRL) a été utilisé selon les instructions du fabricant. Un oligonucléotide poly(dT)<sub>22</sub>, complémentaire de l'extrémité poly(A) des ARNm, sert d'amorce pour cette réaction.

### 6.2.3.2. Analyses par PCR

#### 6.2.3.2.1. Principe

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une réaction enzymatique qui permet d'amplifier de manière sélective et exponentielle une séquence d'ADN donnée, conduisant à l'accumulation d'un grand nombre de copies du fragment d'ADN considéré, lesquelles peuvent être simplement visualisées sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose, clonées, séquencées, ou bien encore utilisées comme sonde dans une hybridation moléculaire. Dans le cas particulier de la PCR en temps réel, le suivi de l'accumulation des copies permettra d'évaluer la richesse relative d'une séquence d'ADN d'intérêt comparée à une séquence de référence au sein d'un mélange d'ADNc. Cette réaction enzymatique nécessite une connaissance de la séquence des bordures flanquant le fragment d'ADN amplifié. Des oligonucléotides s'hybridant spécifiquement de part et d'autre de la séquence cible, une fois celle-ci dénaturée, pourront ainsi être synthétisés (MWG Biotech). Ces amorces, dont les extrémités 3'-OH sont orientées en direction du fragment à amplifier, constituent un point d'ancrage pour l'ADN polymérase thermostable qui copie les matrices d'ADN simple brin.

#### 6.2.3.2.2. PCR classique non quantitative

La réaction est menée dans un volume de 20  $\mu$ l. Celui-ci contient 1  $\mu$ l d'un mélange à 5 mM des quatre dNTPs (GibcoBRL), 1  $\mu$ l de chacune des amorces à 10  $\mu$ M, 1 U d'ADN polymérase thermostable (Taq Eurobio), 2  $\mu$ l d'un tampon 10x spécifique de la Taq (Tris Hcl 670 mM pH 8,8, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 160 mM, Tween 0,1%), 0,6  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> à 50 mM, et 1 à 100 ng d'ADN matrice. Les microtubes de 0,2 ml contenant les produits de la réaction sont placés dans un thermocycleur programmable (PTC-100 MJ research ; Prolabo) et l'amplification s'effectue au cours d'une série de cycles successifs :

- (i) Dénaturation de l'ADN à  $94^{\circ}\text{C}$  (30 s)
- (ii) Hybridation des oligonucléotides sur la matrice à une température spécifique des amorces (30 s)

- (iii) Elongation par ajout de dNTPs libres aux extrémités 3'-OH du brin complémentaire en cours de synthèse à 72°C (1 à 3 min)

Après une trentaine de cycles, le système d'amplification arrive à saturation du fait de l'épuisement du milieu réactionnel en dNTPs et de la baisse d'efficacité de l'ADN polymérase. Au terme de  $n$  cycles d'amplifications, la théorie prévoit l'obtention de  $(1+Eff)^n$  copies du fragment cible, où  $Eff$  représente l'efficacité de l'amplification (dépendante de l'efficacité de l'ADN polymérase, de la séquence des amorces, de la taille du fragment d'ADN à amplifier.). La représentation de la quantité de copies synthétisées en fonction du nombre de cycles d'amplification est alors une courbe exponentielle. La courbe obtenue dans la pratique est une sigmoïde, dans le plateau reflète la saturation du processus d'amplification.

#### 6.2.3.2.3. Utilisation de polymérases « haute fidélité »

Lorsque la séquence amplifiée par PCR est destinée à être clonée, la Pfu Turbo DNA Polymerase (Stratagene) est utilisée. Son activité de relecture des brins néosynthétisés limite les erreurs de réplication. Contrairement aux autres Taq d'usage courant, qui ont tendance à ajouter des nucléotides (des adénines en particulier) aux extrémités 3'-OH des fragments néosynthétisés, la Pfu génère des fragments d'ADN à bouts francs. La réaction enzymatique est menée dans un volume de 50  $\mu$ l d'un mélange à 5 mM des quatre dNTPs (GibcoBRL), 1  $\mu$ l de chacune des amorces à 10  $\mu$ M, 1 U de Pfu, 5  $\mu$ l de tampon de réaction 10x (Tris Hcl 200 mM pH 8,8, HCl 10 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 20 mM, Triton X-100 1 %, « BSA nuclease free » à 1 mg.ml<sup>-1</sup>) et 1 à 100 ng d'ADN.

#### 6.2.3.2.4. PCR en temps réel

##### Principe

Au cours de la PCR en temps réel, ou PCR quantitative, un suivi du nombre de copies synthétisées au cours du temps va permettre d'estimer la richesse relative d'une séquence d'ADN d'intérêt comparée à une séquence de référence au sein d'un mélange d'ADNc servant de matrice. Ainsi, il sera possible d'évaluer le niveau d'expression relatif d'un gène par rapport à un autre gène utilisé comme référence.

Le suivi des nombres de copies synthétisées est permis par la présence d'un agent intercalant, le Sybr Green I, dans le milieu réactionnel. Lorsqu'il est lié à l'ADN double brin, celui-ci devient fluorescent (maximum d'émission à 530 nm) après excitation, et la fluorescence détectée est directement proportionnelle à la quantité d'ADN présente. Au cours de la phase

de dénaturation de l'ADN, le Sybr Green est libéré dans le milieu réactionnel et cesse d'émettre jusqu'à la séquence d'élongation suivante. Le suivi de la fluorescence à la fin de chaque cycle d'amplification permet de construire la cinétique d'accumulation des produits de la PCR, qui a la forme d'une sigmoïde. Dans la portion linéaire de cette courbe, le nombre de copies synthétisées  $X$  peut être calculé de la manière suivante :

$$X = X_0 \cdot (1 + \text{Eff})^n$$

$X_0$  représente le nombre de copies de la matrice initialement introduites dans le milieu réactionnel,  $\text{Eff}$  l'efficacité de la réaction, et  $n$  le nombre de cycles d'amplification réalisés. En comparant le nombre de cycles nécessaires à l'obtention d'une même quantité  $X$  de copies dans deux réactions conduites en parallèle sur un même mélange d'ADNc et avec deux couples d'oligonucléotides distincts, il est possible d'évaluer la richesse relative d'une séquence d'ADNc par rapport à une autre au sein du mélange. Le rapport des concentrations entre les deux séquences considérées est calculé de la manière suivante :

$$X_{0a}/X_{0b} = (1 + \text{Eff})^{(n_b - n_a)}$$

Avec  $n_a$  et  $n_b$  tels que  $X_a = X_b$ , et  $\text{Eff}_a = \text{Eff}_b = \text{Eff}$  (voir ci-après)

### Protocole

Les réactions de PCR sont réalisées dans un thermocycleur à air pulsé couplé à un microfluorimètre (Light Cycler ; Roche Diagnostics). Le volume réactionnel de 20  $\mu\text{l}$  comprend 5  $\mu\text{l}$  d'un mélange d'ADNc (obtenu par une dilution plus ou moins poussée d'un produit de reverse transcription), 1  $\mu\text{l}$  de chacune des deux amorces à 10  $\mu\text{M}$ , 2,4  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  à 10 mM, 10,6  $\mu\text{l}$  d'eau stérile et 2  $\mu\text{l}$  de Fast Start Master Sybr Green I 10 x (Quiagen) contenant la Fast Start Taq DNA polymérase, les dNTP et le Sybr Green I dans un tampon de réaction. Chaque cycle de PCR comprend une phase de dénaturation de l'ADN à 95°C (15 s), une étape d'hybridation des amorces à 55°C (5 s) et une phase d'élongation à 72°C (6 s). Au préalable, les ADNc ont été dénaturés pendant 8 min à 95°C, ce qui permet également d'activer la Taq polymérase utilisée (« hot start »). Afin de vérifier la spécificité du produit amplifié, la PCR à proprement parler est suivie d'une lente montée en température (0,1°C par seconde, jusqu'à 95°C). Au cours de cette rampe de température, la fluorescence va diminuant ; elle chute brusquement lorsque la  $T_m$  du produit de PCR est atteinte. Il est ainsi possible de déterminer la nature et la pureté du produit PCR, chaque fragment amplifié ayant une  $T_m$  spécifique.



