

## CARACTÉRISATION DU RÔLE DE TROIS FACTEURS DE TRANSCRIPTION, MtABL, MtABI5 ET MtHSFA2.2 DANS LA QUALITÉ GERMINATIVE DES GRAINES DE *MEDICAGO TRUNCATULA*<sup>1</sup>

par Julia Zinsmeister<sup>2</sup>

Dominique Job<sup>3</sup>. – La thèse de Julia Zinsmeister, intitulée *Caractérisation du rôle de trois facteurs de transcription, MtABL, MtABI5 et MtHSFA2.2 dans la qualité germinative des graines de Medicago truncatula*, s'inscrit dans l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'embryogenèse chez les plantes, notamment dans les phases finales de la maturation des graines sur la plante mère pendant lesquelles sont acquises des propriétés physiologiques importantes tant au plan écologique (dispersion et survie des graines dans l'environnement, régulation des dormances et des germinations) que des applications agronomiques (qualité germinative conditionnant le rendement des cultures) et nutritionnelles (qualité et quantité des réserves) des graines.

Un autre aspect particulièrement important au plan agronomique est que cette thèse porte sur la légumineuse, *Medicago truncatula*, plus communément appelée luzerne tronquée, plante herbacée de la famille des Fabaceae qui présentent la capacité unique de former des nodosités racinaires capables de fixer l'azote atmosphérique. *Medicago truncatula* est considérée comme la plante modèle des légumineuses. En effet, cette plante diploïde ( $2n = 16$ ) présente une grande synténie (conservation de l'ordre des gènes entre deux espèces apparentées) avec certaines espèces cultivées comme le pois, le soja, la luzerne, l'arachide, les haricots, les lentilles, le pois chiche... La connaissance de son génome, sept fois plus petit que celui du pois, permet d'accéder très rapidement aux séquences génomiques d'intérêt et de produire des mutants qui servent notamment pour l'identification de leur rôle fonctionnel. Ces travaux de génomique et de génétique mettant à profit la synténie existant entre les espèces de légumineuses permettent d'identifier des gènes importants chez les espèces cultivées.

Les légumineuses sont en général cultivées pour leurs graines et, à ce titre, jouent un rôle majeur dans l'alimentation humaine et animale grâce à leur forte teneur en protéines (comprise entre 20% et 35% ; 100 g de légumineuses apportent autant de protéines que 100 g de viande). Toutefois, ces protéines ne sont pas toujours idéalement équilibrées pour l'alimentation animale et humaine puisqu'elles manquent souvent d'acides aminés soufrés comme la méthionine, un acide aminé essentiel. De fait, des recherches intensives sont actuellement consacrées à augmenter les taux d'acides aminés soufrés dans les graines de légumineuses. Les autres nutriments importants présents dans ces graines sont l'amidon et éventuellement les lipides (e.g. soja ou arachide). Par ailleurs, les légumineuses, du fait de leur capacité à réaliser la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique, sont des plantes pionnières et jouent un rôle important dans la végétalisation des sols.

Enfin, il faut signaler que la soixante-huitième Assemblée générale des Nations Unies a proclamé 2016 Année internationale des légumineuses (AIL)(A/RES/68/231) et a désigné

---

<sup>1</sup> Thèse soutenue le 22 novembre 2016 et préparée au sein de l'école doctorale Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer (VENAM) (spécialité : Biologie et Agronomie) et de l'unité mixte de recherche n°1345 « Institut de Recherche en Horticulture et Semences » (IRHS).

<sup>2</sup> Depuis janvier 2017, postdoctorante en physiologie de la graine au sein de l'entreprise Enza Zaden, Enkhuizen, Pays-Bas. courriel : [julia.zinsmeister@laposte.net](mailto:julia.zinsmeister@laposte.net)

<sup>3</sup> Membre de l'Académie d'agriculture de France, directeur de recherche émérite au CNRS.

l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) pour faciliter la mise en œuvre de cet événement. La thèse de Julia Zinsmeister s'inscrit donc parfaitement dans le cadre de la célébration de cette Année à laquelle l'Académie d'agriculture de France a consacré, en 2016, de nombreuses séances et colloques.

La phase de maturation des graines est caractérisée par l'acquisition successive de composantes qui constituent la qualité physiologique d'un lot de graines, à savoir la tolérance à la dessiccation (capacité à survivre au retrait total quasi de l'eau cellulaire), la longévité (capacité de survivre à l'état sec pendant le stockage), la dormance ainsi que la vigueur germinative (capacité à germer de façon rapide et homogène quelles que soient les conditions de l'environnement). La production de lots de graines de haute qualité germinative représente un enjeu majeur pour les semenciers car elle constitue un levier clé pour augmenter les rendements agricoles. Cependant, les mécanismes régulant l'acquisition de la qualité germinative et, en particulier, la longévité restent peu connus. L'étude préalable conduite au laboratoire d'un réseau de co-expression génique de facteurs de transcription (protéines particulières se liant à l'ADN et régulant l'expression des gènes, c'est-à-dire l'accumulation des transcrits correspondant à ces gènes lors de l'étape de transcription) avait identifié trois gènes candidats associés à la longévité chez *Medicago truncatula* : *MtABL* (*ABA INSENSITIVE4-LIKE*), *MtABI5* (*ABA INSENSITIVE5*) et *MtHSFA2.2* (*HEAT SHOCK FACTOR A2.2*).