### Choix des amorces

Les amorces utilisées ont une longueur de 20 pb en moyenne et permettent d'amplifier un fragment de 150 à 300 bp. Pour l'ensemble des études d'expression menées, le gène de référence est EF1 $\alpha$ A4 (*EF*), qui code un facteur d'élongation exprimé de manière ubiquiste (Liboz *et al.*, 1990). La détermination du niveau d'expression d'un gène relativement à *EF* implique que l'efficacité de la PCR menée avec les amorces spécifiques de ce gène soit indiquée à l'efficacité de la réaction menée avec les amorces servant à amplifier l'ADNc de *EF*. Toutes choses étant identiques par ailleurs, cela revient à vérifier que les couples d'amorces utilisés ont des efficacités comparables. Aussi détermine-t-on l'efficacité de chaque couple. Pour cela, une gamme décroissante de concentrations en ADNc est réalisée et le couple d'amorce dont on souhaite déterminer l'efficacité est testé sur chaque dilution. A chaque dilution correspond un nombre spécifique de cycles (croissant avec la dilution) nécessaire pour l'obtention d'une même quantité arbitraire X de copies. La représentation graphique de ce nombre de cycles en fonction du logarithme de la concentration en ADNc permet tout d'abord de déterminer dans quelle gamme de concentrations ces deux variables sont liées par une relation linéaire. Il conviendra alors de travailler avec des dilutions en ADNc appartenant à cette zone. Ensuite, la pente de la droite obtenue nous permet de calculer l'efficacité du couple d'oligonucléotides testé.

### 6.2.3.3. Clonages moléculaires classiques

#### Transformation de bactéries par électroporation

La transformation de bactéries par un plasmide recombiné est réalisée par un choc électrique, selon la technique de l'électroporation (Potter, 1993). Dans une cuve à électroporation (contenu de 1 ml, largeur de 0,4 cm), 10  $\mu$ l de produit de ligation préalablement dessalé sont mélangés à 50  $\mu$ l de bactéries électrocompétentes. La cuve est ensuite placée dans un électroporateur (Gene Pulser II System ; Bio-Rad) où une tension de 1,25 kV lui est appliquée. Après ajout rapide de 1 ml de milieu LB, destiné à favoriser la croissance des bactéries, celles-ci sont transférées dans un tube de 10 ml, qui est mis à incuber sous agitation rotative durant 1 h à 37°C pour *E. coli*, ou durant 2 h à 28°C pour *Agrobacterium*. Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur boîtes de Pétri contenant du milieu LB solide additionné du ou des antibiotique(s) adéquat(s) à 37°C de 16 à 24 h pour *E. coli*, ou 2 jours à 28°C pour *Agrobacterium*.

#### 6.2.3.4. Clonages moléculaires de séquences promotrices par la technique Gateway

Cette technique de clonage par recombinaison a été mise en œuvre dans le cadre de l'étude d'expression de promoteurs d'intérêt. La séquence à cloner est amplifiée par PCR par la Pfu Turbo DNA Polymerase (Stratagene) en utilisant un couple d'amorces ancrées dans la séquence génomique et auxquelles ont été ajoutées les séquences de recombinaison b1(5'AAA AAA GCA GGC T-3') et b2 (5'-AAG AAA GCT GGG T-3'). Le produit de PCR ainsi obtenu présente des demi-sites de recombinaison à ses extrémités, lesquels serviront d'ancrage aux amorces B1 (GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT-3') et B2 (5'GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT-3') au cours d'une seconde étape de PCR. S'ensuit une recombinaison entre les sites B1 et B2, d'une part, et les sites attP1 et attP2 présents sur le vecteur pDONR, d'autre part. Cette réaction est catalysée par la BP clonase selon les instructions du constructeur (Invitrogen). Le construit obtenu sert à la transformation de la souche DH10B d'E. Coli, lesquelles sont sélectionnées sur gentamycine. Seules les bactéries porteuses d'un vecteur ayant recombiné vont croître. En effet, la cassette de contre-sélection présente dans les plasmides n'ayant pas recombiné est toxique pour les bactéries. Lorsqu'il s'exprime, ccdB provoque l'insertion d'une arginine dans la protéine A de la gyrase, bloquant ainsi les processus de réplication de l'ADN.

Une seconde recombinaison, de type LR, permettra ensuite d'introduire la séquence promotrice dans un vecteur de destination du type pBI101-GUS Gateway. Cette réaction sera catalysée par la LR clonase, qui recombine les sites L issus de la précédente recombinaison (BP) et les sites R du vecteur de destination.

#### 6.2.3.5. Séquençage

La technique utilisée pour le séquençage d'ADN est basée sur la méthode de terminaison prématurée de synthèse, ou méthode de Sanger, et fait appel à des didésoxynucléotides (ddNTPs), désoxy nucléotides modifiés capables de s'intégrer dans une chaîne d'ADN en synthèse et empêchant l'incorporation du nucléotide suivant. Le fragment d'ADN dont on souhaite déterminer la séquence est donc amplifié par une ADN polymérase copiant la matrice à partir d'un oligonucléotide de synthèse, en présence de ddNTPs. Chaque fois qu'un ddNTP est incorporé, l'élongation de la chaîne en synthèse est arrêtée, ce qui génère une population de molécules de tailles différentes. La réaction est menée selon les instructions du fournisseur (ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit ; Applied Biosystems). Après la réaction de PCR, l'ADN est précipité, lavé, séché et repris dans de la formamide. Les fragments d'ADN dénaturés sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire

(les différents fragments migrants en fonction de leur taille, ils sont séparés à la base près) et sont analysés automatiquement (ABI Prism 310 Genetic Analyser ; Perkin Elmer) à la sortie du capillaire par un système laser permettant d'identifier la nature du fluorophore fixé au ddNTP ayant arrêté la synthèse. Chaque ddNTP étant marqué d'un fluorophore spécifique, la séquence d'ADN peut ainsi être reconstituée.

#### 6.2.4. ANALYSES PHYSIOLOGIQUES ET CYTOLOGIQUES

##### 6.2.4.1. Incubation des siliques en présence des solutions « sucrées »

Des siliques âgées de 15 jours après floraison (JAF) ont été incubées avec des solutions sucres (glucose (50mM), saccharose (50mM), tréhalose (50mM), mannitol (50mM), MES (10mM), 2-deoxyglucose (0.5mM), 3-*O*-methyl glucose (10mM), *N*-acetyl-glucosamine (10mM), à l'abri de la lumière durant une période de 18 heures. Après le temps d'incubation, les siliques ont été congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C avant l'emploi.

##### 6.2.4.2. Activité GUS

###### 6.2.4.2.1. Détection par histochimie

La détermination de l'activité GUS au niveau tissulaire nécessite l'utilisation de l'acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronique (X-GlucA), dissout dans la diméthylformamide à une concentration stock de 10 mg pour 100  $\mu$ l. Celui-ci est transformé par la  $\beta$ -glucuronidase en acide glucuronique et CIBr-indigo. Les tissus à analyser sont incubés dans un tampon d'infiltration (Tampon GUS) préparé extemporanément (tampon phosphate 50 mM pH 7, EDTA 10 mM, méthanol 20%, Triton X-100 1 %, X-GlucA 2 mM). Lorsque l'activité GUS étudiée est particulièrement forte, l'ajout de ferricyanide et de ferrocyanide dans le tampon permet d'éviter la diffusion du composé indigo. Après infiltration des échantillons sous vide, ceux-ci sont placés à 37°C, à l'obscurité, durant 4 à 48 h selon les cas. Après incubation, les tissus sont observés sous la loupe binoculaire ou au microscope.

###### 6.2.4.2.2. Détection par fluorométrie (Jefferson *et al.*, 1987)

L'activité GUS est mesurée à 355 nm (excitation) et à 460 nm (émission) par la formation d'un produit fluorescent, le 7-hydroxy-4-méthylcoumarine (4-MU). L'échantillon est broyé dans l'azote liquide en présence de 250  $\mu$ l de tampon d'extraction (tampon phosphate 50 mM pH 7,0, EDTA 10 mM, Triton X-100 0,1 %, *N*-lauryl sarcosine 0,1%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 10 mM) puis centrifugé. 40  $\mu$ l de surnageant sont mélangés avec 100  $\mu$ l de MUG (4-

méthylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucuronique) 1mM et 60  $\mu$ l de tampon d'extraction. Après homogénéisation, la fluorométrie est mesurée dans un lecteur de plaque (Labsystems Fluroskan II). L'activité est rapportée à la concentration en protéines, mesurée selon la méthode de Bradford (1976).

#### 6.2.4.3. Immunoblot

Approximativement 200 graines au cours du développement sont extraites à 4°C dans 120  $\mu$ l de la solution d'extraction 200mM Tris/borate pH 8.7 (Egger et Hampp, 1993). Les échantillons dénaturés (10% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoéthanol et 5% (v/v) de SDS, incubation à 100°C pendant 5min) sont soumis à une électrophorèse SDS-PAGE sur gel de d'acrylamide 8% (BIO-RAD), entre 20 et/ou 25  $\mu$ g de protéines ont été chargées par piste. La taille moléculaire relative de SUS2 a été déterminée avec le marqueur moléculaire « precision plus protein™ » (BIO-RAD) couvrant une gamme de 10 à 250 kDa. Après migration, le gel de polyacrylamide est soumis à un transfert liquide sur filtre de nitrocellulose (BioTrace™ NT membrane; Gelman, Pall, Saint-Germain-en-Laye, France). Les membranes sont ensuite bloquées avec la solution (TBS) « Tris buffered saline » avec 3% BSA et incubées pour 1 h, puis pour 2 h dans une solution (TBS) contenant 1% de BSA et anticorps de lapin SUS2 (1.5:100). L'anticorps polyclonal a été obtenu après injection d'un peptide spécifique synthétique pour cette protéine (H2N-PTG RFE TMR EWV YDA C-CONH2) chez un lapin (Eurogentec). La présence de l'association antigène-anticorps est détectée après incubation dans du TBS contenant 1% de BSA et anticorps Alexa 488 (1 : 2500) de lapin pour 2 h à l'abri de la lumière. Les membranes sont alors ont été visualisées à l'aide d'une phosphoimager par le lecteur d'image FLA-5000 V3.0 (FUJIFILM FLA-5000).

**RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

**Allen RD, Bernier F, Lessard PA, Beachy RN** (1989) Nuclear factors interact with a soybean beta-conglycinin enhancer. *Plant Cell* **1**: 623-631

**Angeles-Núñez JG, Kronenberger J, Wulleme S, Lepiniec L, Rochat C** (2008) Study of AtSUS2 localization in seeds reveals a strong association with plastids. *Plant Cell Physiol.* **doi: 10.1093/pcp/pcn117**

**Avigad G** (1964) Sucrose-Uridine Diphosphate Glucosyltransferase from Jerusalem Artichoke Tubers. *J. Biol. Chem.* **239**: 3613-3618

**Barker L, Kuhn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM, Frommer WB** (2000) SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* **12**: 1153-1164

**Barratt DHP, Barber L, Kruger N, Smith AM, Wang TL, Martin C** (2001) Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea. *Plant Physiol.* **127**: 655-664

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

**Baud S, Dubreucq B, Miquel M, Rochat C, Lepiniec L** (2008) Storage reserve accumulation in *Arabidopsis*: Metabolic and developmental control of seed filling. *In* ASP Biologists, ed, The *Arabidopsis* Book, Ed July 24, 2008. American Society of Plant Biologists, Rockville MD, p [doi:10.1199/TAB.0113](https://doi.org/10.1199/TAB.0113)

**Baud S, Vaultier M-N, Rochat C** (2004) Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **55**: 397-409

**Baud S, Wulleme S, Dubreucq B, de Almeida A, Vuagnat C, Lepiniec L, Miquel M, Rochat C** (2007) Function of plastidial pyruvate kinases in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **52**: 405-419

**Baud S, Wulleme S, Lemoine R, Kronenberger J, Caboche M, Lepiniec L, Rochat C (2005)** The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in Arabidopsis. *Plant J.* **43**: 824-836

**Baumlein H, Misera S, Luerssen H, Kollé K, Horstmann C, Wobus U, Müller A (1994)** The FUS3 gene of *Arabidopsis thaliana* is a regulator of gene expression during late embryogenesis. *Plant J.* **6**: 379-387

**Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993)** *In planta* infiltration of adult Arabidopsis plants. *C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci.* **316**: 1194-1199

**Bennett MD, Leitch IJ, Price HJ, Johnston JS (2003)** Comparisons with *Caenorhabditis* (approximately 100 Mb) and *Drosophila* (approximately 175 Mb) using flow cytometry show genome size in Arabidopsis to be approximately 157 Mb and thus approximately 25% larger than the Arabidopsis genome initiative estimate of approximately 125 Mb. *Ann. Bot.* **91**: 547-557

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

**Bergmeyer H, Bernt E, Schmidt F, Stark H (1974)** Sucrose. *In* H Bergmeyer, ed, *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York, pp 1196-1201

**Bieniawska Z, Paul Barratt DH, Garlick AP, Thole V, Kruger NJ, Martin C, Zrenner R, Smith AM (2007)** Analysis of the sucrose synthase gene family in Arabidopsis. *Plant J.* **49**: 810-828

**Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254

**Braybook S, Stone SL, Park S, Bui AQ, Le BH, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (2006) Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON 2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**: 3468-3473

**Brocard-Gifford IM, Lynch TJ, Finkelstein RR** (2003) Regulatory networks in seeds integrating developmental, abscisic acid, and light signaling. *Plant Physiol.* **131**: 78-92

**Browse J, McCourt PJ, Somerville C** (1986) Fatty acid composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methyl ester formation from fresh tissue. *Anal. Biochem.* **152**: 141-145

**Brun T, Roche E, Kim KH, Prentki M** (1993) Glucose regulates acetyl-CoA carboxylase gene expression in a pancreatic beta-cell line (INS-1). *J. Biol. Chem.* **268**: 18905-18911

**Buchner P, Poret M, Rochat C** (1998) Cloning and Characterization of a cDNA (Accession No. AJ001071) Encoding a Second Sucrose Synthase Gene in Pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* **117**: 719

**Bush DR, Chiou T-J** (1995) Sucrose transporters in assimilate partitioning and plant growth. *In* HG Pontis, GL Salerno, E Echevarria, eds, *Sucrose metabolism*. ASPP, Rockville-USA, pp 198-205

**Cardini CE, Leloir LF, Chiriboga J** (1955) The biosynthesis of sucrose. *J. Biol. Chem.* **214**: 149-155

**Carlson SJ, Chourey PS, Helentjaris T, Datta R** (2002) Gene expression studies on developing kernels of maize sucrose synthase (SuSy) mutants show evidence for a third SuSy gene. *Plant Mol. Biol.* **49**: 15-29

**Chopra S, Del-favero J, Dolferus R, Jacobs M** (1992) Sucrose synthase of Arabidopsis: Genomic cloning and sequence characterization. *Plant Mol. Biol.* **18**: 131-134