Sur ces bases, l'objectif de cette thèse, réalisée sous la codirection de Julia Buitink (DR INRA, IRHS Angers) et Olivier Leprince (professeur à Agrocampus Ouest, IRHS Angers) était de valider ces gènes et d'en comprendre la fonction chez *Medicago truncatula* et le pois par la caractérisation de mutants, soit d'insertion utilisant le transposon Tnt1 ou issus de la mutagenèse chimique à base de méthanesulphonate d'éthyle (mutagenèse EMS), perturbant/inactivant l'expression de ces gènes. Les résultats présentés dans cette thèse montrent clairement que les facteurs ABL et ABI5 jouent un rôle clé dans la maturation en régulant positivement la longévité des graines alors que celle-ci n'est pas affectée chez les mutants *hsfa2.2* inactivant le facteur HEAT SHOCK A2.2. Par ailleurs, Julia Zinsmeister a conduit des études transcriptomiques et biochimiques permettant de démontrer que ABL et ABI5 régulent la dégradation de la chlorophylle (impliquée dans l'activité de photosynthèse des graines au cours de la maturation) et l'accumulation des oligosaccharides de la famille du raffinose (sucres osmoprotecteurs impliqués dans l'acquisition de la tolérance à la dessiccation des graines orthodoxes). De plus, cette thèse démontre que ABI5 joue un rôle crucial dans l'accumulation de protéines protectrices de type LEA, protéines impliquées dans l'acquisition de la tolérance à la dessiccation des graines orthodoxes.

Le mémoire de thèse, qui comporte 129 pages de texte, 71 figures et 19 tableaux, est de lecture agréable et est fort bien illustré.

L'Introduction (chapitre 1) correspond à une analyse bibliographique bien documentée. Elle permet d'introduire les concepts généraux sur :

- les plantes légumineuses dont *Medicago truncatula*, plante modèle étudiée au cours du travail de thèse, et le pois, cible agronomique des travaux de thèse ;
- le développement et la germination des graines des dicotylédones, dont la régulation des dormances, l'acquisition de la tolérance à la dessiccation et la longévité ;
- la régulation transcriptionnelle de la maturation des graines ;
- les mécanismes de survie à l'état sec des graines (e.g., rôle des oligosaccharides de la famille du raffinose (RFOs), des protéines LEA, des protéines chaperonnes de type HSP (Heat Shock Proteins)) ;
- les mécanismes de détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS), et de protection contre les dommages cellulaires et de leur réparation ;
- le rôle de la photosynthèse des graines lors de la maturation ;

ainsi que les objectifs généraux de la thèse.

Le chapitre Résultats comprend trois parties principales. La première (chapitre 2) porte sur la caractérisation du rôle majeur joué par ABI5 dans la régulation de la maturation et de la longévité des graines chez les légumineuses. Au cours de ce travail, Julia Zinsmeister a caractérisé les graines d'un mutant d'insertion du transposon *Tnt1*, nommé *Tnt1 Mt-abi5*, dans le gène codant MtABI5 et montré que les mécanismes d'acquisition de la longévité et de la dormance des graines étaient fortement dérégulés chez ce mutant. En conduisant une étude transcriptomique des graines de ce mutant au cours du développement, elle a identifié un réseau de co-expression plaçant MtABI5 comme un régulateur de différents modules de gènes liés au métabolisme des RFOs, des protéines LEA et des gènes associés à la photosynthèse (*PHANGs*). Ses résultats permettent de montrer que la plus faible accumulation en RFOs est liée à la régulation d'une protéine nommée SEED IMBIBITION PROTEIN1 (MtSIP1). Par ailleurs, ses résultats identifient l'absence d'inhibition des gènes *PHANGs* en fin de développement de la graine avec une accumulation différentielle en chlorophylle et caroténoïdes, faisant des graines matures des mutants *Tnt1 Mt-abi5* des "graines vertes". Ces phénotypes sont associés à une réponse de stress, avec une accumulation plus importante d'alpha tocophérol (antioxydant) et une surreprésentation des gènes liés au programme de mort cellulaire. L'auteure a également conduit une caractérisation des mutants *Tnt1 abi5* chez une seconde légumineuse, le pois, et chez *Arabidopsis thaliana* (une crucifère) dont les résultats confortent le rôle d'ABI5 dans la régulation de la longévité, de la perte de la chlorophylle et de l'accumulation des RFOs dans la maturation de la graine des légumineuses.