**Chourey P** (1981) Genetic control of sucrose synthetase in maize endosperm. *Mol. Gen. Genet.* **184**: 372-376

**Chourey P, Talierco EW, Carlson SJ, Ruan Y-L** (1998) Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **259**: 88-96

**Chourey PS, Nelson OE** (1976) The enzymatic deficiency conditioned by the shrunken-1 mutations in maize. *Biochem. Genet.* **14**: 1041-1055

**Chourey PS, Schwartz D** (1971) Ethyl methanesulfonate-induced mutations of the Sh1 protein in maize. *Mutat. Res.* **12**: 151-157

**Chourey PS, Talierco EW, Kane EJ** (1991) Tissue-specific expression and anaerobically induced posttranscriptional modulation of sucrose synthase genes in *Sorghum bicolor* M. *Plant Physiol.* **96**: 485-490

**Cieresko I, Kleczkowski L** (2002) Glucose and mannose regulate the expression of a major sucrose synthase gene in *Arabidopsis* via hexokinase-dependent mechanisms. *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 907-911

**Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735-743

**Craig J, Barratt P, Tatge H, Déjardin A, Gardner CD, Barber L, Wang TL, Hedley CL, Martin C, Smith AM** (1999) Mutations at the rug4 locus alter the carbon and nitrogen metabolism of pea plants through an effect on sucrose synthase. *Plant J.* **17**: 353-362

**Dali N, Michaud D, Yelle S** (1992) Evidence for the Involvement of Sucrose Phosphate Synthase in the Pathway of Sugar Accumulation in Sucrose-Accumulating Tomato Fruits. *Plant Physiol.* **99**: 434-438

**daSilva PMFR, Eastmond PJ, Hill LM, Smith AM, Rawsthorne S** (1997) Starch metabolism in developing embryos of oilseed rape. *Planta* **203**: 480-487

**Debeaujon I, Nesi N, Perez P, Devic M, Grandjean O, Caboche M, Lepiniec L** (2003) Proanthocyanidin-Accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *Plant Cell* **15**: 2514-2531

**Déjardin A, Rochat C, Wuillème S, Boutin J-P** (1997) Contribution of sucrose synthase, ADP-glucose pyrophosphorylase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds. *Plant, Cell Environ.* **20**: 1421-1430

**Doyle JJ, Doyle JL** (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissues. *Focus* **12**: 13-15

**Egger B, Hampp R** (1993) Invertase, sucrose synthase and sucrose phosphate synthase in lyophilized spruce needles; microplate reader assays. *Trees* **7**: 98-103

**Ehness R, Ecker M, Godt DE, Roitsch T** (1997) Glucose and Stress Independently Regulate Source and Sink Metabolism and Defense Mechanisms via Signal Transduction Pathways Involving Protein Phosphorylation. *Plant Cell* **9**: 1825-1841

**Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE** (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* **5**: 199-206

**Fait A, Angelovici R, Less H, Ohad I, Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR, Galili G** (2006) *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiol.* **142**: 839-854

**Fallahi H, Scofield GN, Badger MR, Chow WS, Furbank RT, Ruan YL** (2008) Localization of sucrose synthase in developing seed and siliques of *Arabidopsis thaliana* reveals diverse roles for SUS during development. *J. Exp. Bot.* **59**: 3283-3295

- Fiehn O** (2006) Metabolite profiling in Arabidopsis. *Methods Mol. Biol.* **323**: 439-447
- Focks N, Benning C** (1998) wrinkled 1: a novel, low-seed oil mutant of Arabidopsis with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant Physiol.* **118**: 91-101
- Fox SR, Hill LM, Rawsthorne S, Hills MJ** (2000) Inhibition of the glucose-6-phosphate transporter in oilseed rape (*Brassica napus* L.) plastids by acyl-CoA thioesters reduces fatty acid synthesis. *Biochem. J.* **352**: 525-532
- Fu H, Kim SY, Park WD** (1995) High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato Sus4 sucrose synthase gene require 5' and 3' flanking sequences and the leader intron. *Plant Cell* **7**: 1387-1394
- Fu H, Park W** (1995) Sink- and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato. *Plant Cell* **7**: 1369-1385
- Gazzarrini S, Tsuchiya Y, Lumba S, Okamoto M, McCourt PJ** (2004) The transcription factor *FUSCA3* controls developmental timing in Arabidopsis through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Development* **7**: 373-385
- Germain V, Ricard B, Raymond P, Saglio PH** (1997) The role of sugars, hexokinase, and sucrose synthase in the determination of hypoxically induced tolerance to anoxia in tomato roots. *Plant Physiol.* **114**: 167-175
- Giaquinta RT** (1983) Phloem loading of sucrose. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **34**: 347-387
- Giraudat J, Hauge BM, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman HM** (1992) Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* **4**: 1251-1261

**Godt D, Riegel A, Roitsch T** (1995) Regulation of sucrose synthase expression in *Chenopodium rubrum*: characterization of sugar induced expression in photoautotrophic suspension cultures and sink specific expression in plants. *J. Plant Physiol.* **146**: 231-238

**Godt DE, Roitsch T** (1997) Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. *Plant Physiol.* **115**: 273-282

**Goldberg RB, de Paiva G, Yadegari R** (1994) Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* **266**: 605-614

**Gutierrez L, Van Wuytswinkel O, Castelain M, Bellini C** (2007) Combined networks regulating seed maturation. *Trends Plant Sci.* **12**: 294-300

**Haigler CH, Ivanova-Datcheva M, Hogan PS, Salnikov VV, Hwang S, Martin K, Delmer DP** (2001) Carbon partitioning to cellulose synthesis. *Plant Mol. Biol.* **47**: 29-51

**Harada JJ** (1997) Seed maturation and control of germination. *In* BA Larkins, IK Vasil, eds, *Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development*. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, pp 554-592

**Harada JJ** (2001) Role of *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON genes in seed development. *J Plant Physiol.* **158**: 405-409

**Harrington GN, Bush DR** (2003) The bifunctional role of hexokinase in metabolism and glucose signaling. *Plant Cell* **15**: 2493-2496

**Heath JD, Weldon R, Monnot C, Meinke DW** (1986) Analysis of storage proteins in normal and aborted seeds from embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **169**: 304-312

**Herbers K, Sonnewald U** (1998) Molecular determinants of sink strength. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 207-216

**Hill LM, Morley-Smith ER, Rawsthorne S** (2003) Metabolism of sugars in the endosperm of developing seeds of oilseed rape. *Plant Physiol.* **131**: 228-236

**Hiraiwa N, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (1997) Expression and activation of the vacuolar processing enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant J.* **12**: 819-829

**Ho LC** (1988) Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**: 355-378

**Holdsworth M, Kurup S, McKibbin R** (1999) Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. *Trends Plant Sci.* **4**: 275-280

**Huang AH** (1996) Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol.* **110**: 1055-1061

**Jang JC, Leon P, Zhou L, Sheen J** (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* **9**: 5-19

**Jang JC, Sheen J** (1994) Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* **6**: 1665-1679

**Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**: 3901-3907

**Kagaya Y, Ohmiya K, Hattori T** (1999) RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res.* **27**: 470-478

**Kagaya Y, Toyoshima R, Okuda R, Usui H, Yamamoto A, Hattori T** (2005) LEAFY COTYLEDON1 controls seed storage protein genes through its regulation of FUSCA3 and ABSCISIC ACID INSENSITIVE3. *Plant Cell Physiol.* **46**: 399-406

**Keith K, Kraml M, Dengler NG, McCourt P** (1994) fusca3: A Heterochronic Mutation Affecting Late Embryo Development in Arabidopsis. *Plant Cell* **6**: 589-600

**Kim I, Zambryski PC** (2005) Cell-to-cell communication via plasmodesmata during Arabidopsis embryogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 593-599

**King SP, Lunn JE, Furbank RT** (1997) Carbohydrate content and enzyme metabolism in developing canola siliques. *Plant Physiol.* **114**: 153-160

**Koch K** (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 509-540

**Koch K** (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 235-246

**Koch KE, Nolte KD, Duke ER, McCarty DR, Avigne WT** (1992) Sugar Levels Modulate Differential Expression of Maize Sucrose Synthase Genes. *Plant Cell* **4**: 59-69

**Komatsu A, Moriguchi T, Koyama K, M O, Akihama T** (2002) Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships. *J. Exp. Bot.* **53**: 61-71

**Koncz C, Kreuzaler F, Kalman Z, Schell J** (1984) A simple method to transfer, integrate and study expression of foreign genes, such as chicken ovalbumin and  $\alpha$ -actin in plant tumors. *EMBO J.* **3**: 1029-1037

**Koornneef M, Reuling G, Karssen CM** (1984) The isolation and characterization of abscisic-acid insensitive mutants mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **61**: 377-383

**Krebbers E, Herdies L, De Clercq A, Seurinck J, Leemans J, Van Damme J, Segura M, Gheysen G, Van Montagu M, Vandekerckhove J** (1988) Determination of the Processing Sites of an Arabidopsis 2S Albumin and Characterization of the Complete Gene Family. *Plant Physiol.* **87**: 859-866

**Kroj T, Savino G, Valon C, Giraudat J, Parcy F** (2003) Regulation of storage protein gene expression in *Arabidopsis*. *Development* **130**: 6065-6073

**Kuhn C, Barker L, Burkle L, Frommer WB** (1999) Update on sucrose transport in higher plants. *J. Exp. Bot.* **50**: 935-953

**Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM** (1999) The dual function of sugar carriers. Transport and sugar sensing. *Plant Cell* **11**: 707-726

**Landry J, Delhaye S** (1996) A simple and rapid procedure for hydrolyzing minute amounts of proteins with alkali. *Anal. Biochem.* **243**: 191-194

**Laux T, Jurgens G** (1997) Embryogenesis: A New Start in Life. *Plant Cell* **9**: 989-1000

**Laux T, Wurschum T, Breuninger H** (2004) Genetic regulation of embryonic pattern formation. *Plant Cell* **16 Suppl**: S190-202

**Lee H, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (2003) Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 represents a functionally specialized subunit of the CCAAT binding transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**: 2152-2156

**Lehti-Shiu MD, Adamczyk BJ, Fernandez DE** (2005) Expression of MADS-box genes during the embryonic phase in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **58**: 89-107

**Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul JM, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M** (2006) Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 405-430

**Lepiniec L, Devic M, Berger F** (2005) Genetic and molecular control of seed development in Arabidopsis. In D Leister, ed, Plant Functional Genomics. Food Products Press, Binghamton, NY, pp 511-564

**Leprince O, Bronchart R, Deltour R** (1990) Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. Plant Cell Environ. **13**: 539-546

**Lerchl J, Geigenberger P, Stitt M, Sonnewald U** (1995) Impaired photoassimilate partitioning caused by phloem-specific removal of pyrophosphate can be complemented by a phloem-specific cytosolic yeast-derived invertase in transgenic plants. Plant Cell **7**: 259-270

**Liao Y-C, Wang A-Y** (2003) Sugar-modulated gene expression of sucrose synthase in suspension-cultured cells of rice. Physiol. Plant. **118**: 319-327

**Liboz T, Bardet C, Le Van Thai A, Axelos M, Lescure B** (1990) The four members of the gene family encoding the Arabidopsis thaliana translation elongation factor EF-1 alpha are actively transcribed. Plant Mol. Biol. **14**: 107-110

**Lin Y, Ulanov AV, Lozovaya V, Widholm J, Zhang G, Guo J, Goodman HM** (2006) Genetic and transgenic perturbations of carbon reserve production in Arabidopsis seeds reveal metabolic interactions of biochemical pathways. Planta **225**: 153-164

**Lotan T, Ohto M, Yee KM, West MA, Lo R, Kwong RW, Yamagishi K, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (1998) Arabidopsis *LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. Cell **93**: 1195-1205

**Luerssen H, Kirik V, Herrmann P, Misera S** (1998) *FUSCA3* encodes a protein with a conserved VP1/ABI3-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. **15**: 755-764



**Macquet A, Ralet MC, Kronenberger J, Marion-Poll A, North HM** (2007) In situ, chemical and macromolecular study of the composition of *Arabidopsis thaliana* seed coat mucilage. *Plant Cell Physiol.* **48**: 984-999

**Mansfield SG, Briarty LG** (1990) Endosperm cellularization in *Arabidopsis thaliana* L. *Arabidopsis Info Service* **27**: 65-72

**Mansfield SG, Briarty LG** (1992) Cotyledon cell development in *Arabidopsis thaliana* during reserve deposition. *Can. J. Bot.* **70**: 151-164

**Marana C, Garcia-Olmedo F, Carbonero P** (1988) Linked sucrose synthase genes in group-7 chromosomes in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Gene* **63**: 253-260

**Martin T, Frommer WB, Salanoubat M, Willmitzer L** (1993) Expression of an *Arabidopsis* sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs. *Plant J.* **4**: 367-377

**Mayer KF, Torres-Ruiz RA, Berleth T, Missera S, Jürgens G** (1991) Mutations affecting body organisation in *Arabidopsis* embryo. *Nature* **353**: 402-407

**McCarty DR, Hattori T, Carson CB, Vasil V, Lazar M, Vasil IK** (1991) The Viviparous-1 developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* **66**: 895-905

**McCarty DR, Shaw JR, Hannah LC** (1986) The cloning, genetic mapping, and expression of the constitutive sucrose synthase locus of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **83**: 9099-9103

**Meinke D** (1995) Genetic nomenclature guide. *Arabidopsis thaliana*. *Trends Genet.*: 22-23

**Meinke DW** (1992) A Homoeotic Mutant of *Arabidopsis thaliana* with Leafy Cotyledons. *Science* **258**: 1647-1650

**Meinke DW, Franzmann LH, Nickle TC, Yeung EC** (1994) *Leafy cotyledon* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **6**: 1049-1064

**Meyer S, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjolund RD, Sauer N** (2004) Wounding enhances expression of *AtSUC3*, a sucrose transporter from *Arabidopsis* sieve elements and sink tissues. *Plant Physiol.* **134**: 684-693

**Miquel M, Browse J** (1995) Lipid biosynthesis in developing seeds. *In* J Kigel, G Galili, eds, *Seed development and germination*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp 169-193

**Monke G, Altschmied L, Tewes A, Reidt W, Mock HP, Baumlein H, Conrad U** (2004) Seed-specific transcription factors *ABI3* and *FUS3*: molecular interaction with DNA. *Planta* **219**: 158-166

**Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J** (2003) Role of the *Arabidopsis* glucose sensor *HXK1* in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* **300**: 332-336

**Morley-Smith ER, Pike MJ, Findlay K, Kockenberger W, Hill LM, Smith AM, Rawsthorne S** (2008) The transport of sugars to developing embryos is not via the bulk endosperm in oilseed rape seeds. *Plant Physiol.* **147**: 2121-2130

**Münch E** (1930) Cité. *In* FB Salisbury, CW Ross, eds, *Plant Physiology*, "Transport in the phloem", 1985. Wadsworth Publish. Company, Belmont, U.S.A., pp 135-194

**Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**: 165-185

**Nambara E, Naito S, McCourt PJ** (1992) A mutant of *Arabidopsis* which is defective in seed development and storage protein in a new *abi3* allele. *Plant J.* **2**: 435-441