La seconde partie des Résultats (chapitre 3) porte sur la caractérisation du facteur de transcription MtABI4-like en tant que régulateur de la perte de chlorophylle et de longévité des graines de *Medicago truncatula* au cours de la maturation. L'objectif était de tester si MtABL (orthologue d'ABI4 chez *Arabidopsis thaliana*) régule la longévité des graines en lien avec le démantèlement des chloroplastes pendant la maturation. Pour cela, Julia Zinsmeister a caractérisé les graines de mutants d'insertion *Tnt1 Mt-abl* chez *Medicago truncatula*. En lien avec la perte de la longévité, elle a observé que les graines des mutants *Tnt1 Mt-abl* sont tolérantes à la dessiccation (plaçant l'étape d'acquisition de la longévité après celle de tolérance à la dessiccation lors du développement) et vertes à la maturité. Afin d'identifier la part des facteurs de transcription ABL et ABI5 dans la régulation des événements de la maturation de la graine en lien avec l'acquisition de la longévité, elle a ensuite caractérisé les graines des double mutants *Mt-abi5/Mt-abl*. Cette étude a permis de démontrer que l'inhibition de l'expression des gènes *PHANGs* était spécifiquement régulée par MtABL et MtABI5, alors que la perte de la chlorophylle apparaît spécifique de MtABL et que MtABI5 régule plus spécifiquement l'activation des gènes codant certaines protéines LEA.

Dans la troisième partie des Résultats (chapitre 4), Julia Zinsmeister effectue une caractérisation fonctionnelle du facteur MtHSFA2.2 dans la qualité germinative de la graine de *Medicago truncatula*. Les protéines HSP sont des protéines de stress. Très abondantes dans les graines, elles sont régulées par des facteurs de transcription de type HSF (Heat Shock Factor). Chez le tournesol, *HaHSFA9* est exprimé exclusivement au cours de la maturation de la graine, en l'absence de stress. Sa surexpression chez les graines de tabac conduit à une meilleure résistance à une épreuve de détérioration contrôlée. Ces données ont amené l'auteure à chercher à identifier l'orthologue de *HSFA9* chez *Medicago truncatula* et à évaluer son rôle dans la longévité des graines de cette espèce. Pour cela, elle a criblé et caractérisé les graines de mutants d'insertion du transposon *Tnt1* inactivant les gènes codant des protéines HSP s'exprimant dans les graines chez *Medicago truncatula*. Pour identifier des cibles potentielles de ce facteur de transcription, elle a également réalisé une analyse transcriptomique à partir de racines de plants de *Medicago truncatula* sur-exprimant de manière ectopique le facteur MtHSFA9. Les résultats permettent de démontrer que *MtHSFA2.2* est le plus proche orthologue de *HaHSFA9*. Conjointement, les données qu'elle a obtenues permettent d'identifier MtHSFA2.2 comme un régulateur de la dormance des graines, en

lien putatif avec la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme des deux principales phytohormones régulant la dormance des graines, c'est-à-dire l'acide abscissique (ABA) et les gibbérellines (GAs).

Les Matériels et Méthodes (chapitre 6) sont très complets et permettent au lecteur de suivre aisément les différentes expériences de génétique, biologie moléculaire et physiologie conduites lors de ce travail de thèse. La liste bibliographique est très copieuse, récente et exhaustive (environ 330 références).

En conclusion, le travail effectué par Julia Zinsmeister représente une contribution extrêmement originale et de très grande qualité. Il illustre que l'approfondissement des connaissances sur les mécanismes de régulation de l'expression de gènes (ici médiés par des facteurs de transcription) s'exprimant spécifiquement chez les graines peut conduire à des avancées scientifiques majeures au plan fondamental, qui seront source d'applications nouvelles en sélection végétale. La démonstration que les facteurs de transcription étudiés jouent un rôle prépondérant dans la dormance et la longévité des graines de *Medicago* mais aussi chez le pois ouvre de nouvelles perspectives originales quant à l'amélioration des graines d'un très grand nombre de plantes légumineuses d'intérêt économique et nutritionnel majeur (e.g., soja, ...). La thèse est valorisée de manière remarquable, avec une publication (dont est tirée la photo de couverture du volume publiant cet article) dans la prestigieuse revue *The Plant Cell*, une publication dans *Frontiers in Plant Science* et une publication en cours de rédaction (chapitre 4). Julia Zinsmeister a été lauréate, en 2015, d'une bourse de recherche Jean et Marie-Louise Dufrenoy délivrée par l'Académie d'agriculture lui permettant de présenter ses résultats dans un colloque international.

### Publications associées à la thèse

- (1) ZINSMEISTER J., LALANNE D., TERRASSON E., CHATELAIN E., VANDECASTEELE C., VU B.L., DUBOIS-LAURENT C., GEOFFRIAU E., SIGNOR C.L., DALMAIS M., GUTBROD K., DÖRMANN P., GALLARDO K., BENDAHMANE A., BUITINK J., LEPRINCE O., 2016. - ABI5 is a regulator of seed maturation and longevity in legumes. *PlantCell* **28**(11), 2735-2754.
- (2) TERRASSON E., BUITINK J., RIGHETTI K., VU B.L., PELLETIER S., ZINSMEISTER J., LALANNE D., LEPRINCE O., 2013. - An emerging picture of the seed desiccation confirmed regulators and new comers identified using transcriptome comparison. *Frontiers in Plant Science* **4**, 497.