**Napier JA, Stobart AK, Shewry PR** (1996) The structure and biogenesis of plant oil bodies: the role of the ER membrane and the oleosin class of proteins. *Plant Mol. Biol.* **31**: 945-956

**Nguyen-Quoc B, Krivitzky M, Huber SC, Lechamy A** (1990) Sucrose synthase in developing maize leaves. Regulation of activity by protein level during the import to export transition. *Plant Physiol.* **94**: 516-523

**Nomura T, Akazawa T** (1973) Enzymic mechanism of starch synthesis in ripening rice grains. VII. Purification and enzymic properties of sucrose synthetase. *Arch. biochem. biophys.* **156**: 644-652

**Norton G, Harris JF** (1975) Compositional changes in developing rape seed (*Brassica napus* L.). *Planta* **123**: 163-174

**Oard J, Dronavalli S** (1992) Rapid isolation of rice and maize DNA for analysis by random-primer PCR. *Plant Mol. Biol. Report.* **10**: 236-241

**Pang PP, Pruitt RE, Meyerowitz EM** (1988) Molecular cloning, genomic organization, expression and evolution of 12S seed storage protein genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*: 805-820

**Parcy F, Valon C, Kohara A, Misera S, Giraudat J** (1997) The *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3*, *FUSCA3*, and *LEAFY COTYLEDON1* loci act in concert to control multiple aspects of arabidopsis seed development. *Plant Cell* **9**: 1265-1277

**Parcy F, Valon C, Raynal M, Gaubier-Comella P, Delseny M, Giraudat J** (1994) Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development: roles of the *ABI3* locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell* **6**: 1567-1582

**Patrick JW** (1997) Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 191-222

**Planchot V, Colonna P, Saulnier L** (1997) Dosage des glucides et des amylases. *In* B Godon, W Loisel, eds, Guide pratique d'analyses dans les industries des céréales. Lavoisier, Paris, pp 341-398

**Potter H** (1993) Application of electroporation in recombinant DNA technology. *Methods Enzymol.* **217**: 461-478

**Qu LJ, Zhu YX** (2006) Transcription factor families in Arabidopsis: major progress and outstanding issues for future research. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 544-549

**Raz V, Bergervoet JHW, Koornneef M** (2001) Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development* **128**: 243-252

**Rochat C, Boutin J-P** (1989) Carbohydrates and nitrogenous compounds changes in the hull and in the seed during the pod development of pea. *Plant Physiol. Biochem.* **27**: 881-887

**Rohde A, De Rycke R, Beeckman T, Engler G, Van Montagu M, Boerjan W** (2000) ABI3 affects plastid differentiation in dark-grown Arabidopsis seedlings. *Plant Cell* **12**: 35-52

**Roitsch T** (1999) Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 198-206

**Roitsch T, Bittner M, Godt DE** (1995) Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiol.* **108**: 285-294

**Rolland F, Moore B, Sheen J** (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* **14 Suppl**: S185-205

**Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM** (2001) Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 310-317

**Rolletschek H, Koch K, Wobus U, Borisjuk L** (2005) Positional cues for the starch/lipid balance in maize kernels and resource partitioning to the embryo. *Plant J.* **42**: 69-83

**Rolletschek H, Nguyen TH, Hausler RE, Rutten T, Gobel C, Feussner I, Radchuk R, Tewes A, Claus B, Klukas C, Linemann U, Weber H, Wobus U, Borisjuk L** (2007) Antisense inhibition of the plastidial glucose-6-phosphate/phosphate translocator in *Vicia* seeds shifts cellular differentiation and promotes protein storage. *Plant J.* **51**: 468-484

**Rosen H** (1957) A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Archiv. biochem. biophys.* **67**: 10-15

**Ruan Y-L, Llewellyn DJ, Furbank RT** (2003) Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development. *Plant Cell* **15**: 952-964

**Ruuska SA, Girke T, Benning C, Ohlrogge J** (2002) Contrapuntal networks of gene expression during *Arabidopsis* seed filling. *Plant Cell* **14**: 1191-1206

**Salanoubat M, Belliard G** (1989) The steady-state level of potato sucrose synthase mRNA is dependent on wounding, anaerobiosis and sucrose concentration. *Gene* **84**: 181-185

**Sanchez de la Hoz P, Vicente-Carbajosa J, Mena M, Carbonero P** (1992) Homologous sucrose synthase genes in barley (*Hordeum vulgare*) are located in chromosome 7H (syn.1) and 2H. Evidence for a gene translocation. *FEBS Lett.* **310**: 46-50

**Santos Mendoza M, Dubreucq B, Miquel M, Caboche M, Lepiniec L** (2005) LEAFY COTYLEDON 2 activation is sufficient to trigger the accumulation of oil and seed specific mRNAs in *Arabidopsis* leaves. *FEBS Lett.* **579**: 4666-4670

**Santos-Mendoza M, Dubreucq B, Baud S, Parcy F, Caboche M, Lepiniec L** (2008) Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in *Arabidopsis*. *Plant J.* **54**: 608-620

**Schwender J, Goffman F, Ohlrogge JB, Shachar-Hill Y** (2004) Rubisco without the Calvin cycle improves the carbon efficiency of developing green seeds. *Nature* **432**: 779-782

**Schwender J, Ohlrogge J, Shachar-Hill Y** (2004) Understanding flux in plant metabolic networks. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 309-317

**Schwender J, Ohlrogge JB** (2002) Probing in vivo metabolism by stable isotope labeling of storage lipids and proteins in developing *Brassica napus* embryos. *Plant Physiol.* **130**: 347-361

**Schwender J, Ohlrogge JB, Shachar-Hill Y** (2003) A Flux Model of Glycolysis and the Oxidative Pentosephosphate Pathway in Developing *Brassica napus* Embryos. *J. Biol. Chem.* **278**: 29442-29453

**Schwender J, Shachar-Hill Y, Ohlrogge JB** (2006) Mitochondrial metabolism in developing embryos of *Brassica napus*. *J. Biol. Chem.* **281**: 34040-34047

**Smeekens S** (1998) Sugar regulation of gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 230-234

**Smeekens S** (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 49-81

**Solfanelli C, Poggi A, Loreti E, Alpi A, Perata P** (2006) Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **140**: 637-646

**Stadler R, Lauterbach C, Sauer N** (2005) Cell-to-cell movement of green fluorescent protein reveals post-phloem transport in the outer integument and identifies symplastic domains in *Arabidopsis* seeds and embryos. *Plant Physiol.* **139**: 701-712

**Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (2001) *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**: 11806-11811

**Sturm A, Tang G-Q** (1999) The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Sci.* **4**: 401-407

**Sun C, Palmqvist S, Olsson H, Boren M, Ahlandsberg S, Jansson C** (2003) A novel WRKY transcription factor, *SUSIBA2*, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the *iso1* promoter. *Plant Cell* **15**: 2076-2092

**Sun J, Loboda T, Sung S-JS, Black CC** (1992) Sucrose synthase in wild tomato, *Lycopersicon chmielewskii*, and tomato fruit sink strength. *Plant Physiol.* **98**: 1163-1169

**Suzuki M, Wang HH, McCarty DR** (2007) Repression of the *LEAFY COTYLEDON 1/B3* regulatory network in plant embryo development by *VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3* genes. *Plant Physiol.* **143**: 902-911

**Tatematsu K, Ward S, Leyser O, Kamiya Y, Nambara E** (2005) Identification of cis-elements that regulate gene expression during initiation of axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **138**: 757-766

**Thomas JC, Bohnert HJ** (1993) Salt Stress Perception and Plant Growth Regulators in the Halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* **103**: 1299-1304

**To A, Valon C, Savino G, Guillemintot J, Devic M, Giraudat J, Parcy F** (2006) A network of local and redundant gene regulation governs *Arabidopsis* seed maturation. *Plant Cell* **18**: 1642-1651

**Truernit E, Sauer N** (1995) The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H<sup>+</sup> symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* **196**: 564-570

**Tsuchiya Y, Nambara E, Naito S, McCourt PJ** (2004) The *FUS3* transcription factor functions through the epidermal regulator *TTG1* during embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* **37**: 73-81

**Tsukagoshi H, Morikami A, Nakamura K** (2007) Two B3 domain transcriptional repressors prevent sugar-inducible expression of seed maturation genes in *Arabidopsis* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **104**: 2543-2547

**Tsukagoshi H, Saijo T, Shibata D, Morikami A, Nakamura K** (2005) Analysis of a sugar response mutant of *Arabidopsis* identified a novel b3 domain protein that functions as an active transcriptional repressor. *Plant Physiol.* **138**: 675-685

**Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**: 1963-1971

**Vicient CM, Bies-Etheve N, Delseny M** (2000) Changes in gene expression in the *leafy cotyledon1* (*lec1*) and *fusca3* (*fus3*) mutants of *Arabidopsis thaliana* L. *J. Exp. Bot.* **51**: 995-1003

**Wang AY, Yu WP, Juang RH, Huang JW, Sung HY, Su JC** (1992) Presence of three rice sucrose synthase genes as revealed by cloning and sequencing of cDNA. *Plant Mol. Biol.* **18**: 1191-1194

**Weber H, Borisjuk L, Wobus U** (1997) Sugar import and metabolism during seed development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio* **2**: 169-174

**Weber H, Borisjuk L, Wobus U** (2005) Molecular physiology of legume seed development. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**: 253-279



**Weckwerth W, Loureiro ME, Wenzel K, Fiehn O** (2004) Differential metabolic networks unravel the effects of silent plant phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**: 7809-7814

**Weigelt K, Kuster H, Radchuk R, Muller M, Weichert H, Fait A, Fernie AR, Saalbach I, Weber H** (2008) Increasing amino acid supply in pea embryos reveals specific interactions of N and C metabolism, and highlights the importance of mitochondrial metabolism. *Plant J* **55**: 909-926

**Weijers D, Jurgens G** (2005) Auxin and embryo axis formation: the ends in sight? *Curr Opin Plant Biol* **8**: 32-37

**West M, Harada JJ** (1993) Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. *Plant Cell* **5**: 1361-1369

**White JA, Todd J, Newman T, Focks N, Girke T, de Ilarduya OM, Jaworski JG, Ohlrogge JB, Benning C** (2000) A new set of Arabidopsis expressed sequence tags from developing seeds. The metabolic pathway from carbohydrates to seed oil. *Plant Physiol* **124**: 1582-1594

**Xiao W, Sheen J, Jang JC** (2000) The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol Biol* **44**: 451-461

**Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Tomo Y, Hayami N, Terada T, Shirouzu M, Osanai T, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S** (2004) Solution structure of the B3 DNA binding domain of the Arabidopsis cold-responsive transcription factor RAV1. *Plant Cell* **16**: 3448-3459

**Yazdi-Samadi B, Rinne RW, Seif RD** (1977) Components of developing soybean seeds: oil, protein, sugars, starch, organic acids and amino acids. *Agron J* **69**: 481-486

**Yelle S, Chetelat RT, Dorais M, Deverna JW, Bennett AB** (1991) Sink Metabolism in Tomato Fruit : IV. Genetic and Biochemical Analysis of Sucrose Accumulation. *Plant Physiol* **95**: 1026-1035

**Yu W-P, Wang A-Y, Juang R-H, Sung H-Y, Su J-C** (1992) Isolation and sequences of rice sucrose synthase cDNA and genomic DNA. *Plant Mol. Biol.* **18**: 139-142

**Zhang W-H, Zhou Y, Dibley K, Tyerman S, Furbank RT, Patrick JW** (2007) Nutrient loading of developing seeds. *Functional Plant Biology* **34**: 314-331

**Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L, Sonnewald U** (1995) Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* **7**: 97-107

## ANNEXE I. CULTURE DES PLANTES

**I.a. Milieu de culture *in vitro* d'*Arabidopsis thaliana***, d'après Murashige et Skoog, 1962 (MS avec vitamines et tampon MES, Duchefa n°M0255).

Ce milieu se présente sous forme de poudre dont il faut dissoudre à 4,9 g.l<sup>-1</sup>. Le saccharose (10 g.l<sup>-1</sup>) et l'agar (7 g.l<sup>-1</sup>) sont ensuite ajoutés. Le milieu est finalement complété avec du BCP (5 ml d'une solution stock à 0,16 % par litre de milieu préparé) avant d'être autoclavé 20 min à 120°C.

<b>Macroéléments</b>	<b>Concentration finale</b>	<b>Quantité pour 1 litre</b>
KNO <sub>3</sub>	18,79 mM	1900,00 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25 mM	170,00 mg
MgSO <sub>4</sub>	1,50 mM	180,54 mg
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20,61 mM	1650,00 mg
CaCl <sub>2</sub>	2,99 mM	332,02 mg

<b>Microéléments</b>	<b>Concentration finale</b>	<b>Quantité pour 1 litre</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,10 mM	6,200 mg
MnSO <sub>4</sub> ,1H <sub>2</sub> O	0,10 mM	16,900 mg
CuSO <sub>4</sub> ,5H <sub>2</sub> O	0,10 µM	0,025 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	1,03 µM	0,250 mg
KI	5,00 µM	0,830 mg
ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	29,91 µM	8,600 mg
CoCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	0,11 µM	0,025 mg
FeNaEDTA	0,10 mM	36,700 mg

<b>Vitamines</b>	<b>Concentration finale</b>	<b>Quantité pour 1 litre</b>
<i>myo</i> -Inositol	0,56 mM	100,00 mg
Thiamine HCl	0,30 µM	0,10 mg
Pyridoxine HCl	2,43 µM	0,50 mg
Glycine	26,64 µM	2,00 mg
acide nicotinique	4,06 µM	0,50 mg

### Tampon MES (acide 2-(N-Morpholino)éthane sulfonique)

MES                                      2,35 mM                                      500,00 mg.l<sup>-1</sup>

### Préparation de la solution stock de pourpre de bromocrésol (BCP) à 0,16 % (p/v)

1,6 g de poudre de BCP (Merck) sont dissous dans 15 ml d'éthanol à 95 %. Le tout est complété à 1 litre avec de l'eau ultrapure avant d'être autoclavé 20 min à 120°C.

### I.b. Agents de sélection des plantes.

	Concentration stock	Concentration finale
Kanamycine (Duchefa)	100 mg.ml <sup>-1</sup> dans H <sub>2</sub> O	50 mg.l <sup>-1</sup>
Hygromycine (Duchefa)	100 mg.ml <sup>-1</sup> dans H <sub>2</sub> O	75 mg.l <sup>-1</sup>

### I.c. Transformation des plantes

Microéléments (solution 1000 x)	Concentration finale	Quantité pour 1 litre
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	70,00 mM	4328,0 mg
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	14,00 mM	2770,0 mg
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,50 mM	125,0 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,20 mM	50,0 mg
NaCl	10,00 mM	584,0 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,00 mM	288,0 mg
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 mM	2,5 mg

Dissoudre dans 1 litre d'eau ultrapure et autoclaver 20 min à 120°C.

Macroéléments (solution 10 x)	Concentration finale	Quantité pour 1 litre
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	200,00 mM	16,5 g
KNO <sub>3</sub>	200,00 mM	19,0 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	30,00 mM	4,4 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	15,00 mM	3,7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12,50 mM	1,7 g

Dissoudre dans 1 litre d'eau ultrapure.

<b>Milieu de transformation</b>	<b>Pour 1 litre</b>
microéléments 1 x	1 ml microéléments 1000 x
macroéléments 1 x	100 ml macroéléments 10 x
saccharose	50 g
eau	qsp 1000 ml
Silwet	50 $\mu$ l

## ANNEXE II. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

### II.a. Electrophorèse

<b>Tampon migration TAE 50 x</b>	<b>Concentration finale</b>	<b>Pour 1 litre</b>
Tris-acétate	2 M	243 g de Tris et ajouter 57,1 ml d'acide acétique glacial
EDTA	50 mM	100 ml EDTA 0,5 M
Eau ultrapure		qsp 1 litre
<i>Autoclaver</i>		

<b>Gel d'électrophorèse</b>	<b>Concentration finale</b>	<b>Pour 100 ml</b>
Agarose pour électrophorèse	1 % (p/v)	1 g
TAE	1 x	2 ml TAE 50 x
BET	0,5 $\mu$ g.ml <sup>-1</sup>	5 $\mu$ l BET 10 $\mu$ g. $\mu$ l <sup>-1</sup>
Eau ultrapure		qsp 100 ml

<b>Solution de charge 10 x</b>	<b>Concentration finale</b>	<b>Pour 100 ml</b>
Bleu de bromophénol (Sigma)	0,25 % (p/v)	0,25 g
EDTA	100 mM	20 ml EDTA 0,5 M
Glycérol	40 % (v/v)	40 ml glycérol 100 %
Eau stérile		qsp 100 ml

## II.b. Hybridation moléculaire

<b>Solution de (pré)hybridation</b>	<b>Concentration finale</b>	<b>Pour 400 ml</b>
SDS	7 %	140 ml SDS 20 %
EDTA	2 mM	1,6 ml EDTA 0,5 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250 mM, pH 7,4	100 ml de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M et 20 ml de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M
Eau ultrapure		qsp 400 ml

<b>SSC 20 x</b>	<b>Concentration finale</b>	<b>Pour 1 litre</b>
Tri-citrate Na	0,3 M	300 ml de Tri-citrate Na 1 M
NaCl	3 M	600 ml NaCl 5 M
Eau ultrapure		qsp 1000 ml

*Ajuster à pH 7 avec HCl 1 M et autoclaver.*

<b>Solution LAVI</b>	<b>Concentration finale</b>	<b>Pour 1 litre</b>
SSC	2 x	100 ml SSC 20 x
SDS	0,1 %	5 ml SDS 20 %
Eau ultrapure		qsp 1000 ml, pH 7

<b>Solution LAVII</b>	<b>Concentration finale</b>	<b>Pour 1 litre</b>
SSC	0,5 x	25 ml SSC 20 x
SDS	0,5 %	5 ml SDS 20
Eau ultrapure		qsp 1000 ml

## ANNEXE III. MICROBIOLOGIE

### III.a. Milieu LB (Luria-Bertani) liquide

	<b>Pour 1 litre</b>
Bacto-tryptone (Biomerieux)	10 g
Bacto-Yeast extract (Biomerieux)	5 g
NaCl	10 g

Eau ultrapure qsp 1 litre  
Ajuster à pH 7,5 avec NaOH puis autoclaver

### III.b. Milieu LB solide

#### Pour 1 litre

Milieu LB liquide 1 litre  
Agar (Biomar) 15 g  
*Autoclaver*

### III.c. Milieu SOC

#### Pour 1 litre

Bacto-tryptone (Biomerieux) 20 g  
Bacto-Yeast extract (Biomerieux) 5 g  
NaCl 0,5 g  
Eau ultrapure qsp 1 litre  
*Ajuster à pH 7,5 avec NaOH puis autoclaver*

Ajouter avant utilisation:

MgCl<sub>2</sub> 10 mM  
MgSO<sub>4</sub> 10 mM  
Glucose 20 mM

### III.d. Agents de sélection des bactéries (*E.coli* et *Agrobacterium*)

		Concentration du Stock	Concentration finale
Ampicilline	(Duchefa)	50 mg.ml <sup>-1</sup> dissout dans H <sub>2</sub> O	50 mg.l <sup>-1</sup>
Kanamycine	(Duchefa)	100 mg.ml <sup>-1</sup> dissout dans H <sub>2</sub> O	50 mg.l <sup>-1</sup>
Rifampicine	(Duchefa)	50 mg.ml <sup>-1</sup> dissout dans DMSO	50 mg.l <sup>-1</sup>
Gentamycine	(Duchefa)	50 mg.ml <sup>-1</sup> dissout dans H <sub>2</sub> O	25 mg.l <sup>-1</sup>
X-Gal	(Duchefa)	20 mg.ml <sup>-1</sup> dissout dans DMF	40 mg.l <sup>-1</sup>
IPTG	(Duchefa)	250 mg.ml <sup>-1</sup> dissout dans H <sub>2</sub> O	50 mg.l <sup>-1</sup>

## ANNEXE IV. HYBRIDATION *IN SITU*

### Tampon PBS 10 x

(Phosphate-Buffered Saline)	Concentration finale	Pour 1 litre
NaCl	1,3 M	260 ml de NaCl 5 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	70 mM	115,4 ml de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 mM	84,6 ml de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 M
pH 7,2		
Eau "RNase free"		qsp 1000 ml

### Proteinase K (pronase)

Tampon	Concentration finale	Pour 1 litre
Tris-HCl, pH 7,5	20 mM	10 ml de Tris-HCl 2 M, pH 7,5
CaCl <sub>2</sub>	2 mM	4 ml de CaCl <sub>2</sub> 0,5 M

Le stock de pronase à 10 mg.ml<sup>-1</sup> est dilué dans de l'eau "RNase free" et stocké à -20°C.

Utilisation de 1 µl de protéinase K concentrée pour 10 ml de tampon (1 µg.ml<sup>-1</sup>).

### Acide acétique anhydre/triéthanolamine-HCl

Peser 3 g de triéthanolamine (TEA) dans 200 ml d'eau "RNase free" (solution à 0,1 M).

Ajuster à pH 8,0 avec 700 µl d'HCl fumant.

Au dernier moment, ajouter 1 ml d'acide acétique anhydre pour 200 ml de TEA 0,1 M.

Agiter le milieu pendant la manipulation.

Solution 1 = TBS	Concentration finale	Pour 500 ml
Tris-HCl, pH 7,5	100 mM	25 ml Tris-HCl 2 M, pH 7,5
NaCl	150 mM	15 ml de NaCl 5 M
Eau ultrapure		qsp 500 ml

### Solution 2

Solution 1 (TBS)

Agent bloquant 0.5 %

Préchauffer légèrement le tampon 1 puis ajouter l'agent bloquant. Agiter très doucement pour éviter de dénaturer les protéines.



### **Solution 3**

Solution 1 (TBS)

BSA	1 %
Triton X-100	0,3 %

### **Solution 4**

	<b>Concentration finale</b>	<b>Pour 500 ml</b>
Tris, pH 9,5	100 mM	25 ml de Tris 2 M, pH 9,5
NaCl	100 mM	10 ml de NaCl 5 M
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	25 ml de MgCl <sub>2</sub> 1 M
Eau ultrapure		qsp 500 ml

### **Solution de coloration**

	<b>Concentration finale</b>	<b>Pour 1 ml</b>
NBT	0,338 mg.ml <sup>-1</sup>	4,5 µl NBT à 75 mg.ml <sup>-1</sup> dans DMF 70 %
BCIP	0,175 mg.ml <sup>-1</sup>	3,5 µl BCIP à 50 mg.ml <sup>-1</sup> dans DMF 100%
solution de détection (solution 4)		qsp 1 ml

### **Solution d'arrêt de coloration**

	<b>Concentration finale</b>	<b>Pour 500 ml</b>
Tris-HCl, pH 7,5	10 mM	2,5 ml de Tris-HCl 2 M, pH 7,5
EDTA	50 mM	50 ml de EDTA 0,5 M
Eau ultrapure		qsp 500 ml